OLIVIA BELOTO DA SILVA

**A PKA modula a localização do SGLT1 e indiretamente a
recuperação do pHi, no tratamento com alta
concentração de glicose**

**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
2012**

OLIVIA BELOTO DA SILVA

**A PKA modula a localização do SGLT1 e indiretamente a
recuperação do pHi, no tratamento com alta
concentração de glicose**

**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 e
Biofísica**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria
Oliveira de Souza**

Versão Original

**São Paulo
2012**

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Olivia Beloto da.

A PKA modula a localização do SGLT1 e indiretamente a recuperação do pHi, no tratamento com alta concentração de glicose / Olivia Beloto da Silva. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia renal.

Versão do título para o inglês: PKA modulates the SGLT1 distribution and the pHi recovery rate indirectly, in the higher glucose concentration treatment.

1. Trocador Na^+/H^+ 2. Co-transportador $\text{Na}^+/\text{glicose}$ 3. Receptor GPR1 4. Proteína cinase A I. Souza, Profa. Dra. Maria Oliveira de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB039/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Olivia Beloto da Silva.

Título da Tese: A PKA modula a localização do SGLT1 e indiretamente a recuperação do pHi, no tratamento com alta concentração de glicose.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza.

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:

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 271, referente ao projeto intitulado: “*No tratamento crônico com glicose diferentes sítios de fosforilação para PKA Modulam a localização do SGLT1 e indiferente a recuperação do pHⁱ*” sob a responsabilidade de **Olívia Beloto da Silva**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 29 de outubro de 2008.

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

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Aos meus pais, irmão,
marido e filha: obrigada
pelo apoio e compreensão.*

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu forças para que continuasse lutando e estudando.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A Dra. Maria Oliveira de Souza pela dedicação e incentivo.

Aos colegas de Laboratório e as minhas amigas Cláudia e Raif pelo companheirismo, fidelidade, amizade e ombro amigo, durante muitas adversidades ao longo do percurso.

A minha família: pai, mãe, irmão, marido e filha que estiveram todo o momento me apoiando e acreditando no meu potencial.

Enfim, a todos que contribuíram (diretamente ou indiretamente) para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

“Não importa se a estação do ano muda...
Se o século vira, se o milênio é outro.
Se a idade aumenta...
Conserva a vontade de viver,
Não se chega a parte alguma sem ela”

Fernando Pessoa

RESUMO

SILVA, O. B. **A PKA modula a localização do SGLT1 e indiretamente a recuperação do pH_i, no tratamento com alta concentração de glicose.** 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo desse estudo foi avaliar em células HEK-293, o efeito da glicose sobre a atividade da PKA e a interação dessa cinase com o SGLT1 e os trocadores Na⁺/H⁺ (NHE1 e NHE3).

As células HEK-293 (Human embryonic Kidney cells – clone 293) foram transfectadas com os recombinantes hSGLT1 wild type (WT) e mutante (troca da Ser 418 por His - S418H). As células foram tratadas 20 dias com DMEM contendo glicose 5 mM ou 25 mM. Por Western blot foi avaliada a expressão total de hSGLT1, hSGLT1+GFP, NHE1, proteínas de regulação, como ezrin e NHERF1, além da expressão de NHE3 e PKA fosforilados. Por biotinylation foi avaliada a expressão de hSGLT1+GFP e SGLT2 na membrana, com ou sem o uso de H-89 ou Manose, para avaliar o efeito da PKA e do GPR1 sobre esse parâmetro. Com Sucrose e Filipina foi avaliado o efeito da clatrina e da caveolina sobre a expressão de hSGLT1+GFP na membrana. Por microscopia de fluorescência foi avaliada a velocidade de recuperação do pH intracelular (dpH_i/dt), onde a solução contendo NH₄Cl foi substituída por uma solução: 1) contendo glicose 5 mM ou 2) contendo glicose 25 mM ou 3) ambas as soluções com 5 ou 25 mM de glicose na ausência ou na vigência de H-89 e/ou 4) ambas as soluções na ausência ou na vigência de S3226 (inibidor do NHE3).

Os resultados indicam que, o tratamento com glicose 5 mM não alterou a expressão total, mas diminuiu a expressão de S418H na membrana. O tratamento com glicose 25 mM não modificou a expressão de WT ou S418H na membrana, mas diminuiu a expressão de SGLT2. Também foi demonstrado que GPR1 ativa PKA. PKA, clatrina e caveolina não modificam a expressão de WT ou S418H na membrana, mas PKA tem efeito sobre a expressão de SGLT2 na membrana. A inibição do GPR1 diminui a expressão de WT e S418H na membrana, indicando que Epac1 (demonstrado presença de RNAm nessas células) pode estar atuando no SGLT1.

A atividade dos NHEs foi diminuída com a transfecção dos recombinantes. Esses resultados estão intimamente ligados com modificações na expressão de NHE1 e NHE3. Além disso, a atividade do NHE3 parece sofrer ação da PKA e NHERF1 nessas células.

Em conjunto, esses dados indicam o aumento do AMPc pela glicose altera a expressão e atividade de diferentes proteínas, como SGLTs e NHEs. Nossos experimentos utilizando a transfecção do SGLT1 (WT ou S418H) demonstraram que as células regulam a quantidade de transportadores de glicose na membrana, frente ao aumento extracelular desse substrato, mas é necessário que as proteínas estejam íntegras. As vias ativadas pela glicose afetam a capacidade de recuperação do pH intracelular (pHi), através do NHE3.

Palavras-chave: Trocador Na^+/H^+ . Co-transportador Na^+ /glicose. Receptor GPR1. Proteína cinase A.

ABSTRACT

SILVA, O. B. **PKA modulates the SGLT1 distribution and the pHi recovery rate indirectly, in the high glucose concentration treatment.** 2012. 113 p. Ph.D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The purpose of this study was to evaluate the glucose effect on PKA activity and how PKA can interact with both SGLT1 (Sodium Glucose Cotransporter 1) and Na/H exchangers, isoforms 1 and 3 (NHE1 and NHE3).

We worked with HEK-293 cells (Human embryonic Kidney cells – clone 293) with transfected with hSGLT1 wild type (wt) or S418H-mutant (hSGLT1 with Ser 418 mutated to His). HEK-293 were treated for 20 days with DMEM medium containing 5 or 25 mM of glucose. Western blot analysis was performed to check the total expression of hSGLT1, hSGLT1/GFP (hSGLT1 attached to a Green Fluorescent Protein), NHE1 and PKA were tested by Western blot analysis. Surface biotinylation was also performed to show the membrane expression of hSGLT1/GFP with or without H-89 (PKA inhibitor) or Manose (a GPR1 inhibitor) to verify if PKA or GPR1 (G Protein Coupled Receptor) can affect the membrane expression of hSGLT1. Fluorescence imaging experiments were performed to measure the recovery rate of intracellular pH (dpH_i/dt) of the HEK-cells after an NH_4Cl -acid loading, when the cells were exposed to a solution containing 5 mM or 25 mM of Glucose, with or without H89 and/or S2326 (NHE3 inhibitor).

The results showed that 1) the treatment with glucose 5 mM did not affect the total expression but decreased the membrane expression of hSGLT1+GFP, 2) the treatment with glucose 25 mM did not change the expression of WT or S418H-mutant while decreased that of SGLT2 (Sodium Glucose Cotransporter 2). In addition, the western blot analysis showed that GPR1 increases the expression of PKA, however, PKA itself did not change the surface expression of WT or S418H-mutant while, differently, it increases that of SGLT2. We also showed that, interestingly, the inhibition of GPR1 decreases the membrane expression of SGLT1-wt and S418H-mutant, what may indicate that Epac1 (exchange protein directly activated by cAMP) (which mRNA was found in HEK-293 cells) can be acting on SGLT1. On the other hand, NHEs activity was showed to decrease in HEK-293 cells transfected with SGLT1 wt and S418H-mutant. These results are probably involved with changes in the NHE1 and NHE3 expression.

Together, these data indicate that despite of the cAMP-activated pathway, the increase of cAMP by glucose can change the expression and activity of different proteins, such as SGLT1 and NHEs. Also, our data showed that HEK-293 cells transfected with SGLT1wt or

S418H-mutant are able to regulate the amount of SGLTs on the membrane when there is an increase in glucose level in the extracellular medium. The glucose-activated pathways can affect the dpH_i/dt probably by decreasing the activity of NHE3.

Palavras-chave: Na^+/H^+ exchanger. Sodium glucose cotransporter. G protein coupled Receptor. Protein kinase A.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Considerações gerais	15
1.2 Transporte de glicose acoplado ao Na ⁺	15
1.3 Transporte de H ⁺ acoplado ao Na ⁺	21
1.4 Efeitores de adenosina monofosfato cíclico (AMPC)	24
1.5 Efeito da glicose sobre a ativação de vias de sinalização intracelular e atividade dos SGLT's e NHE's	28
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)	33
3.1.1 <u>cDNA do WT</u>	36
3.1.2 <u>Clonagem do cDNA do WT no vetor pGEM-TEasy</u>	37
3.1.3 <u>Clonagem do DNA do WT no vetor pEGFP-N1</u>	37
3.1.4 <u>Sequenciamento dos ácidos nucleicos do hSGLT1-WT</u>	38
3.1.5 <u>Construção do mutante S418H</u>	40
3.1.6 <u>Sequenciamento dos ácidos nucleicos do S418H</u>	43
3.2 Modelo experimental – células HEK-293	43
3.3 Análise da expressão protéica por Western blot	44
3.4 Biotinilação	46
3.5 Avaliação do pH _i através de microscopia de fluorescência	47
3.6 Análise estatística dos experimentos	54
3.7 Drogas e reagentes	55
4 RESULTADOS	57
4.1 Primeira fase do estudo – expressão de hSGLT1-WT e mutante hSGLT1-S418H	57
4.1.1 <u>Imunofluorescência</u>	57
4.1.2 <u>Efeito da glicose 5 mM sobre a expressão de hSGLT1+GFP</u>	58
4.1.3 <u>Efeito da transfecção sobre a expressão total de hSGLT1 na vigência de glicose 5 mM e 25 mM</u>	59
4.1.4 <u>Expressão total e de membrana do hSGLT1+GFP na vigência de glicose 25 mM</u>	62
4.1.5 <u>Expressão do SGLT2 na membrana</u>	64
4.1.6 <u>Efeito da PKA sobre a distribuição celular do WT e S418H e SGLT2</u>	65
4.1.7 <u>Presença do receptor de glicose (GPR1)</u>	69

4.1.8 <u>Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão da PKA fosforilada</u>	70
4.1.9 <u>Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão do hSGLT1+GFP</u>	71
4.1.10 <u>Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão de hSGLT1+GFP na membrana</u>	72
4.1.11 <u>Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão do SGLT2 na membrana</u>	73
4.1.12 <u>Participação da clatrina e da caveolina na distribuição do hSGLT1+GFP na membrana</u>	74
4.2 Segunda fase do estudo – análise da atividade dos NHE’S.....	76
4.2.1 <u>Avaliação da recuperação do pHi na vigência de glicose 5 mM</u>	76
4.2.2 <u>Efeito da glicose 25 mM sobre a recuperação do pHi</u>	77
4.2.3 <u>Análise da expressão de NHE1 total e NHE3 fosforilado</u>	81
4.2.4 <u>Análise da expressão de fatores modulatórios da atividade dos NHE’s</u>	84
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	89
5.1 Primeira fase do estudo - hSGLT1-WT, hSGLT1-S418H e SGLT2.....	89
5.2 Segunda fase do estudo – NHE1 e NHE3.....	95
REFERÊNCIAS	100
ANEXO A - Sequência original do hSGLT1.....	111
ANEXO B - Sequências do GPR1 de humano.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os rins são órgãos homeostáticos que participam da manutenção da concentração de água e dos diversos solutos do organismo, tais como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e glicose.

No epitélio do túbulo proximal (primeira porção tubular do néfron) ocorre a reabsorção de aproximadamente 65% de todo o fluido filtrado nos glomérulos. Ao longo desse epitélio existe uma variação morfofuncional importante que permite classificá-lo em três segmentos (S) S1, S2 e S3. No entanto, a reabsorção de Na^+ , nessa porção inicial do néfron, se dá principalmente em troca por H^+ e uma parcela menor é absorvida por co-transporte com glicose, aminoácidos, fosfato inorgânico, sulfatos ou ácidos orgânicos (AIRES, 2008; BORON; BOULPAEP, 2009; NELSON; COX, 2008). O elemento chave para a reabsorção transcelular de sódio e solutos associados é a Na^+/K^+ ATPase (ou bomba Na^+/K^+) situada na membrana basolateral das células epiteliais do túbulo proximal e dos demais segmentos do néfron. Uma das funções da Na^+/K^+ ATPase é manter uma baixa concentração de Na^+ intracelular, criando um gradiente químico para o Na^+ através da membrana apical. Como o interior celular, na condição basal, é eletricamente negativo, cria-se um gradiente elétrico para o movimento do Na^+ do meio extra para o intracelular. Dessa forma, o gradiente eletroquímico para o Na^+ é o grande responsável pelo movimento de diversas substâncias através da membrana luminal.

1.2 Transporte de glicose acoplado ao Na^+

A glicose é o principal substrato energético do organismo porque está vinculada à síntese do trifosfato de adenosina (ATP). No plasma, suas concentrações normais encontram-se na faixa de 70 - 100 mg/d L (4 - 5 mM), apesar das grandes variações na captação e liberação desse substrato, como as que ocorrem após as refeições ou durante as atividades físicas (BORON; BOULPAEP, 2009).

No organismo, o ajuste glicêmico depende essencialmente da ação de vários hormônios, incluindo a insulina (hormônio hipoglicemiante) e o glucagon (hormônio hiperglicemiante), além das catecolaminas, o cortisol e o hormônio do crescimento (que intensificam as ações metabólicas do glucagon) (BORON; BOULPAEP, 2009; NELSON; COX, 2008).

Além do pâncreas e o fígado, os rins também participam do controle dos níveis plasmáticos de glicose. Para tal, chegam aos rins (por dia) cerca de 180 g de glicose (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2007). Em um indivíduo saudável, a glicose é livremente filtrada pelos glomérulos e cerca de 97 % dessa glicose filtrada são reabsorvidos no túbulo proximal. Por outro lado, se a concentração de glicose no plasma passar para 15 a 20 mM, ocorre a saturação dos transportadores e a sua excreção é significativamente aumentada (BAINES; HO, 2002; WOOD; TRAYHURN, 2003; WRIGHT, 2001; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

Nas células do túbulo proximal, existem dois tipos de transportadores envolvidos no processo de reabsorção de glicose: os co-transportadores de Na^+ e Glicose (“Sodium Glucose Transporters” ou SGLTs) e os transportadores de Glicose (“Glucose Transporters” ou GLUTs) (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2007; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011). Conforme esquema apresentado na figura 1, na membrana apical dos segmentos S1 e S2 do túbulo proximal, a glicose é transportada para dentro da célula através da isoforma 2 do SGLT (SGLT2) e deixa a célula através da isoforma 2 do GLUT (GLUT2) localizada na membrana basolateral. Na membrana apical do segmento S3, a glicose é transportada para dentro da célula através da isoforma 1 do SGLT (SGLT1) e deixa a célula através da isoforma 1 do GLUT (GLUT1) localizada na membrana apical. É importante ressaltar que, o transporte de glicose acoplado ao movimento do íon Na^+ garante uma elevação da concentração de glicose intracelular acima de seu nível intersticial e, com isso, a glicose do interior da célula é capaz de ser transportada pelos GLUTs para o interstício (TUNE; BURG, 1971).

Estudos de microperfusão em néfrons de ratos demonstram que na porção inicial do túbulo proximal, a concentração de glicose é semelhante a do plasma e cai para valores próximos de zero na porção final do segmento tubular (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011). Essas diferenças na concentração de glicose ao longo do túbulo proximal estão associadas à estequiometria de cada co-transportador. O SGLT2 possui estequiometria de 1 íon Na^+ e 1 Glicose e é considerado uma proteína de alta capacidade de transporte. O SGLT1 possui estequiometria de 2 íons Na^+ e 1 Glicose e é considerado uma proteína de menor capacidade de transporte) (BAINES; HO, 2002; WOOD; TRAYHURN, 2003; WRIGHT, 2001).

Figura 1 - Esquema do transporte de glicose no néfron.

Mecanismos de transporte de glicose no túbulo proximal inicial (Segmento 1 – S1) e no túbulo proximal final (Segmento 3 – S3).
FONTE: (COSTANZO, 2011).

Os SGLTs pertencem à família dos “Sodium Solute Symporter” (SSS ou SSF), sendo classificados geneticamente em humanos como SLC5. A família SCL5 possui cerca de seis membros (WRIGHT et al., 2004), compostos de 580 a 718 aminoácidos e com peso molecular entre 60 e 80 kDa (DIEZ-SAMPEDRO et al., 2003). Além dos SGLTs, a família SSF possui outros membros: Na^+ /mioinositol (SMIT), Na^+ /colina (CHT), Na^+ /iodido (NIS), Na^+ /ácido monocarboxílico (SMCT) e Na^+ /multivitamina (SMVT) (WRIGHT et al., 2004; Figura 2).

Figura 2 - Árvore filogenética dos membros da família SLC5 humano.

FONTE: (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

Estudos demonstram que a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para SGLTs (1-6) varia de acordo com o tecido. A expressão de RNAm para SGLT1 é alta no intestino delgado, mas reduzida em outros tecidos, como traquéia, rim, coração, cólon e testículos. O SGLT2 é expresso nos rins, coração, glândulas salivares, tireóide e cerebelo; o SGLT3 é expresso nos testículos, útero, baço, encéfalo, rins e pulmões; o SGLT4 é expresso no fígado, encéfalo e pulmão; o SGLT5 é expresso no córtex adrenal e o SGLT6 no encéfalo, rins e intestino delgado (NISHIMURA; NAITO, 2005; TAZAWA et al., 2005; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

A partir da clonagem do SGLT1 humano (hSGLT1) em bactérias, diversos autores se empenharam para expressar e purificar essa proteína, a fim de realizar estudos bioquímicos e estruturais (QUICK; WRIGHT, 2002; SMITH; HIRAYAMA; WRIGHT, 1992). No entanto, os resultados foram limitados pela complexidade da proteína. Considerando que estudos de expressão, purificação e reconstituição de transportadores bacterianos são obtidos com maior sucesso, Wright e colaboradores passaram a investigar a estrutura e função da proteína vSGLT (“Sodium Galactose Transporter de *Vibrio parahaemolyticus*”), a qual é homologa ao SGLT humano (32% de identidade e 75% de similaridade com o hSGLT1). Em 2008, Faham e colaboradores (FAHAM et al., 2008) resolveram a estrutura cristalográfica do vSGLT e juntamente com outros estudos moleculares de caracterização dessa proteína, Turk e

colaboradores (TURK et al., 2000) demonstraram que, o modelo de estrutura secundária do vSGLT se assemelha a do hSGLT1 (Figura 3). Além disso, as funções dessas proteínas são semelhantes, com exceção da seletividade para o açúcar (hSGLT1 transporta glicose e vSGLT transporta galactose) e da estequiometria (hSGLT1 = $2\text{Na}^+/1\text{Glicose}$ e vSGLT1 = $1\text{Na}^+/1\text{Galactose}$).

Baseando-se nos estudos de cristalografia, Wright e colaboradores propuseram um novo modelo de estrutura secundária para o hSGLT1, sobrepondo as hélices da estrutura cristalográfica do vSGLT sobre o modelo de estrutura secundária do hSGLT1, proposta pelo mesmo grupo em 1997 (WRIGHT et al., 1997; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011). Estes estudos confirmaram a hipótese de que o hSGLT1 é uma proteína integral de membrana, com quatorze segmentos transmembrânicos (TM – 14 TM) e composta por uma única subunidade (HIRAYAMA; WRIGHT; ABRAMSON, 2008; ZHAO; KEATING, 2007).

Figura 3 - Estrutura secundária do hSGLT1 sobreposta à estrutura cristalográfica do vSGLT (proteína homóloga ao SGLT, mas de *Vibrio parahaemolyticis*).

Os círculos amarelos representam os aminoácidos dos domínios transmembrânicos (baseados na estrutura do vSGLT).

FONTE: (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

Além da questão estrutural, o ciclo de transporte do SGLT1 é capaz de assumir seis diferentes estados conformacionais (C), conforme esquematizado na figura 4. No estado 1 (C1) o poro da proteína (por onde passam o Na^+ e a glicose) encontra-se fechado, mas a face de ligação do íon (face ligante) encontra-se voltada para o meio extracelular. No C2 o Na^+ interage com o seu sítio de ligação, voltado para o meio extracelular, e abre o “gate” extracelular para a glicose interagir com o seu sítio específico. Assim, o Na^+ e a glicose ficam retidos no poro da proteína (C3). Esse estado (C3) é seguido por uma mudança conformacional na proteína de um estado oclusivo com a face ligante voltada para o extracelular, para um estado oclusivo com a face ligante voltada para o meio intracelular (C4). Quando o “gate” intracelular se abre (C5), tanto o Na^+ , quanto a glicose são liberados para o meio intracelular. O ciclo é concluído quando existe uma mudança conformacional tornando a face ligante intracelular livre de soluto (C6) em uma face ligante extracelular livre de soluto, que pode novamente estar no estado C1 e permitir a ligação do Na^+ extracelular (FAHAM et al., 2008; RESSL et al., 2009; SHIMAMURA et al., 2010; WANATABE et al., 2010).

Figura 4 - Esquema dos seis estados conformacionais do hSGLT1.

FONTE: (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

Ainda outros autores têm proposto a participação do SGLT1 no transporte de água (cerca de 260 moléculas de água por molécula de glicose poderia estar sendo transportada pelo SGLT1), causando mudanças significativas no volume celular (DUQUETTE; BISSONNETTE; LAPOINTE, 2001; LOIKE et al., 1996; WRIGHT et al., 2004).

