## THAISSA DANTAS PESSOA

# EFEITO DA GLICOSE E DA ATIVIDADE DO CO-TRANSPORTADOR Na<sup>+</sup>-GLICOSE, ISOFORMAS 1 E 2, SOBRE O TROCADOR Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, ISOFORMA 3 EM TÚBULOS PROXIMAIS: PAPEL DO METABOLISMO GLICOLÍTICO, DO TRANSPORTE DE ÁGUA E DA LOCALIZAÇÃO DOS TRANSPORTADORES

Tese apresentada ao programa de pósgraduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor.

São Paulo 2013

## THAISSA DANTAS PESSOA

# EFEITO DA GLICOSE E DA ATIVIDADE DO CO-TRANSPORTADOR Na<sup>+</sup>-GLICOSE, ISOFORMAS 1 E 2, SOBRE O TROCADOR Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, ISOFORMA 3 EM TÚBULOS PROXIMAIS: PAPEL DO METABOLISMO GLICOLÍTICO, DO TRANSPORTE DE ÁGUA E DA LOCALIZAÇÃO DOS TRANSPORTADORES

Tese apresentada ao programa de pósgraduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor.

Área de concentração: Fisiologia Renal Orientador: Prof. Dr. Gerhard Malnic

Versão Original

São Paulo

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

© reprodução total

Pessoa, Thaissa Dantas.

Efeito da glicose e da atividade do SGLT1 e 2 no trocador Na+/H+ isoforma 3 em túbulos proximais renais: papel do metabolismo glicolítico, do transporte de água e da localização dos transportadores / Thaissa Dantas Pessoa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Gerhard Malnic.

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

Versão do título para o inglês: Effect of glucose and SGLT1 and SGLT2-activity on NHE3 in proximal tubules: role of glycolytic metabolism, water flux and transporter co-localization.

1. NHE3 2. SGLT1 3. SGLT2 4. Glicose 5. Glicólise 6. Aumento de volume celular I. Malnic, Prof. Dr. Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0105/2013

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Thaissa Dantas Pessoa.	
Título da Tese:	Efeito da glicose e da atividade do SGLT1 e 2 no trocador Na+/H+ isoforma 3 em túbulos proximais renais: papel do metabolismo glicolítico, do transporte de água e da localização dos transportadores.	
Orientador(a):	Prof. Dr. Gerhard Malnic.	
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão		

## ( ) 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:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438 e-mail: cenç@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 144 nas fls. 39 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Gerhard Malnic, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "Regulação da interação do transporte de glicose e de hidrogênio no túbulo proximal" do qual participou(aram) o(s) alunos Thaissa Dantas Pessoa e a pesquisadora Nancy Rebouças do Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 17.10.2006.

São Paulo, 18 de outubro de 2006.

atal

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI Secretária da CEEA – ICB/USP



#### 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) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEEA.20.09 WTL/mcgn

São Paulo, 02 de setembro de 2009.

#### REF.: Protocolo nº144/06.

"Regulação da interação do transporte de glicose e de hidrogênio no túbulo proximal"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até <u>18.10.2012</u>** 

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEEA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

x 8

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da Comissão de Ética em Experimentação Animal - ICB /USP

Ilmo.Sr. Prof. Dr. GERHARD MALNIC Departamento de Fisiologia e Biofisica

Instituto de Ciências Biomédicas -USP

À minha família, que sempre me apoiou.

Ao meu marido, pela sua compreensão, sabedoria e apoio.

Ao meu orientador, pela sua amizade e ensinamentos, e principalmente, por andar ao meu lado.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e em especial ao meu orientador, Professor Gerhard Malnic. Nesses anos todos, esteve ao meu lado e se tornou um amigo. Sua importância vai além da ciência, por que vale para a vida!

Agradeço também a Prof<sup>a</sup>. Nancy Amaral Rebouças, pois sem suas sugestões este trabalho jamais teria existido. Agradeço a ela por me ceder parte de seu laboratório para a execução de alguns experimentos.

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que conheci neste laboratório. Obrigada pela ajuda e também pela amizade! Gostaria de agradecer em especial a Dra. Adriana C. C. Girardi e a Luciene Carraro-Lacroix que contribuíram enormemente para minha formação. Tenho vocês como inspiração.

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Este trabalho também teve auxilio financeiro das agencias CAPES e CNPq.

"Não há acaso, sina, destino, que possa limitar, impedir ou controlar a firme resolução de uma alma determinada"

Ella Wheeler Wilcox

#### **RESUMO**

Pessoa TD. Efeito da glicose e da atividade do co-transportador Na<sup>+</sup>-glicose, isoformas 1 e 2, sobre o trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, isoforma 3 em túbulos proximais: papel do metabolismo glicolítico, do transporte de água e da localização dos transportadores. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

Por serem transportadores ativos secundários, há muito se postulou uma possível relação funcional entre o trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> isoforma 3 (NHE3) e os co-transportadores Na<sup>+</sup>/glicose (SGLTs). Além disso, sabe-se que o NHE3 é modulado por doenças e hormônios relacionados ao metabolismo/homeostase da glicose (GLU). Há diversos trabalhos na literatura sobre a interação funcional do SGLT1 e do NHE3 intestinais. Apesar de todos os avanços nos estudos sobre a coordenação entre o transporte de  $HCO_3^-$  e GLU no intestino delgado, pouco se sabe sobre a modulação do NHE3 pela GLU no túbulo proximal (TP). O objetivo do presente trabalho foi o de estudar os mecanismos envolvidos na modulação do transporte de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pela GLU, com ênfase na modulação do NHE3. Nosso interesse foi o de definir o papel do metabolismo e transporte de GLU sobre o NHE3. Além disso, tínhamos o interesse de verificara expressão destes transportadores e determinar se os mesmos se co-expressão no tecido renal. Através da técnica de microperfusão estacionária "in vivo" verificamos que a GLU é capaz de modular o fluxo de bicarbonato (JHCO<sub>3</sub>, em nmol/cm<sup>2</sup>/s). A perfusão de GLU 5mM (GLU5) foi capaz de estimular o JHCO<sub>3</sub>, enquanto que a perfusão de concentrações maiores aboliram ou inibiram o JHCO3<sup>-</sup> (GLU 20mM e 40mM ou 60mM respectivamente). Estes efeitos ocorreram pela modulação da atividade do NHE3, uma vez que a adição de S3226 10µM, inibidor do NHE3, foi capaz de abolir os efeitos promovidos pela GLU. A perfusão de galactose (GALAC), isômero da GLU, em substituição a esta não promoveu efeito modulatório sobre o NHE3, demonstrando que propriedades inerentes à GLU são responsáveis pelos efeitos. A substituição da GLU pelo seu análogo não metabolizável, a α-metil-D-glicose (α-MG), inibiu o efeito estimulatório, mas não o efeito inibitório promovido pela perfusão de GLU5 e GLU40 respectivamente, demonstrando que o efeito estimulatório deve-se ao metabolismo da GLU. A adição de 2deoxy-D-glicose (2-DG), inibidora da via glicolítica, à solução perfusora promoveu acentuada inibição da atividade do NHE3, indicando que o estimulo promovido pela GLU5 ocorre predominantemente pela glicólise. A adição de manitol, substância osmoticamente ativa e à qual a membrana celular não é permeável, às soluções GLU40 e α-MG40, foi capaz de abolir o efeito inibitório promovido por estes dois açúcares sobre a atividade do NHE3, demonstrando que a perfusão aguda de altas concentrações de GLU gera aumento de volume celular, e este último, inibe o NHE3. Verificamos também que após a correção da injúria de volume ocorre estimulo do NHE3 através do metabolismo da GLU. Além disso, verificamos que a atividade dos SGLTs é essencial para a manutenção da atividade do NHE3 uma vez que a adição de Plz (inibidora dos SGLTs) foi capaz de inibir acentuadamente o JHCO<sub>3</sub> na presença de substratos glicídicos ou na ausência dos mesmos. Por fim verificamos que o SGLT2 colocaliza-se com o NHE3 enquanto que o SGLT1 não é expresso nas mesmas regiões que o trocador. A co-expressão do SGLT2 e do NHE3 na mesma região da BB pode justificar a interação funcional observada entre estas proteínas, como verificado no presente estudo. Concluímos então que o NHE3 é estimulado pelo metabolismo da GLU apical via glicólise, que o efeito estimulatório do metabolismo da GLU é inibido por mudanças de volume após a captação aguda de altas concentrações de GLU e que a atividade dos SGLTs é essencial para a manutenção da atividade do trocador. A co-expressão do SGLT2 com o NHE3 no TP pode justificar a interação funcional observada no presente trabalho.

Palavras-chave: NHE3. SGLT1 e 2. Glicose. Glicólise. Aumento de volume celular.

### ABSTRACT

Pessoa TD. Effect of glucose and SGLT1 and SGLT2-activity on NHE3 in proximal tubules: role of glycolytic metabolism, water flux and transporter co-localization. [thesis (PhD in Human Physiology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

Because NHE3 and SGLTs are both secondary active transporters, an interaction between them was proposed. Besides that, it is well established that NHE3 is modulated by diseases and hormones associated with glucose (GLU) metabolism. There is plenty evidence that initiation of SGLT1-mediated glucose uptake leads to NHE3 activation in the intestine. Despite considerable advance in the knowledge of the role of glucose in NHE3 activity in the intestine, little is known about NHE3 modulation by glucose in the renal proximal tubule. The goal of the present work was to determine the mechanisms involved with glucose-dependent NHE3 modulation in the proximal tubule. It was our interest to define the role of SGLT-mediated glucose uptake and glucose metabolism on NHE3 activity. Besides, we aimed to determine a co-localization of these transporters in the kidney. By means of stationary microperfusion experiments we determined that GLU is able to modulate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> reabsorption (JHCO<sub>3</sub>, nmol/cm<sup>2</sup>/s). The perfusion of GLU 5mM (GLU5) was able to stimulate JHCO<sub>3</sub>, while the perfusion of increasing GLU concentrations inhibited JHCO<sub>3</sub> (20 mM, 40 mM and 60 mM GLU). These effects were due to NHE3 activity modulation, since addition of 10µM S3226, a NHE3 inhibitor, was able to abolish the GLU-dependent effects. The perfusion of galactose (GALAC), had no effect on NHE3 activity, showing that the glucose-dependent NHE modulation occurs due to inherent characteristics of the glucose molecule. The substitution of GLU by  $\alpha$ -metil-D-glucose ( $\alpha$ -MG), a non-metabolizable glucose analogue, was able to abolish the stimulatory effect on  $HCO_3^-$  transport but not the inhibitory effect seen with high GLU perfusion. These results show that the stimulatory effect of glucose is dependent on glucose metabolism. Addition of 2-deoxy-D-glucose (2-DG), a hexokinase inhibitor, to 5 mM glucose or CTRL solution markedly inhibited NHE3, showing that the stimulatory effect of glucose occurs through glycolytic metabolism. Addition of Mannitol to GLU40 or α-MG40, was able to abolish the inhibitory effect promoted by these two sugars, showing that high glucose concentrations probably act via cellular volume increase, which ultimately inhibits NHE3. After the correction of the volume injury, the stimulatory effect during GLU40 perfusion was seen. Besides, we determined that SGLTs-activity is important for NHE3 activity, since perfusion of Phlorizin markedly inhibited the exchanger in the presence or absence of GLU. We also were able to show that SGLT2 colocalizes to NHE3, while SGLT1 is not expressed in the same regions as NHE3. The coexpression of SGLT2 and NHE3 in the same region of the brushborder can explain the functional interaction observed between these proteins, as shown in the present study. We conclude that glucose exerts a bimodal effect on NHE3: the physiological metabolism of glucose stimulates NHE3 transport activity, whereas supraphysiological glucose concentrations inhibit this exchanger. Additionally, phlorizin-sensitive SGLT transporters and NHE3 interact functionally in the proximal tubule.

Keywords: NHE3. SGLT1 and 2. Glucose. Glycolysis. Cellular volume increase.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b> Representação esquemática dos mecanismos de transporte de Na <sup>+</sup> e GLU em célula de túbulo proximal15
<b>Figura 2</b> – Papel do NHE na reabsorção renal de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 20
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática da estrutura predita para os NHEs23
<b>Figura 4</b> – Modelo de cinética do cotransportador Na <sup>+</sup> /GLU27
Figura 5 – Representação esquemática do metabolismo da GLU
<b>Figura 6 –</b> Representação esquemática do metabolismo da GALAC32
<b>Figura 7</b> – Prováveis vias de sinalização pelas quais a GLU, via SGLT1, estimula o NHE3, aumentando sua exocitose34
Figura 8 – Esquema do modelo de absorção intestinal antes e após a refeição36
<b>Figura 9 –</b> Esquema do modelo de reabsorção renal de GLU
Figura 10 – Registro representativo de curvas experimentais
<b>Figura 11</b> – Representação Esquemática do Sistema Utilizado para Microperfusão Estacionária in vivo44
<b>Figura 12</b> – Registro representativo de uma calibração de eletrodo durante o experimento. 
<b>Figura 13</b> – Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU no JHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 56
<b>Figura 14</b> – Determinação do papel do NHE3 na modulação da reabsorção de HCO3 <sup>-</sup> proximal pela GLU58
Figura 15 – Efeito da perfusão de GALAC sobre a atividade do NHE359
<b>Figura 16</b> – Efeito da perfusão de um análogo não metabolizável da GLU no JHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 61
<b>Figura 17 –</b> Efeito da perfusão de iso-Leucina no JHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 61
<b>Figura 18</b> – Efeito da perfusão de um inibidor da hexoquinase no $JHCO_3^{-1}$
<b>Figura 19</b> – Efeito da adição de iso-Leucina à solução contendo 2-DG no JHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 63
<b>Figura 20 –</b> Efeito da perfusão de uma solução hipotônica no JHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 64
<b>Figura 21</b> – Representação esquemática do efeito da perfusão de altas concentrações de GLU ou α-MG sobre o transporte de água e o efeito da adição de Manitol à solução perfusora65

<b>Figura 22</b> – Determinação do efeito osmótico produzido pela perfusão de GLU40, α-M e GALAC40 sobre o JHCO3	1G40 66
<b>Figura 23 –</b> Efeito da perfusão de Plz sobre o JHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	71
Figura 24 – Estudo da co-localização entre os SGLTs e o NHE3	74
Figura 25 – Esquema do efeito do metabolismo da GLU sobre a atividade do NHE3	99
<b>Figura 26</b> – Esquema do efeito do aumento do aporte de GLU e o consequente aument	o de
volume celular sobre o NHE5	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU no JHC	<i>O</i> <sub>3</sub> <sup>-</sup> 57
Tabela 2 – Efeito da perfusão de solução CTRL, GLU5 e GLU40 sozinho o	u adicionado de
$S3226 \ 10\mu M \ no \ JHCO_3^{-}$	

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-DG-2-deoxy-D-glicose
- AC anidrase carbônica
- AC1 anidrase carbônica isoforma 1
- AC2 anidrase carbônica isoforma 2
- AC4 anidrase carbônica isoforma 4
- $AE-trocador \ anion/HCO_3^-$
- AQP aquaporina
- AQP-1 aquaporina isoforma 1
- BB-membrana de borda em escova
- CA anidrase carbônica
- CO2-gás carbônico
- CO<sub>2i</sub> gás carbônico intracelular
- DPP-IV dipeptidil peptidase IV
- GALAC galactose
- GALAC40 galactose 40mM
- GALAC5 galactose 5mM
- GLP-1 peptídeo semelhante ao glucagon
- GLU-Glicose
- GLU20 Glicose 20mM
- GLU40-Glicose 40mM
- GLU5 Glicose 5mM
- GLU60 Glicose 60mM
- GLUT transportador de glicose
- GLUT1 transportador de glicose isoforma1
- GLUT2 transportador de glicose isoforma2
- H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ácido carbônico
- $H_2O-\acute{a}gua$

- $HCO_3^-$  Bicarbonato
- JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fluxo de bicarbonato
- MAPK "mitogen activate protein kinases"
- NBC co-transportador Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- $NHE-trocador\;Na^{+}\!/H^{+}$
- NHE1 trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>isoforma1
- NHE3 trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>isoforma3
- NHERF "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factors"
- $NKA-Na^{\!+}\!/K^{\!+}\!ATPase$
- pCO<sub>2</sub>-pressão parcial de gás carbônico
- Plz-Phlorizina
- RFG Ritmo de filtração glomerular
- SGLT Co-transportador Na<sup>+</sup>/glicose
- SGLT1 Co-transportador Na<sup>+</sup>/glicose isoforma1
- $SGLT2-Co\mbox{-}transportador\ Na^{+}\!/glicose\ isoforma2$
- $t^{1/2}$  meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato ao nível estacionário
- TP Túbulo proximal
- $\alpha\text{-}MG-\alpha\text{-}metil\text{-}D\text{-}glicose$
- $\alpha\text{-}MG40-\alpha\text{-}metil\text{-}D\text{-}glicose40mM$
- $\alpha\text{-}MG5-\alpha\text{-}metil\text{-}D\text{-}glicose5mM$

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Mecanismos de reabsorção de glicose e bicarbonato no túbulo proximal	18
1.2 Trocador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> isoforma 3	21
1.3 Co-transportador Na <sup>+</sup> -glicose isoformas 1 e 2	24
1.4 Informações importantes sobre o metabolismo da glicose e de outros	
açúcares	28
1.5 Evidências da literatura da interação entre o transporte de $H^+$ via NHE3	
e o transporte de GLU via SGLT	32
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Materiais	39
3.2 Origem dos Animais	39
3.3 Métodos	40
3.3.1 Microperfusão estacionária in vivo	40
3.3.1.1 Grupos experimentais	40
3.3.1.2 Características da técnica de microperfusão estacionária	41
3.3.1.3 Preparo cirúrgico dos animais	45
3.3.1.4 Posicionamento e utilização da micropipeta dupla e do micro-	
eletrodo	46
3.3.1.5 Confecção da micropipeta dupla e do microeletrodo assimétrico	
de dois ramos	47
3.3.1.6. Características do microeletrodo e do sistema elétrico	49
3.3.2 Imunofluorescência	51
3.3.2.1 Fixação do tecido renal	51
3.3.2.2 Secção do tecido e preparo para imunofluorescência	52
3.3.3 Análise estatística	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU no JHCO3 <sup>-</sup>	54
4.2 Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU na atividade do	
NHE3	55

4.3 Efeito da substituição da GLU pela GALAC sobre a atividade do NHE3	55
4.4 Efeito do metabolismo da GLU sobre a atividade do NHE3	57
4.5 Efeito da adição de uma substância osmoticamente ativa à luz tubular	
sobre a inibição do JHCO3 <sup>-</sup> produzido pela GLU 40mM	63
4.6 Efeito da inibição dos SGLTs na atividade do NHE3	67
4.7 Efeito da adição de Plz à solução de GLU5	68
4.8 Efeito da adição de Plz à solução de GLU40	69
4.9 Efeito da adição de Plz à solução de GALAC5 e α-MG 5mM	70
4.10 Estudo da co-localização entre o NHE3 e os SGLTs	72
5 DISCUSSÃO	78
5.1 Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU sobre o NHE3	78
5.2 Efeito da substituição da GLU pela GALAC	79
5.3 Efeito da perfusão de α-MG sobre o NHE3	81
5.4 Efeito da perfusão de isoleucina na atividade do NHE3	83
5.5 Efeito da inibição da via glicolítica sobre a atividade do NHE3	83
5.6 Efeito da perfusão de iso-Leucina adicionada a solução de 2-DG	86
5.7 Interpretação do mecanismo fisiológico do metabolismo da glicose e da	
geração de ATP sobre a atividade do NHE3	87
5.8 Efeito do aumento do volume celular sobre o NHE3	87
5.9 Efeito do metabolismo da GLU sobre o NHE3 após correção do volume	
celular	90
5.10 Efeito da adição de manitol a solução de GALAC40	91
5.11 Efeito da inibição do SGLT sobre a atividade do NHE3	91
5.12 Estudo da co-localização entre o NHE3 e os SGLTs	95
5.13 Estudos da interação física entre o SGLT2 e o NHE	97
6 CONCLUSÃO	98
REFERENCIAS	101

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Mecanismos de reabsorção de glicose e bicarbonato no túbulo proximal

Os túbulos proximais (TP) iniciam-se na junção epitélio-glomerular e se estendem até a alça de Henle. São formados por uma membrana apical em borda de escova (BB) com alta capacidade de transporte de solutos, graças à expressão maciça de diversos transportadores de membrana. Entre eles vale destacar o trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> isoforma 3 (NHE3) e os cotransportadores Na<sup>+</sup>-glicose isoforma 1 e 2 (SGLT1 e SGLT2), que foram objeto do presente trabalho.

No TP ocorre reabsorção de aproximadamente 70% do bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e quase a totalidade da glicose (GLU) filtrados nos glomérulos (1;2). O NHE3 e os SGLTs são responsáveis pela reabsorção do HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e GLU (respectivamente) e são expressos na membrana apical deste segmento renal. Estes transportadores utilizam o potencial eletroquímico de Na<sup>+</sup> através da membrana, como força movente. Este gradiente é mantido pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (NKA), expressa na membrana basolateral do epitélio tubular renal. A atividade da NKA está vinculada a um gasto de energia metabólica, pois transporta Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> contra seus gradientes eletroquímicos. O Na<sup>+</sup> é transportado para o meio extracelular, e o K<sup>+</sup> para o meio intracelular, mantendo-se, com a atividade desse transportador, o meio intracelular pobre em Na<sup>+</sup> e concentrado em K<sup>+</sup>.

A reabsorção de GLU, como mencionado anteriormente, ocorre através do cotransportador Na<sup>+</sup>/GLU, isoformas 1 e 2 (SGLT1 e SGLT2) (3). Como pode ser visto na **figura 1**, a GLU filtrada nos glomérulos é reabsorvida da luz tubular, inicialmente via SGLT2, expresso nos segmentos iniciais do TP. O remanescente da GLU tubular é reabsorvido pelo SGLT1, expresso em segmentos distais do TP. A GLU reabsorvida deixa a célula por difusão facilitada, através dos transportadores de GLU isoformas 1 e 2 (GLUT1 e GLUT2), expressos na membrana basolateral do epitélio renal. A coordenação entre o transporte apical e basolateral de GLU gera o fluxo resultante transepitelial de GLU, permitindo que quase toda a GLU filtrada seja reabsorvida (4;5).