1.3 Transporte de H^+ acoplado ao Na^+

Duas tarefas importante dos rins relacionadas com o balanço ácido-base do organismo é: 1) reabsorver HCO_3^- e 2) secretar ácidos fixos (produzido pelo catabolismo das proteínas, fosfolípidos, carboidratos e ácidos nucleicos) para o fluido tubular. O principal tampão do fluido extracelular produzido diariamente para neutralizar ácidos não voláteis ou fixos (H^+) é o HCO_3^- . Portanto, o HCO_3^- filtrado nos glomérulos não pode ser eliminado na urina devendo, assim, ser totalmente reabsorvido ao longo do néfron (BOBULESCU; MOE, 2006).

Contudo, a reabsorção de HCO_3^- não envolve o simples movimento transcelular de HCO_3^- nos túbulos renais. O mecanismo pelo qual HCO_3^- é reabsorvido, envolve a secreção de H^+ para a luz tubular. Assim, os rins realizam a tarefa de reabsorver HCO_3^- ao secretar H^+ para a luz do túbulo (BORON; BOULPAEP, 2009; COSTANZO, 2011).

No túbulo proximal, o H^+ é secretado do sangue para a luz tubular renal (extrusão de ácido) via dois mecanismos: O trocador Na^+/H^+ (o qual é movido pelo gradiente eletroquímico do Na^+ , mantido pela Na^+/K^+ -ATPase basolateral) e pela H^+ -ATPase apical (processo ativo primário). Sob condições fisiológicas, cerca de 80-90% da carga de HCO_3^- filtrada é reabsorvida ao longo dos túbulos proximais e depende essencialmente da extrusão de H^+ através da membrana luminal (MALNIC et al., 1987; STEINMETZ, 1986). Essa alta capacidade de secreção de H^+ pelo túbulo proximal (e, conseqüentemente, da reabsorção de HCO_3^-) é devida à atividade e número de transportadores contidos neste epitélio tubular, além da presença de enzimas que catalizam as reações de hidratação e desidratação do CO_2 , como as anidrases carbônicas (ACs).

A acidificação luminal desloca o equilíbrio das reações de hidratação do CO_2 e de dissociação do ácido carbônico em direção à formação de CO_2 e HCO_3^- na luz do túbulo, de acordo com a reação (1):

O HCO_3^- filtrado pelos glomérulos reage rapidamente com íons H^+ secretados pelas células do túbulo proximal para o lúmen tubular, formando H_2CO_3 . O H_2CO_3 é desidratado em CO_2 e H_2O . Essa reação por ser lenta necessita ser catalizada pela enzima AC do tipo IV, presente na borda em escova da membrana apical do túbulo proximal. Assim, tanto o CO_2 (por difusão) quanto a H_2O (através de canais para H_2O -Aquaporinas 1) entram na célula pela membrana apical. Dentro da célula o CO_2 se combina com a H_2O para formar H_2CO_3 . Este por sua vez, se dissocia em H^+ que deixa a célula via NHEs ou H^+ -ATPase localizados na membrana apical e HCO_3^- que deixa a célula através do co-transporte 3Na^+ - 1HCO_3^- ou NBCe1 localizado na membrana basolateral. (BORON; BOULPAEP, 2009).

Os trocadores Na^+/H^+ ou NHEs constitui uma família de proteínas que são encontradas, virtualmente, em todas as células de mamíferos (KURASHIMA et al., 1997). A energia movente para a atividade dos NHEs, assim como para os SGLTs, deriva da Na^+/K^+ ATPase, presente na membrana basolateral (DONOWITZ; LI, 2007; FLIEGEL, 2006; FLIEGEL, 2008; MALO; SLEPKOV et al., 2007).

Várias isoformas do trocador Na^+/H^+ já foram clonadas: NHE1 – NHE10 (GOYAL; VANDER-HEUVEL; ARONSON, 2003; KLANKE et al., 1995; LEE et al., 2008; NUMATA; ORLOWSKI, 2001; ORLOWSKI; KANDASAMY; SHULL, 1992; SARDET; FRANCHI; POUYSSÉGUR, 1989; TSE et al., 1992; TSE et al., 1993; WANG; ORLOWSKI; SHULL, 1993). Essas isoformas de NHE são divididas em dois grandes grupos (A e B) relacionados com a distribuição celular e, conseqüentemente, com a função desses transportadores. O grupo A inclui as isoformas de 1 a 5, as quais estão presentes, preferencialmente, na membrana celular. Já o grupo B inclui as isoformas de 6 a 10, que estão distribuídas nas membranas de diferentes organelas celulares (ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2004; SLEPKOV et al., 2007).

Foram identificadas, em células do túbulo proximal renal, três isoformas de NHE: 1 (NHE1), 3 (NHE3) e 8 (NHE8) (GOYAL; VANDER-HEUVEL; ARONSON, 2003; WANG; ORLOWSKI; SHULL, 1993). O NHE1 é uma proteína ubíqua em células de mamíferos, presente na membrana basolateral dessas e por ser considerada uma proteína “housekeeping” (Figura 5) contribui substancialmente para a regulação do pH e volume celulares. Além disso, o NHE1 é a isoforma mais sensível ao amiloride e seus análogos (BIEMESDERFER et al., 1992; BOBULESCU; MOE, 2006; FLIEGEL, 2008; ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2004; NOËL; POUYSSÉGUR, 1995; SLEPKOV et al., 2007).

Figura 5 - Estrutura secundária do NHE isoforma 1 (NHE1) com os sítios de interação com diversos sinalizadores intracelulares.

FONTE: (FLIEGEL, 2008)

No geral, as isoformas 3 e 8 do NHE estão presentes na membrana apical e contribuem eficientemente, no túbulo proximal, para a reabsorção de NaCl , NaHCO_3^- e água (SARKER et al., 2008). Além disso, o NHE3 (Figura 6) é uma isoforma menos sensível ao amiloride (AZARANI; GOLTZMAN; ORLOWSKI, 1995; BOBULESCU; MOE, 2006; D'SOUZA et al., 1998; DONOWITZ; LI, 2007; MOE, 1997). No entanto, o NHE3 não foi detectado apenas na superfície celular das células tubulares proximais, mas também em uma população de vesículas subapicais, podendo circular entre citosol e membrana celular em resposta a uma estimulação intracelular, como a fosforilação de proteínas cinases (ALEXANDER; GRINSTEIN, 2009).

Figura 6 - Estrutura secundária do NHE isoforma 3 (NHE3) com os sítios de interação com alguns sinalizadores intracelulares.

FONTE: (ALEXANDER; GRINSTEIN, 2009)

Assim, juntos no túbulo proximal, o NHE1, o NHE3 e o NHE8 colaboram com a manutenção da reabsorção de Na⁺ e participam do equilíbrio ácido-base do organismo.

1.4 Efeitores de adenosina monofosfato cíclico (AMPc)

Os mecanismos de transporte de Na⁺, glicose, H⁺ (e HCO₃⁻) ao longo do epitélio renal podem ser regulados por diversos agentes parácrinos, neuronais e endócrinos. Um desses agentes é o AMPc, que por ser um segundo mensageiro derivado da adenosina trifosfato (ATP), possui papel importante na transdução de sinal intracelular em diversos tecidos. O AMPc é sintetizado no meio intracelular em resposta a ligação de diversas moléculas extracelulares (hormônios, fatores de crescimento ou neurotransmissores) aos seus respectivos receptores, comumente denominados GPCRs (“G Protein coupled Receptors”). Os GPCRs possuem cerca de 7 domínios transmembrana e por estarem acoplados a proteína G, são

capazes de iniciar inúmeras cascatas de eventos intracelulares com conseqüente modulação da resposta celular (ALBERTS et al., 2006).

As proteínas G possuem três subunidades denominadas α , β e γ , que estão agrupadas entre si. Em condições basais, a subunidade α , além de estar associada às subunidades β e γ , está ligada ao GDP (guanilil difosfato), acoplado ao GPCR. Contudo, a ativação do GPCR pelo ligante extracelular, ativa a proteína G aumentando os níveis de GTP (guanilil trifosfato) ligados à subunidade α , a qual se dissocia das subunidades β e γ . Como demonstrado na figura 7, a subunidade $G_{\alpha s}$ dissociada ativa uma das nove isoformas de Adenilil Ciclase (AC) aumentando assim, os níveis de AMPc provenientes do ATP (PIDOUX; TASKÉN, 2010).

Zaccolo e Pozzan (2002), utilizando a técnica de FRET (fluorescence resonance energy transfer) em células, demonstraram a presença de microdomínios com altos níveis de AMPc, fato que contribui para a manutenção dos níveis intracelulares adequados do segundo mensageiro, garantindo a resposta intracelular aos estímulos externos. Contudo, o controle dos níveis de AMPc depende, não somente da ativação da AC (HANOUNE; DEFER, 2001; COOPER, 2003), mas também da Fosfodiesterase (PDE), enzima que catalisa a degradação do AMPc em AMP (BAILLIE; SCOTT; HOUSLAY, 2005; LUGNIER, 2006). O aumento nos níveis de AMPc intracelular culmina com a ativação de seus efetores, como a proteína cinase A dependente de AMPc (PKA) (WALSH; PERKINS; KREBS, 1968), “cAMP guanine-nucleotide-exchange factor” (Epac) (Figura 7) (De ROOIJ et al., 1998; KAWASAKI et al., 1998) e canais iônicos ativados por AMPc (NAKAMURA; GOLD, 1987).

Figura 7 - Modelo de formação do microdomínio com elevação dos níveis de AMPc e seus efetores.

1) PKA e proteína ancoradora de PKA (AKAP), 2) Fosfodiesterases (PDEs), 3) “cAMP guanine-nucleotide-exchange factor” (Epac), 4) Canais iônicos ativados por AMPc.
 FONTE: (PIDOUX; TÁSKEN, 2010).

A PKA foi uma das primeiras cinases a serem descobertas (WALSH; PERKINS; KREBS, 1968). Essa cinase é uma holoenzima que possui duas subunidades regulatórias (R), cada uma com dois sítios de ligação para o AMPc e duas subunidades catalíticas (C). A figura 8 esquematiza as duas formas (ativa e inativa da PKA). No estado basal, os níveis de AMPc estão baixos e a PKA está cataliticamente inativa pela união das 4 subunidades (2R + 2C). No entanto, quando os níveis de AMPc se elevam, 4 moléculas de AMPc se ligam as subunidades R, permitindo a dissociação das subse unidades C. Dessa forma, as subunidades C podem, então, fosforilar resíduos de serinas e treoninas de substratos-alvo próximos (KOPPERUD et al., 2002; PIDOUX; TASKÉN, 2010; SHABB, 2001). Essa fosforilação usualmente resulta em uma mudança na atividade ou expressão desses substratos, incluindo proteínas de transporte.

Figura 8 - Modelo representativo da forma inativa e ativa da PKA.

As subunidades C ligadas as subunidades R estão inativas. A ligação de 4 moléculas de AMPc (2 moléculas em cada subunidade R) causa mudança conformacional da proteína que facilita a dissociação das subunidades C. As subunidades C se tornam cataliticamente ativas e fosforilam substratos alvos próximos. C = Subunidade Catalítica; R = Subunidade regulatória; Círculos vermelhos = AMPc; A e B = Sítios de ligação para o AMPc.

FONTE: (SILVA, 2012).

Existem dois tipos de PKA (tipo I e II) descritos na literatura. A PKA do tipo I, além de ser mais sensível ao AMPc (possui uma constante de ativação rápida, pois necessita de menor concentração de AMPc - 50 a 100 nM) é considerada citosólica. No entanto, a distribuição celular da PKA do tipo II está vinculada às organelas celulares e apresenta uma constante de ativação mais lenta, pois necessita de maior concentração de AMPc (200 a 400 nM) (CLEGG; CADD; MCKNIGHT, 1988; GAMM; BAUDE; UHLER, 1996; JAHNSEN et al., 1986; REIMANN; WALSH; KREBS, 1971; LEE et al., 1983; SCOTT, 1991; SCOTT et al., 1987; TASKEN et al., 1993).

Além disso, é importante ressaltar que, as diferenças na afinidade ao AMPc e na localização celular da PKA contribuem para especificidade da via de sinalização do AMPc. Contudo, a presença da PKA em regiões subcelulares favorece o ancoramento da subunidade R pelas Proteínas de Ancoramento de PKA (AKAPs) (SKALHEGG; TASKÉN, 2000).

As AKAPs são proteínas que regulam os eventos intracelulares dependentes de PKA, favorecendo a aproximação da PKA com seus substratos-alvo e permitindo a regulação dessa cinase de forma temporal ou espacial. Além disso, as AKAPs podem estar envolvidas na ligação dos PDEs, terminando a sinalização da PKA (BAUMAN et al., 2006). Praticamente quase todas as proteínas consideradas AKAPs possuem uma região conservada contendo cerca de 14-18 aminoácidos. Essa região é responsável pela ligação das AKAPs na subunidade R da PKA. No entanto, assim como os tipos de PKA possuem diferentes afinidades ao AMPc, a subunidade RII da PKA possui alta afinidade à AKAP (na ordem de

nanomolar), enquanto a subunidade RI se liga a AKAP com baixa afinidade (na ordem de submicromolar) (CARR et al., 1991; HERBERG et al., 2000).

Dessa maneira, para que a via da PKA exerça sua função no substrato-alvo, diferentes condições, seja a relação da afinidade da PKA com o AMPc ou até mesmo da PKA com a AKAP, precisam ser reguladas, indicando que essa via de sinalização celular deixa de ser uma via trivial de comunicação entre o meio extra e intracelular, se tornando uma via de alta complexidade.

Além da PKA, a Epac (“cAMP guanine-nucleotide-exchange factor”) é também considerada efetora do AMPc. A Epac possui um domínio com alta afinidade para o AMPc, homólogo a subunidade R da PKA (CHENG; TSALKOVA; MEI, 2008). No entanto, o que difere a via da Epac à da PKA é que a ligação do AMPc ativa a Rap 1 e 2 (que são pequenas GTPases pertencentes a superfamília das Ras), processo que é independente da ativação da PKA (CHENG; TSALKOVA; De ROOIJ et al., 1998; MEI, 2008).

Interessantemente, assim como a PKA, a Epac possui duas isoformas. A Epac 1 é ubíqua, mas a Epac 2 possui sua expressão tecidual mais restrita (De ROOIJ et al., 1998; KAWASAKI et al., 1998). De forma geral, as Epac’s participam da adesão celular, interação célula-célula, exocitose e secreção, diferenciação e proliferação, expressão gênica, apoptose, hipertrofia, fagocitose, ativação de vias de sinalização intracelular e regulação de proteínas de transporte (CULLERE et al., 2005; ENSERINK et al., 2004; KOOISTRA et al., 2005; LI et al., 2007; OZAKI et al., 2000; RANGARAJAN et al., 2003; SEINO; SHIBASAKI, 2005; HONEGGER et al., 2006; SCHMIDT et al., 2001). Dentre os efeitos da Epac na exocitose e estão a secreção de insulina pelas células β pancreáticas e inserção de aquaporina do tipo 2 na membrana apical de células do ducto coletor medular (KANG; CHEPURNY; HOLZ, 2001; KASHIMA et al., 2001;).

Foi demonstrado que somente a Epac1 está presente em células do tubulo proximal e que essa isoforma é insensível a H-89, sendo uma possível via de ativação por AMPc, independente de PKA (HONEGGER et al., 2006; SCHMIDT et al., 2001).

1.5 Efeito da glicose sobre a ativação de vias de sinalização intracelular e atividade dos SGLT’s e NHE’s

É bem descrito na literatura a influência de altas concentrações de glicose sobre mudanças na expressão dos transportadores de glicose e sobre a recuperação do pH_i . Inicialmente, em 1986, Harris e colaboradores sugeriram a existência de um efeito

coordenado entre SGLTs e NHEs, mas em 1997, alguns autores (AMBÜHL et al., 1997; HARRIS; BRENNER; SEIFTER, 1986; Nascimento-Gomes et al., 1997) demonstraram que tanto a velocidade de recuperação do pH_i quanto a acidificação tubular renal, podem ser modificadas de acordo com a concentração plasmática de glicose. Assim, alterações na concentração plasmática de glicose ao gerar modificações na expressão dos transportadores de glicose e na recuperação do pH_i , podem implicar em uma série de alterações celulares, como alterações na expressão gênica, na polarização celular e, conseqüentemente, na concentração iônica alterando o funcionamento adequado de proteínas.

Estudos recentes de nosso laboratório (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011) demonstraram que, em células HEK-293, a velocidade de recuperação do pH_i é modulada pela glicose de acordo com a concentração e o tempo de exposição da célula à esse substrato. Além disso, o tratamento crônico com alta concentração de glicose (25 mM por 20 dias) aumentou a velocidade de recuperação do pH_i e essa resposta depende da participação da PKA. Contudo, a expressão de SGLT1 e SGLT2 na membrana foi aumentada pelo tratamento, mas somente a expressão de SGLT2 foi revertida pelo uso de H-89 (inibidor da PKA).

Diversos autores têm demonstrado que altas concentrações de glicose podem aumentar a concentração de cálcio citosólico, diferentes tipos de PKC e PKA (GANZ, et al, 2000; GREEN; FOELLMER; KLEEMAN, 1994; HAN et al., 2003; SCHAAAN, 2003; SYMONIAN et al., 1998; WILLIAMS; SCHRIER, 1993; XU; OSBORNE; STANTON, 2005; ZERBINI et al., 1995). Já é bem descrito na literatura que esses fatores intracelulares, descritos anteriormente, são capazes de modular a atividade dos NHE's e SGLT's (AVIV et al., 1994; BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011; DYER et al. 2003; ILSHII et al., 1998; KITAZONO et al., 1989; KPCINSKY et al., 2005; SALAMANCA et al., 2005; SCHAAAN et al., 2003; SUBRAMANIAN et al., 2009; WAKABAYASHI et al., 1992; WAKABAYASHI et al., 1997; WRIGHT et al., 1997).

Em relação à regulação desses transportadores pela PKA, tanto Weinman e colaboradores (1987), como Kurashima e colaboradores (1997) observaram que a atividade do NHE3 diminuiu com a fosforilação da PKA na Serina 605 (Ser⁶⁰⁵) (KURASHIMA et al., 1997; WEINMAN; SHENOLIKAR; KAHN, 1987). Em contraste com o NHE3, a regulação do NHE1 pela PKA é controversa. Alguns autores relatam que o NHE1, expresso em células PS120 (células de fibroblasto de pulmão), não foi responsivo à ativação dessa cinase (BORGESE et al., 1992; LEVINE et al., 1993). No entanto, Kandasamy e colaboradores (1995) demonstraram que a transfecção estável de NHE1 em células AP-1 (uma célula

mutante de ovário de hamster chinês) foi estimulada por Forskolin (agonista do AMPc) (KANDASAMY et al., 1995). Já em células OK (células de tubulo proximal de opossum) transfectadas com NHE1, a atividade do NHE1 foi inibida pela PKA.

Em relação aos SGLT's, Pajor e colaboradores (2008) relataram que altas concentrações de glicose aumentam a atividade de SGLT1 e SGLT2 até o nível máximo de transporte dessas proteínas. No entanto, outros autores têm associado mudanças na atividade do SGLT1 com modificações na distribuição celular dessa proteína (HIRSCH et al., 1996). Além disso, diversos autores demonstraram diferentes mecanismos de regulação envolvendo a PKA. Dyer e colaboradores (2003) demonstraram que em ovelhas, a PKA é ativada pela glucose e essa cinase aumenta a atividade promotora do SGLT1, aumentando os níveis de RNAm desse transportador (DYER et al., 2003; SHIRAZI-BEECHEY et al., 1991). Adicionalmente, experimentos em *Xenopus laevis*, expressando SGLT1 de coelhos, demonstraram que o uso de um ativador de AMPc (8-Br-cAMP) aumentou a atividade desse transportador e esse aumento estava relacionado com mudança na distribuição da proteína do citosol para membrana (HIRSCH et al., 1996).

Apesar dos inúmeros estudos, a forma como as células sentem e respondem às mudanças na concentração de glicose, ainda não foi esclarecida. Dyer et al. (2003) sugerem a presença de um sensor para glucose, o qual é capaz de sentir as alterações da glucose extracelular e ativar a via da PKA, que por sua vez, modularia a atividade do SGLT1. Outros autores sugerem, a presença de um receptor de membrana em leveduras do tipo GPCR, denominado Gpr1 que atuaria como sensor de glicose, ativando a PKA. Essa cinase por sua vez, atuaria sobre a região promotora do gene responsável pela expressão dos transportadores de glicose (KIM; JOHNSTON, 2006).

Além disso, foi demonstrado que, diferentemente da ação da PKA sobre o NHE3, a Epac1 pode modificar a expressão de NHE3 na membrana, sem envolver mecanismos de fosforilação (HONEGGER et al., 2006). A Epac pode ativar a PKC ϵ , que aumenta a concentração de cálcio citosólico, em células HEK-293 (SCHMIDT et al., 2001). E, tanto PKA quanto PKC podem regular negativamente a atividade do NHE3 (AZARANI; GOLTZMAN; ORLOWSKI, 1995; KANDASAMY et al., 1995). Em relação ao NHE1, diversos estudos demonstraram que a atividade dessa isoforma pode ser regulada pela PKC, mas a resposta do NHE1 depende da isoforma de PKC e não parece envolver fosforilação direta (FLIEGEL et al., 1992; SAUVAGE et al., 2000; KANDASAMY et al., 1995; LEVINE et al., 1993; SARDET, FAFOURNOUX; POUYSSÉGUR, 1991; SNABAITIS; YOKOYAMA; AVKIRAN, 2000) .