A reabsorção de bicarbonato, por sua vez, depende da secreção de  $H^+$ , sendo esta realizada majoritariamente via trocador  $Na^+/H^+$  isoforma 3 (NHE3), mas também através de outras proteínas extrusoras de  $H^+$ , tais como a  $H^+$ -ATPase vacuolar.



*Figura 1- Representação esquemática dos mecanismos de transporte de Na<sup>+</sup> e GLU em célula de túbulo proximal.* 

A maior parte da GLU filtrada é reabsorvida nos primeiros segmentos do túbulo proximal via SGLT2, enquanto que o restante da GLU é reabsorvido via SGLT1, em especial nos segmentos finais do TP. A GLU reabsorvida deixa a célula através de difusão facilitada, mediada pelos GLUT 2 e 1, que são expressos e trabalham coordenadamente com seus parceiros apicais (SGLT2 e 1 respectivamente). S1 = segmento inicial do túbulo proximal; S3 = segmento final do túbulo proximal (4).

A **figura 2** resume os processos químicos e de transporte que ocorrem durante a reabsorção de  $HCO_3^-$  após a extrusão de  $H^+$ , via NHE3. Como podemos ver na figura, as células proximais expressam, em sua membrana apical, o trocador sódio-hidrogênio (NHE). Este transportador secreta para a luz tubular íons  $H^+$ , usando a força movente do gradiente químico de Na<sup>+</sup>.

Uma vez que o  $H^+$  intracelular é secretado pelo NHE3 apical, através da troca com Na<sup>+</sup>, a maior parte do  $H^+$  secretado reage com o  $HCO_3^-$  luminal, formando ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Este é rapidamente desidratado pela atividade da enzima anidrase carbônica 4 (AC4) expressa na membrana apical do TP, sendo transformado em água (H<sub>2</sub>O) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (7). A AC acelera a cinética de desidratação do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em mais de 10.000 vezes (8). A água formada incorpora-se ao volume tubular e o CO<sub>2</sub> formado difunde-se através da Aquaporina 1 (AQP-1), ou através da membrana plasmática, para o meio

intracelular, até que o equilíbrio de pressões parciais desse gás, entre o lúmen tubular e o meio intracelular, seja atingido.



Figura 2- Papel do NHE na reabsorção renal de HCO<sub>3</sub>.

Os trocadores  $Na^+/H^+$  apicais, como o NHE3, operam em conjunto com a anidrase carbônica (CA), o trocador Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (AE) e canais de água – aquaporinas (AQP) -, mediando a reabsorção de NaCl, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e fluido do lúmen tubular. O NHE1, o Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> co-transportador (NBC) e a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (NKA) basolaterais transportam em conjunto com seus parceiros apicais, promovendo um fluxo resultante de NaCl e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e água transepitelial (6).

O CO<sub>2</sub> formado assim como o gás carbônico já presente no meio intracelular (CO<sub>2i</sub>) é hidratado em H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pela catálise da anidrase carbônica 2 (CA2), presente em abundância no citosol das células do TP. O H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> rapidamente se dissocia em HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup>, pois o equilíbrio desta reação está deslocado nesta direção, uma vez que o H<sup>+</sup> e o HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formados no meio intracelular são transportados para fora da célula (9).

 $O \ HCO_3^-$  formado no meio intracelular é transportado para o meio interno através da membrana basolateral, principalmente pelo co-transportador sódio-bicarbonato (Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NBC) e pelo trocador bicarbonato-cloreto (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ Cl<sup>-</sup>, AE) (6).

## 1.2 Trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> isoforma 3

O NHE3 é um polipeptídeo de 80 kDa (10), membro de uma família composta por 9 diferentes isoformas descritas até o momento (6). Todos os membros da família dos NHEs de mamíferos secretam um H<sup>+</sup> citosólico em troca por um Na<sup>+</sup> extracelular com uma estequiometria rígida de 1:1 e compartilham uma estrutura comum. Estes permutadores possuem uma porção N-terminal com aproximadamente 400 aminoácidos, formando 12 segmentos transmembrana, relativamente conservada entre as diferentes isoformas. A porção C-terminal citoplasmática é pouco conservada e apresenta aproximadamente 400 aminoácidos. Esta possui importantes funções regulatórias, contendo diversos sítios de fosforilação que são alvo de cinases e domínios de interação com fatores regulatórios (11) (**Figura 3**).

Em camundongos, o NHE3 é expresso principalmente nos rins, intestino delgado, cólon e ceco, além de estômago e cérebro. Em humanos, sua expressão foi verificada também nos testículos, ovários, cólon, próstata, timo, leucócitos, baço e placenta (12;13). Nos rins, o NHE3 é expresso principalmente na membrana apical do TP com pequena expressão no segmento ascendente grosso da alça de Henle (14).

O NHE3 é amplamente expresso no TP, tanto na região microvilar quanto na região intermicrovilar da BB (15). Este transportador desempenha um importante papel em relação à reabsorção de Na<sup>+</sup> e  $HCO_3^-$ . Sua atividade é modulada por diversos fatores: doenças, hormônios, toxinas, fatores humorais, peptídeos, entre outros (6). Tais fatores podem ocasionar mudanças no "turnover" do NHE3, ou mudanças em sua expressão apical, ocasionando tráfego da região microvilar para a região intermicrovilar, ou vice-versa (2;16).

Ambas as formas de modulação (mudança de "tunover" e tráfego de membrana) podem ocorrer pelo acionamento de cascatas de sinalização intracelulares que modificam a interação de proteínas regulatórias com o NHE3, sendo que a maior parte destas proteínas regulatórias está associada à longa alça C-Terminal do trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Além disso, diversas quinases e fosfatases, que realizam a (des)fosforilação direta de aminoácidos de sua alça C-terminal, já foram identificadas e são capazes de modular a atividade do NHE3 e até mesmo aumentar seu tráfego na BB (2).

A importância fisiológica do NHE3 se tornou mais evidente após a obtenção de camundongos "knock out" desta proteína. Estes animais apresentam defeitos severos de (re)absorção renal e intestinal com depleção de volume sistêmico, queda da pressão arterial e

do ritmo de filtração glomerular (RFG), altos níveis de expressão renal de renina e altos níveis séricos de aldosterona (2;17;18).

Além disso, quando submetidos à dieta hipossódica, os camundongos "knock out" não são capazes de reter Na<sup>+</sup> e apresentam acentuada perda de peso e insuficiência renal hipovolêmica (19). Quando submetidos à dieta hipersódica (Na<sup>+</sup> 5%), apesar do elevado aporte oral de Na<sup>+</sup>, estes não apresentam melhora dos sinais, provavelmente pela acentuada perda de água e Na<sup>+</sup> intestinais, causadas pela ausência de expressão intestinal do NHE3(13).

Woo, A. L. e col. (2003) desenvolveram um modelo de camundongo transgênico, "knock out" renal para o NHE3, mantendo a expressão deste no intestino delgado. Estes animais, quando tratados com dieta normossódica (Na<sup>+</sup> 1%) não apresentaram normalização de parâmetros, como níveis renais de renina, níveis séricos de aldosterona e pressão arterial, indicando que frente a um aporte normal de Na<sup>+</sup> na dieta, o NHE3 renal é indispensável para a manutenção da pressão arterial e do volume plasmático.

Todavia, quando submetidos a uma dieta hipersódica, estes animais apresentaram melhora de todos os parâmetros citados. Este achado indica que o aumento do aporte oral de e, consequentemente, o aumento da absorção intestinal de  $Na^+$  são capazes de suprir a perda renal deste íon (21).

O NHE3 também está envolvido na gênese ou manutenção de várias condições patológicas, principalmente relacionadas ao controle da pressão arterial e da volemia, tais como, o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão arterial essencial e hipertensão de outras origens (22-24). Além disso, apresenta importante papel nas alterações intestinais, principalmente relacionadas às diarreias (25;26). Por estas razões, este trocador tem sido exaustivamente estudado, bem como as proteínas e/ou fatores regulatórios que o modulam.

Nos últimos anos, várias proteínas regulatórias de diferentes isoformas do permutador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> foram descobertas, incluindo o grupo das "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factors" (NHERF), as "mitogen activated protein kinases" (MAPK), a ezrina, a "dipeptidil peptidase IV" (DPP-IV), entre outras. Além disso, se definiu diversas condições patológicas, hormônios, toxinas, fatores de crescimento, entre outros, que são capazes de modular sua atividade, função, transcrição e expressão (2;16;27).



Figura 3- Representação esquemática da estrutura predita para os NHEs.

Os NHEs são proteínas formadas por doze segmentos transmembrana e diversos sítios de fosforilação em sua longa alça C-terminal (20).

O diabetes é uma das doenças capazes de modular a atividade do NHE3 (28), além de ocasionar distúrbio ácido-base no organismo. Assim, esta doença pode regular este transportador de forma direta, através de mecanismos ainda não completamente conhecidos, mas também de forma indireta, ao ocasionar acidose, uma vez que esta também regula a atividade do NHE3 (17;29).

Além disso, a insulina, importante hormônio responsável pela manutenção da glicemia, é capaz de modular o trocador (24). Diversos trabalhos também demonstraram que o NHE3 é fortemente modulado pelo peptídeo semelhante ao glucagon -1 (GLP-1), e possui interação física proteína-proteína com a DPP-IV, a enzima responsável pela sua degradação (30-34). Sendo o GLP-1 um hormônio liberado pelas células L endócrinas do intestino no período pós-prandial e tendo este grande papel na homeostase glicêmica, é provável que exista uma interação entre a homeostase glicêmica e vias regulatórias do NHE3.

Assim, a coordenação entre o transporte de  $HCO_3^-$  e GLU há muito tempo foi postulada. Há hoje várias evidências na literatura sobre o papel da GLU na regulação da

atividade do NHE3, seja através de seu transporte, seja por condições patológicas do controle de sua homeostase (35-37).

## 1.3 Co-transportador Na<sup>+</sup>-glicose isoformas 1 e 2

Os SGLTs expressos nos rins fazem parte de uma ampla família denominada SLC5. Dentre os 11 membros dessa família codificados pelo genoma humano, o SGLT1, denominado SLC5A1, foi o primeiro membro descrito com homologia de 21 a 70%. Todos estes membros dos SGLTs possuem entre 60KDa e 80KDa, e aproximadamente 580 a 718 aminoácidos. Os SGLTs 1 e 2 e a maior parte dos demais membros, apresentam 14 hélices transmembrana com a alça N-terminal e C-terminal extracelular, sendo que a alça N-terminal apresenta diversos sítios de glicosilação, enquanto que a alça C-terminal apresenta estrutura diminuta (38).

A secreção de GLP-1 pelas células L endócrinas após a ingestão de GLU depende da absorção desta através do SGLT1, uma vez que este é o principal transportador intestinal responsável pela absorção de GLU e galactose (GALAC). Animais "knock out" para SGLT1 apresentam queda da secreção deste hormônio no período pós-prandial (39), confirmando a importância deste transportador na secreção deste importante hormônio com efeitos modulatórios sobre o NHE3.

O SGLT1 é expresso ao longo de todo intestino delgado (jejuno > duodeno = íleo), na musculatura esquelética (hSGLT) e nos rins, mas também já foi encontrado na traqueia, cérebro, coração, testículo e próstata (40). No túbulo proximal de ratos o rSGLT1 localiza-se na membrana de borda em escova (BB) (segmentos S1 < S2 < S3) e em organelas intracelulares (S1 > S2 > S3), com expressão menos acentuada na região cortical do que na medula externa (40;41). O SGLT2 é expresso quase que exclusivamente nos rins e na BB dos segmentos S1 e S2 (S1>S2) (42), mas o mesmo já foi detectado no cérebro, fígado, testículo e próstata (3).

Nos rins, os SGLTs são expressos de maneira heterogênea ao longo do TP. O SGLT2 é mais expresso no inicio do TP e o SGLT1 é mais expresso em regiões distais (41;42). A expressão destes é acompanhada pela expressão do GLUT2 e GLUT1, respectivamente, na membrana basolateral (1).

Além das diferenças de expressão, estes transportadores apresentam também diferentes afinidades em relação aos substratos que são transportados. O SGLT1 transporta

GLU e GALAC com afinidade semelhante, ao contrário do SGLT2 que apresenta menor afinidade pela GLU e baixíssima capacidade e afinidade pela GALAC. Ambos são capazes de interagir e transportar glicosídeos (moléculas formadas pela união de um glicídio e um não-glicídio ou glicona) como o  $\alpha$ -Methyl-D-glucopiranoside ( $\alpha$ -MG), mas não transportam D-mannose e D-frutose (1;43-45).

A afinidade dos SGLTs 1 e 2 pela GLU foi amplamente estudada. O SGLT2 é considerado um transportador de baixa afinidade-alta capacidade enquanto que o SGLT1 é considerado um transportador de alta afinidade-baixa capacidade (44;45). Porém, estudos recentes determinaram que ambas isoformas apresentam afinidades, isto é, Km (Km corresponde a metade da concentração de substrato necessária para que ocorra ligação ao sítio de transporte) semelhantes para GLU (2mM e 5mM para o SGLT1 e SGLT2 respectivamente) em condições fisiológicas. Em relação à capacidade de transporte, uma vez que esta depende do número de cópias e da capacidade de "turnover", não se conhece em detalhes as diferenças de capacidade entre estas proteínas em condições fisiológicas, por dificuldades experimentais (1;40;41;44;46).

Um modelo de como os SGLTs 1 e 2 transportam GLU e Na<sup>+</sup> já foi proposto. Neste o transporte de Na<sup>+</sup> e GLU obedece a uma cinética de seis estados. Foi definido também que ambos os transportadores são capazes de transportar Na<sup>+</sup> na ausência de qualquer substrato glicídico.

Neste modelo cinético de seis estados, nos estados de 1 a 3 o vestíbulo encontra-se voltado para o meio extracelular. Nesses estados ocorre a ligação do Na<sup>+</sup> e da GLU presentes no lúmen. Nos estados 4 a 6, o vestíbulo encontra-se voltado para o meio intracelular, e nestes estados ocorre liberação do Na<sup>+</sup> e da GLU para o meio intracelular. A **figura 4** esquematiza a cinética de transporte do SGLT1.

Na figura, em C1, está representada a proteína na ausência do ligante Na<sup>+</sup>. Nesta condição não ocorre a ligação de GLU, uma vez que seu sítio de ligação não fica evidente. Em C2, temos a representação da exposição do sítio de ligação para a GLU após a ligação de dois sódios ao sítio de ligação de sódio. Em C3, está representado o modo de lotação do transportador, com os dois substratos ligados, promovendo uma mudança alostérica na proteína, para o estado representado em C4. Neste, o vestíbulo abre-se para o meio interno. Nessa conformação a afinidade pela GLU é menor e, portanto, ela se solta de seu sítio de ligação liberando o Na<sup>+</sup> (C5), que também se solta de seu sítio movido pelo gradiente

favorável (baixa concentração de sódio intracelular) (C6). A seta ligando o estado C2 ao estado C5 mostra a possibilidade de transporte de Na<sup>+</sup> na ausência de transporte de GLU (47).

Diversos glicosídeos são capazes de inibir estes transportadores. O mais antigo e amplamente estudado, a Phlorizina (Plz), é capaz de inibir ambas isoformas, porém, o SGLT2 apresenta maior sensibilidade a este inibidor que o SGLT1. Estudos de expressão heteróloga em oócitos mostram que, quando aplicada no meio extracelular, a Plz inibe os SGLTs competindo pelo sítio de ligação da GLU. Além disso, estes estudos determinaram que a concentração de Plz capaz de inibir 50% do transporte via SGLTs 1 e 2 (medida através da técnica de patch clamp, como inibição de 50% da corrente medida) é de 140nM e 11nM, na presença de GLU 2mM e 5mM, respectivamente (1;43).

Atualmente diversos  $\beta$ —glicopiranosídeos com capacidade de inibir seletivamente o SGLT2 foram desenvolvidos, uma vez que a inibição do SGLT2 renal foi proposta como tratamento para o diabetes. O mecanismo de seletividade proposto para o dapagliflozin, uma dessas moléculas, refere-se ao período de ligação do inibidor à molécula do SGLT2 em relação ao SGLT1. Para este aglicone específico, o tempo em que este permanece na forma ligada é de 500s para o SGLT2 e apenas 2,5s para o SGLT1. De maneira comparativa, a Plz permanece apenas 30s ligada ao SGLT2 e 14s ao SGLT1 (43).

Estes inibidores seletivos foram recentemente aprovados para o tratamento do diabetes pelas agências de saúde da Europa e dos EUA. A curta experiência clínica com tais medicamentos já demonstrou que estes são capazes de corrigir a hiperglicemia, a insulinemia e a glicemia pós-prandial, são capazes de promover queda de peso e queda da pressão arterial. Alguns estudos demonstraram que estes fármacos promovem queda da pressão arterial por apresentarem um efeito diurético (48-50).

A importância fisiológica destes dois transportadores pode ser evidenciada pelos estudos com camundongos "knock out" e também pela incidência de duas doenças genéticas distintas em humanos com mutação nos genes codificantes para SGLT1 e para SGLT2.

A deficiência da expressão da isoforma 1 dos SGLTs produz uma doença genética autossomal recessiva, denominada síndrome da má reabsorção de GLU-GALAC. Os sintomas desta síndrome surgem logo após o nascimento e caracterizam-se principalmente por diarreia osmótica. Esta é ocasionada pela não absorção intestinal de GLU e GALAC presentes no leite materno, devido a mutações no gene SLC5A1, codificante desta importante proteína intestinal. Indivíduos com esta doença apresentam diarreia, desidratação, perda de peso,

aumento dos borborigmos intestinais, do peristaltismo, distensão de alças intestinais e apatia (5;51).



*Figura 4- Modelo de cinética do co-transportador Na<sup>+</sup>/GLU.* 

+, Na<sup>+</sup>; -, GLU (52)

A deficiência da expressão da isoforma 2 dos SGLTs produz uma doença genética codominante, com característica completamente distinta da síndrome da má absorção de GLU-GALAC, denominada, Glicosúria renal familiar. Na maior parte dos casos a doença deve-se a mutações do gene SLC5A2 (codificante para o SGLT2), mas por ser esta uma doença que apresenta uma variabilidade muito grande na gravidade dos sinais clínicos, acredita-se que mutações em outros genes podem estar envolvidas (5;53).

Uma vez que possui sinais brandos, mesmo nos casos mais graves, a Glicosúria Familiar renal é considerada uma enfermidade benigna. A doença é, atualmente, clinicamente dividida de acordo com os sinais que produz, em: glicosúria branda, quando a carga excretada de GLU corrigida pela superfície corpórea em uma coleta de urina de 24 horas é <10g/1,73m<sup>2</sup> por dia; e severa, quando a carga excretada é  $\geq$ 10g/1,73m<sup>2</sup> por dia. Em alguns casos mais severos a carga excretada corresponde à carga filtrada de GLU, mas mesmo nesses casos, os portadores da doença apresentam apenas poliúria e enurese, além de atraso na maturação sexual e leve déficit de crescimento. Em casos isolados observou-se aminoacidúria, provavelmente devido à dissipação do gradiente eletroquímico para o  $Na^+$ , que dificultaria a reabsorção de aminoácidos dependente do co-transportador  $Na^+$ /amino-ácidos (53).

Experimentos realizados em camundongos "knock out" para SGLT2 demonstram que, em condições fisiológicas, o SGLT2 é responsável pela reabsorção da totalidade da GLU filtrada. Porém, na ausência da expressão desta proteína, ainda ocorre a reabsorção de 30-40% da carga filtrada de GLU, provavelmente via SGLT1. Estes experimentos demonstraram não só a importância fisiológica do SGLT2, mas também que o SGLT1 é capaz de reabsorver cerca de ~35% da GLU filtrada, indicando que sua atividade é exacerbada durante ausência e provavelmente durante a inibição da atividade do SGLT2 (5;54).

Estudos realizados a 37 °C em oócitos expressando o SGLT1 e 2 determinaram que o SGLT2 funciona com apenas 50% da sua capacidade em condições de normoglicemia (1). Estes experimentos com expressão heteróloga determinaram que a ocorrência de glicosúria por saturação do transporte proximal de GLU deve ocorrer apenas quando a concentração de GLU exceder 35mM de GLU, concentração ~7 vezes maior que a encontrada no sangue em condições normais de glicemia (1;54).

Esses dados são consistentes com a experiência clinica em pacientes diabéticos, nos quais a ocorrência de glicosúria é observada apenas quando a glicemia alcança valores altos, e corrobora também experimentos em animais, nos quais em glicemias de 250mg/dl não se observou glicosúria (55-57).

É interessante lembrar que durante ausência de expressão ou durante o uso de inibidores para o SGLT2, a compensação funcional deste pelo SGLT1 (que se encontra mais ativo nesta situação), pode trazer consequências para a reabsorção de Na<sup>+</sup>, uma vez que a estequiometria do transporte acoplado Na<sup>+</sup>:GLU para o SGLT1 é de 2:1, enquanto para o SGLT2 é de 1:1 e, portanto, mais sódio é reabsorvido por unidade de GLU através do SGLT1 (1;3;44;45;58).

#### 1.4 Informações importantes sobre o metabolismo da glicose e de outros açúcares

A GLU é metabolizada inicialmente em piruvato pela glicólise, processo este que ocorre no citosol. O piruvato é posteriormente metabolizado na mitocôndria através da cascata oxidativa. A **figura 5** representa esquematicamente os eventos que ocorrem durante o processo de glicólise.

A hexoquinase, primeira enzima da via glicolítica, é responsável pela adição de um grupo fosfato, proveniente de um ATP, ao 6° carbono da GLU, gerando GLU-6-fosfato (G6F). Uma vez este esteja formado, a enzima fosfoglucoisomerase converte a molécula de G6F em seu isômero de 5 lados, frutose-6-fosfato (F6F). A enzima fosfofrutoquinase então adiciona um grupo fosfato, proveniente de um ATP, ao 1ª carbono da F6F, formando frutose-1,6-bifosfato (F1,6F). A enzima aldolase abre o anel da F1,6F e quebra esta molécula em 2 moléculas de 3 carbonos: uma molécula de dihidroxiacetona-fosfato e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato (G3P). A enzima triose isomerase converte rapidamente a dihidroxiacetona-3-fosfato em G3P modificando a posição do grupo fosfato (a partir desta etapa da glicólise, todas as reações descritas ocorreram para as duas moléculas de G3P formadas, porém, descreveremos apenas uma reação).

A enzima triose-fosfato-desidrogenase transfere inicialmente um H<sup>+</sup> da molécula de gliceraldeído-3-fosfato para o agente oxidante nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>), formando NADH. Em seguida, esta mesma enzima adiciona um fosfato inorgânico na molécula de G3P oxidada, formando 1,3-bifosfoglicerato (BPG). A enzima fosfogliceratoquinase transfere então um fosfato da molécula de 1,3-BPG para uma molécula de ADP, formando ATP. Este processo forma uma molécula de 3-fosfoglicerato (3-FG) e ATP. A enzima fosfoglicerato mutase transfere o grupo fosfato da molécula de 3-FG para o 2° carbono da molécula, formando 2-fosfoglicerato (2-FG). A enzima enolase desidrata o 2-FG, formando ácido fosfoenolpiruvato (PEP). Por fim, a enzima piruvato-quinase transfere um fosfato do PEP para um ADP, formando ATP e ácido pirúvico.

Diversos trabalhos da literatura atribuem importante papel à glicólise na modulação de transportadores de membrana (59). A fundamentação destes trabalhos está alicerçada no fato de que muitos transportadores encontram-se distantes das regiões enriquecidas de mitocôndrias. Cálculos da taxa de difusão do ATP gerado nas proximidades dessas regiões indicam que a necessidade de diversos transportadores poderia não ser satisfeita apenas pela produção de ATP via respiração oxidativa (60;61). Estes estudos foram majoritariamente conduzidos utilizando-se a 2-deoxy-D-glicose (2-DG), um inibidor da primeira enzima da glicólise (a hexokinase) (62). Este análogo da GLU não é transportado pelos SGLTs e não é reabsorvido pelos rins de humanos, porém é reabsorvido no túbulo proximal de ratos (33% segmento S1, 13% segmento S2 e 9% segmento S3) (3;63).

Como mencionado anteriormente, além da GLU, os SGLTs são responsáveis pelo transporte de outros açúcares, tais como a GALAC. A GALAC é uma hexose muito importante por ser, junto à GLU, a principal hexose presente no leite, sendo esta absorvida via SGLT1 no intestino.

Nos rins, a GALAC é reabsorvida no túbulo proximal pelo SGLT1, sendo a afinidade do SGLT2 por este açúcar muito baixa (1). Como descrito anteriormente, ao contrário do intestino, estas duas isoformas distintas dos SGLTs são expressas no túbulo proximal: o SGLT1, considerado um transportador de alta afinidade–baixa capacidade, expresso principalmente no segmento S3, mas também presente no segmento S2 do túbulo proximal; e o SGLT2, um transportador de alta capacidade–baixa afinidade, expresso principalmente nos segmentos S1 e S2 (46).

O metabolismo da GALAC difere do metabolismo da GLU nas primeiras etapas da glicólise. Enquanto a GLU é fosforilada no sexto carbono pela hexoquinase, dando origem à glicose-6-fosfato (G-6F), a GALAC é fosforilada no primeiro carbono pela galactoquinase (GALK), formando a galactose-1-fosfato (Gal-1F). A Gal-1F juntamente com a uracildifosfato-glicose (UDP-GLU) são transformadas, pela enzima galactose-1-fosfato uridililtransferase (GALT), em uracil-difosfato-galactose (UDP-Gal) e glicose-1-fosfato (G-1F). A G-1F é rapidamente biotransformada em GLU, enquanto que a UDP-Gal é metabolizada em UDP-GLU pela enzima UDP-galactose-4-epimerase (GALE), servindo de substrato para a metabolização de novas moléculas de GALAC pela GALT (**Figura 6**) (64).

Os rins são responsáveis pela metabolização de aproximadamente 20% da glicose consumida em uma refeição.(65) Neste cenário, o TP é o segmento que apresenta a menor expressão de hexoquinase, mas que apresenta a maior expressão e atividade da enzima glicose-6-fosfatase deidrogenase, indicando que este segmento é capaz de realizar glicólise, uma vez que apresenta toda a aparelhagem celular para isto. (66;67) No entanto, acredita-se atualmente que o TP utilize apenas fontes não-carboidrato como fonte de energia, uma vez que a membrana apical do TP expressa diversas enzimas capazes de biotransformar aminoácidos em intermediários do ciclo de Krebs, entre eles a isoleucina. (67)



Figura 5- Representação esquemática do metabolismo da GLU.

Durante o processo de glicólise a molécula de GLU é biotransformada em duas moléculas de ácido pirúvico por uma série de enzimas que atuam em 10 etapas distintas. Fonte: (http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/601glycolysissum.html).



(A) Representação das enzimas responsáveis pela biotransformação da GALAC em UDP-GLU (64). (B) Molécula de UDP-GLU (uracil-difosfato GLU). Esta é formada por um grupamento pirofosfato, uma ribose, uma GLU e um nucleotídeo uracil (Modificado de: http://en.wikipedia.org).

# 1.5 Evidências na literatura da interação entre o transporte de $H^+$ via NHE3 e o transporte de GLU via SGLT

Por serem transportadores ativos secundários, há muito se postulou uma possível relação funcional entre o NHE3 e os SGLTs. Além disso, sabe-se que o NHE3 é modulado por doenças e hormônios relacionados ao metabolismo/homeostase da GLU. A diabetes e a

33

insulina estimulam o trocador enquanto que o GLP-1, secretado pelos enterócitos no período pós-prandial, inibe a atividade do NHE3. Ademais, o permutador apresenta interação física proteína-proteína com a DPP-IV, enzima responsável pela degradação do GLP-1 circulante (24;28;31;68).

Há diversos trabalhos na literatura sobre a interação funcional do SGLT1 e do NHE3 intestinais. Nos intestinos, o SGLT1 parece estimular o NHE3, aumentando sua expressão apical, via p38MAPKinase e diversas outras quinases. Estas ativam a proteína do citoesqueleto Ezirina, que é responsável pela translocação do NHE3 dos domínios intermicrovilares para as regiões menos densas do microvilo da BB do intestino delgado (37;69-71). Coincidentemente, a atividade do SGLT1 também é responsável, após a ingestão de GLU, pelo aumento da secreção de GLP-1 nas células L, sendo que o GLP-1 circulante inibe o NHE3 (39). Acredita-se que a ativação sinérgica do SGLT1 e do NHE3 no intestino ocorra para otimizar a absorção de nutrientes no período pós-prandial. A despeito do crescente interesse em se estudar a coordenação entre o NHE3 e o SGLT1 nos intestinos, não há ainda estudos a respeito desse mecanismo em células de túbulo renal "in vivo" e pouco há a esse respeito "in vitro". A **figura 7** resume os achados até o momento sobre a modulação do NHE3 pelo transporte de GLU nos intestinos (69-72).

O estudo dos efeitos da GLU e de seu transporte sobre a atividade do NHE3 tornou-se cada vez mais importante, devido aos avanços nos conhecimentos da regulação do NHE3 por hormônios responsáveis pela homeostase glicêmica, no tecido renal ou em outros tecidos. E mais ainda, devido aos avanços no desenvolvimento de inibidores do SGLT2, que já foram aprovados em alguns países para o tratamento da diabetes (pe. Dapagliflozin). Assim, é fundamental determinar a influência da GLU e de seu transporte nos rins, uma vez que esta isoforma do SGLT é especificamente expressa neste tecido, e não no intestino (42).

Além disso, apesar do SGLT1 e do NHE3 serem expressos nos dois tecidos, a existência de expressão do SGLT2 nos rins pode resultar em diferenças ainda não elucidadas no que concerne a esta coordenação entre os diferentes transportadores de solutos através da membrana apical. Não obstante, as funções que desempenham estes dois órgãos podem resultar em diferenças quanto a sua regulação.

Os intestinos absorvem grandes quantidades de nutrientes no período pós-prandial. Sendo assim, durante o período de jejum as concentrações de GLU e Na<sup>+</sup> são menores que as plasmáticas e abruptamente tornam-se extremamente superiores a estas durante a refeição.

*Figura 7- Prováveis vias de sinalização pelas quais a GLU, via SGLT1, estimula o NHE3, aumentando sua exocitose.* 



RE = retículo endoplasmático; BML = Membrana baso-lateral; BB = membrana apical (2)

No período pós-prandial, o intestino recebe sinais hormonais e sofre mudanças intracelulares, com a entrada de grande quantidade de solutos que ativam cascatas de sinalização e receptores. Estes são responsáveis pela modulação da atividade dos transportadores de membrana dos diversos tipos celulares expressos ao longo dos intestinos. Neste período ocorre a ativação de uma via responsável pela inserção do transportador GLUT2 na membrana apical, uma vez que a concentração apical é muito superior à concentração celular durante as refeições. Após a refeição, o GLUT2 deixa de ser expresso na membrana apical, mas sua expressão basolateral se mantém. Durante o jejum, o SGLT1 é normalmente expresso, isto é, sua expressão não diminui, ao contrário do que ocorre com o GLUT2, sendo que o SGLT1 não parece ser modulado por variações de expressão apical. Neste período (jejum), o este transportador parece ser responsável pela captação de GLU da luz, que encontra-se em baixíssima concentração (**Figura 8**) (18).

O mesmo não ocorre no tecido renal. Diariamente são filtrados aproximadamente 180g de GLU. Em condições de normoglicemia, a concentração de GLU no filtrado glomerular, no inicio do TP, é constante e idêntica à do plasma durante todo o dia, sem sofrer grandes variações, em situação de jejum ou após as refeições. Cerca de 97% da GLU filtrada é reabsorvida via SGLT2 nos segmentos iniciais do TP. O restante é reabsorvido pelo SGLT1, expresso em segmentos distais do TP (**Figura 9**).

Além disso, há pouca evidência da expressão apical de GLUT2 em condições de normoglicemia, sendo o papel deste nos rins o de realizar o transporte facilitado de GLU na membrana basolateral, principalmente nos segmentos S1 e S2 do TP. O GLUT1, por sua vez, realiza o transporte facilitado em segmentos mais distais do TP (**Figura 9**) (5).

Sendo assim, apesar de haver vários indícios da correlação entre o transporte de GLU, a manutenção da glicemia e o NHE3, pouco se sabe dos principais mecanismos, sejam eles químicos ou físicos, envolvidos nas mudanças da atividade do NHE3, devido a variações agudas do aporte de GLU no túbulo proximal. O entendimento destes mecanismos pode trazer informações relevantes sobre a coordenação do transporte apical de solutos e melhorar a compreensão das modificações funcionais do transporte destes em situações patológicas.


Figura 8- Esquema do modelo de absorção intestinal antes e após a refeição.

(A) Durante o jejum e antes das refeições (before a meal), na presença de baixíssimas concentrações de carboidratos ou na ausência deste, o SGLT1 é responsável pela absorção da GLU presente na luz, uma vez que apresenta alta capacidade de concentração (transporte ativo secundário). Nesta condição, o GLUT2 apical é internalizado e permanece em vesículas. O GLUT2 basolateral, por sua vez, é responsável pelo transporte facilitado de GLU do interstício para o interior da célula, suprindo assim, juntamente com a GLU absorvida via SGLT apical, as necessidades celulares de energia. (B) Após a refeição (after a meal), a concentração luminal de GLU alcança valores capazes de saturar o SGLT1, e este transporta grandes quantidades de GLU para o meio intracelular. O aumento da GLU intracelular gera sinais positivos para a inserção de GLUT2 na membrana apical. Devido à alta concentração apical de GLU, o GLUT2, nesta situação realiza o transporte facilitado de GLU do lúmen para o meio intracelular. O GLUT2 basolateral continua realizando transporte facilitado para o interstício, uma vez que a concentração instersticial se mantém próxima à plasmática devido à receptação de GLU pelos capilares intestinais (18).



Figura 9- Esquema do modelo de reabsorção renal de GLU.

Todos os dias ~180g de GLU são filtrados pelos glomérulos em sujeitos normoglicêmicos. Cerca de 97% da GLU filtrada é reabsorvida pelo SGLT2 no inicio do TP. O SGLT1 reabsorve apenas 3% deste total nos segmentos distais do TP, sendo excretadas quantidades desprezíveis de GLU na urina. Sendo assim, a concentração de GLU ao longo do TP vai caindo, uma vez que boa parte da água é reabsorvida juntamente com a GLU, mas também pela reabsorção de NaCl e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> neste segmento. Durante a inibição farmacológica da atividade do SGLT2, o SGLT1 é capaz de reabsorver 40% de toda a GLU filtrada, demonstrando que sua capacidade de transporte é muito superior ao aporte fisiológico de GLU. Nesta condição, 60% da GLU filtrada é perdida na urina. Trabalhos recentes atribuíram importante papel do canal de potássio KCNE1/Q1 na reabsorção de GLU tubular (5).

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar os mecanismos envolvidos na modulação do transporte de  $HCO_3^-$  pela GLU, com ênfase na modulação do NHE3, importante proteína responsável pela reabsorção de Na<sup>+</sup> e  $HCO_3^-$ . Nosso interesse foi o de definir o papel do metabolismo e transporte de GLU sobre a atividade do NHE3, determinando assim se a GLU é o único substrato glicídico transportado pelo epitélio proximal responsável por qualquer efeito sobre o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Além disso, tínhamos o interesse de definir a co-expressão dos SGLTs e do NHE3 na membrana apical do TP.

Foram nossos objetivos:

- Determinar se o fluxo de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é modulado por variações agudas da concentração de GLU luminal "in vivo"
- Determinar se essas mudanças do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ocorrem devido à modulação do NHE3 ou de outro transportador de H<sup>+</sup>.
- Determinar se a GALAC é capaz de modular o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> da mesma forma que a GLU.
- Determinar se o metabolismo da GLU é responsável pela modulação do JHCO<sub>3</sub>.
- Determinar se a glicólise desempenha papel importante na modulação do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pela GLU.
- Determinar se variações do volume celular ocasionadas pelo transporte de grandes quantidades de GLU são responsáveis pela modulação do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- Determinar se o transporte de GLU pelo SGLT é capaz de modular o JHCO<sub>3</sub>.
- Determinar se os SGLT1 e 2 são expressos nas mesmas regiões do TP, isto é, se ocorre co-localização destes.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

## **3.1 Materiais**

- Sigma: DMSO (dimethyl sulfoxide); Phlorizin; α-MG (α-methyl-D-glicose); glicose; GALAC; 2-deoxy-D-glicose; Rafinose; Manitol
- Fluka: Hydrogen Ionophore I; Hexamethyldisilazane;
- Roche: Heparina Liquemine
- Virbac: Cetamin
- Univet: Acepran
- Fresenius: Propofol
- Synth e Sigma: demais sais utilizados para a preparação das soluções
- S3226 foi gentilmente doado pelo Dr. Jurgen Punter da Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha
- Os anticorpos: anti-SGLT2 policlonal e anti-NHE3 monoclonal foram obtidos da Santa Cruz, Dallas, Estados Unidos.
- O anticorpo anti-SGLT1 policional foi obtido da Abcam, Cambridge, Estados Unidos.
- Os anticorpos secundários Alexafluor-588 e AlexaFluor-488 foram obtidos da Life Technology, Carlsbad, Estados Unidos.

## 3.2 Origem dos Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar machos, com peso entre 200 e 350g, para a execução deste trabalho. Esses animais foram obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para estudos em animais, do ICB. Neste biotério, os animais foram colocados em gaiolas de polietileno com tampa de grade metálica contendo água filtrada e comida (Nuvilab, São Paulo) *ad libitum* numa lotação de até 5 ratos por gaiola, com 15 a 20 trocas de ar por hora e um ciclo de claro/escuro de 12 horas.

## 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Microperfusão estacionária in vivo

Ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 350g, foram mantidos no biotério de experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, alimentados com dieta normal de laboratório em pellets e com água *ad libitum* até o momento do procedimento. A técnica de microperfusão estacionária foi realizada como descrito anteriormente por MALNIC *e* MELLO-AIRES, 1971 (73) e AMORIM *e* MALNIC, 2006 (74) e LESSA, L. M.; *et al* (2009) (75).

#### **3.3.1.1 Grupos experimentais**

Neste trabalho, a técnica de microperfusão estacionária *in vivo* foi utilizada, para se determinar o efeito da GLU, análogos desta, ou inibidores de seu transporte ou metabolismo, sobre o transporte de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> em TP. A partir da solução padrão, composta de NaCl 90mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM e MgSO<sub>4</sub> 1,2mM, diferentes soluções perfusoras foram utilizadas para se estudar os efeitos da GLU (seus análogos, inibidores de seu transporte ou de seu metabolismo), sendo elas:

- Solução Perfusora Controle (CTRL): corresponde a solução padrão ajustada para a osmolaridade de 300mOsmois/Kg de H<sub>2</sub>O pela adição de rafinose, sendo que está não é transportada através de membranas biológicas e, portanto, se mantém na luz tubular após a perfusão. Esta solução foi utilizada como CTRL para todos os grupos experimentais e corresponde a uma condição de ausência de substratos transportados pelos SGLTs e ausência de GLU.

 Solução Perfusora com diferentes concentrações de GLU: à solução perfusora padrão foi adicionado GLU nas concentrações de 5mM (GLU5), 20mM (GLU20), 40mM (GLU40) e 60mM (GLU60).

 Solução Perfusora contendo inibidor do NHE3: à solução CTRL, GLU5 e GLU40 foi adicionado S3226 10µM, um inibidor específico do NHE3.

Solução Perfusora adicionada de GALAC: à solução perfusora padrão foi adicionado
GALAC nas concentrações de 5mM (Galac5) e 40mM (Galac40).

- Solução Perfusora adicionada de iso-Leucina: à solução perfusora padrão foi adicionada iso-Leucina nas concentrações de 20mM (Leu20) e 40mM (Leu40).

- Solução Perfusora adicionada de um análogo não-metabolizável da GLU, a  $\alpha$ -methyl-D-GLU ( $\alpha$ -MG): à solução perfusora padrão foi adicionada  $\alpha$ -MG nas concentrações de 5mM ( $\alpha$ -MG5) e 40mM ( $\alpha$ -MG40).

- Solução Perfusora contendo um inibidor da hexoquinase, a primeira enzima da via glicolítica, a 2-deoxy-D-GLU: à solução perfusora CTRL e GLU5 foi adicionada 2-deoxy-D-GLU 10mM.

- Solução Perfusora contendo 2-deoxy-D-GLU adicionado ou não de iso-Leucina: à solução perfusora CTRL ou 2-DG 10mM foi adicionado iso-Leucina na concentração de 10mM.

- Solução Perfusora hipotônica: utilizou-se a solução padrão sem a adição de rafinose, apresentando osmolaridade de 250mOsmóis/Kg de água.

- Solução Perfusora contendo Manitol 20mM e 40mM: às soluções perfusoras CTRL, GLU40, GALAC40 e  $\alpha$ -MG40 foi adicionado manitol nas concentrações de 20mM e 40mM. - Solução Perfusora contendo Phlorizina (Plz): à solução perfusora CTRL foi adicionada Plz nas concentrações de 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM e 2mM; à solução perfusora GLU5 foi adicionada Plz nas concentrações de 50 $\mu$ M, 10mM, 2mM e 4mM; à solução GLU40 foi adicionada Plz nas concentrações de 500 $\mu$ M, 1mM, e 2mM; a solução de GALAC5 e  $\alpha$ -MG5 foi adicionada Plz nas concentrações de 50 $\mu$ M, 500 $\mu$ M, 1mM.

A correção da osmolaridade das soluções perfusoras para 300mOsmois/Kg de H<sub>2</sub>O, com rafinose, foi realizada somente após a adição de todos os componentes de cada uma das soluções. Para se determinar a quantidade de rafinose a ser adicionada em cada solução, a osmolaridade das mesmas foi medida em osmometro de pressão de vapor (Wescor, USA). Para os grupos realizados com as soluções contendo manitol, a osmolaridade foi primeiramente corrigida com rafinose e, somente após, foi acrescentado manitol nas concentrações de 20mM e 40mM, sendo as soluções usadas para este grupo experimental hipertônicas.

#### 3.3.1.2 Características da técnica de microperfusão estacionária

Através da técnica de microperfusão estacionária *in vivo*, uma micropipeta dupla contendo solução perfusora alcalina corada de verde-FDC em um ramo e óleo de rícino

corado com negro Sudan no outro foi usada para puncionar um túbulo proximal visualizado por microscópio. O túbulo puncionado foi então perfundido com a solução corada, sendo que esta foi isolada da solução tubular proveniente do glomérulo e mantida estacionária (até o momento da próxima perfusão), por gotas de óleo.

Neste mesmo túbulo, algumas alças adiante da punção inicial, identificada a partir do corante da solução perfusora, foi colocado um microeletrodo de dois ramos, conectado a um eletrômetro cujo sinal foi convertido de analógico para digital e gravado, em intervalos de 0,5s, por um conversor análogo-digital (Lynx, Brasil). Este eletrodo, cujo um dos ramos é seletivo para H<sup>+</sup>, foi utilizado para monitorar variações do pH tubular, em tempo real, durante todo o procedimento.

Sendo assim, a cada perfusão tubular obteve-se uma curva experimental cujo valor de pH inicial, correspondente ao pH da solução experimental (que é alcalino uma vez que a solução possui 25mM de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que foi sendo acidificado, ao longo do tempo, até um valor estacionário (**Figura 10**).