Vale a pena ressaltar que, a ativação da PKC (com DOG – 1,2-dioctytanoylglycerol) também pode diminuir a atividade do SGLT1 (HIRSCH, LOO; WRIGHT, 1996) e, como a PKA, o efeito da PKC sobre o SGLT1 induziu modificações quantidade de proteínas na membrana. Wright e colaboradores (1997) demonstraram que o hSGLT1 possui 4 sítios de fosforilação para PKC e apenas um para PKA (Serina 418) (WRIGHT et al., 1997). Assim, a maioria dos trabalhos tem postulado que esses sítios estão envolvidos com modificações na distribuição da proteína do citosol para membrana e não fosforilação direta dessas cinases, modificando a atividade desse transportador.

Um estudo recente demonstrou uma conexão entre o aumento da atividade do SGLT1 como e a ativação do NHE3. Nesse estudo foi demonstrado que a diminuição da fosforilação do NHE3 pelo NHERF (“NHE regulatory factor”) ativa essa isoforma de trocador (LIN et al. 2011). Considerando que o domínio C-terminal do NHE3 é responsável pela modulação do transporte, a interação desse domínio com o citoesqueleto ou com moléculas intracelulares, como NHERF (“NHE Regulatory Factor”), PKA ou ERM (“Ezrin, Radixin and Myosin Complex”), pode regular a atividade desse trocador (ALEXANDER; GRINSTEIN, 2009).

De forma geral, tanto a atividade dos SGLT's como dos NHE's pode ser modulada por vias de sinalização similares que são ativadas pela glicose. Assim, considerando que tanto os NHEs (isoformas 1 e 3) quanto o SGLT1 podem ter sua atividade regulada pela PKA, e que o SGLT1 possui um sitio específico para essa cinase, postulamos que uma mutação na serina 418 do hSGLT1 poderia facilitar o entendimento do efeito crônico de alta concentração de glicose sobre o hSGLT. Além disso, postulamos também investigar nesse modelo, o efeito crônico da glicose sobre a atividade do SGLT2 e dos NHEs, via PKA.

2 OBJETIVOS

Com base no exposto acima, os objetivos do estudo foram avaliar, na vigência de alta concentração de glicose (25 mM), se:

- a) mudanças na distribuição do SGLT1 estão relacionadas com a fosforilação direta da PKA nesse transportador e se esse processo envolve a Serina 418;
- b) a ativação da PKA está relacionada à ativação do GPR1;
- c) existe participação da via da PKA na atividade dos NHEs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

Para extração do RNA mensageiro total de hSGLT1 foram utilizadas células Caco2 (células epiteliais de adenocarcinoma colo-retal humano), em cultura. As células foram ressuspensas e homogeneizadas com 1 ml de TRIzol LS Reagent (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos). O homogeneizado obtido foi incubado a 25 °C (por 5 minutos) para a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos e, em seguida, foi adicionado 0.2 ml de clorofórmio (para cada ml de TRIzol) a este homogeneizado. A amostra foi agitada (por 15 segundos), incubada a 25 °C (por 3 minutos) e centrifugada a 30.000 g, a 4 °C (por 15 minutos). Assim, duas fases foram obtidas: uma fase superior aquosa (transferida para um tubo novo) e uma fase inferior que corresponde ao RNA total (cujo volume foi precipitado com o mesmo volume de isopropanol absoluto). Em seguida, a amostra de RNA foi incubada a 25 °C (por 10 minutos) e centrifugada a 30.000 g a 4 °C (por 10 minutos). Após esses dois períodos de incubação, o pellet de RNA total foi lavado com 1 ml de etanol a 75% e centrifugado a 30.000 g a 4 °C (por 5 min). O etanol foi removido e o pellet de RNA total foi dissolvido em água com DEPC (diethylpyrocarbonate), o qual inativa as RNases.

Em 5 µg desse RNA total foi adicionado a quantidade de 1 µl de Random Hexamers (50 pmol), 1 µl de dNTP mix e mais água com DEPC, a fim de totalizar um volume final de 10 µl. Essa mistura foi primeiramente incubada a 65 °C (por 5 minutos) e depois transferida rapidamente para o gelo. Em seguida, 2 µl de tampão 10x RT, 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de RNase OUT e 1 µl de SuperScript III RT (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos) foram adicionados, totalizando um volume de 20 µl. O tubo contendo os 20 µl de amostra foi preparado para o início da reação de síntese de cDNA (cópia de DNA) no termociclador seguindo as etapas: 25 °C (por 10 minutos), 50 °C (por 50 minutos) e 85 °C (por 5 minutos). Por fim, ao produto desta reação foi adicionado 1 µl de RNase Hb e, após centrifugação, a amostra contendo a primeira fita de cDNA foi incubada a 37 °C (por 20 minutos) e, posteriormente, congelada para experimentos de PCR.

Nos experimentos de PCR foram utilizadas as primeiras fitas do cDNA (como fitas molde ou template), DNA polimerases, oligos específicos e dNTPs (desoxirribonucleotídeos

fosfatados – dATP, dCTP, dGTP, dTTP). As reações de PCR para obtenção dos recombinantes foram realizadas de acordo com as seguintes etapas:

- Construção de oligos para o hSGLT1 wild type (WT):

Sense: 5' **CTC GAG GCC ACC** CAT GGA CAG TAG CAC 3'

Seqüência enzimática de **XhoI**

Seqüência **ZAC**

Antisense: 5' **AAG CTT** GGC AAA AGA CAG CCA CGG TCA 3'

Seqüência enzimática de **HindIII**

- Construção de oligos para o hSGLT1 Mutante - Ser418His (S418H):

Substituição da Serina 418 (**TCT**) por Histidina (**CAT**)

Sense: 5' CCG CAA GAG AGC **ACA TGA** GAA AGA GCT CAT G 3'

Antisense: 5' CAT GAG CTC TTT CTC **ATG** TGC TCT CTT GCG G 3'

Ciclo de PCR para extração e amplificação do DNA:

Ciclo 1: 95 °C/ 5 minutos

Ciclo 2: 94 °C/ 45 segundos, 60 °C/ 45 segundos e 72 °C/ 1 minuto

Ciclo 3: 72 °C/ 10 minutos

Total de ciclos: 35

Após a reação de PCR, cerca de 20 µl do DNA foram aplicados em gel de agarose (1 %) diluído em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) para avaliação do tamanho do recombinante. Em seguida, o gel contendo a amostra foi fotografado por um sistema ligado a um transluminador onde a banda de DNA de interesse foi comparada ao marcador (1 kb plus DNA ladder – Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos).

Considerando que a concentração do DNA (obtido pela reação de PCR) não é suficiente para clonagem no vetor de expressão pEGFP-N1, inicialmente esse cDNA foi inserido no vetor pGEM – T Easy (plasmídeo) para amplificação do cDNA do WT ou do

S418H (recombinantes), de acordo com o protocolo do pGEM-TEasy (Promega, Wisconsin, Estados Unidos). Para tal, os plasmídeos recombinantes (WT ou S418H + pGEM-TEasy) foram inseridos em bactérias *E.coli* competentes pela técnica de “heat shock”. Após a inserção, as bactérias foram plaqueadas em meio seletivo com antibiótico (para pGEM-TEasy utiliza-se ampicilina), a fim de selecionar as colônias positivas, ou seja, aquelas que contêm os plasmídeos recombinantes. Estes plasmídeos foram purificados das bactérias utilizando o kit miniprep (Promega). Uma alíquota de cada amostra dos plasmídeos recombinantes foi utilizada para análise do tamanho do cDNA, por eletroforese em gel agarose (1 %) e os pesos moleculares das bandas de cDNA foram comparadas com o peso molecular do marcador (1 kb plus DNA ladder - Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos) enquanto que outra alíquota dos plasmídeos recombinantes foi sequenciada e os clones positivos foram selecionados para clonagem no vetor de expressão.

O vetor da linha GFP (“Green Fluorescent Protein”) quando ligado ao cDNA de interesse, permite a identificação da proteína transfectada através de microscopia de fluorescência. Isso se deve ao fato de que, ao ser excitado em um comprimento de onda de cerca de 488 nm, emite fluorescência de coloração verde. Dessa forma, para esse estudo foi selecionado o vetor de expressão pEGFP-N1 onde tanto esse vetor quanto os plasmídeos recombinantes foram linearizados por clivagem, utilizando enzimas de restrição específicas: XhoI e HindIII. Após a linearização, os recombinantes foram ligados ao pEGFP-N1 nos sítios dessas enzimas, através da enzima T4 DNA-ligase (Figura 10). Novamente, os recombinantes WT ou S418H + pEGFP-N1 foram inseridos em bactérias *E.coli* e as colônias positivas foram selecionadas por meio do antibiótico (kanamicina). Após essa etapa, os recombinantes foram purificados das bactérias utilizando o kit mini e maxiprep (Promega, Wisconsin, Estados Unidos). Seguinte a purificação, foi confirmada a ligação do cDNA de interesse (WT ou S418H) com o vetor de expressão (pEGFP-N1) incubando-os com as enzimas de restrição HindIII e XhoI por 1 hora a 37 °C, a fim de linearizá-los. Após 1 hora, as amostras foram aplicadas no gel de agarose (1 %), procedimento esse, que confirmou o tamanho da banda do cDNA e do vetor. Assim como para os plasmídeos recombinantes WT ou S418H + pGEM-TEasy, outra amostra de 5 µl contendo os recombinantes ligados ao pEGFP-N1 foi sequenciada, a fim de comprovar sua integridade. Os recombinantes WT ou S418H/pEGFP-N1 que estavam com a sequência de aminoácidos correta e íntegra foram transfectados no modelo celular escolhido para o desenvolvimento do trabalho.

Figura 9 - Esquema do recombinante *hSGLT1-wt*/pEGFP-N1 com os sítios de restrição das enzimas XhoI (sense) e Hind III (antisense).

FONTE: (SILVA, 2010).

3.1.1 cDNA do WT

O cDNA do hSGLT1 WT obtido das células Caco-2 (Figura 10) possui cerca de 1995 pb e está de acordo com o BLAST (gi: 4507030, anexo 1).

Figura 10 - Produto de RT-PCR de células Caco-2 por eletroforese em gel de agarose (1%).

M= Marcador (1Kb DNA Ladder); 1= cDNA de hSGLT1 (1995 pb); pb = pares de bases.
FONTE: (SILVA, 2012).

3.1.2 Clonagem do cDNA do WT no vetor pGEM-TEasy

O cDNA do WT obtido por RT-PCR, foi diretamente inserido no vetor pGEM-TEasy. A figura 11 representa o experimento de clivagem do plasmídeo recombinante (WT + pGEM-TEasy) com as enzimas de restrição HindIII e XhoI, o qual resultou em dois fragmentos desejados: vetor pGEM-TEasy (3.015pb) e hSGLT1 - WT (aproximadamente 1.995pb).

Figura 11 - Análise do produto de clivagem do plasmídeo recombinante (WT + pGEM-TEasy).

Plasmídeo recombinante com enzimas de restrição HindIII e XhoI, por eletroforese em gel de agarose (1%). pGEM-TEasy = 3015 pb e WT = 1995 pb; M= Marcador (1Kb DNA Ladder); pb = pares de bases.
 FONTE: (SILVA, 2012).

3.1.3 Clonagem do DNA do WT no vetor pEGFP-N1

Antes da clonagem do cDNA WT no vetor de expressão pEGFP-N1, esse vetor foi linearizado por clivagem, utilizando as enzimas de restrição específicas HindIII e XhoI. Após essa etapa, utilizando a T4 DNA-ligase, o cDNA WT (que foi clivado do vetor pGEM-TEasy) foi inserido no vetor pEGFP-N1 nos sítios das enzimas de restrição, citadas anteriormente. Após essa inserção, o plasmídeo recombinante (WT + pEGFP-N1) foi clivado (para a confirmação da ligação com o cDNA de interesse), utilizando as enzimas de restrição HindIII e XhoI, resultando em 2 fragmentos desejados (Figura 12): pEGFP-N1 (4.700pb) e WT (1.995 pb).

Figura 12 - Análise do produto de clivagem do plasmídeo recombinante (WT + pEGFP-N1).

Plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição HindIII e XhoI por eletroforese em gel de agarose (1 %); pEGFP-N1 (4700 pb) e WT (1995 pb); M= Marcador (1Kb DNA Ladder); pb = pares de bases.

FONTE: (SILVA, 2012).

3.1.4 Sequenciamento dos ácidos nucleicos do hSGLT1-WT

Após sua amplificação do cDNA do hSGLT1-WT inserido no vetor pEGFP-N1 foi submetido ao sequenciamento de seus ácidos nucleicos. As figuras 13 e 14 comprovam a integridade dos aminoácidos do WT, incluindo os sítios das enzimas Hind III e XhoI, previamente inseridos.

Figura 13 - Sequência sense dos ácidos nucleicos do WT inserido no vetor de expressão pEGFP-N1.

Figura 15 - Esquema da sequência da alça citoplasmática (entre os TM 9 e 10) da nova estrutura secundária do hSGLT1 baseada na estrutura do vSGLT. Aminoácido mutado (Serina 418) em destaque.

FONTE: (SILVA, 2012).

Assim, conforme descrito para o WT, o produto de PCR referente ao S418H foi diretamente clonado no vetor pGEM-TEasy. A Figura 16 indica que a clivagem do recombinante com as enzimas de restrição HindIII e XhoI, a qual resultou em dois fragmentos desejados: vetor pGEM-TEasy (3.015pb) e S418H (1.995pb).

Figura 16 - Análise do produto de clivagem do plasmídeo recombinante (S418H + pGEM-TEasy).

Plasmídeo recombinante com enzimas de restrição HindIII e XhoI por eletroforese em gel de agarose (1%). pGEM-TEasy (3015 pb) e S418H (1995 pb) M= Marcador (1Kb DNA Ladder); pb = pares de bases.

FONTE: (SILVA, 2012).

O cDNA do S418H (separado do vetor pGEM-TEasy) foi inserido, utilizando a enzima T4 DNA-ligase, no vetor de expressão pEGFP-N1 (após sua linearização utilizando enzimas de restrição HindIII e XhoI). A figura 17 representa o experimento de clivagem do plasmídeo recombinante, o qual resultou em 2 fragmentos desejados: pEGFP-N1 (4.700pb) e S418H (1.995 pb).

Figura 17 - Análise do produto de clivagem do recombinante S418H.

Plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição Hind III e Xho I e posterior análise através de eletroforese em gel de agarose (1 %); pEGFP-N1 (4700 pb) e cDNA do S418H (1995 pb); M= Marcador (1Kb DNA Ladder); pb = pares de bases.

FONTE: (SILVA, 2012).

3.1.6 Sequenciamento dos ácidos nucleicos do S418H

Após a amplificação do S418H no vetor pEGFP-N1, os ácidos nucleicos do cDNA do S418H foram sequenciados. A figura 18 demonstra uma parte desse sequenciamento que possui a região de substituição da Serina 418 (TCT) por Histidina (CAT).

Figura 18 - Parte da sequência do S418H no vetor de expressão pEGFP-N1 demonstrando a região de substituição Serina por Histidina.

FONTE: (SILVA, O. B., 2012).

3.2 Modelo experimental – células HEK-293

Os estudos foram realizados em Human Embryonic Kidney cells (HEK-293), as quais foram adquiridas da “American Type Culture Collection”. Para que essas células formassem uma monocamada confluenta, foram cultivadas em meio de cultura DMEM “low glucose” (“Dulbecco's Modified Eagles's Medium-Gibco – baixa glicose”). Esse meio, continha, além dos nutrientes básicos, 5 mM de glicose, 25 mM de NaHCO_3 , 10 % de soro fetal bovino, penicilina (50 unidades/ml), estreptomicina (50 ug/ml), L-glutamina (2 mM) e o pH foi ajustado a 7.2. A cada semana essa monocamada foi tripsinizada, utilizando 0.05 % de tripsina, 0.53 mM de EDTA e tampão fosfato salino (PBS), a fim de remover as células do recipiente de cultura e transferi-las para novos frascos, multiplicando assim, a linhagem celular.

Contudo, antes da transfecção, as células foram tratadas com tripsina e transferidas para uma placa de 6 poças, onde ao atingir uma confluência de cerca de 80 % foram transfectadas com os recombinantes WT ou S418H/pEGFP-N1. As células HEK-293 não transfectadas (NT) foram transferidas e cultivadas em uma placa de 6 poças até atingir uma confluência de cerca de 80 %. Após esse período, as células confluentes foram lavadas com

meio Opti-MEM e em seguida, incubadas (dentro da incubadora de CO₂) com a solução contendo 6 µg de cDNA WT ou S418H + 10 µl de Lipofectamina 2000 diluídos em 1 ml de Opti-MEM + /1 ml de Opti-MEM, por 5 horas.

Como nesse estudo foi utilizada a técnica de expressão estável, após a transfecção, as células foram cultivadas utilizando meio DMEM baixa glicose suplementado com 2 mg/ml de Geneticina (G418- antibiótico específico para selecionar os clones contendo os recombinantes), até a conclusão da seleção dos clones positivos. Para seleção, os clones foram, inicialmente, visualizados por microscopia confocal (imunofluorescência direta) e, em seguida, selecionados com discos, os quais delimitaram a área a ser tripsinizada. A tripsinização da área interna do disco facilitou a obtenção de um maior número de células contendo os recombinantes transfectados para que essas pudessem crescer em maior quantidade nas placas de cultura. Dessa forma, 15 dias após a transfecção as células transfectadas com WT ou S418H passaram a ser cultivadas em DMEM baixa glicose suplementado com 0.5 mg/ml de Geneticina.

Para a realização de todos os experimentos (descritos a seguir), as células HEK-293: não transfectadas (NT), transfectadas com WT ou transfectadas com S418H foram tratadas 20 dias com meio DMEM baixa glicose (glicose 5 mM) ou alta glicose (glicose 25 mM). Vale ressaltar que para as células transfectadas, tanto o DMEM baixa ou alta glicose foram suplementados com 0.5 mg/ml de Geneticina (durante todo o tratamento), a fim de garantir a seleção dos clones.

3.3 Análise da expressão protéica por Western blot

Para os experimentos de Western blot, após os 20 dias de tratamento, seja na situação controle, ou no tratamento crônico, as células HEK-293 NT, transfectadas com WT ou S418H foram cultivadas em placas de petri com 6 poços. Em algumas situações, além do tratamento de 20 dias, as células foram incubadas 30 minutos antes do experimento com H-89 (10⁻⁶ M) ou D-manose (50 mM). Após os tratamentos, as células foram removidas por raspagem utilizando o tampão “radioimunoprecipitation tampão assay” (RIPA) [(in mM) 50 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100; pH 7.4], acrescidos de inibidores de protease e fosfatase. O homogeneizado celular foi centrifugado (30.000 g) por 10 min e o sobrenadante foi coletado e diluído em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2 %, glicerol 20 %, β-mercaptoetanol 1.96 % e azul de bromofenol 0.05 %)]. Em seguida, as amostras contendo cerca de 50 ug de proteína, foram

aplicadas, juntamente com um padrão de massa molecular específico (Bio-Rad, Califórnia, Estados Unidos), no gel de poliacrilamida (10 %, com espessura de 1.5 mm), o qual foi submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 % e pH 8.3). A corrida das amostras no gel foi efetuada a 150 Volts, sendo interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel.

Após a corrida do gel de poliacrilamida-SDS, para que os polipeptídeos contidos no gel fossem transferidos para uma membrana de PVDF (hydrophobic polyvinylidene difluoride) (Amersham Hybond-LFP, GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos), essa membrana foi previamente hidratada com metanol 100 % por 1 min, também foi lavada 2x de 15 min (cada) com água destilada e foi submersa em tampão de transferência gelado (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, pH 8.3) por 2 min.

A transferência dos polipeptídeos para a membrana de PVDF foi realizada por um sistema do tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência gelado (descrito anteriormente), sobre o qual se aplicou uma voltagem de 100 V, durante 1 hora. Após a transferência, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo na membrana de PVDF, essa membrana foi incubada em solução de bloqueio (TBS-T [in mM = NaCl 150 mM, Fosfato de Sódio Monobásico (2.8 mM), Fosfato de Sódio Dibásico (7.2 mM), leite em pó desnatado ou albumina (5%), Tween 20 (0.1 %)]), utilizando leite em pó desnatado ou albumina, de acordo com as recomendações dos fabricantes dos anticorpos, por 2 horas. Após o período de bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário específico previamente diluído em solução de TBS-T (com leite ou albumina), a 4 °C “overnight”.

No dia seguinte, a fim de remover o excesso desse anticorpo primário, foram realizadas 3 lavagens de 15 min (cada), utilizando a solução de TBS-T (sem leite ou albumina). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado específico previamente diluído em solução de TBS-T (com leite ou albumina), por 1 hora. Após esse período, a fim de remover o excesso de anticorpo secundário, foram realizadas 3 lavagens de 15 min (cada), utilizando a solução de TBS-T (sem leite ou albumina).

Para observar o resultado, após essas etapas, a membrana foi tratada com o reagente para imunodeteção “Enhanced Chemiluminescence” (ECL da Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos) por 1 minuto e foi exposta em um filme (HyperfilmTM MP da Amersham, GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos) dentro de um cassete específico, por 30 segundos ou mais. As bandas positivas e com peso molecular corretos foram estatisticamente analisadas e comparadas com seus respectivos controles, como descrito no item 3.6.

3.4 Biotinilação

Para os experimentos de biotinilação, as células HEK-293: 1) NT, 2) transfectadas com WT ou 3) transfectadas com S418H foram cultivadas em placas de Peri com 6 poças (até formar uma monocamada com 80% de confluência) e foram tratadas 20 dias com DMEM baixa (glicose 5 mM) ou alta glicose (glicose 25 mM). Além disso, em algumas situações, essas células também foram pré-tratadas com H-89 (10^{-6} M) ou D-manose (50 mM) por 30 minutos, antes da realização dos experimentos.

Após esses tratamentos, o meio de cultura (DMEM) foi removido e a monocamada foi lavada com uma solução denominada tampão Ca-Mg [(in mM) NaCl-150, NaH_2PO_4 -0.9, CaCl_2 -0.1, MgCl_2 -1, pH 7.4)]. Após essa lavagem a monocamada foi exposta a uma solução de biotina [1.5 mg/ml EZ-Link Sulpho-NHS-SS-Biotin (Pierce, Rockford, IL) NaCl-150 mM, Triethanolamine-10 mM, CaCl_2 -2 mM, pH 7.4] a 4 °C, com agitação, por 1 hora. Depois desse período, a monocamada foi incubada com o tampão Ca-Mg-glicina [(in mM) glicina-100, NaCl-150, NaH_2PO_4 -0.9, CaCl_2 -0.1, MgCl_2 -1, pH 7.4)] por 20 minutos. Para a remoção da glicina, a monocamada foi lavada com o tampão Ca-Mg (citado anteriormente). Após essa lavagem, as células foram lisadas com 1 ml de tampão RIPA [(in mM) 50 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 % Triton X-100; pH 7.4)], acrescidos de inibidores de protease e fosfatase. Ao lisado (diluído em 1 ml de tampão RIPA) foi adicionado 100 µl de estreptavidina. Assim, esse lisado com estreptavidina foi incubado a 4 °C, “overnight”.

No dia seguinte, o lisado com estreptavidina foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, formando um pellet. Cerca de 40 µl do sobrenadante foi recolhido para análise da expressão de actina e o restante foi desprezado, sobrando apenas o pellet. Esse pellet foi ressuspensionado com 1 ml de tampão RIPA (anteriormente citado), centrifugado a 30.000 g por 1 minuto e o sobrenadante foi desprezado, sobrando somente o pellet. Esse processo foi repetido cerca de 3 vezes, com o intuito de remover a resina presente na estreptavidina.

Após essas lavagens, o pellet foi ressuspensionado em tampão Laemmli (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2 %, glycerol 20 %, β -mercaptoethanol 1.96 %, bromophenol blue 0.05 %), acrescidos de inibidor de protease e fosfatase, e centrifugados a 30.000 g por 2 min. Uma das funções do tampão Laemmli na biotinilação é dissociar a resina das proteínas ligadas a biotina e estreptavidina fazendo com que essas proteínas permaneçam no sobrenadante (fração biotinilada). Assim, a fração biotinilada foi analisada pela técnica de Western blot, utilizando anticorpos específicos para SGLT1, SGLT2 e GFP. As bandas

positivas e com pesos moleculares corretos foram estatisticamente analisadas e comparadas com seus respectivos controles, como descrito no item 3.6.

3.5 Avaliação do pH_i através de microscopia de fluorescência

As medidas de pH_i foram realizadas por microscopia de fluorescência, utilizando a sonda intracelular fluorescente BCECF (2', 7' - biscalboxietil - 5,6 – carboxifluoresceína), o qual é sensível a concentração de H⁺, segundo o protocolo de Rink; Trein; Pozzan, (1982).

A utilização do BCECF como sonda fluorescente se baseia no fato de que a forma não fluorescente - BCECF-acetoxi-metil ester ou BCECF-AM – atravessa facilmente a membrana (por ser lipossolúvel) e, uma vez no interior da célula, se torna impermeável por ação das esterases intracelulares, pois essas removem rapidamente o resíduo acetoximetil (AM), tornando a molécula hidrossolúvel (Figura 19).

Adicionalmente, o pK da reação do BCECF com o H⁺ é de 6.98 (BOYARSKEE et al., 1988), sendo um bom indicador para medidas de pH_i que variam entre 6,5 e 7,5 como as que ocorrem durante nossos experimentos. Na acidificação do pH_i (após pulso ácido), o BCECF é protonado e sua intensidade fluorescente diminui, mas na alcalinização intracelular ocorre o oposto, aumentando assim, sua intensidade fluorescente.

Figura 19 - Esquema ilustrativo da entrada da molécula BCECF-AM (lipossolúvel) na célula e a ação das esterases intracelulares sobre essa molécula tornando-a hidrossolúvel.

FONTE: (SILVA, 2012).

Em nossos experimentos, a amostra com BCECF foi excitada em 440 nm (comprimento de onda do espectro relativamente insensível ao pH_i e considerado comprimento de onda isosbético) e em 495 nm (comprimento de onda do espectro altamente sensível ao pH_i). A emissão ocorreu em 530 nm (amplitude proporcional ao pH do meio). Para descartar as variações nas intensidades de fluorescência por exemplo, induzidas pela perda do fluorescente, foi utilizada a razão da intensidade fluorescente (IF) ($R=I_{495nm}/I_{440nm}$), que corresponde a um pH_i específico (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico representativo dos espectros do BCECF-AM.

FONTE: Molecular Probes (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos).

Para a leitura da fluorescência emitida pela amostra, foi usado o modelo operacional do microscópio de fluorescência esquematizado na figura 21. A luz proveniente de duas lâmpadas de Xenônio (de 150 W cada) foi conduzida através de fibras ópticas até os filtros de interferência (para comprimentos de onda de 440 nm e 495 nm), que selecionam os comprimentos de onda desejados e a passagem da luz foi controlada por dois “shutters” (interruptores do caminho óptico). Durante o experimento, os ciclos dos shutters intercalaram-se no estado aberto (por 150 ms) e fechado (por 5000 ms), garantindo a independência das medidas nos dois comprimentos de onda. Em seguida, a luz foi conduzida por duas fibras ópticas até o espelho dicróico (ED), que refletiu os comprimentos

de onda inferiores a 510 nm. Desse espelho, a luz passou pela objetiva do microscópio, excitando (nos comprimentos de onda de 440 nm e 495 nm) a amostra. Assim, a amostra emitiu uma fluorescência acima do comprimento de corte do espelho (510 nm). Essa emissão atravessou uma placa perfurada, para evitar a influência de raios dispersos pela objetiva, e foi coletada por um fotomultiplicador, que gerou uma corrente proporcional à potência da luz de 530 nm. Essa corrente, então, foi amplificada e convertida em um sinal digital, que foi adquirido por um microcomputador.

Figura 21 - Esquema do microscópio de fluorescência utilizado para os estudos de pH_i.

FONTE: (BORON; BOYARSKY, 1988).

Para que os valores de razão de fluorescência fossem convertidos em valores de pH_i, as células foram expostas a uma solução contendo alta concentração de K⁺ e Nigericina (Solução 7, Tabela 2). Essa técnica é conhecida como Curva de Calibração com Nigericina (THOMAS et al., 1979). Por ser um ionóforo carboxílico, ou seja, uma molécula lipossolúvel que introduz um poro hidrofílico na membrana e permite a passagem de íons através dessa, a forma básica de atuação da Nigericina (antibiótico derivado da *Streptomyces hygroscopicus*) é a capacidade que esse antibiótico tem de aumentar a permeabilidade da membrana celular a íons, principalmente H⁺ e K⁺. Assim, à medida que a Nigericina iguala a concentração de K⁺ extra ([K⁺]_o) com a concentração de K⁺ intracelular

($[K^+]_i$), o mesmo acontece com a concentração de H^+ extra ($[H^+]_o$) e intracelular ($[H^+]_i$) (CHAILLET; BORON, 1985). Dessa forma, em nossos experimentos (ao utilizar a Nigericina), quando o pH extracelular (pH_o) foi ajustado para valores conhecidos (6.0, 6.5, 7.0 ou 7.5), foi possível medir os valores de razão de fluorescência correspondentes aos valores conhecidos de pH_o , os quais conseqüentemente, corresponderam aos de pHi .

Além disso, os dados obtidos com a curva de calibração foram normalizados pela razão de fluorescência e posteriormente, o “slope” da curva foi utilizado para converter os valores de fluorescência em pHi (Figura 22).

Figura 22 - Curva de calibração em células **HEK 293**, com o uso de nigericina (10 μ M).

pH_e = pH extracelular; **RF** = razão de fluorescência. Razão de fluorescência em função do tempo (**A**) e Razão de fluorescência em função do pHi (**B**).
 FONTE: (SILVA, 2012).

Assim, para a realização dos experimentos de pHi, as células HEK-293: 1) NT, 2) transfectadas com WT ou 3) transfectadas com S418H foram tratadas 20 dias com DMEM baixa (glicose 5 mM) ou alta glicose (glicose 25 mM). Uma semana antes de completar os 20 dias de tratamento, os três tipos de células (NT, WT e S418H) foram cultivados sobre lamínulas de vidro (as quais foram adicionadas nas placas de Petri com 6 poças, ou seja, 1 lamínula para cada poça) e cresceram até formar uma monocamada com 80 % de

confluência sobre essas lamínulas. Além disso, em algumas situações, essas células também foram pré-tratadas (30 minutos antes do experimento) com H-89 (10^{-6} M) ou S3226 (inibidor específico do NHE3, 100 μ M).

As soluções experimentais utilizadas tiveram, em todas as etapas do experimento, a concentração de glicose alterada para os valores desejados e a osmolaridade foi mantida em torno de 290-300 mOsm, pois a concentração de NaCl foi recalculada. Assim, para células tratadas 20 dias com DMEM baixa glicose (condição controle) a concentração de glicose utilizada nas soluções experimentais foi de 5 mM (situação controle), enquanto que para células tratadas 20 dias com DMEM alta glicose (tratamento crônico) a concentração de glicose utilizada foi de 25 mM. Além disso, para avaliar o efeito do H-89 (10^{-6} M; inibidor da PKA) e do S3226 (100 μ M; inibidor do NHE3) esses inibidores foram diluídos nas soluções utilizadas em todas as etapas dos experimentos.

Dessa forma, após todos os tratamentos citados anteriormente, as lamínulas de vidro (contendo a monocamada de células) foram colocadas em uma câmara de acrílico termorregulada (temperatura mantida a 37 °C) que estava montada na platina do microscópio de epifluorescência invertido (108 da Nikon-draphot TMD). Porém, antes de iniciar o experimento, essas lamínulas foram incubadas, dentro da câmara, com solução de baixa ou alta glicose, contendo 10 μ M de BCECF-AM, por 10 minutos (Soluções 3 e 4, respectivamente, Tabela 2).

Para remover o excesso de BCECF, as células foram lavadas com solução de baixa ou alta glicose (Solução 1 e 2, respectivamente, Tabela 2) e o registro da razão de fluorescência foi realizado por cerca de 10 minutos, até a estabilização da curva (curva controle). Importante ressaltar que, dentro da câmara, a substituição das soluções foi realizada utilizando pipetas do tipo pasteur.

Em seguida, as soluções de baixa ou alta glicose, foram substituídas por uma solução contendo 20 mM de NH_4Cl (Solução 5 e 6, Tabela 2) e permaneceram em contato com as células por 2 minutos (Boron; De Weer, 1976). Durante esse período, foi observado uma alcalinização transitória do pH_i , devido a entrada de NH_3 (amônia) na célula, que ao reagir com o H^+ intracelular, forma o NH_4^+ (íon amônio) de acordo com a reação (2):

O pK_a desta reação é de 9.2, enquanto que o pH_i era de, aproximadamente, 7.2 (2 unidades de pH abaixo do valor de pK_a do tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Assim, NH_3 foi altamente

eficiente para tamponar o H^+ , pois nesse exemplo, a concentração de NH_4^+ era 100 vezes mais alta do que a concentração de NH_3 .

Após os 2 minutos de contato com a solução de NH_4Cl , essa foi substituída por uma solução contendo baixa ou alta glicose (Solução 1 e 2, respectivamente, Tabela 2). Essa etapa permitiu uma abrupta acidificação do pH_i , fato ocorrido devido à dissociação do NH_4^+ intracelular em NH_3 e H^+ , com posterior saída de NH_3 , carregando assim, as células com o H^+ . Dessa forma, o H^+ foi extruído do meio intracelular por mecanismos de transporte específicos (extrusores de ácido) que levaram à recuperação do pH_i , próximo ao seu valor basal inicial (Figura 23).

Figura 23 - Experimento típico da recuperação do pH_i em células HEK-293.

Experimento realizado após o pulso ácido com NH_4Cl e representação esquemática da entrada e saída de NH_3/NH_4^+ da célula. C = Controle ($Na^+ = 138$ mM)
 FONTE: (SILVA, 2012).

O cálculo da velocidade de extrusão celular de H^+ , após o pulso ácido com NH_4Cl , utilizou a regressão linear dos valores de pH_i encontrados nos dois primeiros minutos, pelo

método dos quadrados mínimos. A velocidade de extrusão celular de H^+ foi expressa pelo valor do coeficiente angular da reta de regressão (dpH_i/dt). Ou seja (3):

$$y = a + bx, \text{ sendo } b = dpH_i/dt \quad (3)$$

3.6 Análise estatística dos experimentos

Os resultados referentes às medidas de pH_i e densidade de pixels dos experimentos de Western blot e biotinylação, foram apresentados como valor médio $\pm$ erro padrão (n° de experimentos). Para os experimentos de Western blot e biotinylação, a intensidade dos blots foi avaliada por densitometria óptica, utilizando o software Scion Image (imlD – Pharmacia Biotech, Uppsala, SW). Para os experimentos de Western blot os valores foram normalizados pelos valores médios das actinas de cada experimento, enquanto que para os experimentos de biotinylação os grupos foram comparados com seus respectivos controles, uma vez que a actina pertence à outra fração celular.

A análise estatística de todos os resultados foi realizada por Teste t, pareado e/ ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentou significância estatística, o teste post-hoc de Bonferroni foi aplicado. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.7 Drogas e reagentes

Nesse trabalho foram utilizadas as seguintes drogas ou reagentes:

- a) Sigma: Sacarose (0.45 M), Nigericina (0.01 mM) e Florizina (100 μ M);
- b) Calbiochem: H-89 [N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, 2HCl; 10^{-6} M];
- c) Molecular probes: 2',7'-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF/AM; 0.01 mM);
- d) Amersham: sistema de quimioluminescência para western blot e membrana de PVDF;
- e) Cultilab: soro fetal bovino e tripsina;
- f) Abcam: anticorpos monoclonal anti-NHE1 (1:1000), anti-p-NHE3 (1:2000), anti-SGLT2 (1:1000), anti- α -actina (1:10000);
- g) Jackson ImmunoResearch: anticorpos secundários anti-mouse (de 1:1000 a 1:10000) e anti-rabbit (de 1:1000 a 1:6000);
- h) Cell Signaling: anti-p-PKA (1:3000), anti-GFP (1:1000), anti-Ezrin (1:2000) e anti-NHERF1 (1:2000);
- i) anti-SGLT1 (8821; 1:3000) e seu peptídeo (0.5 μ g/ml) foram gentilmente concedidos pelo Dr. Ernest M. Wright (Universidade da Califórnia – Los Angeles);
- j) Invitrogen e Fischer Scientific: as demais drogas e reagentes.

Tabela 2 - Composição das soluções utilizadas nos experimentos com células **HEK-293**.

Reagentes	Sol.1 Baixa Glicose (5 mM)	Sol.2 Alta Glicose (25 mM)	Sol.3 BCECF Baixa Glicose	Sol.4 BCECF Alta Glicose	Sol.5 NH ₄ Cl Baixa Glicose	Sol.6 NH ₄ Cl Alta Glicose	Sol.7 Nigericina
NaCl	138	136	138	136	140	136	20
KCl	5	5	5	5	5	5	130
CaCl ₂	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1
MgCl ₂	-----	----	----	----	----	----	1
MgSO ₄	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	0,81	----
NaH ₂ PO ₄	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	----
HEPES	10	10	10	10	10	10	5
Glicose	5	25	5	25	5	25	----
NaOH	8	5	8	8	8	8	----
NH ₄ Cl	---	----	----	----	20	20	----
Nigericina	----	----	----	----	----	----	0,01
NaHCO ₃	----	----	----	----	----	----	----
BCECF	----	----	0,01	0,01	----	----	----
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	8,0	8,0	6,0 / 6,5 7,0 e 7,5

As concentrações dos reagentes estão expressas em mM. A osmolalidade das soluções estava em torno de 290-300 mOsm (Sol = Solução).

FONTE: (SILVA, 2012).

4 RESULTADOS

4.1 Primeira fase do estudo – expressão de hSGLT1-WT e mutante hSGLT1-S418H

Dados recentes de nosso laboratório (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011), juntamente com os achados de Lang et al. (2003), demonstraram que as células HEK-293 expressam, endogenamente, as duas isoformas de SGLT (SGLT1 e SGLT2) e as duas isoformas de NHE (NHE1 e NHE3). Diante deste fato, a transfecção dos recombinantes hSGLT1-wild type (WT) e hSGLT1-mutante (S418H), nessa mesma linhagem celular, permitiu que avaliássemos diferentes parâmetros sem que as características funcionais dessas células fossem prejudicadas. Além disso, com o intuito de investigar separadamente a atividade dos NHEs, foi utilizado um inibidor específico para NHE3 {3-[2-(3-guanidino-2-methyl-3-oxo-propenyl)-5-methylphenyl]-*N*-isopropylidene-2-methyl-acrylamide dihydrochloride; S3226; 100 μ M}.

4.1.1 Imunofluorescência

Uma vez que o vetor fluorescente pEGFP-N1 foi utilizado para a transfecção dos recombinantes WT ou S418H em células HEK-293, tornou-se possível, observar por imunofluorescência, a eficiência da transfecção de ambos os recombinantes, conforme apresentado na figura 24 (A, B e C). As células HEK-293 não transfectadas (NT), estão representadas somente com luz refletida e as transfectadas com WT ou S418H, representadas com a coloração verde (imagem obtida em um comprimento de onda para excitação de 488 nm). Esses resultados indicam que os recombinantes foram transfectados com sucesso, favorecendo a utilização das células transfectadas para os experimentos subsequentes.

Figura 24 - Imunofluorescência de células HEK-293 na vigência de glicose 5 mM.

A) Células HEK-293 não transfectadas (NT); B) células HEK-293 transfectadas com hSGLT1+GFP - wild type (WT); C) células HEK-293 transfectadas com hSGLT1+GFP - S418H (S418H).
 FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.2 Efeito da glicose 5 mM sobre a expressão de hSGLT1+GFP

Após a confirmação da transfecção por imunofluorescência, as células HEK-293: 1) não transfectadas (NT), 2) transfectadas com WT ou com o mutante S418H foram tratadas por 20 dias com o meio de cultura - DMEM baixa glicose (que contém glicose 5 mM). Por Western blot, se avaliou a expressão de hSGLT1 nas células NT e transfectadas com os recombinantes (WT – hSGLT1+GFP) e (mutante S418H - hSGLT1+GFP). Conforme apresentado na figura 25 (A e B), as células transfectadas apresentam alta expressão dos recombinantes quando comparado com as células não transfectadas, confirmando assim a eficiência do processo de transfecção. Além disso, pode se observar que a mutação não interferiu na expressão total de hSGLT1+GFP. No entanto, quando se avaliou, por biotinylação, a expressão dos recombinantes na membrana celular (Figura 25, C e D) se observou que a expressão do recombinante hSGLT1+GFP/S418H na membrana foi diminuída, quando comparada com o WT. Esses achados indicam que a serina 418 do hSGLT1 é essencial para coordenar a distribuição do hSGLT1 entre o citosol e a membrana.

Figura 25 - Expressão total e de membrana do hSGLT1+GFP (WT ou S418H).

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão do hSGLT1+GFP (recombinantes WT ou S418H) e actina (α -actina) em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM. Blot em gel de SDS Poliácridamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-GFP (1:1000/100 KDa); anti-actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. C) Experimento de biotilação demonstrando a expressão do GFP (recombinantes WT ou S418H + GFP) na membrana em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM. Blot em gel de SDS Poliácridamida 10% [anti-GFP (1:1000/100 KDa)]. D) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.3 Efeito da transfecção sobre a expressão total de hSGLT1 na vigência de glicose 5 mM e 25 mM

Considerando que as células HEK-293 expressam o hSGLT1 endógeno, é importante investigar se nos modelos transfectados a glicose poderia interferir na expressão das proteínas endógenas.

Como representado na figura 26 (A e B), na vigência de glicose 5 mM, a expressão total de hSGLT1 (endógeno + transfectado) não foi modificada pela transfecção dos recombinantes, indicando que nessa condição as células são capazes de modular a

expressão total de hSGLT1, a fim de garantir o transporte adequado de glicose para o seu interior.

Vale ressaltar que, para viabilizar os experimentos, 2 horas antes de expor a membrana ao anticorpo primário (overnight), esse mesmo anticorpo foi incubado junto com seu peptídeo (o qual reconhece e se liga na seqüência de aminoácidos específicos do anticorpo). Assim, ainda na figura 26 (A) é possível verificar que houve o bloqueio da banda do hSGLT1 pelo peptídeo, indicando que a banda encontrada nos experimentos que avaliam a expressão de hSGLT1 é referente a proteína.

Dados recentes de nosso laboratório (BELOTO-SILVA et al., 2011), utilizando células HEK-293 não transfectadas (NT), demonstraram que o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias dessas células com glicose 25 mM por 20 dias não modificou a expressão total de hSGLT1. Para avaliar se esse efeito do tratamento com glicose 25 mM por 20 dias se repetia nas linhagens celulares transfectadas, experimentos de Western blot foram realizados (Figura 26, C e D) e demonstram que o tratamento com alta concentração de glicose não modificou a expressão total dos recombinantes WT e S418H, indicando que as células são capazes de controlar a quantidade total de hSGLT1, mesmo aumentando a concentração extracelular do substrato.

Como um dos objetivos desse estudo foi avaliar a expressão e a localização celular das proteínas transfectadas (WT e S418H), a partir dessa etapa, as células transfectadas com o recombinante WT/hSGLT1+GFP foram consideradas grupo controle.