A acidificação observada ocorreu, em geral, em duas fases: uma fase rápida e outra mais lenta. A acidificação inicial rápida corresponde à acidificação dependente de  $CO_2$  e ocorre pela difusão de  $CO_2$  (uma vez que este é lipofílico) a partir do meio intracelular (da célula do túbulo perfundido) em direção à solução perfusora, recém injetada na luz tubular. A difusão de  $CO_2$  da célula para a solução ocorre devido ao grande gradiente existente, uma vez que a solução perfusora apresenta pressão parcial de  $CO_2$  (p $CO_2$ ) igual à do ambiente, e portanto, próxima de zero, enquanto que a p $CO_2$  tubular é semelhante à arterial, e portanto, próxima de 45mmHg (76). A fase de acidificação rápida não foi utilizada no presente trabalho tendo sido excluída das análises (**Figura 10**).

A fase de acidificação lenta, posterior, corresponde à fase de acidificação dependente da secreção de H<sup>+</sup>, para a luz tubular, através de transportadores de membrana presentes na membrana apical, ou através da via paracelular (**Figura 10**). No túbulo proximal, a acidificação observada na fase lenta de recuperação ocorre majoritariamente via NHE3, uma vez que a acidificação tubular é amplamente inibida pela perfusão de solução zero Na<sup>+</sup>, ou contendo S3226, um inibidor específico do NHE3 (68). Porém, a H<sup>+</sup>ATPase também é expressa e responsável pela maior parte da acidificação remanescente que ocorre na presença do inibidor para NHE3 (ou durante a perfusão com solução sem Na<sup>+</sup>) (77).

A acidificação observada após a perfusão da solução contendo bicarbonato alcança um valor estacionário (**Figura 10**), que corresponde ao poder máximo de concentração dos

transportadores renais de  $H^+$  presentes na membrana apical do TP. O pH estacionário depende, então, da fonte de energia utilizada pelo transportador, sendo que esta fornece a energia para a criação de um gradiente químico entre os compartimentos.





O traçado representa o potencial obtido pelo eletrodo durante a perfusão tubular, em um animal perfundido com solução de GLU 20mM e bicarbonato 25mM. Em 1: potencial que representa o pH tubular inicial; em 2: momento em que ocorre a perfusão da solução; em 3: recuperação do pH dependente de CO<sub>2</sub>; em 4: recuperação de pH dependente de transportadores de H+; em 5: potencial que representa o pH estacionário ao final da perfusão.

Para o TP, a acidificação tubular ocorre majoritariamente via NHE3, como descrito anteriormente. Esta proteína utiliza o gradiente de Na<sup>+</sup>, existente entre a solução perfusora e a célula do TP, como força movente para a secreção do H<sup>+</sup>. O gradiente de Na<sup>+</sup> depende da concentração de Na<sup>+</sup> na solução perfusora e no interior da célula, sendo esta última gerada, principalmente pelas características biofísicas da membrana e pela atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase basolateral (**Figura 11**).

Nos experimentos de microperfusão deste trabalho, a concentração de Na<sup>+</sup> de todas as soluções perfusoras foi sempre igual (90mM) e, portanto, a ocorrência de variações na concentração de Na<sup>+</sup> foi minimizada. Esta só existiu após o inicio do transporte de solutos e água, uma vez que a rafinose adicionada às soluções não é reabsorvida e se mantém na luz tubular durante todo o tempo em que a coluna de fluido se mantém estacionária. Estas pequenas alterações de concentração de Na<sup>+</sup> não parecem afetar a capacidade de acidificação tubular, uma vez que o pH estacionário atingido foi muito semelhante em todos os grupos experimentais (mesmo entre os grupos CTRL e os grupos nos quais a maior parte da rafinose

foi substituída por GLU e que, portanto, apresentava muito menos rafinose que a solução CTRL), provavelmente pela reciclagem de Na<sup>+</sup> através da via paracelular.

## Figura 11- Representação Esquemática do Sistema Utilizado para Microperfusão Estacionária in vivo.



À esquerda, representação de um néfron sendo perfundido por uma pipeta de perfusão de dois ramos com P (solução de perfusão) e C (óleo de rícino). Neste mesmo néfron, foi colocado um microeletrodo de dois ramos com resina de troca iônica sensível a H<sup>+</sup> (IE) e solução de referência (em verde). À direita, representação da luz tubular durante o experimento de microperfusão estacionária in vivo (eletrodos e pipeta foram suprimidos). A solução experimental (em verde) contendo HCO3- 24mM, Na+ 100mM e rafinose (ver tabela para demais sais de sua composição), com ou sem GLU ou outros açúcares, é adicionada ao lúmen tubular e separada do fluído tubular por gotas de óleo. Esta solução se mantém estacionada no lúmen (devido à característica de viscosidade do óleo que impede que o fluxo tubular proveniente do glomérulo a desloque). A concentração de HCO3-, GLU (ou outros açúcares) e Na+ tendem a cair ao longo do tempo devido a sua captação apical (ver explicação sobre a concentração de Na+ no texto) até um valor estacionário, que dependerá do gradiente eletroquímico e das características de afinidade de seus transportadores apicais. A membrana basolateral não é ativamente manipulada pela técnica em questão.

A partir da curva obtida pelo conversor análogo-digital, que apresenta as características citadas acima, calculou-se a taxa de acidificação tubular, expressa como a meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato ao nível estacionário ( $t^{1/2}$ ), em segundos (s), e, a partir desta, obteve-se o fluxo de bicarbonato transepitelial por unidade de tempo (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em nmoles/cm<sup>2</sup>/s, utilizando-se a equação:

$$J_{HCO3^{-}} = \frac{\ln 2}{t \frac{1}{2}} (HCO_{3^{-}o} - HCO_{3^{-}s}) * \frac{r}{2}$$

Onde  $t^{1/2}$  é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio do túbulo, e [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>0</sub> e [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>8</sub> são as concentrações de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> injetada e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a nível estacionário, respectivamente.

A concentração estacionária de  $HCO_3^-$  foi calculada a partir da equação de Henderson-Hasselbalch para o tampão  $HCO_3^-/CO_2$ , utilizando-se o pH mais ácido medido e considerando que a pCO<sub>2</sub> tubular é igual à do sangue arterial (78). Neste trabalho, a pCO<sub>2</sub> arterial foi medida em um pHmetro e Gasometro Radiometer, com eletrodos seletivos a pH e  $CO_2$  (**ABL5, Dinamarca**), a partir da obtenção de uma amostra de sangue arterial pela punção da aórta abdominal, ao final de cada experimento.

Cada túbulo renal foi perfundido de 6 a 8 vezes, obtendo-se para cada curva um valor de pH estacionário,  $HCO_3^-$  estacionário, meia vida de acidificação tubular  $(t^{1}/_{2})$  e fluxo de bicarbonato (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Estes dados foram utilizados para se obter uma média para cada túbulo. Em cada um dos grupos experimentais (isto é, a cada uma das soluções perfusoras descritas anteriormente) utilizou-se pelo menos 3 animais, e em cada um deles foram perfundidos de 1 a 4 túbulos proximais; desta maneira, o valor de "N" indicado para as médias obtidas corresponde ao número de túbulos perfundidos.

Após a obtenção das curvas experimentais e da aquisição de valores de  $t^{1/2}$ , JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> estacionário e pH estacionário foi realizada analise estatística, para determinar a significância das diferenças entre os grupos experimentais.

#### 3.3.1.3 Preparo cirúrgico dos animais

Para o procedimento de microperfusão, os animais foram anestesiados com Quetamina e Acepromazina, nas doses de 150 mg/kg e 2 mg/Kg, respectivamente, via intramuscular, acrescentado de Propofol, via intravenosa através de um cateter colocado na veia femural ou peniana, na dose de 20 mg/Kg, se necessário. Depois de anestesiados, os animais foram tricotomizados no pescoço e na região paralombar esquerda e levados a uma gaiola de Faraday, onde foram acondicionados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica aquecida a 37 °C por meio de uma placa térmica.

Foi realizada então incisão na porção ventral do pescoço a fim de se expor a musculatura que recobre a traqueia. Esta musculatura foi então separada com o auxilio de pinças adequadas e a traqueia foi exposta. Realizou-se então a traqueostomia com a introdução de um tubo de polietileno de diâmetro semelhante ao traqueal a partir de uma

incisão primeiramente paralela a 2 anéis traqueais e, posteriormente, perpendicular a aproximadamente 3 anéis traqueais. A traqueostomia foi realizada com o intuito de se manter a ventilação do animal, evitando assim mudanças da p $CO_2$  e do pH ao longo do experimento.

Em seguida, separou-se, a partir da mesma incisão no pescoço do animal, a musculatura que recobre a jugular. Através de um pequeno orifício na mesma, realizado com uma tesoura para cirurgia oftálmica, esta foi canulada com um tubo de polietileno ligado a uma seringa contendo solução de NaCl 0,9% e manitol 3%. Realizou-se então, infusão desta solução via jugular durante todo o experimento, através de uma bomba de infusão contínua, na dose de 0,05ml/min (se necessário) (Harvard Apparatus, Massachusetts, USA), com o intuito de tornar os túbulos mais visíveis, uma vez que o manitol é um diurético osmótico.

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

Na mesma abertura para-lombar, ao lado do suporte contendo o rim, foi colocado um fio de prata cloretado ligado a um fio de cobre, que também foi fixado por ágar. Este fio de prata ligado a um fio de cobre foi então conectado ao terra e, desta forma, o compartimento extracelular do animal foi utilizado como nível de referência das medidas elétricas realizadas.

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

## 3.3.1.4 Posicionamento e utilização da micropipeta dupla e do microeletrodo

Uma micropipeta dupla, contendo em um dos ramos, solução perfusora corada com FDC-Green e, no outro ramo, óleo de rícino corado por negro Sudan, foi colocada em um micromanipulador mecânico (Leitz, Wetzlar, Alemanha). Com o auxilio deste micromanipulador, a micropipeta dupla foi utilizada para puncionar TPs visualizados na superfície renal. Um ramo da micropipeta foi utilizado para injetar a solução de perfusão e o

outro para injetar óleo de rícino, sendo que este último foi aplicado antes e após a solução perfusora, com o intuito de bloquear e isolar as colunas de fluido injetadas no lúmen.

A solução e o óleo presentes no interior da micropipeta dupla foram injetados na luz tubular, através da aplicação de ar sob pressão, produzido por seringas de vidro conectadas a tubos de polietileno através de agulhas de metal hipodérmicas de 0,5 mm, em cada um dos ramos da pipeta, e vedadas com um lacre odontológico.

Um microeletrodo de dois ramos assimétrico foi colocado em um micromanipulador mecânico (Leitz, Wetzlar, Alemanha). Este microeletrodo foi utilizado para puncionar o mesmo néfron perfundido pela solução perfusora corada (o corante possibilita o reconhecimento do túbulo perfundido).

# 3.3.1.5 Confecção da micropipeta dupla e do microeletrodo assimétrico de dois ramos

Para se realizar a técnica de microperfusão, é necessário que se prepare as micropipetas e os microeletrodos com antecedência. Os microeletrodos foram preparados seguindo o método descrito por Ammann, *et al* (1981) (79). Foram utilizados, para confeccionar os microeletrodos, capilares duplos do tipo Hilgenbeg (Malsfeld, Alemanha), assimétricos, com o ramo de maior raio medindo 1,6mm de diâmetro e o ramo de menor raio medindo 0,8mm de diâmetro. Estes capilares foram estirados verticalmente utilizando-se um estirador de micropipetas/microeletrodos (Narishige, modelo P2, Japan), de forma a obter-se diâmetro de ponta de aproximadamente 1µm.

Devido à natureza apolar da resina utilizada no ramo de maior diâmetro, este ramo passou pelo processo de silanização (hidrofobização). Este processo consiste na reação dos grupos hidroxila do vidro com o átomo de silício do composto orgânico Hexamethildisilasano (Fluka Chemika, Buchs, Suíça).

Para realizar a silanização, as extremidades sem ponta dos capilares devidamente estirados (pelo processo acima citado), foram colocadas em uma tampa com uma vedação de borracha perfurada adaptada à fixação dos microeletrodos. Para isso, o ramo de menor diâmetro teve que ser seccionado na extremidade sem ponta, reduzindo-se seu comprimento (o ramo de maior diâmetro ficou com um comprimento maior que o de menor diâmetro), uma vez que o ramo menor não deve sofrer o processo de silanização para obter uma medida experimental adequada. A tampa contendo os eletrodos foi então rosqueada a um frasco de

vidro de 15cm de altura e 5 cm de diâmetro, contendo em seu interior 0,3ml de Hexamethildisilasano. O frasco com os microeletrodos foi colocado em uma capela de fluxo por pelo menos 30 minutos. O vapor do composto entrou em contato com a parede do vidro durante a reação de hidrofobização.

O microeletrodo assim preparado foi então preenchido com uma resina hidrofóbica seletiva ao H<sup>+</sup> (Fluka Chemika, Buchs, Suíssa), em seu maior ramo. A adição dessa resina foi realizada utilizando-se um capilar de vidro estirado manualmente em chama de um bico de Bunsen.

Os eletrodos, preenchidos com esta resina, apresentam uma boa resposta à atividade do íon  $H^+$  em uma faixa de pH de 5,5 a 12, sem interferência de outros íons (79). Devido à resistência elétrica do eletrodo de pH ser relativamente baixa (10<sup>8</sup> a 10<sup>10</sup>ohm), para pontas entre 0,8-1,0µm, seu tempo de resposta é rápido, sendo de aproximadamente 0,5s. Esta última característica os faz particularmente adequados para estudos da cinética da acidificação ou alcalinização tubular, como os realizados neste trabalho. Após ser preenchido com resina, o microeletrodo foi colocado em dissecador para ser utilizado no dia do experimento.

No momento do experimento, foi adicionado, no ramo de menor diâmetro, também com o auxilio de um capilar de vidro estirado, solução de KCl 1M corada com verde FDC. Neste mesmo ramo foi colocado um fio de prata de 0,5mm previamente cloretado. Este ramo do microeletrodo foi utilizado como referência para a medida de diferença de potencial transtubular e possui resistência de aproximadamente 10MegaOhm e potencial de ponta de menos de 10mV.

O processo de cloretação foi realizado fixando o fio de prata por meio de um jacaré ao polo positivo de uma bateria de 9 volts. O fio foi mergulhado em uma solução de HCl 0,2N. No outro polo da bateria havia um arame de prata que também foi mergulhado nesta mesma solução de HCL 0,2N. Ocorreu, desta maneira, deposição de cloreto de prata no fio de prata através de reação de oxiredução entre a solução e o fio.

No ramo previamente preenchido com resina, no dia do experimento, foi adicionada acima da resina, com o auxílio de um capilar de vidro estendido manualmente em chama no bico de Bunsen, solução salina contendo NaCl 130mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM e ajustada para um pH 7,0.

Para confeccionar as micropipetas duplas, foram utilizados capilares duplos do tipo Theta (ReD. optical systems, Inc., Spencerville, MD, USA), com 2mm de diâmetro total e dividido ao meio formando dois ramos simétricos. Estes capilares foram estirados verticalmente utilizando-se um estirador de micropipetas/microeletrodos (Narishige, modelo P2, Japan), de forma a obter-se um diâmetro de ponta de aproximadamente 12 a 15µm. A pipeta foi então afiada utilizando-se um microesmeril (Fabricado na oficina do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, USP) para permitir a obtenção de um bizel. Esta foi então guardada em uma caixa e fixada com massa de modelar.

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

#### 3.3.1.6 Características do microeletrodo e do sistema elétrico

O microeletrodo, utilizado para puncionar o túbulo, foi previamente preparado como descrito acima. A ponta do ramo de maior diâmetro do microeletrodo foi preenchida com resina de troca iônica seletiva a  $H^+$  e o restante do ramo foi preenchido por solução eletrolítica complemento (NaCl 130mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, ajustada para o pH 7), sendo portanto, este ramo seletivo ao  $H^+$ .

Este ramo foi ligado ao canal A de um voltímetro de alta impedância com resistência de entrada de 10<sup>16</sup> Ohm, amplificação variável e com dois canais (WPI, Sarasota, FL, USA). Ao canal B deste voltímetro, foi conectado o ramo de menor diâmetro do microeletrodo, previamente preenchido com solução eletrolítica de KCl 1M, contendo em seu interior um fio de prata devidamente cloretado, utilizado para a conecção com o voltímetro.

As medidas foram realizadas, para cada canal, a partir da diferença de potencial (DDP) entre o eletrodo e o terra do aparelho. O terra por sua vez, foi conectado através de um fio de cobre à gaiola de Faraday utilizada para realizar o experimento. Esta, por sua vez, foi conectada, através de uma placa de liga de cobre e zinco e um fio de cobre, ao fio de prata cloretado colocado no interior do abdome do animal. Desta forma, o terra do aparelho, utilizado como referência para os demais canais do voltímetro (e, portanto, para os diferentes ramos do microeletrodo), foi eletricamente ligado ao interior do rato e, portanto, representa o potencial do meio interno do mesmo. Sendo assim, a solução intratubular (representada pelos dois ramos do eletrodo ligados ao canal A e B) foi comparada com a solução extratubular, ou meio interno (representada pelo terra).

O potencial obtido no canal B foi utilizado para se determinar a DDP transepitelial, uma vez que o terra representa o interstício do animal; e o potencial gerado no eletrodo de referência representa o potencial gerado por todos os íons que compõe o fluído tubular. A solução de KCl foi utilizada neste ramo do eletrodo, pois o K<sup>+</sup> e o Cl<sup>-</sup> (que representam o cátion e o ânion desta solução, respectivamente) apresentam quase a mesma mobilidade quando submetidos a uma corrente elétrica e, portanto, não ocorrem erros de medida devido ao atraso de um dos compostos da solução eletrolítica condutora.

A DDP medida entre o ramo do microeletrodo contendo resina e o terra foi obtida com o intuito de se saber, a partir desta, o pH da solução. Arbitrariamente, o potencial transmitido ao aparelho pelo terra foi considerado zero.

Figura 12- Registro representativo de uma calibração de eletrodo durante o experimento.



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

Para se obter o valor de pH medido, os microeletrodos foram calibrados antes e depois da perfusão de cada túbulo , através da adição e da troca de soluções tampão ringer-fosfato (NaCl 130mM, , Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM) à 37 °C, ajustadas para os pHs 6,5; 7,0 e 8,0 (os pHs foram ajustados utilizando-se NaOH ou HCl). Estas soluções foram adicionadas à superfície do córtex renal, sendo as pontas dos eletrodos colocadas nesta solução. Uma vez que a variação do potencial por unidade de pH, à mesma temperatura e na faixa de pH estudada, é linear, foi possível obter uma reta de calibração, a partir do potencial medido para cada pH padrão, a qual foi utilizada para se calcular o valor de pH desconhecido (luminal), a partir dos potenciais medidos pelo eletrodo durante o procedimento experimental (**Figura 12**).

As voltagens medidas foram lidas no eletrômetro de dois canais, como exposto anteriormente. A saída desse eletrômetro foi continuamente digitalizada em intervalos de 0,5s, por um microcomputador PC acoplado a um conversor análogo-digital (Lynx, São Paulo), através do qual os dados foram obtidos e processados. Os dados obtidos foram posteriormente exportados para o programa Excel (Microsoft, USA). No Excel, a partir dos valores tubulares e de calibração obtidos para cada eletrodo, foram determinados os valores de pH,  $HCO_3^-$ ,  $t^1/_2$  e JHCO $_3^-$ , calculados por um programa VisualBasic elaborado por um técnico de computação.

#### 3.3.2 Imunofluorescência

#### 3.3.2.1 Fixação do tecido renal

Animais Wistar normoglicêmicos foram anestesiados (como descrito para microperfusão) e, após a tricotomia da região abdominal, foi realizada laparotomia. A aorta abdominal foi canulada abaixo da artéria renal e posteriormente ocluída. Após a canulação, imediatamente realizou-se a oclusão da artéria aorta abdominal e da veia cava abdominal na região em que foi canulada a artéria aorta para dar-se inicio a infusão de PBS pH 7,4 a 37 °C pela canula. Em seguida, uma veia de grosso calibre da parede posterior da cavidade abdominal foi secciona para permitir a drenagem do sangue do animal e a substituição deste por PBS, a fim de retirar as hemácias dos vasos sanguíneos. Para que a perfusão renal fosse optimizada, uma vez que este era o nosso tecido alvo, após o inicio da infusão e da drenagem do sangue, a aorta abdominal e a veia cava abdominal faram ocluídas acima do fígado.

Após a perfusão de aproximadamente 150 ml de PBS, por um período de aproximadamente 15 minutos, o PBS foi substituído por uma solução de perodato de sódiolisina-paraformaldeído (PLP), este último a 4 %. Esta solução foi perfundida por aproximadamente 20 minutos em um volume de ~100 ml ou até o enrijecimento do tecido renal.

Os rins foram então retirados e as capsulas renais foram removidas manualmente. Foram então congelados em Tissue-Tek utilizando-se nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80 °C.

#### 3.3.2.2 Secção do tecido e preparo para imunofluorescência

Os rins foram preparados conforme descrição acima. Em seguida, seccionados longitudinalmente em cortes com  $6\mu$ M de espessura, utilizando um criostato (Microm HM505E). Os cortes foram então fixados por imersão em paraformaldeído 4 %, por 2 horas, a 4 °C, e reidratados em PBS por 5 minutos. Os tecidos renais foram demarcados com PAP Pen (invitrogen) e permeabilizados com solução 0,5 % triton X\_100, por 10 minutos em temperatura ambiente. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução 2 % caseína (Sigma-Aldrich), por 30 minutos a 37 °C.