Figura 26 - Expressão total de hSGLT1.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de hSGLT1 e actina (α -actina) em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H. Figura representando também o bloqueio da banda do SGLT1 pelo peptídeo (SGLT1 – 8821 + peptídeo). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-SGLT1 (8821) concedido pelo Dr. Ernest M. Wright – 1:6000/ 60KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. C) Experimento de biotinylação demonstrando a expressão do SGLT1 na membrana em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM. Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% [anti-SGLT1 (1:6000/60 KDa). D) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.4 Expressão total e de membrana do hSGLT1+GFP na vigência de glicose 25 mM

Como na vigência de glicose 5 e 25 mM a expressão total de hSGLT1 não foi diferente, experimentos de Western blot e de biotilação foram realizados para identificar o hSGLT1+GFP, a fim de avaliar o efeito do tratamento com glicose 25 mM por 20 dias sobre a expressão total e de membrana apenas das proteínas transfectadas (WT e S418H). A figura 27 (A e B) demonstra que, nessa condição experimental, a expressão total de WT e S418H não foi significativamente diferente. Esses resultados indicam que as células modulam a quantidade total de proteínas, apesar da overexpressão. Além disso, a figura 27 (C e D) demonstra que a expressão desses recombinantes na membrana não foi diferente, nessa mesma condição experimental. Esses resultados indicam que na vigência de glicose 25 mM, a substituição da Serina 418 por Histidina não foi suficiente para alterar a distribuição dessa proteína na membrana celular, como acontece no tratamento com glicose 5 mM. Uma vez que as proteínas por estarem na membrana podem ser consideradas ativas, a mutação, aparentemente, não prejudica a função do SGLT1.

Figura 27 - Expressão total e de membrana do hSGLT1+GFP.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão do hSGLT1+GFP (recombinantes WT ou S418H) e actina (α -actina) em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM. Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-GFP (1:1000/100 KDa); anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. C) Experimento de biotilação demonstrando a expressão do GFP (recombinantes WT ou S418H + GFP) na membrana em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM. Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% [anti-GFP (1:1000/100 KDa)]. D) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.5 Expressão do SGLT2 na membrana

Trabalhos prévios de nosso Laboratório demonstraram que as células HEK-293 expressam também o SGLT2 (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011). Além disso, é bem descrito na literatura que o SGLT1 e o SGLT2 possuem uma cinética de transporte de glicose diferente, apesar de possuírem alta similaridade em suas sequências (> 50 %), decidiu-se avaliar se as células transfectadas com o WT ou com o S418H são capazes de alterar a expressão de SGLT2 na membrana de células tratadas com glicose 5 e 25 mM por 20 dias. Para tal, experimentos de biotinylação foram realizados e conforme apresentado na figura 28 (A e B), foi observado que o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose 25 mM reduziu a expressão de SGLT2 na membrana das células transfectadas com o mutante hSGLT1+GFP/S418H, indicando que esse tratamento favorece a permanência do hSGLT1 mutado na membrana, fato que pode estar associado com a queda na expressão do SGLT2 na mesma membrana.

Figura 28 - Expressão do SGLT2 na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de SGLT2 em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 (G 5) ou 25 mM (G 25). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% [anti-SGLT2 (abcam – 1:1000/ 70KDa. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels.* $p < 0.05$ G5 vs G25 em células transfectadas com S418H.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.6 Efeito da PKA sobre a distribuição celular do hSGLT1+GFP e SGLT2

Considerando que a Serina 418 do SGLT1 pode ser um sítio modulado pela PKA (SUBRAMANIAN et al., 2009; WRIGHT et al., 1997), se avaliou a possibilidade do tratamento com glicose 25 mM por 20 dias ativar essa cinase. Para tal, utilizando experimentos de Western blot, se analisou a expressão total da PKA em sua forma ativa (fosforilada), tanto em células transfectadas com WT quanto com S418H. A figura 29 (A e B) mostra que a expressão de PKA fosforilada foi semelhante em células transfectadas com WT e com S418H, indicando que o tratamento com glicose 25 mM ativa a PKA, independentemente da proteína transfectada.

Figura 29 - Efeito da glicose sobre a expressão da PKA fosforilada (p-PKA)

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de PKA fosforilada (p-PKA) e actina (α -actina) em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-p-PKA (cell signaling – 1:3000/ 55 KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)] α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. FONTE: (SILVA, 2012).

O passo seguinte foi avaliar se na vigência de glicose 25 mM por 20 dias, a PKA está envolvida, com a permanência do mutante S418H e a queda do SGLT2 na membrana celular. Para tal, as células tratadas com glicose 25 mM receberam também um tratamento adicional com H-89 (inibidor de PKA; 10^{-6} M) e em seguida, foram submetidas aos experimentos de biotilação para hSGLT1+GFP (WT ou S418H). A figura 30 (A e B) demonstra que a inibição da PKA não diminuiu o efeito do tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose 25 mM sobre a expressão de WT ou S418H na membrana. Esses resultados indicam

que nessa condição, a PKA, não parece estar envolvida com a expressão da proteína mutante na membrana. Esses dados reforçam a importância da Serina 418 para o papel da PKA sobre distribuição do SGLT1, mas não exclui a possibilidade de outra via intracelular atuar sobre o SGLT1.

Além disso, a inibição da PKA reverteu, significativamente ($\sim 84\%$), o efeito do tratamento com glicose 25 mM por 20 dias sobre a expressão de SGLT2 na membrana (Figura 31, A e B). Esses resultados indicam que a distribuição do SGLT2, nessa condição experimental, é modulada pela PKA.

Figura 30 - Efeito da PKA sobre a expressão de GFP na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de hSGLT1+GFP em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + H-89 (10^{-6} M, inibidor da PKA, G 25 + H-89). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-GFP (abcam – 1:1000/ 100KDa). N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. FONTE: (SILVA, 2012).

Figura 31 - Efeito da PKA sobre a expressão de SGLT2 na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de SGLT2 e em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + H-89 (10^{-6} M, inibidor da PKA, G 25 + H-89). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% (anti-SGLT2 (abcam – 1:1000/ 100KDa). N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ WT (G 25) vs S418H (G 25); # $p < 0.05$ S418H (G 25) vs S418H (G 25 + H-89). FONTE: (SILVA, 2012).

Juntos, esses resultados indicam que, em células HEK-293 transfectadas com S418H, o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias: favorece a translocação da proteína mutante do citosol para a membrana celular, portanto a serina 418 é essencial para a reciclagem do SGLT1, permite a modulação da expressão do SGLT2 na membrana via PKA e, mostra que a distribuição do SGLT1 entre o citosol e a membrana celular pode ser regulada por outros fatores intracelulares.

4.1.7 Presença do receptor de glicose (GPR1)

Considerando o efeito da glicose sobre a fosforilação da PKA nos resultados acima descritos, surgiu uma questão: como a glicose extracelular seria capaz de ativar a PKA, que está presente no meio intracelular? Estudos recentes em leveduras demonstraram a presença de um sensor de glicose denominado GPR1 (G protein receptor – isoforma 1), o qual ativa a PKA, pois é sensível a alterações na concentração de glicose no meio extracelular (KIM et al., 2006). Considerando o fato de que diversos genes de leveduras são conservados em humanos, experimentos de RT-PCR foram realizados (SENSE: 5'CTGGTGTTATATTGTTTGGC 3'/ANTISENSE: 5'CATGCTTCTGAAAATTGTTATAGC3' - de acordo com o gi: 45709641 – anexo 2), a fim de investigar a presença de RNA mensageiro para esse receptor, em células HEK-293 não transfectadas (Figura 32, A e B). Os resultados indicam que essas células possuem RNA mensageiro (RNAm) para o GPR1, indicando que esse receptor pode ativar a PKA nessa linhagem celular.

Figura 32 - Figura representativa dos experimentos de RT-PCR para GPR1.

Figura representativa dos experimentos de RT-PCR os quais foram utilizados cDNAs de células HEK-293 e de células MDCK (controle negativo). Após a reação de PCR as amostras correram em gel de agarose (1%) por eletroforese. cDNA de HEK-293 (459 pb / n=2); cDNA de células MDCK – controle negativo. M = marcador (1 Kb DNA Ladder); pb = pares de bases.
 FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.8 Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão da PKA fosforilada

Dessa forma, o passo seguinte foi avaliar se o GPR1 está envolvido com a ativação da PKA durante o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias das células com glicose. Estudos em leveduras demonstraram que esse receptor pode ser inibido por manose (LEMAIRE et al., 2004) e que esse açúcar não é transportado pelo SGLT1 e 2 (WRIGHT et al., 2011). Dessa forma, experimentos de Western blot foram realizados para avaliar a expressão da PKA fosforilada, em células transfectadas com WT ou S418H, no tratamento com glicose 25 mM por 20 dias na ausência ou presença de manose (50 mM). A figura 33 (A e B) demonstra que a manose inibiu a ativação da PKA, tanto em células transfectadas com WT quanto com o mutante S418H, indicando que nesse tratamento, possivelmente, a ativação dessa cinase ocorre via ativação do GPR1, na membrana celular.

Figura 33 - Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão total da PKA fosforilada.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de PKA fosforilada (p-PKA) e actina (α -actina) em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + manose (50 mM; G 25 + Man). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-p-PKA (cell signaling – 1:3000/ 55 KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ G 25 dos grupos WT ou S418H vs G 25 + manose de seus respectivos grupos de células.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.9 Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão do hSGLT1+GFP

Para avaliar se a inibição do GPR1 poderia modificar a expressão total das proteínas transfectadas (WT ou S418H), experimentos de Western blot foram realizados no tratamento com glicose 25 mM por 20 dias na ausência ou vigência de manose (50 mM). A figura 34 (A e B) demonstra que nessas condições experimentais, a expressão total de WT e S418H não foi modificada, indicando que o efeito da inibição do GPR1 pela manose altera apenas a via de sinalização ativada pelo receptor, sem alterar a expressão do SGLT1.

Figura 34 - Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão total do hSGLT1+GFP.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de hSGLT1+GFP e α -actina em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + manose (50 mM; G 25 + Man). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-GFP (abcam – 1:1000/ 100KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.10 Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão de hSGLT1+GFP na membrana

Considerando que a via da PKA, nesse modelo experimental (células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H), parece ser modulada pela ativação do GPR1, o próximo passo foi avaliar se a inibição do GPR1 poderia modificar a expressão de WT e S418H na membrana celular, o que tornaria possível avaliar uma interação da PKA com o hSGLT1 (via ativação do GPR1 pela glicose), modificando a distribuição celular desse transportador. Para tal, experimentos de biotinylation foram realizados, em células transfectadas com WT ou S418H e tratadas com glicose 25 mM na ausência ou vigência de manose (50 mM). Os resultados estão representados na figura 35 (A e B), a qual demonstra que a inibição do GPR1 diminuiu (~ 60 %) a expressão do mutante S418H na membrana. Se a inibição da PKA (pelo uso de H-89) não modificou a expressão de S418H, esses dados com manose postulam que a inibição da via desde seu início tem um efeito diferenciado, sugerindo a participação de outro efector do AMPc, como Epac. Além disso, esses resultados reforçam o importante papel da Serina 418 na atuação da PKA sobre a distribuição do SGLT1.

Figura 35 - Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão do hSGLT1+GFP na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de hSGLT1+GFP e α -actina em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + manose (50 mM; G 25 + Man). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-GFP (abcam – 1:1000/ 100KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. # $p < 0.05$ S418H (G 25) vs S418H (G 25 + Man).

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.11 Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão do SGLT2 na membrana

Com o intuito de investigar um possível efeito da manose também sobre a expressão do SGLT2 na membrana celular, experimentos de biotinilação foram realizados. Conforme apresentado na figura 36 (A e B), a manose induziu aumento na expressão de SGLT2 na membrana, resultado semelhante ao encontrado com de H-89, ou seja, a via de ativação da PKA foi inibida por manose, indicando que essa cinase pode ser ativada por GPR1 e tem sua atuação sobre a distribuição do SGLT2 entre o citosol e a membrana celular.

Figura 36 - Efeito da inibição do GPR1 sobre a expressão do SGLT2 na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de SGLT2 em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + manose (50 mM; G 25 + Man). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% [anti-SGLT2 (abcam – 1:1000/ 70KDa)]. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ WT (G 25) vs S418H (G 25); # $p < 0.05$ S418H (G 25) vs S418H (G 25 + Man).

FONTE: (SILVA, 2012).

4.1.12 Participação da clatrina e da caveolina na distribuição do hSGLT1+GFP na membrana

Para avaliar se a distribuição do WT e do S418H do citosol para membrana poderia ser influenciada por proteínas que facilitam a inserção ou remoção de transportadores na/da membrana, experimentos de biotinilação foram realizados em células transfectadas com WT ou S418H tratadas com glicose 25 mM por 20 dias na ausência ou vigência de Filipina (inibidor da caveolina, 0.5 $\mu\text{g/ml}$) ou Sucrose (inibidor da clatrina, 0.45 M). A figura 37 (A e B) demonstra que a expressão de WT e S418H na membrana não foi modificada pela inibição

da caveolina. Esses resultados indicam que a caveolina não está envolvida com a remoção do hSGLT1 da membrana, ou mesmo, que essa via não sofre ação de efetores do AMPc. Além disso, a inibição da clatrina também não foi capaz de modificar a expressão dessas proteínas transfectadas na membrana celular (Figura 38, A e B), indicando que, provavelmente, o efeito da PKA ou de outros efetores do AMPc sobre a expressão de SGLT1 podem ser diretos.

Figura 37 - Efeito da inibição do caveolina sobre a expressão do hSGLT1+GFP na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de hSGLT1+GFP em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + Filipina (5 µg/ml; G 25 + Fil). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 µg de proteína [anti-GFP (abcam – 1:1000/ 100KDa)]. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels.
 FONTE: (SILVA, 2012).

Figura 38 - Efeito da inibição da clatrina sobre a expressão do hSGLT1+GFP na membrana.

A) Experimento de Biotinilação demonstrando a expressão na membrana de hSGLT1+GFP em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25) ou na vigência de glicose 25 mM + Sucrose (0.45 M; G 25 + Suc). Blot em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 µg de proteína [anti-GFP (abcam – 1:1000/ 100KDa)]. N° de experimentos = 3. B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels.
 FONTE: (SILVA, 2012).

4.2 Segunda fase do estudo – análise da atividade dos NHE'S

4.2.1 Avaliação da recuperação do pH_i na vigência de glicose 5 mM

Todos os resultados obtidos até essa etapa levam à hipótese de que as células HEK-293 (após 20 dias de tratamento com glicose 25 mM) ao serem transfectadas com WT ou com S418H (mesmo expressando o SGLT1 endógeno) são capazes de modular a expressão das proteínas endógenas, frente a uma sobrecarga extracelular de glicose. Além disso, a expressão das proteínas transfectadas na membrana é modulada por diferentes fatores, incluindo a PKA e, possivelmente, outros efetores do AMPc (como Epac). Isso se deve ao fato de que a

ativação desses efetores depende da presença do GPR1, presente na membrana celular, o qual é capaz de sentir a concentração de glicose no meio extracelular.

Considerando que nesse estudo as células HEK-293 foram transfectadas, experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados na vigência de glicose 5 mM, a fim de avaliar se a transfecção, em si, poderia modificar a $dpHi/dt$. A figura 39 representa a média desses experimentos e demonstra que não houve diferença significativa na atividade dos NHEs em células transfectadas com WT e S418H, quando comparadas com as células NT. Esses resultados indicam que o processo de transfecção não prejudicou a capacidade de recuperação do pHi nessas células, frente a uma sobrecarga ácida, fato que viabilizou os demais experimentos de medida de recuperação do pHi , utilizando as células HEK-293 transfectadas.

Figura 39 - Efeito da transfecção do WT e S418H sobre a velocidade de recuperação do pHi .

Média dos experimentos de velocidade de recuperação do pHi ($dpHi/dt$) realizados na vigência de glicose 5 mM. Os registros foram obtidos nos dois primeiros minutos de recuperação do pHi , após o pulso ácido com NH_4Cl . Experimentos realizados em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H. N° de experimentos = 7.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.2.2 Efeito da glicose 25 mM sobre a recuperação do pHi

Experimentos anteriores de nosso laboratório utilizando células HEK-293 não transfectadas, demonstraram que o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose foi capaz de aumentar a velocidade de recuperação do pHi - $dpHi/dt$ (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011). Assim, para avaliar se o efeito estimulatório do tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose sobre a velocidade de recuperação do pHi permanece em células transfectadas, experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados nessa mesma condição experimental (tratamento com glicose 25 mM por 20 dias). A figura 40 demonstra que, diferentemente do esperado, em células transfectadas, o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias diminuiu significativamente a velocidade de recuperação do pHi.

Figura 40 - Efeito da glicose 25 mM sobre a velocidade de recuperação do pHi.

Média dos experimentos de velocidade de recuperação do pHi ($dpHi/dt$) realizados na vigência de glicose 25 mM. Os registros foram obtidos nos dois primeiros minutos de recuperação do pHi, após o pulso ácido com NH_4Cl . Experimentos realizados em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H. N° de experimentos = 5 - 7. * $p < 0.05$ células NT vs células transfectadas com WT ou S418H.

FONTE: (SILVA, 2012).

Considerando que, dependendo da transfecção dos recombinantes WT ou S418H, o tratamento com glicose é capaz de induzir, no mesmo tipo celular, diferentes respostas sobre a dpH_i/dt , uma questão foi levantada: qual isoforma de NHE (NHE1 ou NHE3) seria responsável por tais respostas? Inicialmente, utilizando células HEK-293 NT, experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados no tratamento com glicose 25 mM por 20 dias na ausência ou vigência de S3226 (100 μ M; inibidor específico do NHE3). A figura 41 representa a média dos valores desses experimentos e demonstra que o uso de S3226 inibiu cerca de 70% do efeito estimulatório sobre a velocidade de recuperação do pH_i , induzido pelo tratamento com glicose 25 mM por 20 dias. Esses resultados indicam que, em células HEK-293 NT, cerca de 70% da atividade total dos NHEs corresponde à atividade de NHE3 e que, provavelmente, a estimulação da velocidade de recuperação, observada no tratamento com glicose 25 mM por 20 dias, deve-se ao aumento da atividade dessa proteína.

Figura 41 - Efeito da inibição do NHE3 sobre a velocidade de recuperação do pH_i .

Média dos experimentos de velocidade de recuperação do pH_i (dpH_i/dt) realizados com glicose 25 mM na ausência ou vigência de S3226 (100 μ M, inibidor do NHE3). Os registros foram obtidos nos dois primeiros minutos de recuperação do pH_i , após o pulso ácido com NH_4Cl . Experimentos realizados em células HEK-293 não transfectadas (NT). N° de experimentos = 6 - 7. * $p < 0.05$ células NT sem inibidor vs células NT com inibidor.
FONTE: (SILVA, 2012).

Para avaliar se, em células HEK-293 transfectadas, o efeito inibitório induzido pelo tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose sobre a velocidade de recuperação do pH_i depende da inibição da atividade do NHE3, esses mesmos experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados em células transfectadas com hSGLT1+GFP (WT ou S418H). A figura 42 demonstra que o S3226 amplificou o efeito inibitório induzido pelo tratamento, indicando que, em células transfectadas, o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias diminui a atividade de NHE3.

Figura 42 - Efeito da inibição da atividade do NHE3 sobre a velocidade de recuperação do pH_i .

Média dos experimentos de velocidade de recuperação do pH_i (dpH_i/dt) realizados com glicose 25 mM na ausência ou vigência de S3226 (100 μ M, inibidor do NHE3). Os registros foram obtidos nos dois primeiros minutos de recuperação do pH_i , após o pulso ácido com NH_4Cl . Experimentos realizados em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H. N° de experimentos = 5 - 7. * $p < 0.05$ células NT, WT ou S418H sem inibidor vs seus respectivos grupos de células com inibidor.

FONTE: (SILVA, 2012).

Considerando que, o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias ativa a PKA (via GPR1) e que o NHE3 é modulado (além de outros fatores) por essa cinase, o passo seguinte foi avaliar em células transfectadas, se a PKA está envolvida com o efeito inibitório da velocidade de recuperação do pH_i , induzido pelo tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose na ausência ou vigência de H-89 (10^{-3} M, inibidor da PKA). A figura 43

demonstra que o efeito inibitório induzido pelo tratamento com glicose 25 mM por 20 dias sobre a dpH_i/dt foi revertido somente em células transfectadas com WT. Em células transfectadas com S418H, possivelmente, outras vias de sinalização dependentes de AMPc podem ter sido ativadas na tentativa de compensar as modificações da distribuição do SGLT1 mutado. Assim, essas vias podem determinar outra resposta do NHE3, perante a inativação da PKA.

Figura 43 - Efeito da inibição da PKA sobre a velocidade de recuperação do pH_i .

Média dos experimentos de velocidade de recuperação do pH_i (dpH_i/dt) realizados com glicose 25 mM na ausência ou vigência de H-89 (10^{-6} M, inibidor da PKA). Os registros foram obtidos nos dois primeiros minutos de recuperação do pH_i , após o pulso ácido com NH_4Cl . Experimentos realizados em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H. N° de experimentos = 5 - 7. * $p < 0.05$ células WT vs células WT com inibidor. FONTE: (SILVA, 2012).

4.2.3 Análise da expressão de NHE1 total e NHE3 fosforilado

É conhecido que alterações na atividade de diversas proteínas de transporte podem estar vinculadas tanto com alterações na expressão quanto com modulações na ativação das vias de sinalização intracelular. Dessa forma, considerando que na situação controle a atividade dos NHEs em células transfectadas não é modificada, experimentos de Western blot foram realizados nessa mesma condição experimental, a fim de avaliar a expressão total das duas isoformas de trocador (NHE1 e NHE3). Como observado na figura 44 (A e B), houve um aumento significativo da expressão total de NHE1 em células transfectadas, quando comparado com as NT no tratamento com glicose 5 mM.

Considerando que o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose 25 mM diminui a $dpHi/dt$ em células transfectadas e que na vigência de glicose 5 mM existem alterações na expressão total de NHE1, passo seguinte foi avaliar se o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose modifica a expressão da isoforma 1 do NHE. A figura 44 (C e D) também demonstra que o aumento da expressão do NHE1 (observado na vigência de glicose 5 mM) foi mantido no tratamento com glicose 25 mM, somente em células transfectadas com WT.