Os cortes foram incubados em uma câmara escura e úmida por toda a noite, a 4 °C com anticorpo monoclonal anti-NHE3 (sc-53963), na concentração de 1:50, junto com anticorpo policlonal anti-SGLT1 (ab14686) ou anti-SGLT2 (sc-47402), na concentração de 1:25, diluídos em PBS contendo caseína 0,5 %. Após este período, os cortes foram lavados 4 vezes com PBS por um período de 5 minutos cada lavagem. Os cortes foram então incubados com anticorpos secundários anti-camundongo para o primário anti-SGLT1 e anti-cabra para o primário anti-SGLT2. Foram utilizados: anti-camundongo conjugado com AlexaFluor-488 (molecular probes) e anti-coelho e anti-cabra conjugados com AlexaFluor-555 (molecular probes). Os anticorpos secundários foram diluídos em uma concentração final de 1:500 em PBS, incubados por 90 min à temperatura ambiente. O núcleo foi marcado com DAPI (molecular probes) diluído em uma concentração final de 20 µg/ml. Foram realizados experimentos com cortes que foram incubados apenas com os anticorpos secundários relatados acima, que foram utilizados como controle negativo para determinar a interação inespecífica destes anticorpos com proteínas renais.

Por fim, os cortes foram lavados com solução PBS 0,01 % tween 20 (Sigma-Aldrich), quatro vezes com uma duração de 5 minutos cada lavagem. As lâminas foram montadas com solução de glicerol 50 % diluído em PBS. A lamínula foi fixada utilizando-se esmalte para unhas e após a secagem do mesmo foram utilizadas para a aquisição de imagens por microscopia de fluorescência em microscópio confocal.

As imagens foram adquiridas em um microscópio invertido Axiovert conectado ao sistema de microscopia confocal da Carl Zeiss 510 LMS. Uma vez fixado na platina, foram submetidos ao escaneamento a laser no microscópio confocal. Foram utilizados os lasers: Argônio (Arg) 488nm para o alexa 488, Helio-Neonio (HeNe) 543nm para o alexa 555 e

Argonio (Ar) 364 nm (UV) para o DAPI. Os lasers foram ajustados para uma potência média de 60% para o CTRL negativo e 50% para os canais utilizados. O escaneamento das amostras foi realizado com o pinhole ajustado para 1,0 airy unit. Foram realizados escaneamentos com a objetiva de 40 vezes e foram feitos zoons de até 3 vezes. A escala foi adicionada às imagens adquiridas utilizando-se o próprio programa de aquisição Zeiss LSM Image software.

#### 3.3.3 Análise estatística

As comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de uma via com contrastes por Tukey, tendo a probabilidade de 0,05 (5 %) como o limite de significância. Em experimentos nos quais diferentes açúcares foram submetidos a uma ou mais condições, isto é, à adição de uma ou mais substâncias (caso do grupo S3226, 2-DG e Manitol) realizou-se teste t não paramétrico (caso do grupo S3226 e do grupo 2-DG) ou Anova de uma via com contrastes por Tukey (apenas o grupo manitol), para comparar o efeito da adição da substância sobre o açúcar em questão (por exemplo: GLU5 vs GLU5 + S3226). Posteriormente, realizou-se Anova de uma via com contraste por Tukey entre todos os grupos. Não foi utilizada Anova de duas vias, uma vez que não havia o interesse de se saber se a adição da substância sobre o açúcar em si.

## **4 RESULTADOS**

## 4.1 Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU no JHCO3<sup>-</sup>

Com o objetivo de identificar o papel da mudança aguda do aporte proximal de GLU na modulação da reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> em condições basais, ratos Wistar normoglicêmicos foram submetidos à microperfusão estacionária "in vivo" e seus túbulos proximais foram perfundidos com soluções contendo diferentes concentrações de GLU ou solução controle (solução livre de substratos transportados pelos SGLTs, CTRL).

Como podemos verificar na **figura 13A**, a perfusão de GLU5 foi capaz de estimular o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se comparado à perfusão de solução controle (de 2,779 $\pm$  0,093 nmol/cm<sup>2</sup>/s; N=13 comparado a 1,903 $\pm$ 0,083 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=14 do controle; p<0,0001). Porém, a perfusão de concentrações maiores de GLU produziu o efeito oposto, com reversão do efeito estimulatório (GLU20 com JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 2,011 $\pm$ 0,11 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=12) e posterior inibição da reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (GLU40 e GLU60, com JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,125 $\pm$ 0,13, N=14 e 1,25 $\pm$ 0,16 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=11, respectivamente; \*\*\* p<0,0001 e \*\* p<0,001 *vs* CTRL respectivamente).

O efeito inibitório máximo foi observado durante a perfusão de GLU40 e o efeito estimulatório foi observado apenas com a perfusão de GLU5. Sendo assim, estas concentrações foram utilizadas nos demais experimentos com o intuito de se estudar os mecanismos inibitório e estimulatório da GLU sobre a atividade do NHE3.

As figuras **13B, 13C e 13D** representam o traçado experimental de curvas originais, transformadas para pH (usando os valores de potencial do padrão, ver métodos), durante a perfusão de solução CTRL, GLU5 e GLU40 respectivamente. Foram selecionados apenas os trechos cuja fase de acidificação depende de transportadores, tendo sido excluída a fase rápida de recuperação dependente de  $CO_2$  (ver métodos). Nestas figuras, as linhas pontilhadas verticais, presentes em cada uma das curvas, correspondem ao  $t^{1/2}$  e as linhas pontilhadas horizontais correspondem ao pH estacionário atingido para cada curva experimental.

Como explicitado na **figura 13C**, a perfusão de GLU5 ocasionou aumento significativo do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se comparado à solução CTRL (**figura 13B**) evidenciado pelo deslocamento para a esquerda da linha representativa do  $t^{1/2}$ . A perfusão de GLU40 (**figura 13D**), por sua vez, ocasionou acentuada redução do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> que pode ser evidenciada pelo deslocamento para a direita (em comparação ao CTRL) da linha vertical que representa o  $t^{1/2}$ .

Podemos verificar também que o pH estacionário não variou com as mudanças de concentração de GLU. Os valores médios de JHCO<sub>3</sub>,  $t^{1/2}$ , pH estacionário de cada um dos grupos com diferentes concentrações de GLU estão expressos na **tabela 1**.

## 4.2 Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU na atividade do NHE3

Os túbulos renais expressam além do NHE3, a principal proteína responsável pela reabsorção de  $HCO_3^-$ , outras proteínas extrusoras de  $H^+$ . Sendo assim, apesar de termos verificado que a GLU foi capaz de modular o  $JHCO_3^-$  em túbulos renais, não há como se afirmar se este efeito deveu-se à modulação apenas do NHE3 e não de outro transportador de  $H^+$ . Com o intuito de verificar se apenas o NHE3 é modulado pela GLU, realizamos experimentos utilizando as concentrações de GLU com efeito mais pronunciado (GLU5 e GLU40), na presença de um inibidor específico para o NHE3, denominado S3226 10 $\mu$ M.

Como pode ser verificado na **figura 14**, a adição de S3226 10µM foi capaz de inibir acentuadamente o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> em todos os grupos (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0,701±0,041 nmol/cm<sup>2</sup>/s CTRL + S3226 vs 1,903±0,083 nmol/cm<sup>2</sup>/s CTRL com P<0,0001 por teste t sozinho vs +S3226; JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0,521±0,07 nmol/cm<sup>2</sup>/s para GLU5 + S3226 vs 2,779±0,094 nmol/cm<sup>2</sup>/s GLU5 com P<0,0001 por teste t sozinho vs +S3226; JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0,538±0,069 nmol/cm<sup>2</sup>/s GLU40 + S3226 vs 1,125±0,130 nmol/cm<sup>2</sup>/s GLU40 com P<0,0001 por teste t sozinho vs +S3226), indicando o importante papel do NHE3 na reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> proximal. O JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> residual observado na presença deste inibidor ocorre pela atividade de outros transportadores de H<sup>+</sup>. A ausência de diferença estatística entre estes fluxos residuais na presença de diferentes concentrações de GLU indica que apenas o NHE3 é modulado por este açúcar. Os valores médios de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, t<sup>1/2</sup>, pH estacionário para cada um dos grupos estão expressos na **tabela 2**.

#### 4.3 Efeito da substituição da GLU pela GALAC sobre a atividade do NHE3

Com o intuito de verificar se os efeitos observados pela GLU sobre a atividade do NHE3 são inerentes às características especificas deste açúcar, realizamos experimentos de microperfusão nos quais a GLU foi substituída pela GALAC (nas concentrações de 5mM (GALAC5) e 40mM (GALAC40)).



Figura 13- Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU no JHCO<sub>3</sub>.

Ratos Wistar, machos e normoglicêmicos foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária. Túbulos proximais foram perfundidos com solução perfusora CTRL (N=14), GLU5 (N=13), GLU20 (N=12), GLU40 (N=14) e GLU60 (N=11). (A) Representação das médias de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante a perfusão de soluções contendo diferentes concentrações de GLU. (B), (C) e (D) Curvas representativas do decaimento do pH tubular durante a perfusão de solução CTRL, GLU5 e GLU40 (respectivamente). As linhas verticais representam a meia vida de acidificação tubular (t<sup>1/2</sup>) após a perfusão das diferentes soluções e as linhas horizontais representam o pH estacionário. \*P < 0.001 and \*\*P < 0.0001 *vs* CTRL; #P < 0.0001 *vs* G5; *e*P < 0.0001 *vs* G20.

Solução Perfusora	Ν	JHCO3-	t1/2	pH estacionário	
CTRL	14	1,903±0,083	4,568±0,190	6,735±0,036	
GLU5	13	2,779±0,094 **	2,675±0,226	6,837±0,152	
GLU20	12	2,011±0,110 #	4,997±0,311 #	6,782±0,096	
GLU40	14	1,125±0,141 **#\$	7,078±0,708 * ##	6,711±0,088	
GLU60	11	1,25±0,161 *#\$	8,532±1,023 ** ## \$	6,455±0,124	

**Tabela 1**- Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU no JHCO<sub>3</sub>.

Valores médios de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (em nmol/cm<sup>2</sup>/s), t<sup>1/2</sup> (em s), pH estacionário e N de cada um dos grupos com diferentes concentrações de GLU. \* P<0,001 e \*\*P<0,0001 vs CTRL. #P<0,001 e ##P<0,0001 vs GLU5. P<0,0001 vs GLU20.

#### 4.4 Efeito do metabolismo da GLU sobre a atividade do NHE3

A GLU é o principal substrato energético do organismo e capaz de modular, diretamente ou através de seus metabólitos, a atividade de muitas proteínas (80-82). Uma vez que a substituição da GLU pela GALAC não foi capaz de produzir o mesmo efeito sobre a atividade do NHE3, postulamos que tal efeito poderia ocorrer devido às diferenças entre o metabolismo destas duas substâncias.

Para determinar se o metabolismo da GLU é necessário para modular a atividade do NHE3, utilizamos um análogo não metabolizável da GLU, o  $\alpha$ -methyl-D-glucopiroside ( $\alpha$ -MG), que ao contrário da GALAC é transportado pelo SGLT isoformas 1 e 2, com quase a mesma afinidade (1) (isolando-se, assim, o efeito do metabolismo da GLU de outros fatores, como por exemplo transporte).

Como demonstrado na **figura 16**, a substituição da GLU5 pelo  $\alpha$ -MG5 foi capaz de abolir o efeito estimulatório produzido pela GLU5, da mesma forma que a perfusão com GALAC5. Estes resultados indicam que a via de metabolização da GLU é de alguma forma necessária para que a GLU5 estimule o NHE3, porém a substituição da GLU40 por  $\alpha$ -MG40 não foi capaz de abolir o efeito produzido pela glicose em altas concentrações.

*Figura 14-* Determinação do papel do NHE3 na modulação da reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> proximal pela GLU.



Representação das médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), GLU5 (N=13) ou GLU40 (N=14) e CTRL + S322610 $\mu$ M (N=11), GLU5 + S322610 $\mu$ M (N=8) e GLU40 + S322610 $\mu$ M (N=10). Realizado Teste t sozinho *vs* S3226 \* P<0,001 e \*\*P<0,0001. Realizado Anova, <sup>#</sup> P<0,0001 *vs* CTRL.

**Tabela 2** - Efeito da perfusão de solução CTRL, GLU5 e GLU40 sozinho ou adicionado de S3226 10μM no JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Solução Perfusora	Ν	JHCO3-	t1/2	pH estacionário
CTRL	14	1,903±0,083	4,568±0,190	6,735±0,036
CTRL + 83226 10µM	11	0,701±0,041 ** #	11,01±1,099 **	6,851±0,056
GLU5	13	2,779±0,094 #	2,675±0,226	6,837±0,152
$GLU5+S3226\ 10\mu M$	8	0,521±0,07 ** #	25,40±5,732 ** #	6,868±0,101
GLU40	14	1,125±0,141 #	7,078±0,708	6,711±0,088
$GLU40 + 83226\ 10 \mu M$	10	0,538±0,069 * #	15,25±1,357 ** #	6,751±0,093

Valores médios de JHCO3- (em nmol/cm<sup>2</sup>/s), t1/2 (em s), pH estacionário e N de cada um dos grupos (CTRL, GLU5 e GLU40) adicionados ou não de S3226  $10\mu$ M. \* P<0,001 e \*\*P<0,0001 *vs* Sozinho (test t não paramétrico). #P<0,0001 *vs* CTRL (Anova de uma via com contraste por Tukey).



Figura 15 – Efeito da perfusão de GALAC sobre a atividade do NHE3.

Representação de médias obtidas durante a perfusão tubular de solução CTRL (N=14), GALAC5 (N=9) e GALAC40 (N=10) em túbulos proximais de ratos Wistar normoglicêmicos. As linhas horizontais representam o JHCO3 médio durante a perfusão de GLU5 (G5) e o JHCO3 médio durante a perfusão de GLU40 (G40) com o propósito de permitir a comparação entre o efeito da perfusão de GLU e GALAC. Realizado Anova, NS para todos os grupos.

O fato da GLU40 e do  $\alpha$ -MG40 produzirem um efeito diferente do observado durante a perfusão de GALAC40 nos indica que alguma característica do transporte da GLU40 e do  $\alpha$ -MG40 é responsável por este efeito, uma vez que esta é a principal diferença entre os dois primeiros e a GALAC. Os valores médios de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, t<sup>1/2</sup>, pH estacionário e N de cada um dos grupos estão expressos na **tabela 4**.

Apesar da substituição da GLU pela α-MG nos fornecer um importante indício do papel do metabolismo da GLU sobre a atividade do NHE3, os experimentos até o momento não apontam de que maneira o metabolismo da GLU poderia estimular este transportador.

Com o intuito de verificar se a geração de ATP através do metabolismo da glicose poderia ser o mecanismo pelo qual a glicose estimula o NHE3, realizamos experimentos nos quais acrescentamos iso-Leucina 5mM (Leu5) e 10mM (Leu10) à solução perfusora. A iso-Leucina é um aminoácido que é metabolicamente convertido em Coenzima A (Co-A), sendo esta última utilizada no ciclo de Krebs para a geração de ATP. O TP é capaz de utilizar aminoácidos como fonte de energia uma vez que expressa diversas enzimas necessárias.(67).

Como podemos verificar na **figura 17**, a perfusão de iso-Leucina nas concentrações de 5mM e 10mM não foi capaz de estimular o NHE3, demonstrando que: (1) ou o efeito estimulatório produzido pela GLU5 não está relacionado a formação de ATP, (2) ou a iso-Leucina nas concentrações testadas não é capaz de gerar ATP da mesma maneira que a GLU5.

Com o intuito de se verificar se algum composto intermediário da GLU, produzido e gerado durante a glicólise, poderia ser o responsável pelo efeito estimulatório observado durante a perfusão de GLU5, realizamos experimentos nos quais perfundimos soluções CTRL e GLU5 sozinhas ou adicionadas de 2-DG 10mM, um inibidor da hexoquinase.

Como podemos verificar na **figura 18**, a perfusão de 2-DG 10mM foi capaz de inibir o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, quando adicionada tanto a solução CTRL quanto a solução GLU5 (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,289±0,054 nmol/cm<sup>2</sup>/s para CTRL + 2-DG *vs* 1,903±0,083 nmol/cm<sup>2</sup>/s para CTRL sozinho P<0,0001 e JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,143±0,073 nmol/cm<sup>2</sup>/s para GLU5 + 2-DG *vs* 2,779±0,094 nmol/cm<sup>2</sup>/s para GLU5 sozinha, P<0,0001).

Figura 16 – Efeito da perfusão de um análogo não metabolizável da GLU no JHCO<sub>3</sub>.



Ratos Wistar, machos e normoglicêmicos foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária. Médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), α-MG5 (N=11), α-MG40 (N=10). Realizado ANOVA \*P<0,0001.

Figura 17 – Efeito da perfusão de iso-Leucina no JHCO<sub>3</sub>.



Ratos Wistar, machos e normoglicêmicos foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária. Médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), iso-Leucina 5mM (N=8), iso-Leucina 10mM (N=12). Realizado ANOVA NS.

Os resultados obtidos com a adição de 2-DG à solução GLU5 corroboram os achados para α-MG5 e GALAC5, indicando que o metabolismo da GLU é imprescindível para o efeito estimulatório produzido pela GLU5. Este resultado também indica que o metabolismo glicolítico e, provavelmente a geração de intermediários da glicólise, é o responsável pelo efeito estimulatório produzido pela GLU5. Porém, a 2-DG 10mM também produziu um efeito inibitório, como mencionado acima. Sabe-se que a adição de 2-DG ocasiona depleção intracelular de ATP e que o mesmo provavelmente não ocorre quando apenas substituímos a GLU da solução por análogos não metabolizáveis. Assim, postulamos que a depleção de ATP é o mecanismo pelo qual ocorre o efeito inibitório produzido pela 2-DG. Realizamos então, experimentos nos quais adicionamos à solução de 2-DG, iso-Leucina 10mM, como uma fonte não-carboidrato de ATP.

*Figura 18 – Efeito da perfusão de um inibidor da hexoquinase no JHCO*<sub>3</sub>.



Ratos Wistar, machos e normoglicêmicos foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária. Médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14), GLU5 (N=13) sozinhas (Sozinho), ou adicionadas de 2-DG-D-GLU (+2-DG): CTRL + 2-DG (N=14) e GLU5 + 2-DG (N=12). Realizado Teste t sozinho *vs* +2-DG \*P<0,0001, Realizado ANOVA de uma via <sup>#</sup>P<0,001 *vs* CTRL e <sup>\$</sup> P<0,0001 *vs* CTRL + 2-DG.

Como ilustrado na **figura 19**, a adição de iso-Leucina à solução de 2-DG foi capaz de abolir o efeito inibitório produzido por esta. Estes resultados indicam que: (1) a iso-Leucina pode ser utilizada como fonte de energia pelo TP e (2) a depleção de ATP é capaz de inibir o NHE3, sendo o mecanismo pelo qual a 2-DG produziu seu efeito inibitório.

Os experimentos acima nos dão evidências da origem do efeito estimulatório produzido pela GLU5, mas não elucidam fatores envolvidos no efeito inibitório produzido pela perfusão de GLU40 ou  $\alpha$ -MG40. Os dados apresentados a seguir referem-se ao estudo dos mecanismos envolvidos com a inibição do NHE3 durante a perfusão de GLU40 ou  $\alpha$ -MG40, efeito este abolido pela perfusão de GALAC40.

Figura 19 – Efeito da adição de iso-Leucina à solução contendo 2-DG no JHCO<sub>3</sub>.



Ratos Wistar, machos e normoglicêmicos foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária. Médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14) (Sozinha), 2-DG 10mM (N=14), iso-Leucina 10mM (Leu10, N=12) ou 2-DG 10mM + iso-Leucina 10mM (2-DG10 + Leu10, N=12). Realizado Realizado ANOVA de uma via  $^*P<0,001 vs$  CTRL.

## 4.5 Efeito da adição de uma substância osmoticamente ativa à luz tubular sobre a inibição do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> produzido pela GLU 40mM

Apesar de todas as soluções utilizadas no presente trabalho serem isosmóticas em relação ao plasma, a captação de glicose pelos SGLTs é acompanhada de fluxo de água e aumento de volume celular.(83) Postulamos, assim, que a perfusão aguda de altas concentrações de glicose ou α-MG poderiam ocasionar aumento de volume celular, sendo este o responsável pela inibição do NHE3.

Para se determinar se condições de aumento de volume celular estão relacionadas com inibição do NHE no TP, realizamos experimentos nos quais perfundimos uma solução hipotônica (250 mOsmóis/Kg de H<sub>2</sub>O), promovendo assim, um choque hiposmótico. Como pode ser verificado na **figura 20**, a perfusão de uma solução hipotônica foi capaz de inibir o

NHE3 na mesma magnitude que a perfusão de GLU40 (linha horizontal). Este resultado sugere que o mecanismo pelo qual a GLU40 inibe o NHE3 é o aumento de volume celular ocasionado pela captação de grandes quantidades de glicose.

Figura 20 – Efeito da perfusão de uma solução hipotônica no JHCO<sub>3</sub>.



Ratos Wistar, machos e normoglicêmicos foram submetidos à técnica de microperfusão estacionária. Médias de túbulos proximais perfundidos com solução CTRL (N=14) ou hipotônica (250mOsmóis/Kg de H<sub>2</sub>O, Hipo) (N=12) Realizado ANOVA \*P<0,0001 *vs* CTRL.

Com base na hipótese acima apresentada, realizamos experimentos nos quais foram adicionados à solução CTRL, GLU40,  $\alpha$ -MG40 e GALAC40 (ajustadas para 290mOsmois, como descrito nos métodos), manitol nas concentrações de 20mM e 40mM. O manitol é uma substância osmoticamente ativa que não é transportada pelo epitélio renal e que, portanto, permanece na luz tubular contrapondo o efeito osmótico produzido pela acentuada entrada de solutos durante a perfusão de altas concentrações de GLU ou  $\alpha$ -MG (**Figura 21**).

É importante salientar que a adição de manitol, não deve gerar grandes variações nos gradientes reabsortivos de GLU e  $Na^+$  (uma vez que no momento da perfusão estes apresentam-se na mesma concentração dos experimentos anteriores). Acreditamos que o manitol luminal deva apenas antagonizar o gradiente osmótico para a água gerado pela entrada de solutos no meio celular, criando, dessa maneira, uma dissociação entre a entrada de água e a entrada de Na<sup>+</sup> e GLU (**Figura 21**).

Espera-se, porém que a adição do manitol à solução CTRL produza um efeito diferente: nesta situação, ao invés de produzir uma contraposição ao efeito osmótico, este

deva gerar uma força osmótica na direção da luz, com consequente saída de água da célula, uma vez que durante a perfusão de solução CTRL não há aumento da entrada de solutos osmoticamente ativos como o postulado para as demais soluções (**Figura 21**).

**Figura 21** – Representação esquemática do efeito da perfusão de altas concentrações de GLU ou α-MG sobre o transporte de água e o efeito da adição de Manitol à solução perfusora.



Um túbulo é perfundido com solução corada contendo altas concentrações de GLU (o mesmo ocorre para  $\alpha$ -MG40). Esta solução permanece isolada do fluido tubular pela aplicação de gotas de óleo antes e após a perfusão da coluna de fluído. Devido à alta capacidade de reabsorção dos SGLTs, ocorre entrada maciça de GLU e Na<sup>+</sup> no interior da célula, aumentando a osmolaridade próxima a membrana apical. Este aumento da osmolaridade intracelular produz uma força movente para a água, que acompanha a entrada de Na<sup>+</sup> e GLU. A adição de manitol na solução perfusora, geraria um gradiente oposto, que poderia se contrapor à entrada de água após a perfusão de GLU40, impedindo assim o aumento do volume celular. Na ausência de GLU (perfusão de solução CTRL) o Manitol geraria uma força movente para a água em direção à luz, ocasionando diminuição do volume celular.

Como podemos verificar na **figura 22**, a perfusão de solução CTRL + Manitol 20mM e CTRL + Manitol 40mM não é estatisticamente diferente da perfusão de solução CTRL sozinha. Porém, a adição de 20mM de manitol a solução GLU40 foi capaz de abolir o efeito inibitório produzido por esta última para o nível do CTRL (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,735 $\pm$  0,102 nmol/cm2/s *vs* 1,125 $\pm$  0,141 nmol/cm2/s para GLU40 sozinha, P<0,05). A adição de 40mM de manitol à solução de GLU40 (**Figura 22**) foi capaz de abolir o efeito inibitório da GLU40 e de produzir efeito estimulatório similar ao observado durante a perfusão de GLU5 (indicado na **figura 22** pela linha horizontal pontilhada) (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 2,802±0,216 *vs* 1,125± 0,083 nmol/cm<sup>2</sup>/s para GLU40 sozinha, P<0,0001), indicando que possivelmente a abolição do aumento de volume celular promovida pela adição de maiores quantidades de manitol à solução de GLU40 é capaz de estimular o NHE3 da mesma maneira que a GLU5.

Como vimos anteriormente, o efeito estimulatório observado durante a perfusão de GLU5 foi totalmente abolido com a perfusão de seu análogo não metabolizável, a α-MG, na mesma concentração (5mM). Este resultado nos indicou que o efeito estimulatório verificado durante a perfusão de GLU5 ocorre através de seu metabolismo.

Figura 22 – Determinação do efeito osmótico produzido pela perfusão de GLU40, α-MG40 e GALAC40 sobre o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



Médias de JHCO3- obtidas pela perfusão de CTRL (N=14), GLU40 (N=14),  $\alpha$ -MG40 (N=10) e GALAC40 (N=10) sozinhas (Sozinho) ou adicionadas de Manitol 20mM (+Manitol 20mM) ou Manitol 40mM (+ Manitol 40mM): CTRL + Manitol 20mM (N=12), CTRL + Manitol 40mM (N=12), GLU40 + Manitol 20mM (N=12), GLU40 + Manitol 40mM (N=11),  $\alpha$ -MG40 + Manitol 20mM (N=10),  $\alpha$ -MG40 + Manitol 40mM (N=10), GALAC40 + Manitol 20mM (N=8) e GALAC40 + Manitol 40mM (N=10). Realizado Anova de uma via entre sozinho *vs* +20mM e +40mM: \*P<0,01; \*P<0,001 e \*\*\*P<0,0001. Realizado Anova de uma via - *vs* CTRL: \*P<0,0001; *vs* CTRL + 20mM: \*P<0,01; *vs* CTRL + Manitol 40mM: \*P<0,001.

Assim, sugerimos que o estimulo observado durante a perfusão de GLU40 + Manitol 40mM, deveu-se ao metabolismo da GLU. Realizamos então experimentos nos quais

adicionamos manitol nas concentrações de 20mM e 40mM à solução de  $\alpha$ -MG40, que como visto é um análogo não metabolizável da GLU.

Como podemos verificar na **figura 22**, a adição de manitol nas concentrações de 20mM e 40mM foi capaz de abolir o efeito inibitório produzido pela perfusão de  $\alpha$ -MG40 (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,81± 0,123 e 1,726±0,119 nmol/cm<sup>2</sup>/s respectivamente *vs* 1,113± 0,106 nmol/cm<sup>2</sup>/s para  $\alpha$ -MG40 sozinha). Porém, a adição de Manitol 40mM não foi capaz de produzir efeito estimulatório (não significativo *vs* CTRL ou CTRL + Manitol 40mM) tal como a perfusão de GLU40 + Manitol 40mM.

Estes resultados nos indicam que o efeito inibitório produzido pela  $\alpha$ -MG40 é osmótico, uma vez que a adição de manitol à solução foi capaz de abolir este efeito. Além disso, estes resultados sugerem que o efeito estimulatório frente à adição de manitol 40mM à solução de GLU40 deve-se ao metabolismo da GLU, uma vez que sob as mesmas condições a  $\alpha$ -MG40 não produziu tal efeito.

Com o intuito de verificar se a adição de manitol 20mM e 40mM à solução de GALAC40 produziria algum efeito, realizamos experimentos nos quais adicionamos manitol 20mM e 40mM à solução de GALAC40.

Como podemos verificar na **figura 22**, a adição de Manitol 20mM e 40mM à solução de GALAC40 não produziu nenhum efeito estatisticamente significante em relação à perfusão desta sozinha (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,848± 0,101 e 1,728±0,086 nmol/cm<sup>2</sup>/s respectivamente *vs* 1,771±0,168 nmol/cm<sup>2</sup>/s GALAC40 sozinha), e não houve nenhuma diferença estatística entre esta e o CTRL ou CTRL + Manitol 20mM ou 40mM (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,903± 0,083; 1,716± 0,088 e 1,63± 0,086, respectivamente).

Estes resultados indicam que o aumento agudo do aporte de GLU 40mM gera a entrada de água e aumento de volume celular, e este último inibe a atividade do NHE3. Indicam também que após a correção do aumento de volume, ocorre estimulo do NHE3 através do metabolismo da glicose.

#### 4.6 Efeito da inibição dos SGLTs na atividade do NHE3

Apesar dos resultados mostrados até o momento indicarem que a GLU modula a atividade do NHE3 via seu metabolismo ou via mudanças agudas do volume celular (devido à captação de água), não há como determinar se a atividade dos seus transportadores (os SGLTs) é capaz de modular a atividade do NHE3. Trabalhos publicados na literatura indicam

que há uma coordenação entre o transporte de GLU via SGLT e a atividade do NHE3 que não dependeriam dos mecanismos até o momento demonstrados no presente trabalho, mas sim da atividade dos SGLTs *per se*. Sabe-se que após início da captação de glicose via SGLT ocorre ativação da p38 MAPKinase, AKT, PI3Kinase, MAPKAPKinase 2 e Ezirin (35;69;71;72;84). Porém os mecanismos pelos quais a ativação do transporte de glicose ativa a p38MAPKinase ainda não forma elucidados.

Com o intuito de identificar se a atividade dos SGLTs está envolvida de alguma maneira na atividade do NHE3 no túbulo proximal renal, experimentos de microperfusão estacionária foram realizados utilizando a droga Phlorizina (Plz). Devido a grande variação das concentrações de Plz utilizadas na literatura (36;43;72) e uma vez que os SGLTs são capazes de transportar Na<sup>+</sup> na ausência de substrato (38), realizamos uma curva dose resposta de Plz, na ordem de  $\mu$ M a mM, adicionada à solução CTRL.

Como podemos observar na **figura 23A**, a perfusão de solução CTRL + Plz 5 $\mu$ M não modificou o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> em relação à perfusão de solução CTRL sem a droga (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 1,903±0,0832, N=14 no CTRL e 1,85±0,1161 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=9 após adição de Plz 5 $\mu$ M). Porém a perfusão de CTRL + Plz 10 $\mu$ M produziu diminuição significativa do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (linha pontilhada vertical da **figura23A**) (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,388±0,1283, N=13 após adição de Plz 10 $\mu$ M, p<0,001 *vs* CTRL). A perfusão de CTRL + Plz 50 $\mu$ M ocasionou redução ainda mais significativa do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 1,147±0,0958, N=7, p<0,0001 *vs* CTRL). O efeito mais pronunciado, ainda que não significativamente diferente da Plz 50 $\mu$ M, ocorreu com a adição de Plz 500 $\mu$ M (JHCO<sub>3</sub>- de 1,193±0,0569, N=11 para Plz 100 $\mu$ M; de 0,8985±0,1131, N=9 para Plz 500 $\mu$ M e de 1,024±0,1311, N=9 para Plz 2mM, p<0,0001 para todos os grupos *vs* CTRL).

Estes resultados demonstram que a Plz 50µM é capaz de inibir significativamente a atividade do NHE3 na ausência de qualquer substrato transportado pelos SGLTs, revelando um importante papel da atividade dos SGLTs para a manutenção da atividade do NHE3.

#### 4.7 Efeito da adição de Plz à solução de GLU5

Com o intuito de verificar se o efeito inibitório observado com a perfusão de solução CTRL adicionada de Plz deveu-se a uma condição especial de ausência de GLU, condição não fisiológica, realizamos experimentos com solução contendo GLU5 adicionada de Plz. Sendo a Plz um inibidor competitivo dos SGLTs (43), realizamos uma curva dose-resposta com Plz na concentração inicial de 50µM, uma vez que, conforme visto acima, esta foi a menor concentração com efeito inibitório máximo sobre a atividade do NHE3 na ausência de um substrato competidor (solução CTRL).

Como podemos verificar na **figura 23B**, a adição de Plz nas concentrações de  $50\mu$ M e  $500\mu$ M não foi capaz de produzir qualquer efeito sobre a atividade do NHE3 na presença de GLU5 (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 2,871±0,2534, N=13 com GLU5mM e de 2,326±0,126, N=12 e 2,581±0,1892 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=9 para Glu 5mM + Plz 50µM e Glu 5mM + Plz 500µM respectivamente).

Já a adição de Plz na concentração de 1mM foi capaz de inibir o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na presença de GLU5 (ponto indicado pela linha pontilhada vertical na **figura 23B**) abaixo do nível do CTRL (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,520±0,1107 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=8, p<0,0001 *vs* Glu 5mM). A adição de concentrações maiores de Plz (2mM e 4mM) não produziu efeito inibitório adicional ao da Plz 1mM (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,127±0,0873, N=9 e 1,274±0,1843 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=10, respectivamente, p<0,0001 *vs* Glu 5mM).

Estes resultados indicam que tanto na ausência de um substrato transportado quanto na presença de GLU5, a Plz é capaz de inibir a atividade do NHE3 acentuadamente e, portanto, a atividade dos SGLTs parece ser importante para a manutenção da reabsorção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> via NHE3, indicando uma função cooperativa entre as vias de reabsorção de solutos no túbulo proximal.

#### 4.8 Efeito da adição de Plz à solução de GLU40

Determinamos acima o importante papel dos SGLTs na presença de GLU5 e na ausência da mesma. Contudo, com o intuito de determinar se a adição de Plz é capaz de produzir um efeito inibitório adicional à perfusão de GLU40, realizamos também experimentos com solução de GLU40 + Plz.

Tendo em vista que a Plz é uma droga competitiva, utilizamos apenas concentrações superiores a 500µM de Plz uma vez que, na presença de uma concentração menor de GLU (5mM), apenas a concentração de 1mM foi capaz de produzir efeito sobre o NHE3.

Como podemos evidenciar na **figura 23C**, a adição de Plz nas concentrações de 500 $\mu$ M, 1mM ou 2mM não foi capaz de produzir qualquer mudança no JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante a perfusão de GLU40 (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,125±0,1303, N=14 para GLU40mM e JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de

1,067±0,1983, N=4; 0,9962±0,0945, N=6 e 0,9844±0,1194 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=7 para GLU40mM + Plz 500μM; GLU40mM + Plz 1mM e GLU40mM + Plz 2mM respectivamente).

Este resultado nos indica que na presença de um efeito inibitório (GLU40) a inibição farmacológica dos SGLTs por Plz não é capaz de produzir efeito inibitório adicional, o que pode significar que ocorre: (1) sobreposição de vias de sinalização ou de outros tipos de mecanismos geradores da inibição do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> via NHE3 (2) ativação de vias diferentes, mas que não são capazes de produzir um efeito sinérgico.

#### 4.10 Efeito da adição de Plz à solução de GALAC5 e α-MG 5mM

Os experimentos realizados até o momento não indicam se a adição de Plz é capaz de produzir o mesmo efeito inibitório verificado na presença ou ausência de GLU quando adicionada a soluções contendo outros substratos transportados pelos SGLTs. Com o intuito de verificar tal efeito, realizamos experimentos de microperfusão estacionária adicionando Plz a solução de GALAC5 e  $\alpha$ -MG5 (**figuras 23D** e **23E** respectivamente).

Como podemos verificar na **figura 23D**, a adição de Plz 50 $\mu$ M não foi capaz de produzir qualquer efeito no JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> quando adicionada à solução de GALAC5 (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,654±0,1501, N=9 para Galac 5mM e JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,579±0,1118 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=10 para GALAC5mM + Plz 50 $\mu$ M).

Porém, a adição de Plz 500 $\mu$ M (indicada pela linha pontilhada vertical na **figura 23D**) e de Plz 1mM produziram acentuada inibição do JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,155±0,1218, N=11 e 0,8264±0,0709 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=11 para Plz 1mM e 2mM respectivamente, p<0,01 *vs* GALAC5mM e p<0,0001 *vs* Galac 5mM para Plz 1mM e 2mM respectivamente).

Na **figura 23E**, por sua vez, verificamos que a perfusão de  $\alpha$ -MG5 + Plz 50 $\mu$ M e  $\alpha$ -MG5 + 500 $\mu$ M não foram capazes de produzir qualquer efeito sobre o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 1,904±0,1196, N=11 para  $\alpha$ -MG e de 1,684±0,1010, N=13 e 1,606±0,0782 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=12 para  $\alpha$ -MG + Plz 50 $\mu$ M e  $\alpha$ -MG5 + Plz 500 $\mu$ M respectivamente). Porém, a perfusão de  $\alpha$ -MG5 + Plz 1mM (indicada pela linha pontilhada vertical na **figura 23E**) foi capaz de inibir significativamente o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0,9854±0,0381 nmol/cm<sup>2</sup>/s, N=13, p<0,0001 *vs*  $\alpha$ -MG 5mM).



Ratos Wistar foram submetidos a técnica de microperfusão estacionária. (**A**) TP foram perfundidos com solução CTRL (N=14) sozinha ou adicionada de Plz 5μM (N=9), 10μM (N=13), 50μM (N=7), 100μM (N=11), 500μM (N=9) e 2mM (N=13). (**B**) TP foram perfundidos com solução GLU5 (N=13) sozinha ou adicionada de Plz 50μM (N=12), 500μM (N=9), 1mM (N=8), 2mM (N=9) e 4mM (N=10). (**C**) TP foram perfundidos com solução GLU40 (N=14) sozinha ou adicionada de Plz 500μM (N=6), 1mM (N=6) e 2mM (N=7). (**D**) TP foram perfundidos com solução GALAC5 (N=9) sozinha ou adicionada de Plz 50μM (N=10), 500μM (N=11) e 1mM (N=11). (**E**) TP foram perfundidos com solução α-MG5 (N=11) sozinha ou adicionada de Plz 50μM (N=13), 500μM (N=12) e 1mM (N=13). a= P<0,01; b=P<0,001 e c=P<0,0001 *vs* sozinho por Anova de uma via. As linhas pontilhadas verticais representam a menor concentração de Plz capaz de promover mudança de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> estatisticamente significativa. As linhas pontilhadas horizontais representam o valor médio de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
Todos os resultados acima descritos indicam que a inibição da atividade dos SGLTs na presença de diferentes substratos é capaz de inibir a atividade do NHE3, exceto quando um efeito inibitório já foi produzido pelo substrato em si. Verificamos, como pode ser identificado pelo desvio à esquerda ou à direita das linhas pontilhadas verticais (que indicam a menor concentração de Plz capaz de produzir efeito significativo no JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a seguinte ordem de sensibilidade à Plz: CTRL>GALAC 5mM >GLU 5mM ou  $\alpha$ -MG 5mM.

#### 4.10 Estudo da co-localização entre o NHE3 e os SGLTs

Verificamos que a atividade dos SGLTs renais tem um importante papel na manutenção da atividade do NHE3, uma vez que a perfusão de Plz foi capaz de inibir acentuadamente a atividade do NHE3 independente da presença ou não de um substrato competidor.

Por esta razão, postulamos que os SGLTs e o NHE3 são expressos nas mesmas regiões da membrana apical e que possivelmente interagem (diretamente ou através de proteínas acessórias). Para determinar se essas proteínas são co-expressas realizamos experimentos de imunohistoquímica de fluorescência utilizando microscópio confocal.

Como podemos verificar na **figura 24A** e **E**, a marcação para NHE3 (verde) encontrase exclusivamente na BB. O mesmo padrão de marcação foi observado para o SGLT2 (vermelho, **figura 24B**). A sobreposição das imagens (**figura 24C**) mostra importante colocalização das duas marcações, indicando uma possível interação física entre essas duas proteínas.

Contrariamente, a marcação para o SGLT1 não seguiu este mesmo padrão. Existem segmentos em que o SGLT1 foi marcado no meio intracelular (**figura 24F**), enquanto que em outros seguimentos, este foi marcado na BB (**figura 24F**). A sobreposição das imagens da aquisição da marcação para NHE3 e para SGLT1 (**figura 24G**) demonstra que estes não se co-localizam. Na verdade, nos seguimentos em que o SGLT1 foi marcado na BB, não havia marcação para o NHE3. Por outro lado, em segmentos em que a marcação para o SGLT1 encontrava-se no meio intracelular, a marcação para o NHE3 ocorreu na BB, sem aparente sobreposição das marcações, indicando que o NHE3 e o SGLT1 não são co-expressos.

As **figuras 24 D, H e L** mostram a imagem de contraste de fase para cada uma das imagens adquiridas com as respectivas marcações fluorescentes (incluindo o DAPI). As

**figuras 24 I, J** mostram as imagens adquiridas de tecidos incubados apenas com os anticorpos secundários para determinar possíveis marcações inespecíficas. Como podemos observar, não houve marcação nestes cortes, mesmo utilizando uma potência de laser maior que a utilizada para os tecidos incubados com primário.





B







Figura 24 – Estudo da co-localização entre os SGLTs e o NHE3 (continuação)



Cortes renais de  $6\mu$ m incubados com anti-NHE3 (verde, A, C, D, E G e H), anti-SGLT2 (B, C e D) e anti-SGLT1 (F, G e H). Escala de 10 $\mu$ m para todas as imagens. As imagens C, G e K mostram a sobreposição da fluorescência obtida para os comprimentos de onda de excitação de 488nm (verde) e 543nm (vermelho) e para o DAPI (azul). As imagens D, H e L mostram a imagem de contraste de fase junto cam as marcações fluorescentes.

# **5 DISCUSSÃO**

## 5.1 Efeito da perfusão de diferentes concentrações de GLU sobre o NHE3

Verificamos em nosso trabalho, através da técnica de microperfusão estacionária *in vivo*, que o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> é modulado pela GLU. Nossos dados demonstraram que a perfusão de GLU5 estimula o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (P<0,0001 vs CTRL) e que a perfusão de concentrações maiores de GLU inibem o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (para GLU40 e GLU60 P<0,0001 vs CTRL). Estes efeitos ocasionados pela GLU ocorreram através da modulação do NHE3 apical, e não de outra proteína secretora de H<sup>+</sup>, uma vez que a adição de S3226 10 $\mu$ M (inibidor do NHE3) às soluções CTRL, GLU5 e GLU40 aboliu as diferenças de JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> existentes.

Turner *e* Black (2001) (37) realizaram experimentos em células CaCo-2 de intestino e verificaram que a substituição de um meio contendo manose e Plz 0,5mM por GLU20, com a consequente ativação do SGLT1, promove estimulo da atividade do NHE3. Estes autores não utilizaram outras concentrações de GLU. Ao contrário do verificado no trabalho citado, em nosso estudo, a concentração de GLU20 não foi capaz de estimular o  $JHCO_3^-$ . Na verdade, esta aboliu o efeito estimulatório produzido pela GLU5. Além disso, observamos um efeito inibitório quando concentrações maiores de GLU foram perfundidas. As variações do efeito da GLU20 sobre o NHE3, observadas entre os resultados aqui apresentados e os obtidos pelos autores acima citados, podem ocorrer devido às diferenças entre os sistemas renal e gastrointestinal.

No intestino, após as refeições, concentrações luminais altíssimas de GLU são comuns, principalmente após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos simples (18). Estas mudanças agudas da concentração de GLU luminal, e o consequente aumento de sua captação apical, ocasionam o aumento da concentração intracelular de GLU. O aumento da GLU intracelular, por sua vez, ativa uma importante rede de sinalização que está envolvida com a modulação do transporte de GLU e com a secreção de GLP-1(18;39).