Figura 44 - Expressão total de NHE1.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de NHE1 e actina (α -actina) em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM (G 5). B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ células NT vs células WT ou S418H. C) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de NHE1 e actina (α -actina) em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM (G 5) ou 25 mM (G 25). D) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ células S418H na vigência de glicose 5 mM vs células S418H na vigência de glicose 25 mM. Todos os blots foram realizados em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-NHE1 (abcam – 1:1000/ 90KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

Considerando que nessa mesma linhagem celular, grande parte da atividade dos NHEs corresponde à atividade do NHE3, provavelmente, quando essa proteína está inibida há uma resposta compensatória da célula induzindo o aumento da expressão do NHE1. Essas modificações na expressão permitem que os valores da velocidade de recuperação do pH_i na presença de glicose 5 mM, não sofram alterações, mantendo assim, a capacidade de resposta celular, frente a uma sobrecarga ácida.

Para avaliar a hipótese de que alterações na expressão de NHE1 estão vinculadas à alterações na atividade do NHE3, experimentos de Western blot foram realizados no tratamento com glicose 5 mM e 25 mM, a fim de avaliar a expressão do NHE3 fosforilado em células transfectadas com WT ou S418H. Vale ressaltar que, para detectar o NHE3 foi utilizado um anticorpo que reconhece somente as proteínas que estão fosforiladas, indicando a inibição do NHE3.

A figura 45 (A e B) demonstra que houve um aumento da expressão do NHE3 fosforilado, induzido pelo tratamento com glicose 5 mM. Além disso, a figura 45 (C e D) demonstra que esse aumento da expressão do NHE3 fosforilado permaneceu somente em células transfectadas com S418H, enquanto que esse parâmetro foi revertido em células transfectadas com WT.

Em conjunto, esses resultados indicam que as respostas inibitórias induzidas pelo tratamento com glicose 25 mM por 20 dias com glicose sobre a dpH_i/dt estão intimamente relacionadas com mudanças na expressão de NHE1 e NHE3. De forma geral, os resultados obtidos nas figuras 44 e 45 podem representar uma resposta conjunta dos NHEs (1 e 3) frente a uma sobrecarga ácida, ou seja, se a atividade do NHE3 diminuir, a expressão do NHE1 pode aumentar.

Figura 45 - Expressão de NHE3 fosforilado (p-NHE3).

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão de NHE3 fosforilado (p-NHE3) e α -actina em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM (G 5). B) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ células NT vs células WT ou S418H. C) Experimento de Western blot demonstrando a expressão de p-NHE3 e α -actina em células HEK-293 transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM (G 5) ou 25 mM (G 25). D) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. * $p < 0.05$ células WT na vigência de glicose 5 mM vs células WT na vigência de glicose 25 mM. Todos os blots foram realizados em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-NHE3 (abcam – 1:3000/ 85 KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

4.2.4 Análise da expressão de fatores modulatórios da atividade dos NHE's

É conhecido que tanto o NHE1, como o NHE3 podem ser regulados por diversos fatores, como vias de sinalização intracelular [efetores do AMPc (como Epac e PKA) e PKC] e fatores próprios de regulação desses transportadores (como os NHERF1 e 2). Foi também demonstrado que a PKA depende de proteínas ancoradoras, como as AKAP's que direcionam essa cinase para a proteína alvo. Uma das AKAP's descritas é a ezrin (proteína constituinte do

citoesqueleto), além das AKAP's: 1 e 2, que estão presentes no tecido renal. Dessa forma, para avaliar se todas essas proteínas poderiam estar envolvidas com as modificações na expressão dos NHE's e, conseqüentemente, na atividade desses transportadores na presença de diferentes tratamentos com glicose, experimentos de RT-PCR (para confirmar a presença de RNAm para AKPs e Epacs) e Western blot foram realizados.

A figura 46 (A e B) representa experimentos de RT-PCR realizados em células HEK-293 NT. Esses experimentos demonstram que essas células possuem RNAm para Epac1, além de AKAP1 e 2. Não foi detectado nesse tipo celular a isoforma 2 da Epac. Não foram realizados experimentos de RT-PCR para detectar a expressão de RNAm para ezrin, pois essa proteína é constituinte do citoesqueleto, estando portanto, presente na maioria das células. No entanto, foram realizados experimentos de Western blot para avaliar a expressão de ezrin em células HEK-293 NT e transfectadas com WT ou S418H na presença de glicose 5 ou 25 mM. A figura 47 (A e B) demonstra que a expressão de ezrin não foi modificada tanto pela transfecção quanto pelo tipo de tratamento com glicose.

A figura 48 (A e B) demonstra que a expressão de NHERF1 aumenta no tratamento com glicose 5 mM em células WT e S418H, quando comparadas com NT. Além disso, esse aumento foi revertido quando as células WT e S418H foram tratadas com glicose 25 mM.

Esses resultados indicam que a maquinaria intracelular das células HEK-293 é extensa e depende da ativação de diferentes vias de sinalização intracelular que podem ser ativadas por glicose.

Figura 46 - Figura representativa dos experimentos de RT-PCR para Epac (1 e 2) e AKAP (1 e 2).

Experimentos utilizando cDNAs de células HEK-293 não transfectada (NT). Após a reação de PCR as amostras correram em gel de agarose (1%) por eletroforese. EPAC1 (134 pb); EPAC2 (273 pb); AKAP1 (336 pb) e AKAP2 (280 pb). M = marcador (1 Kb DNA Ladder); pb = pares de bases.

FONTE: (SILVA, 2012).

Figura 47 - Expressão total de ezrin.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de ezrin e actina (α -actina) em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM (G 5). B) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de ezrin e actina (α -actina) em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25). C) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. Todos os blots foram realizados em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-ezrin (cell signaling – 1:2000/ 81 KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

Figura 48 - Expressão total de NHERF1.

A) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de NHERF1 e α -actina em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM (G 5). B) Experimento de Western blot demonstrando a expressão total de NHERF1 e α -actina em células HEK-293 não transfectadas (NT) e transfectadas com WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM (G 25). C) Gráfico representando os valores médios da densidade de pixels. [#] $p < 0.05$ células NT na vigência de glicose 5 mM vs células WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM. ^{*} $p < 0.05$ células WT ou S418H na vigência de glicose 5 mM vs células WT ou S418H na vigência de glicose 25 mM. Todos os blots foram realizados em gel de SDS Poliacrilamida 10% com 50 μ g de proteína [anti-NHERF1 (cell signaling – 1:2000/ 50KDa; anti- α -actina (abcam – 1:5000/ 43KDa)]. α -actina = controle positivo. N° de experimentos = 3.

FONTE: (SILVA, 2012).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1 Primeira fase do estudo – hSGLT1-WT, hSGLT1-S418H e SGLT2

Para o desenvolvimento desse estudo o RNAm total das células Caco2 foi extraído, a fim de obter o cDNA do hSGLT1 (SGLT1 humano). Técnicas de biologia molecular foram utilizadas para que os recombinantes de hSGLT1: 1) wild type (WT) e 2) mutante (S418H - troca da Serina 418 por Histidina) fossem clonados no vetor de expressão pEGFP-N1. Vale ressaltar que, antes do processo de transfecção desses recombinantes no modelo celular escolhido, a integridade estrutural dos mesmos foi analisada através do sequenciamento de seus aminoácidos.

Contudo, a eficiência da transfecção não depende apenas dos parâmetros acima descritos, mas também, das características particulares de cada linhagem celular, o que pode levar a algumas dificuldades durante a escolha do modelo celular adequado. Recentemente, as células HEK-293 foram utilizadas para outros estudos do nosso laboratório, os quais demonstraram, através de experimentos de RT-PCR e Western blot, que essas células expressam endogenamente, tanto SGLT1 e SGLT2 quanto NHE1 e NHE3 (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011). Assim, no estudo atual, as mesmas células foram utilizadas para transfectar os recombinantes WT e S418H (clonados no vetor pEGFP-N1). Como as células HEK-293 responderam adequadamente ao processo de transfecção, o uso dessa técnica permitiu a avaliação de alterações na distribuição das proteínas transfectadas.

Outro aspecto importante foi a base científica para a escolha e, consequentemente, troca do aminoácido Serina 418 por Histidina. Em 1997 Wright et al. ao sugerirem a estrutura secundária do hSGLT1, demonstraram que a Serina 418, presente na alça citoplasmática entre o domínio transmembrana (TM) 9 e 10 do hSGLT1, pode ser fosforilada pela proteína cinase A (PKA) (WRIGHT et al., 1997). Além disso, recentemente, Wright; Loo e Hirayama (2011) propuseram uma nova estrutura secundária para esse transportador baseada na resolução da estrutura cristalográfica do vSGLT1 (*Vibrio parahaemolyticis*), realizada por Faham et al. (2008). Um aspecto importante dessa “nova” estrutura secundária é o fato de que o TM 9 é mais prolongado que os demais e que, aparentemente, encontra-se na membrana em uma posição mais transversal que os outros domínios dessa proteína. Para validar a hipótese de que a Serina 418 poderia ser fosforilada pela PKA, esse aminoácido deveria estar presente na alça citoplasmática do SGLT1. Assim, com essa “nova” estrutura foi possível confirmar que,

apesar das mudanças no TM 9, a localização da Serina 418 permanece na alça citoplasmática (entre o TM 9 e 10 do SGLT1).

Dessa forma, após determinar que as proteínas transfectadas (WT e S418H) foram expressas adequadamente nas células HEK-293, a próxima etapa foi avaliar se houve diferença na Expressão total dessas proteínas no tratamento dessas células com glicose 5 mM por 20 dias. Os resultados indicaram que, nessa condição experimental, a expressão total de WT e S418H não foi alterada, bem como a expressão total de SGLT1, a qual inclui as proteínas endógenas. Juntos, esses resultados indicam que, no tratamento com glicose 5 mM, as células são capazes de acionar mecanismos de regulação intracelular para modular a expressão das proteínas. Esses achados estão de acordo com os de THIEME et al. (2008), os quais sugerem que a overexpressão do receptor 1 para angiotensina II (AT1), em células MDCK, induz um ajuste dos mecanismos intracelulares, a fim de manter o mesmo “pool” de proteínas.

Para confirmar a hipótese de que as células regulam a expressão total das proteínas, experimentos de biotinylation (para avaliar a expressão das proteínas na membrana) foram realizados em células transfectadas com WT e S418, no tratamento com glicose 5 mM por 20 dias. Esses resultados demonstraram que somente a expressão de S418H na membrana foi diminuída nessa condição experimental, reforçando nossa hipótese de que as células regulam a expressão total, mas a expressão dessas proteínas na membrana pode ser diferente.

Como o intuito desse estudo foi investigar a distribuição do SGLT1 no tratamento com glicose 25 mM por 20 dias, a partir dessa etapa as células HEK-293 transfectadas com WT foram consideradas como grupo controle, uma vez que a detecção das proteínas transfectadas, e consequentemente, separação dessas e das endógenas, somente foi possível pela transfecção com GFP.

Dados recentes de nosso laboratório (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011) demonstraram que o tratamento crônico com glicose (tratamento com glicose 25 mM por 20 dias) aumentou a expressão de SGLT1 na membrana sem alterar sua expressão total, em células HEK-293 não transfectadas (NT). Nesse estudo atual, utilizando células HEK-293 transfectadas com WT ou S418, o mesmo tratamento não modificou a expressão total, tanto de SGLT1 (que inclui as proteínas endógenas) quanto das proteínas transfectadas. No entanto, o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias reverteu o efeito do tratamento com glicose 5 mM sobre a expressão de S418H na membrana e, concomitantemente, diminuiu a expressão de SGLT2 na membrana, somente em células transfectadas com S418H.

Nossos resultados sugerem que, durante os 20 dias de tratamento, as proteínas WT podem ter sua distribuição celular modulada pela PKA, uma vez que a Serina 418 parece ser um importante sítio de fosforilação da PKA no SGLT1. Essa hipótese pode ser observada com o SGLT1 endógeno. Já as proteínas S418H, por possuírem a troca da Serina 418 por Histidina, podem apresentar sua distribuição celular comprometida pela mutação, não sendo direcionada para a membrana celular, no tratamento com glicose 5 mM e, ainda, a sua distribuição para a membrana pode ser modulada por outros fatores intracelulares, que não PKA, mantendo essa proteína na membrana, no tratamento com glicose 25 mM. Esses achados indicam que a Serina 418 pode estar envolvida com o processo de distribuição do SGLT1 do citosol para a membrana, pela ação da PKA.

Outro aspecto importante é o fato de que o tratamento com glicose 25 mM, bem como a mutação, não prejudicam a regulação celular da expressão do SGLT1 endógeno, a qual favorece a diminuição da expressão do SGLT2 na membrana. Esses dados corroboram com os achados anteriores do nosso laboratório, realizados em células HEK-293 NT, os quais demonstraram que a distribuição celular do SGLT1 é diferente da do SGLT2, dependendo do estímulo extracelular (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011). Por exemplo, na situação controle (glicose 5 mM por 20 dias), a expressão de SGLT2 na membrana é superior à expressão de SGLT1, enquanto que no tratamento crônico (glicose 25 mM por 20 dias) existe um aumento significativo da expressão de ambas as proteínas na membrana. Portanto, nesse atual estudo, independente do recombinante de SGLT1 transfectado (WT ou S418H), em células que possuem as duas isoformas de SGLT, existe um balanço da expressão de SGLT1 e 2 na membrana.

Considerando que diversos pesquisadores utilizam em seus estudos somente uma das isoformas de SGLT para obterem seus resultados, nossos achados são importantes para o entendimento da manutenção da homeostase celular de glicose através da modificação dos mecanismos de distribuição celular do SGLT1 e 2, em células que possuem essas duas isoformas. Considerando que essas duas proteínas (SGLT1 e 2) possuem cinética de transporte diferente, mecanismos de modulação da expressão e da atividade desses transportadores têm sido intensamente estudados, a fim de criar uma visão geral da dinâmica celular dessas proteínas no transporte de glicose.

Baseado em nossos estudos anteriores (utilizando células HEK-293 NT), os quais demonstraram que a inibição da PKA no tratamento crônico (glicose 25 mM por 20 dias) não alterou o aumento da expressão de SGLT1 na membrana (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011), os achados atuais levantaram a hipótese de uma possível

participação da PKA na distribuição do SGLT1 do citosol para a membrana dependente da Serina 418, uma vez que a mutação, no tratamento com glicose 5 mM, não permitiu o deslocamento da proteína (S418H) para a membrana, assim como o WT e a inibição da PKA não teve efeito sobre a distribuição do S418H.

Diversos estudos têm proposto a regulação da atividade do SGLT1 por proteínas cinases A e C (CASTANEDA-SCEPPA; SUBRAMANIAN; CASTANEDA, 2010; KIPP et al., 2003; SUBRAMANIAN et al., 2009; VEYHL et al., 2003). Alguns autores propõem que essa regulação pode ser direta, por fosforilação de aminoácidos específicos do SGLT1, como a Serina 418 (SUBRAMANIAN et al., 2009), enquanto que para outros é indireta, por modulação da quantidade de proteínas na membrana (KIPP et al., 2003; WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011).

Independentemente da forma como acontece a regulação da atividade do SGLT1 (direta ou indiretamente), anteriormente a isso, a via de sinalização das proteínas cinases, como por exemplo, a da PKA, precisa ser ativada. Dyer et al. (2003) sugeriram que a regulação da expressão do SGLT1 intestinal (em ovelhas) era mediada por um sensor que inicia uma via de sinalização intracelular (AMPc – PKA), no entanto, essa via para ser ativada dependeria de diversos dias de tratamento com alta concentração de glicose. Assim, com base nessas especulações, a forma como a glicose extracelular poderia ser “sentida” na membrana celular, para ativar uma via de sinalização intracelular, foi indagada por nosso grupo de pesquisa.

Uma das hipóteses sugeridas pelo nosso grupo inclui a via clássica de metabolização da glicose (glicólise). Nesse caso, a glicose que entra na célula (seja pelo SGLT1 ou pelo SGLT2), é metabolizada no ciclo de Krebs (por ação enzimática – através das hexocinases) aumentando assim, os níveis de Adenosina Trifosfato (ATP) e Adenosina Monofosfato cíclico (AMPc) intracelulares (NELSON; COX, 2008). Outra hipótese seria a presença de um sensor para glicose, presente na membrana celular, o qual seria capaz de detectar modificações nas concentrações extracelulares de glicose. Estudos demonstraram, em leveduras, a presença de um sensor de glicose extracelular denominado GPR1 (KIM; JOHNSTON, 2006). Esse sensor é um receptor acoplado a Proteína G que, ao ser ativado, aumenta a concentração de AMPc intracelular e consequentemente ativa a PKA, a qual aumenta a expressão dos transportadores de glicose. Considerando que muitos genes de leveduras são conservados em células de mamíferos, em nosso estudo, utilizando a técnica de RT-PCR foi demonstrada a presença de RNA mensageiro (RNAm) para o GPR1 em células HEK-293.

Para confirmar a participação da PKA em qualquer resposta sobre a expressão das proteínas transfectadas e do SGLT2, foi avaliado se o tratamento com glicose 25 mM por 20 dias seria capaz de alterar a expressão da PKA fosforilada (forma ativa da PKA) em células HEK-293 transfectas com WT ou S418H. Os resultados indicaram que a ativação da PKA existe nessa condição experimental e que não é modificada de acordo com o tipo de recombinante transfectado. Além disso, a inibição da PKA não apresentou efeito sobre o aumento da expressão de S418H na membrana induzido pelo tratamento com glicose 25 mM por 20 dias, mas reverteu o efeito inibitório desse tratamento sobre a expressão do SGLT2. Esses resultados indicam que, na ausência da PKA, essas proteínas transportadoras podem ser reguladas por outros fatores e que, aparentemente, a Serina 418 é importante somente para a ação da PKA sobre a distribuição do SGLT1.

A presença de sítios de fosforilação para proteína cinase C (PKC) no SGLT1 pode ser um dos fatores envolvidos na modulação dos SGLTs na ausência da PKA (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2007). Estudos têm demonstrado a participação da PKC na modulação da distribuição celular de SGLT1 (CASTANEDA-SCEPPA; SUBRAMANIAN; CASTANEDA, 2010; VEYHL et al., 2003), além de relacionarem a ativação dessa cinase com a diminuição da expressão desse transportador na membrana celular (HIRSCH; LOO; WRIGHT, 1996). Juntos, esses achados indicam que, na ausência da PKA, pode existir uma participação da PKC fosforilando outros resíduos de aminoácidos do SGLT1, a qual diminui a expressão do S418H na membrana, na ausência da PKA.

Outro aspecto importante é a de que dados da literatura tem discutido a formação de microdomínios de AMPc (formados pelo aumento da sua concentração local – próximo ao receptor), os quais são capazes de ativar outros efetores de AMPc, com exceção da PKA, como Epacs (Exchange protein directly activated by cAMP) e canais iônicos ativados por AMPc (De ROOIJ et al., 1998; KAWASAKI et al., 1998; NAKAMURA; GOLD, 1987; WALSH; PERKINS; KREBS, 1968). Além disso, o AMPc também pode ativar a fosfodiesterase (PDE) que controla os níveis desse segundo mensageiro, hidrolisando-o e, por fim, terminando a cascata de sinalização. Interessantemente, Dyer et al. (2003) correlacionaram o aumento da concentração local de AMPc, em células intestinais, com a exposição dessas células à altas concentrações de glicose extracelular.

A descoberta de diferentes efetores ativados por AMPc reforçam a teoria de que as vias de sinalização ativadas por esse segundo mensageiro necessitam de controle preciso e integrado. Duas isoformas de Epac já foram identificadas (Epac 1 e 2), mas nossos resultados de RT-PCR demonstraram que as células HEK-293 possuem somente a isoforma 1 (Epac1).

Nossos resultados corroboram com os achados de Honegger et al. (2006) que demonstraram que essa isoforma de Epac está presente na membrana apical de células tubulares proximais. De forma geral, a Epac1 participa de diversos eventos celulares, como: controle de adesão celular, formação de junção celular, secreção de insulina, exocitose, ativação de vias de sinalização celular e regulação de proteínas de transporte (HONEGGER et al., (2006); OZAKI et al., 2000; RANGARAJAN et al., 2003; SCHMIDT et al., 2001).

Além disso, foi demonstrado que apenas a Epac1 é insensível ao H-89, indicando que essa proteína pode ser uma via alternativa para os efeitos do AMPc, além da PKA (SCHMIDT et al., 2001). Interessantemente, esses mesmos autores demonstraram que a Epac pode ativar a PKC ϵ (uma PKC do tipo nova) que aumenta os níveis de cálcio citosólico, em células HEK-293. Esses achados poderiam justificar um possível papel da PKC sobre a distribuição do hSGLT1, na ausência da PKA. Portanto, o aumento nos níveis de AMPc, induzidos por exemplo, por um receptor acoplado a proteína G (GPCR's), ativam não somente essas proteínas, mas toda a cascata de efetores (CHENG et al., 2008), podendo agir sobre a atividade e expressão dos SGLTs.

Como o objetivo desse estudo foi avaliar a ativação da PKA pela glicose (via GPR1), nossa hipótese foi testada através de experimentos de Western blot, utilizando um inibidor do GPR1 (manose – 50 mM). A escolha da manose foi baseada em estudos os quais demonstraram que, apesar desse sacarídeo inibir o GPR1 em leveduras (LEMAIRE et al. 2004), esse não é transportado pelo SGLT1 e 2 (WRIGHT; LOO; HIRAYAMA, 2011) – alvos de nosso estudo. Dessa forma, ao inibir o GPR1 com manose, foi observado uma diminuição da ativação da PKA no tratamento com glicose 25 mM, tanto em células transfectadas com WT quanto com S418H, confirmando que a ativação dessa cinase, ocorre via GPR1.

Além desses resultados, foi demonstrado que a inibição do GPR1 não modificou a expressão total das proteínas transfectadas, no tratamento crônico, mas diminuiu a expressão de S418H na membrana. Como esperado, a inibição do GPR1 reverteu a inibição da expressão de SGLT2 na membrana, induzida pelo tratamento com glicose 25 mM.

Assim, todos os achados utilizando manose reforçam a importância, tanto da Serina 418 do SGLT1 (para que a PKA exerça sua função) quanto da ativação da via como um todo, pois a inibição do GPR1 teve um efeito diferenciado sobre a distribuição do SGLT1 na membrana, quando comparado com o uso de H-89 (inibidor da PKA). Além disso, a inibição total da via interferiu na expressão do SGLT2, confirmando a participação dos efetores ativados por AMPc que modulam a distribuição dessas proteínas (como Epac e PKC), uma

vez que ao modificar a expressão de SGLT1 na membrana, a expressão de SGLT2 precisa ser regulada.

Outro aspecto importante é o fato de que o tratamento com inibidores foi realizado apenas 30 minutos antes da realização dos experimentos. Dessa forma, alterações significantes na expressão total dessas proteínas, realmente poderiam não existir. No entanto, modificações na distribuição celular dos SGLTs poderiam ser observadas nesse pré-tratamento com inibidores.

Sabe-se que a endocitose que ocorre na maioria dos tipos de células de mamíferos pode ser caracterizada por depender ou não de clatrina (GONG; HUNTSMAN; MA, 2008). Uma das formas que não depende de clatrina é a internalização dependente da formação de cavéola, pela caveolina. Interessantemente, tanto a clatrina quanto a caveolina dependem da dinamina para a formação da cavéola ou vesícula (GONG; HUNTSMAN; MA, 2008; NELSON; COX, 2008). Assim, para avaliar se as modificações na distribuição do hSGLT1 envolvem a via da clatrina ou caveolina, experimentos utilizando filipina (inibidor da caveolina) e sucrose (inibidor da clatrina) foram realizados, uma vez que Veyhl et al. (2003) demonstraram uma regulação da distribuição do SGLT1 dependente da dinamina. No entanto, no tratamento com glicose 25 mM por 20 dias, aparentemente, essas duas proteínas não parecem atuar nas modificações de expressão do SGLT1 na membrana. Portanto, com base em nossos resultados, é possível que as alterações atribuídas na expressão de hSGLT1 (e, conseqüentemente SGLT2) na membrana, induzidas pelo tratamento com glicose 25 mM, associam um efeito direto (como fosforilação) das proteínas ativadas na cascata do AMPc no SGLT1.

5.2 Segunda fase do estudo – NHE1 e NHE3

É conhecido que no *Diabetes mellitus*, o indivíduo passa a utilizar outras fontes de energia (por exemplo, derivadas da gordura) as quais aumentam significativamente a concentração de prótons no organismo. Esse aumento de prótons se torna um estímulo para o aumento da atividade dos NHEs. Achados recentes de nosso laboratório (BELOTO-SILVA; MACHADO; OLIVEIRA-SOUZA, 2011) demonstraram que o tratamento crônico (glicose 25 mM por 20 dias), em células HEK-293 NT, aumentou significativamente a velocidade de recuperação do pH intracelular (pHi), induzido pelo aumento da atividade dos NHEs (NHE1 e NHE3), sem alterar a expressão total desses transportadores. Contudo, inicialmente foi necessário avaliar qual isoforma de NHE (1 ou 3) seria a responsável pela resposta

estimulatória, induzida pelo tratamento crônico (glicose 25 mM por 20 dias) sobre a velocidade de recuperação do pH_i em células HEK-293 NT, foi utilizado um inibidor específico do NHE3. Esses resultados indicaram que o NHE3 é responsável por cerca de 70% desse efeito estimulatório.

Considerando que no estudo atual as células HEK-293 foram transfectadas com WT ou S418H, experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados na situação controle, a fim de avaliar se a própria transfecção poderia modificar a dpH_i/dt. Esses experimentos demonstraram que a atividade dos NHEs não foi diferente em células transfectadas com WT ou S418H, quando comparadas com células NT. Contudo, diferentemente do esperado, o efeito estimulatório sobre a atividade dos NHEs (observado em células NT), induzido pelo tratamento crônico, foi significativamente reduzido em células transfectadas com WT ou S418H. Além disso, essa resposta inibitória está envolvida com a diminuição da atividade do NHE3.

Diversos autores têm descrito que mudanças na atividade e na distribuição dos NHEs podem estar associados: ativação da PKA (MALO; FLIEGEL, 2006; DONOWITZ; LI, 2007; BORGESE et al., 1992; WEINMAN; MINKOFF; SHENOLIKAR, 2000; WEINMAN; STEPLOCK; SHENOLIKAR, 2003; ALEXANDER; GRINSTEIN, 2009), ao aumento das concentrações de glicose (LIN et al., 2011) e, às proteínas que são reguladoras da atividade, como as NHERF (proteínas que funcionam como adaptadores para a ligação do NHE3 na membrana e na ezrin – proteína componente do citoesqueleto) (ALEXANDER; GRINSTEIN, 2009; WEINMAN; MINKOFF; SHENOLIKAR, 2000; WEINMAN; STEPLOCK; SHENOLIKAR, 2003).

Assim, considerando que nesse estudo o aumento da concentração de glicose extracelular induz a ativação da PKA, experimentos de microscopia de fluorescência foram realizados utilizando H-89. Como o H-89 reverteu o efeito inibitório somente das células transfectadas com WT, esses resultados indicam que, aparentemente, a via da PKA está envolvida com a diminuição da atividade do NHE3, deduzindo que todas as proteínas da célula precisam estar íntegras para que a PKA exerça seu papel de forma adequada. Isso porque, em células transfectadas com S418H a inibição da PKA não modifica o efeito inibitório do tratamento crônico sobre a dpH_i/dt, possivelmente porque outros fatores podem atuar sobre a atividade do NHE3, quando as células possuem SGLT1 mutado.

Além disso, é conhecido que a atividade de uma proteína transportadora pode estar vinculada não somente às modificações na cinética de transporte, mas também à distribuição celular dessa proteína. Assim, para avaliar se as respostas encontradas sobre a velocidade de

recuperação do pH_i estão vinculadas às alterações da expressão dos NHEs, experimentos de Western blot foram realizados com o intuito de avaliar a expressão do NHE1 e do NHE3 fosforilado.

No tratamento com glicose 5 mM, a expressão do NHE3 fosforilado, em células transfectadas, aumentou significativamente, no entanto, o anticorpo utilizado reconhece apenas a proteína fosforilada. Diversos autores demonstram que a fosforilação direta do NHE3 pela PKA é capaz de inibir sua atividade (KOCINSKY et al., 2005; KURASHIMA et al., 1997; ZHAO et al., 1999; ZIZAK et al. 1999). Dessa forma, ao aumentar a fosforilação do NHE3, há uma diminuição da atividade dessa proteína. Em contra partida, foi observado, ainda no tratamento com glicose 5 mM, que a expressão do NHE1 aumentou significativamente. Esses dados sugerem um efeito celular coordenado na expressão dessas proteínas, uma vez que o NHE3, aparentemente, desempenha um papel fundamental (de cerca de 70%) na recuperação do pH_i nessas células. Ou seja, quando a atividade do NHE3 diminui, pelo aumento da sua fosforilação, a expressão do NHE1 aumenta, a fim de modular a capacidade de recuperação celular do pH_i, frente a uma sobrecarga ácida, não permitindo, dessa forma, que os valores absolutos de recuperação do pH_i se alterem.

Esse efeito celular coordenado sobre a expressão dessas proteínas foi observado também no tratamento com glicose 25 mM. Juntos, esses resultados indicam que, nos experimentos de microscopia de fluorescência, a atividade total dos NHEs, observada, é modificada mediante as alterações na atividade e expressão dessas proteínas.

Diversos fatores podem explicar essas alterações, citadas anteriormente. Um deles é a ativação da PKA pela ligação da glicose com seu receptor, o GPR1 (presente na membrana celular). Uma vez ativada a PKA pode se associar com uma AKAP (SKALHEGG; TASKEN, 2000). A principal função da AKAP é aproximar a PKA do seu substrato, regulando os eventos intracelulares dependentes dessa cinase (BAUMAN et al., 2006). Como mais de 50 tipos de proteínas são consideradas AKAPs, não surpreende o fato de que a expressão dessas varie de acordo com a localização celular e tecidual (PIDOUX; TASKEN, 2010). Os rins, por exemplo, expressam a AKAP1 (ou S-AKAP84, D-AKAP1, AKAP121 e/ou AKAP149) presente na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e envelope nuclear; AKAP2 (ou AKAP-KL) presente no citoesqueleto de actina e membrana apical de células epiteliais; AKAP8 (ou AKAP95) presente na matriz nuclear; AKAP9 (ou AKAP450, AKAP350, Yotiao, CG-NAP e/ou Hyperion) presente principalmente no Golgi; Ezrin (ou AKAP78) presente no citoesqueleto de actina e Miosina VIIA (ubíquamente expressa) presente no citoesqueleto (PIDOUX; TASKEN, 2010).

Considerando que a Ezrin é uma proteína constitutiva do citoesqueleto e está presente na maioria das células epiteliais, experimentos de RT-PCR foram realizados para demonstrar a presença de RNAm para outros tipos de AKAPs, em células HEK-293,. De acordo com os nossos resultados, as células HEK-293 (NT) possuem RNAm somente para AKAP 1 e 2. Assim, uma das hipóteses de nosso estudo é que essas células possuem tanto Ezrin quanto AKAP1 e AKAP2, as quais estariam envolvidas, juntamente com a PKA, com os processos de fosforilação do NHE3, diminuindo sua atividade e, conseqüentemente favorecendo o aumento da expressão do NHE1, a fim de compensar a diminuição da atividade do NHE3. Nossos resultados indicam que a expressão de ezrin, assim como a de PKA não foi modificada independentemente do tratamento e do recombinante transfectado, indicando que essa proteína poderia atuar

Além disso, já foi demonstrado que essas células possuem RNAm para Epac1 e essa proteína pode ser ativada pelo AMPc. Apesar da PKA e da Epac serem ativadas pelo mesmo segundo mensageiro, essas proteínas podem ter efeitos finais opostos - a PKA inibe a via da PKB/AKT enquanto que a Epac ativa essa mesma via (MEI et al., 2002), ou até mesmo sinérgicos - a PKA e Epac inibem a atividade do NHE3 (HONEGGER et al., 2006). Assim, estudos envolvendo a ativação dessas proteínas e conseqüentemente de seus alvos, tem sido de grande interesse, uma vez que a origem e a causa desses efeitos antagônicos e sinérgicos ainda não são bem compreendidas.

Em 2000, Weinman e colaboradores comentaram a respeito da função de um modelo de PKA ligada a ezrin, proposto por Dransfield et al. (1997) e Lamprecht; Weinman; Yun (1998). Com esse modelo foi postulado que NHERF serviria como uma ponte de aproximação para PKA (ligada a ezrin), a fim de fosforilar o NHE3 e inibir sua atividade. Recentemente, Lin et al. (2011) demonstraram que a glicose aumenta a atividade do NHE3 em jejuno de ratos e que esse fator depende da dissociação do NHE3 com a proteína reguladora de NHE (NHERF) isoforma 2 (NHERF2). Adicionalmente, Weinman; Steplock; Shenolikar (2003) indicaram que a presença de NHERF1 é essencial para a inibição do NHE3, via AMPc. Esses achados corroboram com nossos resultados os quais indicam que o aumento da expressão de NHERF1 no tratamento com glicose 5 e 25 mM pode estar associado com a inibição da atividade do NHE3, pois quando houve diminuição da fosforilação do NHE3 em células WT, no tratamento com glicose 25 mM, concomitantemente, foi observado uma diminuição da expressão do NHERF1.

Dessa forma, uma das hipóteses para explicar as modificações da expressão e atividade dos NHEs observadas em células HEK-293, é que essa linhagem celular pode

expressar os dois tipos de NHERF (1 e 2), mas que aparentemente, o NHERF1 está envolvido com a inibição do NHE3. Esse pode ser uma ponte que facilita a fosforilação da PKA (ligada a ezrin) no NHE3, diminuindo sua atividade.

Finalmente, independentemente da via final ativada, o aumento do AMPc pela glicose é capaz de alterar a expressão e atividade de diferentes proteínas, como SGLTs e NHEs. Nossos experimentos de transfecção demonstraram que as células são capazes de regular a quantidade de transportadores de glicose na membrana, frente ao aumento extracelular desse substrato, mas é necessário que as proteínas estejam íntegras. No entanto, essa destreza celular sobre os transportadores de glicose afeta a capacidade de recuperação do pH intracelular (pHi), através principalmente do NHE3.

Assim, a inibição do GPR1 poderia ser um mecanismo de regulação da distribuição do SGLT1 e da atividade do NHE3 em situações que relacionam o aumento da glicose extracelular com a diminuição da atividade desse trocador, pois ambas as proteínas são fundamentais para a homeostase tanto de glicose quanto do equilíbrio ácido-base do organismo.

REFERÊNCIAS*

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232 p.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 866 p.
- ALEXANDER, R. T.; GRISTEIN, S. Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 1630–1637, 2009.
- AMBÜHL, P.; AMEMIYA, M.; PREISIG, P. A.; MOE, O. W.; ALPERN, R. J. Chronic hyperosmolality increase NHE3 activity in OKP cells. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 170-177, 1997.
- AZARANI, A.; GOLTZMAN, D.; ORLOWSKI, J. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide inhibit the apical Na^+/H^+ exchanger NHE-3 isoform in renal cells (OK) via a dual signaling cascade involving protein kinase A and C. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 20004–20010, 1995.
- BAILLIE, G. S.; SCOTT, J. D.; HOUSLAY, M. D. Compartmentalization of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 3264-3270, 2005.
- BAINES, A.; HO, P. Glucose stimulates O_2 consumption, NOS and Na^+/H^+ exchange in diabetic rat proximal tubules. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 283, p. F286-F293, 2002.
- BAUMAN, A. L.; SOUGHAYER, J.; NGUYEN, B. T.; WILLOUGHBY, D.; CARNEGIE, G. K.; WONG, W.; HOSHI, N.; LANGEBERG, L. K.; COOPER, D. M.; DESSAUER, C. W.; SCOTT, J. D. Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes. **Mol. Cell.**, v. 23, p. 925-931, 2006.
- BELOTO-SILVA, O; MACHADO, U. F.; OLIVEIRA-SOUZA, M. Glucose-induced regulation of NHEs activity and SGLTs expression involves the PKA signaling pathway. **J. Membr. Biol.**, v. 239, p. 157-165, 2011.
- BIEMESDERFER, D.; REILLY, R. F.; EXNER, M.; IGARASHI, P.; ARONSON, P. S. Immunocytochemical characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE1 in rabbit kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 263, p. F833–F840, 1992.
- BOBULESCU, I. A.; MOE, O.W. Na^+/H^+ exchangers in renal regulation of acid-base balance. **Semin. Nephrol.**, v. 26, p. 334–344, 2006.

*De acordo com:

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

BORGESSE F.; SARDET C.; CAPPADORO M.; POUYSSÉGUR J.; MOTAIS R. Cloning and expression of a cAMP-activated Na^+/H^+ exchanger: evidence that the cytoplasmic domain mediates hormonal regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 189, p. 6765-6769, 1992.

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

BORON, W.; BOULPAEP, E. L. **Medical physiology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2009. 1337 p.

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

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

BRETT, C. L.; DONOWITZ, M.; RAO, R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, p. C223-C239, 2005.

BRUNSKILL, N. J.; STUART, J.; TOBIN, A. B.; WALLS, J.; NAHORSKI, S. Receptor-mediated endocytosis of albumin by kidney proximal tubule cells is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 2140-2150, 1998.

CARR, D. W.; STOFKO-HAHN, R. E.; FRASER, I. D.; BISHOP, S. M.; ACOTT, T. S.; BRENNAN, R. G.; SCOTT, J. D. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. **J. Biol. Chem.**, v. 22, p. 14188-14192, 1991.

CASTANEDA-SCEPPA, C.; SUBRAMANIAN, S.; CASTANEDA, F. Protein kinase C mediated intracellular signaling pathways are involved in the regulation of SGLT1 activity. **J. Cell. Biochem.**, v. 109, p. 1109-1117, 2010.

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

CHENG, X.; JI, Z.; TSALKOVA, T.; MEI, F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 7, p. 651-662, 2008.

CHOI, J. Y.; KIM, J. L.; SHIN, J. H.; MOON, U. Y.; YOON, J. H. Dexamethasone increases fluid absorption via Na^+/H^+ exchanger (NHE) 3 activation in normal human middle ear epithelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 536, p. 12-18, 2006.

CLEGG, C. H.; CADD, G. G.; MCKNIGHT, G. S. Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 11, p. 3703-3707, 1988.

COOPER, D. M. Regulation and organization of adenylyl cyclase and cAMP. **Biochem. J.**, v. 375, p. 517-529, 2003.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 496 p.

CULLERE, X.; SHAW, S. K.; ANDERSSON, L.; HIRAHASHI, J.; LUSCINSKAS, F. W.; MAYADAS, T. N. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. **Blood**, v. 5, p. 1950-1955, 2005.

De ROOIJ, J.; ZWARTKRUIS, F. J.; VERHEIJEN, M. H.; COOL, R. H.; NIJMAN, S. M.; WITTINGHOFER, A.; BOS, J. L. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by AMPc. **Nature**, v. 396, p. 474–477, 1998.

DIEZ-SAMPEDRO, A.; HIRAYAMA, B. A.; OSSWALD, C.; GORBOULEV, V.; BAUMGARTEN, K.; VOLK, C.; WRIGHT, E. M.; KOEPESELL, H. A glucose sensor hiding in a family of transporters. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, p. 11753-11758, 2003.

DONOWITZ, M.; LI, X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 825-872, 2007.

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

DRANSFIELD, D. T.; BRADFORD, A. J.; SMITH, J.; MARTIN, M.; ROY, C.; MANGEAT, P. H.; GOLDENRING, J. R. Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. **EMBO J.**, v. 16, p. 35-43, 1997.

DUQUETTE, P. P.; BISSONNETTE, P.; LAPOINTE, J. Y. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na^+ /glucose cotransport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, p. 3796–3801, 2001.

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

ENSERINK, J. M.; PRICE, L. S.; METHI, T.; MAHIC, M.; SONNENBERG, A.; BOS, J. L.; TASKÉN, K. The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the $\alpha 3\beta 1$ integrin but not the $\alpha 6\beta 4$ integrin. **J. Biol. Chem.**, v. 43, p. 44889-44896, 2004.

FAHAM, S.; WATANABE, A.; BESSERER, G. M.; CASCIO, D.; SPECHT, A.; HIRAYAMA, B. A.; WRIGHT, E. M.; ABRAMSON, J. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na^+ /sugar symport. **Science**, v. 321, p. 810-814, 2008.

FLIEGEL, L. Molecular biology of the myocardial Na^+/H^+ exchanger. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 44, p. 228–237, 2008.

GAMM, D. M.; BAUDE, E. J.; UHLER, M. D. The major catalytic subunit isoforms of cAMP-dependent protein kinase have distinct biochemical properties in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 26, p. 15736–15742, 1996.

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

GEKLE, M.; MILDENBERGER, S.; FREUDINGER, R.; SCHWERDT, G.; SILBERNAGL, S. Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 272, p. F668-F677, 1997.

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

GONG, Q.; HUNTSMAN, C.; MA, D. Clathrin-independent internalization and recycling. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 12, p. 126–144, 2008.

GREEN, J.; FOELLMER, O.; KLEEMAN, C. R. Collagen type 4 substratum (coll-4) inhibits the Na^+/H^+ exchanger (NHE) in OKP cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, p. 254-259, 1994.

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

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

HANOUNE, J.; DEFER, N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 41, p. 145–174, 2001.

HELMLE-KOLB, C.; COUNILLON, L.; ROUX, D.; POUYSSÉGUR, J.; MRKIC, B.; MURER, H. Na^+/H^+ exchange activities in NHE1-transfected OK-cells: cell polarity and regulation. **Pflugers Arch.**, v.425, p. 34-40, 1993.

HERBERG, F. W.; MALESZKA, A.; EIDE, T.; VOSSEBEIN, L.; TASKEN, K. Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. **J. Mol. Biol.**, v. 2, p. 329–339, 2000.

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

HIRSCH, J. R.; LOO, D. D. F.; WRIGHT, E. M. Regulation of Na^+ /glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 14740-14746, 1996.

HONEGGER, K. J.; CAPUANO, P.; WINTER, C.; BACIC, D.; STANGE, G.; WAGNER, C. A.; BIBER, J.; MURER, H.; HERNANDO, N. Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p. 803-808, 2006.

JAHNSEN, T.; HEDIN, L.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U.; RICHARDS, J. S. The neural type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase is present and regulated by hormones in the rat ovary. **J. Biol. Chem.**, v. 15, p. 6637-6639, 1986.

KANDASAMY, R. A.; YU, F. H.; HARRIS, R.; BOUCHER, A.; HANRAHAN, J. W.; ORLOWSKI, J. Plasma membrane Na^+/H^+ exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 29209-29216, 1995.

KANG, G.; CHEPURNY, O. G.; HOLZ, G. G. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in INS-1 pancreatic beta-cells. **J. Physiol.**, v. 536, p. 375-385, 2001.

KASHIMA, Y.; MIKI, T.; SHIBASAKI, T.; OZAKI, N.; MIYAZAKI, M.; YANO, H.; SEINO, S. Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 49, p. 46046-46053, 2001.

KAWASAKI, H.; SPRINGETT, G. M.; MOCHIZUKI, N.; TOKI, S.; NAKAYA, M.; MATSUDA, M.; HOUSMAN, D. E. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. **Science**, v. 282, p. 2275-2279, 1998.