Porém, nos rins, a concentração de GLU varia muito pouco ao longo do TP durante todo o dia. Sendo assim, as células renais não estão adaptadas a sofrerem aumentos agudos do aporte de GLU, tal como as células intestinais. Essas particularidades dos sistemas renal e intestinal podem justificar as diferenças encontradas em relação ao efeito da GLU20, cuja concentração é muito maior que a fisiológica (e, portanto, do que a presente no filtrado glomerular), porém não é incomum em alimentos ricos em carboidratos. Com base no exposto acima, os resultados deste trabalho sugerem que, apesar dos tecidos renal e intestinal expressarem os mesmos transportadores (SGLT1 e NHE3), com exceção do SGLT2, a modulação do NHE3 a variações do aporte de GLU ocorre de maneira distinta em tais tecidos, sugerindo que a resposta é dependente do tecido no qual o NHE3 é expresso.

BELOTO-SILVA, *et al.* (2010) (85) realizaram experimentos em células embrionárias humanas de rim (Human Embrionic Kidney 293 – HEK-293) e observaram inibição da atividade dos NHEs após a substituição do meio por GLU20. Este grupo não observou efeito estimulatório com GLU5 se comparado ao tratamento com GLU 2mM (menor concentração de GLU utilizada no trabalho citado). Os resultados obtidos por este grupo corroboram os nossos achados para GLU20, uma vez que eles também observaram um efeito inibitório da adição de GLU20 em relação a GLU5. Porém, as células renais utilizadas por estes autores expressam duas isoformas de NHE: o NHE1 e o NHE3 e, por esta razão, não há como determinar se o efeito observado deveu-se à soma dos efeitos individuais de cada uma das isoformas de NHE expressas.

## 5.2 Efeito da substituição da GLU pela GALAC

Verificamos, como exposto acima, que a GLU é capaz de modular a atividade do NHE3. Com o intuito de determinar se tal modulação ocorre por alguma característica inerente à GLU, realizamos experimentos nos quais a GLU foi substituída por GALAC com o intuito de determinar se a modulação da atividade do NHE3 pela GLU dependia de características químicas e/ou biológicas inerentes a ela.

Como se sabe, a GALAC é um isômero da GLU, cuja metabolização é independente e ocorre por uma cascata enzimática distinta até a formação de G1F (64). Além disso, esse monossacarídeo é transportado apenas pelo SGLT1 e não pelo SGLT2 (1).

Verificamos, em nossos experimentos, que a perfusão de GALAC5 e GALAC40 em substituição à GLU5 e GLU40 não foi capaz de ocasionar qualquer variação no JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (*vs* CTRL), abolindo tanto o efeito estimulatório quanto o inibitório produzido pela GLU.

Apesar de serem isômeros ópticos com estruturas químicas quase idênticas, afinal são epímeros que apresentam um carbono quiral (C4), os efeitos dessas moléculas sobre o NHE3 diferiram acentuadamente. As principais diferenças fisiológicas no tecido renal, quanto a esses dois açúcares, estão relacionadas a seu metabolismo e transporte, como mencionado anteriormente. Acreditamos que essas diferenças sejam as responsáveis pelos resultados obtidos.

Ao contrário da GLU, encontrada em diversos alimentos, a GALAC é encontrada apenas no leite materno, na forma do dissacarídeo lactose. Para a GALAC ser utilizada como fonte de energia pelo organismo, a lactose tem que ser clivada em GALAC e GLU no intestino pela enzima lactase. A GALAC é posteriormente metabolizada pela galactokinase.

Tanto a lactase quanto a galactokinase são expressas em abundância na infância e apresentam declínio de expressão ou atividade catalítica com a idade, em especial após o desmame (86). Assim, na fase adulta, tanto a absorção (devido à queda da atividade da lactase) quanto o metabolismo da GALAC (devido à queda da atividade da galactoquinase) decaem. Apesar disso, a galactoquinase presente no fígado apresenta uma atividade basal na fase adulta, sendo este o principal órgão responsável pela obtenção de energia a partir da GALAC (87).

Tendo em vista estas diferenças entre a GLU e a GALAC, as principais questões a serem esclarecidas para o entendimento da ausência de modulação do NHE3 pela GALAC em nosso trabalho, concernem aspectos de seu metabolismo e de seu transporte pelo epitélio renal, e seriam: 1) No tecido renal, a GALAC é metabolizada? Ou, colocando a questão de outra maneira, o tecido renal expressa a galactoquinase e esta se mantém ativa até mesmo na vida adulta?; 2) A GALAC é transportada da luz tubular para o interior da célula? Como ocorre este transporte?

Evidências da literatura demonstraram que a galactoquinase, além de ser expressa no fígado, é também expressa no tecido renal (88). Além disso, existe atividade catalítica desta enzima tanto na infância quanto na vida adulta nos rins. Contudo, tal atividade decai no córtex renal com o envelhecimento, alcançando um valor basal menor do que o verificado no fígado (87;89). Sendo assim, podemos considerar que a GALAC é metabolizada nos rins, porém em baixa intensidade.

Além de metabolizada, diversos dados da literatura indicam que GALAC também é transportada pelo epitélio renal. Estudos em córtex renal revelaram que a captação de GALAC pela membrana apical ocorre contra o gradiente químico, é dependente de Na<sup>+</sup> e pode ser inibida pela Plz. Estes estudos de captação de GALAC corroboram estudos funcionais com a proteína SGLT1, os quais demonstram que esta é capaz de transportar GALAC (1;90). Porém, ao contrário da GLU, a GALAC não é transportada pelo SGLT2, uma vez que a afinidade deste pela GALAC é desprezível (1).

Acreditamos que as diferenças de transporte entre estes dois açúcares possam ter importantes consequências fisiológicas. O SGLT2 é responsável pela reabsorção de ~90% da GLU filtrada e é expresso em abundância no TP, segmentos S1 e S2, sendo estes os únicos segmentos que podem ser acessados pela técnica de microperfusão estacionária *in vivo* utilizada neste trabalho (5;42).

Estudos utilizando fármacos que inibem apenas o SGLT2 demonstraram que o SGLT1 é capaz de reabsorver apenas 40% da GLU filtrada (5). Sendo a GALAC transportada apenas por esta isoforma, que apresenta menor capacidade de transporte, a capacidade absortiva do epitélio renal é muito baixa para a GALAC, em especial nos segmentos S1 e S2, os quais apresentam baixa expressão de SGLT1 (41).

Baseado no exposto até o momento, acreditamos que durante a perfusão de GALAC esta é reabsorvida em menor quantidade que a GLU, o que pode gerar diferenças de concentração de Na<sup>+</sup> e açúcares na proximidade apical, se comparado com a captação da GLU, maciçamente transportada pelo SGLT2. A queda da reabsorção de Na<sup>+</sup> e/ou açúcares podem: 1) diminuir a osmolaridade na proximidade da BB e o transporte de água que ocorre concomitantemente via aquaporina ou via SGLT; 2) Diminuir o aporte de substratos geradores de ATP.

Além disso, o metabolismo da GALAC é muito mais lento e menos intenso que o da GLU, uma vez que a atividade catalítica da galactoquinase na vida adulta é muito menor que a atividade observada na infância (87). A menor capacidade de transporte, associada a uma menor capacidade de metabolização da GALAC, podem gerar queda da concentração de ATP nas proximidades da BB, simulando o efeito da perfusão de solução CTRL, que não contém nenhum açúcar transportado pelo epitélio renal ou metabolizado pela célula renal.

#### 5.3 Efeito da perfusão de α-MG sobre o NHE3

Como a GLU e GALAC são diferentemente metabolizados e transportados no tecido renal, não pudemos concluir qual desses fatores estava influenciando a ausência de modulação do NHE3 pela GALAC. Decidimos então realizar experimentos nos quais a GLU foi substituída por seu análogo não metabolizável: a  $\alpha$ -MG. Ao contrário da GALAC, a  $\alpha$ -MG é transportada pelas duas isoformas de SGLT expressas no TP com a mesma afinidade que a GLU, isolando-se assim apenas o efeito de seu metabolismo sobre a atividade do NHE3 (45).

Verificamos que a perfusão de  $\alpha$ -MG5 em substituição a GLU5 foi capaz de abolir o efeito estimulatório produzido por esta última. Porém, a perfusão de  $\alpha$ -MG40 produziu efeito inibitório, de mesma magnitude do observado pela perfusão de GLU40, sobre a atividade do NHE3 (P<0,0001 vs CTRL).

Esses achados nos sugerem: 1) importante papel do metabolismo da GLU sobre o efeito estimulatório observado durante a perfusão de GLU5; 2) que o metabolismo da GLU não está envolvido com o efeito inibitório produzido pela perfusão aguda de GLU40.

Podemos sugerir também que a abolição do efeito estimulatório pela substituição da GLU5 por GALAC5 sobre o NHE3 deve-se às diferenças de metabolismo desses açúcares (GLU e GALAC), uma vez que os JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> observados durante a perfusão de GALAC5 e  $\alpha$ -MG5 foram de mesma magnitude.

É possível também sugerir que as perfusões de GALAC5 e  $\alpha$ -MG5 produzem JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de magnitude semelhante ao da solução CTRL, pois a perfusão desta última também deve gerar queda do aporte e metabolismo de GLU apical, por não possuir GLU (e nenhum outro açúcar absorvível ou metabolizável pelo TP) em sua composição.

Experimentos em células intestinais não evidenciaram qualquer efeito produzido pela substituição da GLU pela  $\alpha$ -MG sobre o NHE3, e demonstram que o metabolismo da GLU não desempenha importante papel na modulação do NHE3 intestinal (37). Nossos achados não corroboram os desses autores, porém diferenças no manejo de GLU entre o sistema renal e gastrointestinal, algumas destas já apontadas anteriormentes, podem ser responsáveis por esses achados.

Como exposto anteriormente, o epitélio intestinal encontra-se, grande parte do dia, em contato com um meio com baixíssima concentração de GLU. Sendo assim, uma considerável captação de GLU da luz para o meio intracelular ocorre apenas no período pós-prandial. No restante do tempo o que ocorre é uma recaptação de pequenas quantidades de GLU que foram secretadas no muco e que são transportadas de volta para as células intestinais pelo SGLT1 (18).

Nos rins, por sua vez, a membrana apical do TP reabsorve durante todo o dia a GLU presente no filtrado glomerular. Sendo assim, existem grandes diferenças entre as concentrações de GLU na proximidade apical, ao longo do dia, entre estes sistemas. Estas diferenças, podem modificar a maneira como a célula responde e utiliza a GLU no meio intracelular. Uma possível diferença, por exemplo, pode estar relacionada a expressão, na proximidade apical, de enzimas responsáveis pela metabolização da GLU.

## 5.4 Efeito da perfusão de isoleucina na atividade do NHE3

Como visto, a perfusão de α-MG5 não foi capaz de estimular o NHE3 da mesma maneira que a perfusão de GLU5, indicando que este efeito ocorre através do metabolismo da glicose. Esses dados corroboram diversos estudos que verificaram que o metabolismo da GLU é capaz de modular muitas proteínas de membrana (59), entre elas os NHEs, que são acentuadamente inibidos pela queda de ATP intracelular (60;91-101;101;102). Aparentemente este efeito não é ocasionado por mudanças no padrão de fosforilação de sítios da cauda C-terminal dos NHEs, apesar desta ser essencial para ocorrer inibição destes transportadores por depleção do ATP (91). Acredita-se que proteínas acessórias ligadas à alça C-terminal sejam responsáveis pela modulação da atividade dos NHEs pelo ATP (94).

Baseados nestas evidências, realizamos experimentos de microperfusão estacionária nos quais perfundimos os túbulos com iso-Leucina nas concentrações de 5mM e 10mM. A iso-Leucina é um aminoácido que pode ser metabolicamente convertido em Coenzima A (CoA) em tecidos capazes de utilizar como fonte de energia substâncias não-carboidratos.

A perfusão de iso-Leucina, nas duas concentrações testadas não foi capaz de modular a atividade do NHE3, indicando que: (1) a iso-Leucina não é capaz de ser metabolizada em CoA e posteriormente em ATP; ou (2) a iso-Leucina nas concentrações testadas não foi capaz de gerar ATP quantitativamente na mesma proporção que a GLU5; ou (3) a geração de ATP não é o mecanismo final pelo qual a GLU5 estimula o NHE3.

## 5.5 Efeito da inibição da via glicolítica sobre a atividade do NHE3

Baseados neste resultado, levantamos uma questão: como é possível ocorrer a abolição do efeito estimulatório da GLU5, pela perfusão de GALAC5, α-MG5 ou CTRL se, em nossos experimentos a solução perfusora foi adicionada apenas à luz tubular? Manteve-se, portanto, a membrana basolateral banhada pelo líquido intersticial e por isso, a captação de glicose basolateral não foi impedida pela técnica empregada neste trabalho. Podemos considerar, assim, que a captação de GLU via transportadores basolaterais, a geração de energia, assim como a disponibilidade de ATP basolateral não foram afetadas em nossos experimentos.

Diversos trabalhos da literatura sugerem a existência de compartimentalização do ATP intracelular, devido a aparente diferença de concentração deste ao nível subcelular (61). As

diferenças de concentração de ATP no meio intracelular são atribuídas a três fatores: 1) Taxa de produção de ATP, 2) Taxa de difusão do ATP, 3) Taxa de consumo do ATP; sendo que esses três fatores variam dependendo da região da célula (59).

As diferenças locais da taxa de produção e de consumo de ATP tendem a ser ainda maiores em células metabolicamente ativas, como células epiteliais. Este tipo de célula realiza transporte maciço de substâncias e, por serem polarizadas, apresentam expressão diferencial de mitocôndrias e de transportadores. Sendo assim, o ATP proveniente da fosforilação oxidativa é formado em determinadas regiões da célula, enquanto que o consumo pode ocorrer em regiões completamente opostas. Nesse tipo celular, danos metabólicos geram gradientes ainda maiores de ATP, devido ao déficit de produção de ATP pelas mitocôndrias e aumento da necessidade metabólica em condições de privação de energia (60).

Nas células do TP, por exemplo, as mitocôndrias encontram-se concentradas na proximidade da membrana basolateral (103) e, por isso, uma vez produzido localmente, o ATP tem que se difundir para regiões mais distantes. A difusão radial de ATP proveniente da mitocôndria prevê uma queda da concentração de ATP em função da distância (59;60). Isto torna plausível a noção da existência de gradientes de concentração de ATP entre a membrana apical e basolateral das células do TP.

Como a captação de GLU via transportadores basolaterais, a geração de energia, assim como a disponibilidade de ATP basolateral não foram afetadas em nossos experimentos, nossos achados sugerem então, que a GLU captada pela membrana apical e sua metabolização tem importante papel fisiológico na manutenção e modulação de transportadores de membrana, neste caso, o NHE3.

Diversos trabalhos da literatura já determinaram a presença e atividade de enzimas da via glicolítica, associadas à membrana plasmática e ao citoesqueleto (104-117). Porém, não há nenhum estudo da associação destas enzimas na membrana apical do TP ou na BB do intestino.

Postulamos então, a hipótese de que o efeito metabólico observado pela perfusão de GLU5 ocorre pela via glicolítica e não através da geração de ATP pela fosforilação oxidativa. Esta hipótese também foi sustentada pela ausência de estímulo ocasionada pela perfusão de iso-Leucina (103).

Em algumas condições patológicas como câncer, observou-se aumento da glicólise e da formação de lactato/piruvato, além de depleção da cascata oxidativa e da produção de

ATP, associada a um aumento da atividade do NHE1 (118). Seria, então, a glicólise capaz de estimular o NHE independente dos níveis celulares de ATP?

Evidências da literatura demonstraram que o NHE é preferencialmente modulado pela glicólise (95-97;119). De fato, alguns trabalhos demonstraram que o NHE é mais sensível a inibidores da via glicolítica do que a inibidores da fosforilação oxidativa (62;120;121). Postula-se que um ou mais intermediários da glicólise possam ser os responsáveis por essas diferenças (59). Além do mais, o efeito da glicólise sobre o NHE parece ocorrer independentemente da dispersão do gradiente de Na<sup>+</sup> por queda da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase, que poderia, e de fato é, afetada pelo déficit de ATP (62;122).

A 2-DG, inibidora da hexoquinase, já foi amplamente utilizada com o intuito de produzir queda local de ATP e inibição da via glicolítica (92;93;95-100;119). Porém, esta substância não é transportada por nenhuma isoforma dos SGLTs, apenas por GLUTs (3;123;124). Apesar disto, experimentos de micropunção de fluxo livre em ratos, determinaram que este análogo da GLU é reabsorvido pelo TP, em especial nos segmentos S1 e S2, segmentos estes utilizados neste trabalho. Estes autores acreditam que a 2-DG seja transportada pelo GLUT5 nesses segmentos do TP (63).

Apesar de não estar completamente elucidado por qual transportador a 2-DG entra nas células do TP de ratos, acredita-se que os seres humanos não expressem este mesmo transportador, uma vez que experimentos com uma molécula de 2-DG marcada evidenciaram que a mesma não é captada pelo tecido renal humano, sendo completamente excretada na urina (3).

Além de haver dúvidas sobre a capacidade de transporte da 2-DG pelo TP de ratos, o tempo necessário para a 2-DG inibir a glicólise e a capacidade de metabolização da mesma no tecido renal poderiam influenciar os resultados aqui apresentados. Southworth, *et al* (2003) determinaram que, após administrada via endovenosa, a 2-DG é capaz de ser metabolizada pelo tecido renal, apesar da taxa de metabolização ser bem menor que a cerebral e mais próxima da hepática (123).

Na técnica de microperfusão estacionária *in vivo* utilizada neste trabalho, a perfusão é aguda e rápida e ocorre na ordem de poucos minutos. Experimentos nos quais células foram incubadas com 2-DG 5mM revelaram que, após 5 minutos, 90% da atividade glicolítica já foi abolida, o que nos demonstrou ser viável o uso desse fármaco no espaço de tempo da nossa técnica.

Realizamos então a perfusão de soluções contendo 2-DG 10mM no TP de ratos e verificamos que a adição desta inibe acentuadamente o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tanto na presença quanto na ausência de GLU (GLU5 e CTRL, respectivamente). Esses resultados sugerem que a via glicolítica é essencial para a manutenção da atividade do NHE3 apical e corrobora os nossos resultados obtidos com a  $\alpha$ -MG. Entretanto, o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> obtido com a adição de 2-DG às soluções CTRL e GLU5 foi menor do que o obtido com a perfusão de CTRL sozinho, GALAC5 e  $\alpha$ -MG5. Qual seria a explicação para a existência de um efeito inibitório adicional pela perfusão de 2-DG juntamente com solução CTRL e GLU5?

A 2-DG é um inibidor competitivo da enzima hexoquinase, portanto a 2-DG impede a metabolização da GLU intracelular. A 2-DG poderia, então, ocasionar queda de ATP intracelular, uma vez que inibe a glicólise de maneira global na célula, inclusive da glicose captada pela membrana basolateral. Acreditamos que o mesmo não ocorre durante a perfusão de  $\alpha$ -MG, GALAC ou CTRL, uma vez que estes não impedem a formação de ATP na membrana basolateral.

## 5.6 Efeito da perfusão de iso-Leucina adicionada a solução de 2-DG

Os dados acima apresentados sugerem que a 2-DG poderia ocasionar queda do ATP intracelular, como já foi descrito anteriormente na literatura (95-97;119). Com o intuito de determinar o papel do ATP neste efeito, realizamos experimentos nos quais perfundimos 2-DG na presença de iso-Leucina 10mM que, como foi mencionado anteriormente, é um aminoácido que pode ser metabolicamente convertido em CoA e participar da geração de ATP independente de carboidratos. Verificamos que a perfusão de iso-Leucina foi capaz de abolir o efeito inibitório produzido pela 2-DG, indicando que a queda do ATP intracelular é o mecanismo pelo qual a 2-DG inibe os NHEs.

Estes dados corroboram dados da literatura que verificaram que o NHE3 é inibido por quedas da concentração intracelular de ATP, como mencionado anteriormente (60;91-101;101;102). Além disso, confirmam que a iso-Leucina pode ser utilizada como fonte de ATP pelos túbulos renais e, portanto, dão ainda mais subsídios para que possamos afirmar que a geração de ATP não é o mecanismo pelo qual a GLU5 estimula o NHE3. Além disso, podemos dizer que tanto a glicólise quanto a geração de ATP são essenciais para a atividade do NHE3.

# 5.7 Interpretação do mecanismo fisiológico do metabolismo da glicose e da geração de ATP sobre a atividade do NHE3

Com base nos experimentos apresentados acima, que demonstraram o papel do metabolismo da glicose sobre a atividade do NHE3 frente à perfusão de GLU5 acreditamos que a glicose captada ao longo do dia, e metabolizada intracelularmente, seria responsável pela manutenção da atividade do NHE3 e poderia atuar como um sinalizador do status energético do organismo. Assim, em casos de queda da captação de glicose e, portanto, da taxa de glicólise, e/ou da concentração de ATP intracelular, o NHE3 seria inibido com o intuito de poupar energia. Por outro lado, em condições fisiológicas a manutenção das taxas de glicólise e da concentração de ATP sinalizariam boas condições energéticas e manteriam a atividade do NHE3.

## 5.8 Efeito do aumento do volume celular sobre o NHE3

Apesar de termos verificado que o metabolismo glicolítico está relacionado ao efeito estimulatório produzido pela GLU5 sobre o NHE3, nossos resultados demonstraram que o efeito inibitório da GLU40 não ocorre por esta mesma via, uma vez que a substituição da GLU40 pela α-MG40 não aboliu este efeito.

Estes achados nos levaram a considerar que características do transporte da GLU e da  $\alpha$ -MG poderiam ser a causa de tal diferença, uma vez que a perfusão de GALAC40 não produziu este efeito e esta é transportada apenas pelo SGLT1.

Sabe-se que o SGLT2 é responsável pela reabsorção de 90% da GLU filtrada ao longo do dia e que o SGLT1, mesmo após a inibição do SGLT2, é capaz de reabsorver apenas 40% da GLU filtrada. Essas diferenças de capacidade de transporte de glicose poderiam estar associadas ao efeito inibitório.