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

KIPP, H.; KHOURSANDI, S.; SCHARLAU, D.; KINNE, R. K. H. More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 285, p. C737-C749, 2003.

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

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

KOOISTRA, M. R.; CORADA, M.; DEJANA, E.; BOS, J. L. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. **FEBS Lett.**, v. 22, p. 4966-4972, 2005.

KOPPERUD, R.; CHRISTENSEN, A. E.; KJARLAND, E.; VISTE, K.; KLEIVDAL, H.; DOSKELAND, S. O. Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 13443-13448, 2002.

KURASHIMA, K.; YU, F. H.; CABADO, A. G.; SZABÓ, E. Z.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Identification of sites required for down-regulation of Na^+/H^+ exchanger

NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase. phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. **J. Memb. Biol.**, v. 272, p. 28672–28679, 1997.

LAMPRECHT, G.; WEINMAN, E. J.; YUN, C. H. The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 29972–29976, 1998.

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

LEE S. H., KIM T., PARK E.S., YANG S., JEONG D., and CHOI Y. NHE₁₀, an osteoclast specific member of the Na^+/H^+ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 369, p. 320–326, 2008.

LEMAIRE, K.; De VELDE, S. V.; DIJCK, P. V.; THEVELEIN, J. M. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as agonist ligands of the G protein-coupled receptor GPR1 in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell.**, v. 16, p. 293–299, 2004.

LOIKE, J. D.; HICKMAN, S.; KUANG, K.; XU, M.; CAO, L.; VERA, J. C.; SILVERSTEIN, S. C.; FISCHBARG, J. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 40, p. C1774–C1779, 1996.

LEE, D. C.; CARMICHAEL, D. F.; KREBS, E. G.; MCKNIGHT, G. S. Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, p. 3608–3612, 1983.

LEVINE, S. A.; MONTROSE, M. H.; TSE, C. M.; DONOWITZ, M. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na^+/H^+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 25527–25535, 1993.

LI, J.; O'CONNOR, K. L.; CHENG, X.; MEI, F. C.; UCHIDA, T.; TOWNSEND, C. M. JR.; EVERS, B. M. Cyclic adenosine 5'-monophosphate-stimulated neurotensin secretion is mediated through Rap1 downstream of both Epac and protein kinase A signaling pathways. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, p. 159–171, 2007.

LIN, R.; MURTAZINA, R.; CHA, B.; CHAKRABORTY, M.; SARKER, R.; CHEN, T. E.; LIN, Z.; HOGEMA, B. M.; DE JONGE, H. R.; SEIDLER, U.; TURNER, J. R.; LI, X.; KOVBASNJUK, O.; DONOWITZ, M. D-glucose acts via sodium/glucose cotransporter 1 to increase NHE3 in mouse jejunal brush border by a Na^+/H^+ exchange regulatory factor 2-dependent process. **Gastroenterology**, v. 140, p. 560–571, 2011.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacol. Ther.**, v. 3, p. 366–398, 2006.

MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M.; LOPES, A. G.; CASSOLA, A. C.; BERARDI, A. L.; GIEBISCH, G. Filtered load of buffer and renal H^+ -ion secretion: mechanism of proximal tubule load dependence. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 4, p. 455–465, 1987.

MALO, M. E.; FLIEGEL, L. Physiological role and regulation of the Na^+/H^+ exchanger. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 84, p. 1081–1095, 2006.

MEI, F. C.; QIAO, J.; TSYGANKOVA, O. M.; MEINKOTH, J. L.; QUILLIAM, L. A.; CHENG, X. Differential signaling of cAMP: opposing effects of Exchange protein directly activated by cAMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 11497–11504, 2002.

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

NAKAMURA, T; GOLD, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. **Nature**, v. 325, p. 442–444, 1987.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5. ed. New York: Freeman, 2008. 1273 p.

NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. **Drug. Metab. Pharmacokinet.**, v. 20, p. 452–477, 2005.

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

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

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

ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. **Pflugers Arch.**, v. 447, p. 549–565, 2003.

OZAKI, N.; SHIBASAKI, T.; KASHIMA, Y.; MIKI, T.; TAKAHASHI, K.; UENO, H.; SUNAGA, Y.; YANO, H.; MATSUURA, Y.; IWANAGA, T.; TAKAI, Y.; SEINO, S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. **Nat. Cell. Biol.**, v. 11, p. 805–811, 2000.

PIDOUX, G.; TASKÉN, K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. **J. Mol. Endocrin.**, v. 44, p. 271–284, 2010.

QUICK, M.; WRIGHT, E. M. Employing Escherichia coli to functionally express, purify, and characterize a human transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 8597–8601, 2002.

RANGARAJAN, S.; ENSERINK, J. M.; KUIPERIJ, H. B.; DE ROOIJ, J.; PRICE, L. S.; SCHWEDE, F.; BOS, J. L. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. **J. Cell. Biol.**, v. 4, p. 487-493, 2003.

REIMANN, E. M.; WALSH, D. A.; KREBS, E. G. Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 7, p. 1986-1995, 1971.

RESSL, S.; TERWISSCHA, V.; SCHELTINGA, A. C.; VONRHEIN, C.; OTT, V.; ZIEGLER, C. Molecular basis of transport and regulation in the Na⁽⁺⁾/betaine symporter BetP. **Nature**, v. 458, p. 47-52, 2009.

RINK, T. J.; TREIN, R. Y.; POZZAN, T. Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 95, p. 189-196, 1982.

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

SARKER, R.; GRONBORG, M.; CHA, B.; MOHAM, S.; CHEN, Y.; OANDEY, A.; LITCHFIELD, D.; DONOWITZ, M.; LI, S. Casein Kinase 2 binds to the C terminus of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) and stimulates NHE3 basal activity by phosphorylation a separate site in NHE3. **Mol. Biol. Cell.**, v. 19, p. 3859-3870, 2008.

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

SCHMIDT, M.; EVELLIN, S.; WEERNINK, P. A.; VON-DORP, F.; REHMANN, H.; LOMASNEY, J. W.; JAKOBS, K. H. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. **Nat. Cell. Biol.**, v. 3, p. 1020-1024, 2001.

SCOTT, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Pharmacol. Ther.**, v. 50, p. 123-145, 1991.

SCOTT, J. D.; GLACCUM, M. B.; ZOLLER, M. J.; UHLER, M. D.; HELFMAN, D. M.; MCKNIGHT, G. S.; KREBS, E. G. The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 84, p. 5192-5196, 1987.

SEINO, S.; SHIBASAKI, T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. **Physiol. Rev.**, v. 4, p. 1303-1342, 2005.

SHABB, J. B. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2381-2411, 2001.

SHIMAMURA, T.; WEYAND, S.; BECKSTEIN, O.; RUTHERFORD, N. G.; HADDEN, J. M.; SHARPLES, D.; SANSOM, M. S.; IWATA, S.; HENDERSON, P. J.; CAMERON, A. D. Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. **Science**, v. 328, p. 470–473, 2010.

SHIRAZI-BEECHEY, S. P.; HIRAYAMA, B. A.; WANG, Y.; SCOTT, D.; SMITH, M. W.; WRIGHT, E. M. Ontogenic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet. **J. Physiol.**, v. 437, p. 699–708, 1991.

SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. **Front. Biosci.**, v. 5, p. D678–D693, 2000.

SLEPKOV, E.; DING, J.; HAN, J.; FLIEGEL, L. Mutational analysis of potential pore-lining amino acids in TM IV of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1768, p. 2882–2889, 2007.

SMITH, C. D.; HIRAYAMA, B. A.; WRIGHT, E. M. Baculovirus-mediated expression of the Na⁺/glucose cotransporter in Sf9 cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1, p.151–159, 1992.

STEINMETZ, P. R. Cellular organization of urinary acidification. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 251, p. F173–F187, 1986.

SUBRAMANIAN, S.; GLITZ, P.; KIPP, H.; KINNE, R. K. H.; CASTANEDA, F. Protein kinase A affects sorting and conformation of the sodium-dependent glucose co-transporter SGLT1. **J. Cel. Bioch.**, v. 106, p. 444–452, 2009.

SYMONIAN, M.; SMOGORZEWSKI, M.; MARCINKOWSKI, W.; KROL, E.; MASSRY, S. G. Mechanisms through which high glucose concentration raises [Ca²⁺]_i in renal proximal tubular cells. **Kidney Inter.**, v. 54, p. 1206–1213, 1998.

TAZAWA, S.; YAMATO, T.; FUJIKURA, H.; HIRATOCHI, M.; ITOH, F.; TOMAE, M.; TAKEMURA, Y.; MARUYAMA, H.;SUGIYAMA, T.; WAKAMATSU, A.; ISOGAI, T.; ISAJI, M. SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. **Life Sci.**, v. 76, p. 1039–1050, 2005.

TASKÉN, K.; SKALHEGG, B. S.; SOLBERG, R.; ANDERSSON, K. B.; TAYLOR, S. S.; LEA, T.; BLOMHOFF, H. K.; JAHNSEN, T.; HANSSON, V. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. **J. Biol. Chem.**, v. 28, p. 21276–21283, 1993.

THIEME, K.; EGUTI, D. M.; MELLO-AIRES, M.; OLIVEIRA-SOUZA, M. The effect of angiotensin II on intracellular pH is mediated by AT(1) receptor translocation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 295, p. C138–C145, 2008.

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

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

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

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

TURK, E.; KIM, O.; Le COUTRE, J.; WHITELEGGE, J. P.; ESKANDARI, S.; LAM, J. T.; KREMAN, M.; ZAMPIGHI, G.; FAULL, K. F.; WRIGHT, E. M. Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* vSGLT: a model for sodium-coupled sugar cotransporters. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 25711–25716, 2000.

VEYHL, M.; WAGNER, C. A.; GORBOULEV, V.; SCHMITT, B. M.; LANG, F.; KOEPESELL, H. Downregulation of the Na^+ -D-Glucose cotransporter SGLT1 by protein RS1 (RSC1A1) is dependent on dynamin and PKC. **J. Memb. Biol.**, v. 196, p. 71 – 81, 2003.

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

WALSH, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p. 3763–3765, 1968.

WATANABE, A.; CHOE, S.; CHAPTAL, V.; ROSENBERG, J. M.; WRIGHT, E. M.; GRABE, M.; ABRAMSON, J. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. **Nature**, v. 468, p. 988-991, 2010

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

WEINMAN, E. J.; SHENOLIKAR, S.; KAHN, A. M. cAMP-associated inhibition of Na^+/H^+ exchanger in rabbit kidney brush-border membranes. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 252, p. F19-F25, 1987.

WEINMAN, E. J.; MINKOFF, C.; SHENOLIKAR, S. Signal complex regulation of renal transport proteins: NHERF and regulation of NHE3 by PKA. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, p. F393–F399, 2000.

WEINMAN, E. J.; STEPLOCK, D.; SHENOLIKAR, S. NHERF-1 uniquely transduces the AMPc signals that inhibit sodium-hydrogen exchange in mouse renal apical membranes. **FEBS Lett.**, v. 536, p. 141-144, 2003.

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

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

WOOD, I. S.; DYER, J.; HOFMANN, R. R.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. Expression of the Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) in the intestine of domestic and wild ruminants. **Pflugers Arch.**, v. 1, p. 155–162, 2000.

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

WRIGHT, E. M. Renal Na⁺-glucose cotransportes. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 280, p. F10-F18, 2001.

WRIGHT, E. M.; LOO, D. D. F.; HIRAYAMA, B. A.; TURK, E. Surprising Versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. **Physiology**, v. 19, p. 370-376, 2004.

WRIGHT, E. M.; HIRAYAMA, B. A.; LOO, D. F. Active Sugar transport in health and disease. **J. Inter. Medicine.**, v. 261, p. 32–43, 2007.

WRIGHT, E. M.; LOO, D. D. F.; HIRAYAMA, B. A. Biology of human sodium glucose transporters. **Physiol. Rev.**, v. 91, p. 733–794, 2011.

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

ZACCOLO, M.; POZZAN, T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. **Science**, v. 295, p. 1711-1715, 2002.

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

ZHAO, H.; WIEDERKEHR, M.R.; FAN, L.; COLLAZO, R.L.; CROWDER, L.A.; MOE, O.W. Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP. Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 3978–3987, 1999.

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

ZIZAK, M.; LAMPRECHT, G.; STEPLOCK, D.; TARIQ, N.; TSE, C.; WEINMAN, E.J.; DONOWITZ, M. cAMP-induced phosphorylation and inhibition of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 3 (NHE3) are dependent on the presence but not the phosphorylation of NHE regulatory factor. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 24753–24758, 1999.

ANEXO A - Sequência original do hSGLT1

Homo sapiens solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1 (SLC5A1), mRNA

LOCUS NM_000343 1995 bp mRNA linear PRI 21-SEP-2008
 DEFINITION Homo sapiens solute carrier family 5
 (sodium/glucose cotransporter), member 1 (SLC5A1), mRNA.
 ACCESSION [NM_000343](#) REGION: 11..2005
 VERSION NM_000343.1 GI:4507030
 SOURCE Homo sapiens (human)

CDS 1..1995
 /gene="SLC5A1"
 /gene_synonym="D22S675; NAGT; SGLT1"
 /note="Human Na⁺/glucose cotransporter 1 mRNA, complete
 cds; solute carrier family 5 (sodium/glucose
 transporter),
 member 1; sodium/glucose cotransporter 1"

/translation="MDSSTWSPKTTAVTRPVETHELIRNAADISIIVFYFVVMAVGL
 WAMFSTNRGTVGGFFLAGRSMVWVPIGASLFASNIGSGHFVGLAGTGAASGIAIGGFE
 WNALVLVVVLGWLFPVIYIKAGVVTMP EYLRKRFGGQRIQVYLSLLSLLLYIFTKISA
 DIFSGAIFINLALGLNLILAIFLLLAITALYTITGGLAAVIYDTLQTVIMLVGSLIL
 TGFAFHEVGGYDAFMEKYMKAIPTIVSDGNTTFQEKCYTPRADSFHIFRDPLTGDLPW
 PGFIFGMSILTLWYWCTDQVIVQRCLSAKNMSHVKGGCILCGYLKLMPMFIMVMPGMI
 SRILYTEKIA CVVPSECEKYCGTKVGCTNIA YPTLVVELMPNGLRGLMLSVMLASLMS
 SLTSIFNSASTLFTMDIYAKVRKRASEKELMIAGRLFILVLIGISIAWVPIVQSAQSG
 QLFDYIQSITSYLGPPIAAVFLLAIFWKRVNEPGA FWGLILGLLIGISRMITEFAYGT
 GSCMEPSNCPTIICGVHYLYFAIILFAISFITIVVISLLTKPIPDVHLYRLCWSLRNS
 KEERIDLDAEEENIQEGPKETIEIETQVPEKKKGIFRRAYDLFCGLEQHGAPKMTEEE
 EKAMKMKMTDTSEKPLWRTVLNVNGIILVTVA VFCHAYFA"

ORIGIN

```

1 atggacagta gcacctggag cccaagacc accgcggtca cccggcctgt tgagaccac
61 gagctcattc gcaatgcagc cgatatctcc atcatcgta tctacttcgt ggtagtgatg
121 gccgtcggac tgtgggctat gttttccacc aatcgtggga ctggtggagg cttcttcctg
181 gcaggccgaa gtatggtgtg gtggccgatt ggagcctccc tctttgctag taacattgga
241 agtggccact ttgtggggct ggccgggact ggggcagctt caggcatcgc cattggaggc
301 tttgaatgga atgccctggt tttggtggtt gtgctgggct ggctgtttgt ccccatctat
361 attaaggctg gggtggtgac aatgccagag tacctgagga agcggtttgg aggccagcgg
421 atccaggctc acctttccct tctgtccctg ctgctctaca ttttcaccaa gatctcggca
481 gacatcttct cgggggccat attcatcaat ctggccttag gcctgaatct gtatttagcc
541 atctttctct tattggcaat cactgccctt tacacaatta cagggggcct ggcggcggtg
601 atttacacgg acaccttgca gacggtgatc atgctggtgg ggtctttaat cctgactggg
661 tttgcttttc acgaagtggg aggctatgac gccttcatgg aaaagtacat gaaagccatt
721 ccaaccatag tgtctgatgg caacaccacc tttcaggaaa aatgctacac tccaagggcc
```

```

781 gactccttcc acatccttccg agatccccctc acgggagacc tcccatggcc tgggttcac
841 tttgggatgt ccatccttac cttgtggtac tgggtgcacag atcaggtcat tgtgcagcgc
901 tgcctctcag ccaagaatat gtctcacgtg aagggtggct gcatcctgtg tgggtatcta
961 aagctgatgc ccatgttcat catggtgatg ccaggaatga tcagccgcat tctgtacaca
1021 gaaaaaattg cctgtgtcgt cccttcagaa tgtgagaaat attgcggtac caaggttggc
1081 tgtaccaaca tcgcctatcc aaccttagtg gtggagctca tgcccaatgg actgcgaggc
1141 ctgatgctat cagtcatgct ggcctccctc atgagctccc tgacctccat cttcaacagc
1201 gccagcacc ctttcacat ggacatctac gccaaggtcc gcaagagagc atctgagaaa
1261 gagctcatga ttgccggaag gttgtttatc ctggtgctga ttggcatcag catcgcctgg
1321 gtgcccattg tgcagtcagc acaaagtggg caactcttcg attacatcca gtccatcacc
1381 agttacttgg gaccacccat tgcggctgtc ttcttgcttg ctattttctg gaagagagtc
1441 aatgagccag gagccttttg gggactgac ctaggacttc tgattgggat ttcacgtatg
1501 attactgagt ttgcttatgg aaccgggagc tgcattggagc ccagcaactg tcccacgatt
1561 atctgtgggg tgcactactt gtactttgcc attatcctct tcgccatttc tttcatcacc
1621 atcgtgggtca tctccctcct caccaaacc attccggatg tgcattctca ccgtctgtgt
1681 tggagcctgc gcaacagcaa agaggagcgt attgacctgg atgcggaaga ggagaacatc
1741 caagaaggcc ctaaggagac cattgaaata gaaacacaag ttcctgagaa gaaaaaagga
1801 atcttcagga gagcctatga cctattttgt gggctagagc agcacggtgc acccaagatg
1861 actgaggaag aggagaaagc catgaagatg aagatgacgg acacctctga gaagcctttg
1921 tggaggacag tgttgaacgt caatggcatc atcctgggtga ccgtggctgt cttttgccat
1981 gcatattttg cctga

```

Legenda: Linha em amarelo: Alça citoplasmática [do aminoácido 412 (1236 pb) até 419 (1257 pb)] onde se encontra a Serina 418 (aminoácido TCT - em vermelho), possível sítio de fosforilação da PKA.

ANEXO B - Sequências do GPR1 de humano

Homo sapiens G protein-coupled receptor 1, mRNA (cDNA clone MGC:87403 IMAGE:30334911), complete cds

LOCUS BC067833 1068 bp mRNA linear PRI 17-JUL-2006
 DEFINITION Homo sapiens G protein-coupled receptor 1, mRNA
 MGC:87403 IMAGE:30334911), complete cds.
 ACCESSION [BC067833](#) REGION: 252..1319
 VERSION BC067833.1 GI:45709640
 KEYWORDS MGC.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)

CDS /translation=
 "MEDLEETLFEEFENYSYDLDDYYSLESDLEEKVQLGVVHWSLVL
 YCLAFVLGIPGNAIVIWFTGFKWKKTVTTLWFLNLAIADFIFLLFLPLYISYVAMNFH
 WPFGIWLCKANSFTAQLNMFASVFFLTVISLDHYIHLIHPVLSHRHRTLKNSLIVIIIF
 IWLLASLIGGPALYFRDTVEFNNHTLCYNNFQKHDPDLTLIRHHVLTWVKFIIGYLF
 LLTMSICYLCLIFKVKKRSILISSRHFWTILVVVAFVVCWTPYHLFSIWELTIHHNS
 YSHHVMQAGIPLSTGLAFLNSCLNPILYVLVSKKFQARFRSSVAEILKYTLWEVSCSG
 TVSEQLRNSETKNLCLETAQ"

ORIGIN

```

1 atggaagatt tggaggaaac attatttgaa gaatttgaga actattccta tgacctagac
61 tattactctc tggagtctga tttggaggag aaagtccagc tgggagttgt tcactgggct
121 tccctgggtgt tatattgttt ggcttttgtt ctgggaattc caggaaatgc catcgtcatt
181 tggttcacgg ggttcaagtg gaagaagaca gtcaccactc tgtggttcct caatctagcc
241 attgcgggatt tcatttttct tctctttctg ccctgtaca tctcctatgt ggccatgaat
301 ttccactggc cctttggcat ctggctgtgc aaagccaatt ccttactgc ccagttgaac
361 atgtttgcca gtgttttttt cctgacagtg atcagcctgg accactatat ccacttgatc
421 catcctgtct tatctcatcg gcatcgaacc ctcaagaact ctctgattgt cattatattc
481 atctggcctt tggcttctct aattggcgtt cctgccctgt acttccggga tactgtggag
541 ttcaataatc atactctttg ctataacaat tttcagaagc atgatcctga cctcactttg
601 atcaggcacc atgttctgac ttgggtgaaa tttatcattg gctatctctt ccctttgcta
661 acaatgagta tttgctactt gtgtctcatc ttcaaggatga agaagcgaag catcctgatc
721 tccagtaggc atttctggac aattctgggt gtggttggtg cctttgtggg ttgctggact
781 ccttatcacc tgttttagcat ttgggagctc accattcacc acaatagcta tccccaccat
841 gtgatgcagg ctggaatccc cctctccact ggtttgcat tcctcaatag ttgcttgaac
901 cccatccttt atgtcctagt tagtaagaag ttccaagctc gcttccgggc ctcagttgct
961 gagatactca agtacacact gtgggaagtc agctgttctg gcacagttag tgaacagctc
1021 aggaactcag aaaccaagaa tctgtgtctc ctggaaacag ctcaataa
```