Tendo em vista que a saturação do SGLT2 ocorre apenas em concentrações superiores a 35mM quando este é expresso em sistemas heterólogos,(1) e que pacientes diabéticos apresentam glicosúria quando a glicemia está muito mais elevada que a fisiológica, postulamos a hipótese de que a alta capacidade de transporte do SGLT2 ocasionaria acentuado aumento de volume celular, uma vez que os SGLTs transportam água junto à captação de Na<sup>+</sup> e glicose(58;125;126). Estes estudos determinaram que o transporte de GLU é acompanhado da entrada de uma quantidade significativa de moléculas de água que geram aumento do volume celular (58;125;126).

Sabe-se que o trocador é fortemente modulado por variações de volume celular (6;91). Em geral, o aumento de volume celular que ocorre após o co-transporte Na<sup>+</sup> e GLU é acompanhado de mecanismos regulatórios de diminuição de volume que dependem da ativação de canais de K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e da ativação do NHE1, proteína basolateral.

Com base nas evidências da literatura, de que a captação de GLU é acompanhada pela maciça entrada de água no meio intracelular ocasionando aumento de volume celular, realizamos experimentos nos quais perfundimos uma solução hipotônica (250mOsmóis/kg de água) para determinar se aumentos de volume celular estão associados a inibição do NHE3. Verificamos que o choque hiposmótico é capaz de inibir o NHE3 na mesma magnitude que a perfusão de GLU40 ou  $\alpha$ -MG40. Este resultado nos deu fortes evidências de que o influxo de água junto à captação de glicose com consequente aumento de volume celular poderia ser o mecanismo pelo qual altas concentrações de glicose inibem o NHE3.

Com o intuito de elucidar o papel do aumento de volume produzido pela captação de altas concentrações de glicose sobre o NHE3, realizamos experimentos nos quais adicionamos manitol à solução perfusora. Nestes experimentos, o manitol foi adicionado após a correção da osmolaridade da solução, tornando-a hipertônica (para detalhes sobre o modelo experimental ver **figura 21**).

Verificamos que a adição de Manitol 20mM ou 40mM à solução CTRL não produziu nenhum efeito significativo sobre o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Dados da literatura, porém, indicam que a adição de uma substância osmoticamente ativa ao meio extracelular inibe o NHE3 (6;93;127-130). A diferença entre os achados da literatura e os nossos pode residir na osmolaridade das soluções utilizadas na maior parte desses trabalhos. Em nosso trabalho, a solução final apresentava osmolaridade máxima (manitol 40mM) de 340 mOsmois/kg de H<sub>2</sub>O. Nos trabalhos citados acima, a osmolaridade das soluções experimentais variavam de 465 mOsmois/kg de H<sub>2</sub>O a 510 mOsmois/kg de H<sub>2</sub>O. Sendo assim, devido à baixa hipertonicidade da solução utilizada em nossos experimentos, não obtivemos inibição significativa do NHE3, ao contrário do verificado por trabalhos da literatura.

Contrariamente ao que foi observado durante a perfusão de solução CTRL, a adição das mesmas concentrações de manitol à solução de GLU40 gerou significativos efeitos no JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A adição de Manitol 20mM aboliu o efeito inibitório da GLU40, enquanto que a adição de manitol 40mM gerou efeito estimulatório de mesma magnitude do observado após a

perfusão de GLU5. Nossos experimentos com choque hiposmótico e utilizando manitol na solução perfusora (que gera uma força osmótica oposta) suportam a ideia de que o mecanismo pelo qual a perfusão de GLU40 inibe o NHE3 é o aumento de volume celular.

Pouco ou nenhum consenso existe a respeito do efeito do aumento do volume celular sobre a atividade do NHE3. Diversos trabalhos verificaram que o aumento de volume gerado pela adição de uma solução hipotônica ao meio extracelular (choque hiposmótico), promove estimulo do NHE3 (131-133). Porém, há trabalhos que verificaram uma inibição da atividade (37) ou que não verificaram modulação do NHE3 pela adição de solução hiposmótica ao meio extracelular (93;134). Estas diferenças na atividade do NHE3 frente a um aumento de volume celular, após o choque hiposmótico, demonstram que o NHE3 pode ser modulado antagonicamente dependendo do tipo celular.

Alguns autores postulam que estas diferenças podem ocorrer pela expressão de diferentes intermediários. Estes seriam os responsáveis pela modulação de transportadores de membrana, em especial o NHE3, cuja associação a diversas proteínas regulatórias já foi determinada (2;16;133;135). Porém, a maneira pela qual estes mediadores poderiam modificar a reposta do NHE3 às mudanças de volume ainda não foi elucidada (133).

Turner *e* Black (2001) realizaram experimentos em células CaCo-2 e compararam o efeito do inicio do transporte de GLU, após a troca de um meio sem GLU por um meio com GLU20 ao efeito da imposição de aumento de volume celular por choque hiposmótico. Verificaram estímulo do NHE3 frente à ativação do transporte de GLU, mas inibição frente ao choque hiposmótico (37).

Orlowski e Grinstein (2011) (6), em sua revisão, dizem que, apesar dos imensos esforços, os mecanismos pelos quais as diferentes isoformas de NHE conseguem detectar mudanças de volume ainda não foram totalmente esclarecidos. Sabe-se que a atividade de diversas proteínas e quinases podem ser moduladas por variações de volume (133;136). Acredita-se que proteínas auxiliares e fosfolípides podem ser os alvos dessas quinases regulatórias e não os NHEs em si (6). Além disso, como mencionado anteriormente, o NHE3 responde de diferentes maneiras a mudanças de volume dependendo do tipo celular. Essas diferenças são atribuídas à expressão e à ativação de diferentes intermediários dependendo do tipo celular (133).

## 5.9 Efeito do metabolismo da GLU sobre o NHE3 após correção do volume celular

Em nossos experimentos, além da abolição do efeito inibitório produzido pela GLU40, a adição de manitol 40mM à solução de GLU40, foi capaz de gerar efeito estimulatório similar ao produzido pela perfusão de GLU5. Como vimos, a adição de Manitol 20mM e 40mM foi capaz de abolir o efeito inibitório ocasionado pela perfusão de  $\alpha$ -MG40 sozinha. Este resultado, similar ao verificado para GLU40, sugere que o efeito inibitório promovido pela  $\alpha$ -MG40 ocorre pela entrada de água através do SGLT, e que a adição de manitol, e consequente correção do influxo de água é capaz de aboli-lo. Por outro lado, à perfusão de  $\alpha$ -MG40 + manitol 40mM não produziu efeito estimulatório, o que corroborou a hipótese de que o efeito estimulatório observado durante a perfusão de GLU40 + manitol 40mM ocorre pelo metabolismo da GLU, uma vez que a  $\alpha$ -MG40 é um análogo não metabolizável desta última.

Nossos dados nos demonstram que o efeito estimulatório produzido pelo metabolismo da GLU estava sendo inibido/abolido pela mudança de volume celular gerada pelo excesso de captação de GLU durante a perfusão de GLU40 sozinha. Neste caso, podemos dizer que as vias de sinalização relacionadas à regulação de volume, sobrepuseram-se às vias responsáveis pelo estímulo produzido pelo ATP/Glicólise.

Orlowski *e* Grinstein (2011) afirmam que o sensoriamento do pH e a regulação do mesmo são inerentes ao NHE. Cada isoforma apresenta um pH limiar em que seu sítio sensor de pH é ativado. Porém, é interessante o fato que o limiar de ativação deste sítio é modulado por diversos fatores, entre eles variações de volume. Estes fatores, modificam o "set point" do sítio sensor de pH e resultam em mudanças de atividade do NHE frente a um mesmo estímulo.

Podemos sugerir então que, da mesma forma que mudanças de volume alteram o "set point" para pH, mudanças de volume também impedem o NHE3 de responder ao estímulo produzido pelo ATP/glicólise. Quando este insulto (aumento do volume) é removido, o NHE3 volta a ser responsivo ao metabolismo de energia, tal como foi verificado após a correção do volume, pela adição de manitol 40mM à solução GLU40 em nosso trabalho.

## 5.10 Efeito da adição de manitol a solução de GALAC40

Realizamos também a perfusão de Manitol 20mM e 40mM, adicionado à solução de GALAC40. Porém, não pudemos identificar nenhuma diferença entre a perfusão desta e a perfusão de CTRL + manitol (nas mesmas concentrações).

Acreditamos que o transporte de GALAC através do SGLT1 não seja capaz de promover alteração do volume celular e consequente inibição do NHE3, uma vez que a expressão e capacidade de transporte do SGLT1 é muito menor que a do SGLT2, principalmente nos segmentos S1 e S2 do TP, segmentos estes avaliados no presente trabalho.

## 5.11 Efeito da inibição do SGLT sobre a atividade do NHE3

Os resultados até o momento apresentados sugerem importante papel do metabolismo da GLU e de variações de volume originadas pelo transporte de GLU sobre a atividade do NHE3. Porém, trabalhos da literatura em células intestinais já haviam determinado que a inibição do SGLT1 ocasiona inibição do NHE3 (37). Com o intuito de determinar se a inibição do transporte de GLU tem algum papel na modulação do NHE3 em túbulos renais, realizamos experimentos nos quais adicionamos Plz à solução CTRL, GLU5, GLU40, GALAC5 e  $\alpha$ -MG5.

As concentrações de Plz usadas em vários trabalhos diferem enormemente. Em células intestinais, por exemplo, existem trabalhos que estudaram o efeito do transporte acoplado de Na<sup>+</sup>/GLU na permeabilidade da via paracelular e para tanto utilizaram Plz 2mM (36). Por outro lado, experimentos conduzidos no mesmo tipo celular com o intuito de investigar a modulação do NHE3 por GLU foram realizados com Plz 0,5mM (37).

Experimentos utilizando culturas primárias de células do segmento convoluto do TP ou do segmento reto do TP de coelho determinaram que a concentração de Plz capaz de inibir a captação de GLU depende do segmento do TP. Na presença de 100 $\mu$ M de  $\alpha$ -MG, uma concentração de 0,1 mM já foi capaz de inibir acentuadamente a reabsorção de  $\alpha$ -MG em células do segmento convoluto, mas inibiu com intensidade muito menor a captação de  $\alpha$ -MG em células do segmento reto do TP (137).

Além disso, a enorme variedade de períodos de incubação e de concentrações de açúcares competidores modifica intensamente a resposta inibitória da Plz sobre a captação de

açúcares. Experimentos em células isoladas de jejuno de galinha revelaram que quanto maior a concentração de 3-*O*-methyl-D-GLU (3-*O*-MG) no meio, maior é a captação deste açúcar, mesmo na presença de 1 mM de Plz (138).

Em experimentos em segmento reto de túbulo proximal de rato, isolado e perfundido, a adição de Plz em uma concentração de 0,1mM foi capaz de inibir completamente a captação luminal de GLU, mesmo na presença de 5,5 mM de GLU.

Sendo assim, não existe consenso quanto à concentração ideal de Plz necessária para se obter inibição da captação de glicose, uma vez que as diferentes isoformas dos SGLTs apresentam sensibilidades diferentes à Plz. Ademais, a concentração de Plz capaz de inibir o transporte de GLU difere na presença ou ausência de competidores, dependendo do tipo celular, do tecido estudado e da espécie animal em que se realizaram os experimentos.

Além disso, a técnica utilizada, o período de incubação e a natureza do modelo experimental (como, por exemplo, medir diretamente o efeito da Plz sobre o transporte de GLU ou usá-la como ferramenta para determinar o efeito da inibição do transporte de GLU sobre outra proteína ou função celular), geram essas exorbitantes mudanças de concentração de Plz capazes de realizar efeito significativo.

Britten *e* Blank (1968) verificaram que a Plz pode inibir a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase em concentrações que variam entre  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M (na ausência de GLU ou outro substrato competidor). Porém, este efeito inibitório sobre a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase não parece ser inerente a propriedades da Plz, uma vez que este só ocorreu quando a razão entre as concentrações de Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> encontrava-se abaixo da ideal para atividade máxima da bomba. Em uma condição oposta, na qual a razão entre a concentração de Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> encontrava-se acima das ideais, a Plz estimulou a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (139). É importante salientar que o mecanismo de inibição da Plz não é igual ao promovido por glicosídeos cardíacos como a Ouabaína (139).

Este estudo também demonstrou que diversos glicídios (D-mannose>D-arabinose,Dxylose>L-xylose>D-glucose>D-fructose,L-arabinose>D-GALAC) foram capazes de inibir a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, porém em concentrações que variaram entre 0,1 e 0,5M.

Além da ação sobre a  $Na^+/K^+$  ATPase, já foi demonstrado que a Plz apresenta efeito inibitório sobre a atividade de enzimas relacionadas à adenina e sobre nucleotídeos de adenina, entre eles: adenosina trifosfato, piruvato fosfoquinase e adenosina monofosfato, quando utilizadas em altas concentrações (em geral concentrações entre 2 e 3mM) (140). Esses experimentos foram majoritariamente conduzidos em lisado celular. Dessa forma, o efeito pode ter ocorrido pela ligação direta da Plz a essas enzimas intracelulares.

Em nosso trabalho, a Plz foi aplicada na luz tubular de túbulos íntegros. Como a captação de Plz pelo tecido renal é lenta (120 minutos) (141), a concentração de Plz intracelular ao final das perfusões tubulares (poucos minutos) tende a ser desprezível. A Plz apresenta efeito inibitório sobre os SGLTs ao se ligar ao sítio da GLU no meio extracelular e, portanto, não precisa ser captada para inibir os SGLTs.

Levando-se em consideração todas estas evidências da literatura sobre possíveis efeitos secundários da Plz e a ausência de consenso em relação à concentração de Plz capaz de promover efeitos satisfatórios, realizamos curvas concentração (Plz) / resposta (JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) na presença e ausência de açúcares.

Conforme visto, a adição de Plz foi capaz de inibir o JHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> em todas as soluções nas quais esta foi adicionada (exceto para GLU40, na qual a Plz não teve efeito inibitório adicional). Porém, a concentração de Plz com efeito inibitório significativo diferiu, quando esta foi adicionada à soluções que continham algum substrato transportado pelos SGLTs e na dependência do tipo de substrato ao qual esta foi adicionada.

Observamos que a adição de Plz à solução CTRL foi capaz de gerar efeito inibitório na concentração de 10µM, porém a perfusão de Plz na concentração de 50µM produziu resposta inibitória máxima, isto é, a adição de concentrações maiores de Plz não gerou efeito inibitório adicional.

A existência de efeito inibitório com o uso de Plz, mesmo na ausência de qualquer substrato glicídico transportado pelos SGLTs ocorre, provavelmente, devido ao fato que os SGLTs têm a capacidade de transportar Na<sup>+</sup> na ausência de transporte acoplado de GLU (45). Sendo assim, ocorre atividade do SGLT, ainda que reduzida, mesmo na ausência de GLU e, inclusive, com geração de corrente elétrica pelo transporte eletrogênico de Na<sup>+</sup>.

Este resultado está de acordo com os resultados observados por Turner e Black (2001) (72) em células CaCo-2, nos quais a incubação destas células em um meio contendo manose e Plz 0,5mM, inibiu o NHE3, uma vez que a posterior troca deste meio por um meio contendo GLU ocasionou aumento da atividade do trocador.

Experimentos do grupo do Prof. Wright demonstraram que a Plz, em concentrações na ordem de nM, é capaz de inibir pela metade a corrente máxima de Na<sup>+</sup> (i máx) produzida pelo transporte de Na<sup>+</sup> através do SGLT na ausência de um substrato glicídico (i half-maximus) (43;45;52). Nossos resultados apoiam a existência de atividade dos SGLTs na ausência de substratos, uma vez que a Plz foi capaz de inibir o NHE3, mesmo na ausência de açúcares. Entretanto, é importante salientar que não medimos a atividade dos SGLTs diretamente em

nosso modelo experimental, e que a concentração de Plz que foi capaz de produzir efeito sobre a atividade do NHE3 não está na mesma ordem de grandeza daquelas utilizadas em experimentos com expressão heteróloga dos SGLTs em oócito, tais como os realizados pelo grupo do Wright.

A diferença de concentração necessária para promover efeitos significativos pode ter origem no modelo experimental e na intensidade de inibição dos SGLTs necessária para produzir efeito. Nos trabalhos do grupo do Prof. Wright foi medida a concentração capaz de inibir metade da corrente. É possível que o NHE3 só seja modulado frente a inibição de uma porcentagem maior de transportadores.

Além disso, experimentos em células em cultura permitem que a droga seja incubada por diversos períodos. Sendo assim, concentrações maiores de inibidores podem ser necessárias para que o mesmo efeito inibitório observado na cultura celular seja alcançado.

Como vimos acima, a Plz já foi implicada na inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase e de várias enzimas quando utilizadas em concentrações de 1mM ou superiores. Na ausência de açúcares, a concentração de Plz que foi capaz de inibir o NHE3 (entre 10 e 50µM) não possui efeitos paralelos indesejáveis. Este dado nos indica que a inibição do NHE3 pela Plz na ausência de um substrato transportado pelos SGLTs não ocorreu pela modulação de outras proteínas ou enzimas que não os SGLTs.

Porém, verificamos que a concentração de Plz capaz de gerar efeito inibitório sobre o NHE3, na presença de GLU5 e  $\alpha$ -MG5 é de 1mM e na presença de GALAC5 é de 500 $\mu$ M. Atribuímos estas diferenças de concentração aos seguintes fatores: afinidade da Plz às diferentes isoformas de SGLT; quantidade de proteínas de cada uma dessas isoformas expressa na membrana apical do túbulo proximal nos segmentos estudados em nosso trabalho; e a isoforma capaz de interagir e transportar cada um dos substratos testados. Todos estes fatores podem influenciar acentuadamente as respostas à Plz.

Verificamos, em nosso trabalho, que na presença de substratos competidores que são transportados pelas duas isoformas de SGLT (GLU5 e  $\alpha$ -MG5), uma concentração maior de Plz foi necessária para inibir o NHE3. Entretanto, na presença de GALAC5, substrato transportado apenas pela isoforma 1 dos SGLTs, a concentração de Plz necessária para produzir efeito inibitório sobre a atividade do NHE3 foi menor.

Apesar de ter sido descrito na literatura que o SGLT2 apresenta maior sensibilidade a Plz que o SGLT1, (43) este é muito mais abundante na superfície renal dos segmentos S1 e S2 (40;42) do que o SGLT1 (41). A presença de um número maior de transportadores pode justificar a necessidade de uma concentração maior de Plz para produzir efeito na presença de açúcares competidores (GLU e  $\alpha$ -MG) transportados pelo SGLT2, apesar deste ser mais sensível a Plz. Assim, na presença de GALAC, transportada apenas pelo SGLT1 a concentração de Plz necessária foi menor, pois o SGLT1 é pouco expresso nos segmentos S1 e S2.

A ausência de efeito inibitório com adição de Plz à solução de GLU40, em qualquer uma das concentrações testadas, nos indica que o NHE3 não pode ser adicionalmente inibido por este fármaco, provavelmente pela sobreposição das vias de sinalização. Uma outra explicação seria a de que, apesar de possuírem vias de sinalização distintas, estas não são capazes de agir sinergicamente.

Apesar de nossos dados corroborarem com dados da literatura sobre a influência do transporte de GLU através do SGLT1 sobre o NHE3 (72), nossos dados não determinam o mecanismo deste efeito. O fato da adição de Plz à solução CTRL ter gerado um efeito inibitório idêntico ao observado pela adição de Plz a soluções que contém açúcares transportados, nos indica que a inibição da captação de glicose (ou outro açúcar) não é o mecanismo pelo qual a Plz inibe o NHE3.

Assim, a inibição do transporte eletrogênico de Na<sup>+</sup> pode ser, pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual a Plz inibe a atividade do NHE3. Neste caso, é possível que propriedades elétricas da membrana que são mantidas graças ao transporte eletrogênico realizado pelos SGLTs, poderiam influenciar a atividade do NHE3 em condições fisiológicas. A abolição desta diferença de potencial com a inibição deste transportador poderia gerar mudanças conformacionais do NHE3 e bloquear ou dificultar a exposição de sítios de ligação presentes no trocador aos substratos extracelulares e intracelulares (Na<sup>+</sup> e H<sup>+</sup> respectivamente). Estudos específicos do efeito da influência da diferença de potencial transepitelial sobre a atividade do NHE3 são necessários para comprovar tal hipótese, porém estes não foram objeto do presente estudo. Todavia, a veracidade de tal hipótese depende fortemente de uma proximidade física destas proteínas na membrana apical da BB.

## 5.12 Estudo da co-localização entre o NHE3 e os SGLTs

Verificamos que o NHE3 é abundantemente expresso na BB, e que não foi possível detectar marcação intracelular desta proteína em TP, tal como descrito na literatura (14;15;22). Acredita-se que a regulação da inserção do NHE3 na BB represente um dos mais

importantes mecanismos de modulação do transporte apical de  $Na^+$  e  $HCO_3^-$  por este transportador (2;6;15;16). Porém, este translocaria de domínios intermicrovilares da própria BB para a ponta dos vilos. Assim, sua expressão não-apical não é comumente verificada.

Nossos resultados indicam que, ao contrário do NHE3, o SGLT1 não é expresso exclusivamente na BB. Este encontra-se enriquecido na BB e também no meio intracelular. Dados da literatura apontam que o SGLT1 é expresso no meio intracelular nos segmentos S1 e S2 e que, além disso, este é expresso na BB no segmento S3. Interessantemente, dados da literatura indicam que o NHE3 praticamente não é expresso no segmento S3 (14;41). Estes dados corroboram nossos achados, uma vez que verificamos que em regiões nas quais a marcação para o SGLT1 encontrava-se apical (segmentos S3), não havia marcação para o NHE3. E, o oposto, nas regiões em que havia abundante marcação para o NHE3, a marcação para o SGLT1 era intracelular (segmentos S1 e S2).

A marcação para o SGLT2, por sua vez, foi exclusivamente apical e, as imagens sobrepostas de sua marcação junto à marcação do NHE3, demonstraram acentuada coimunolocalização. Este resultado nos fornece subsídios para justificar a interação funcional verificada durante os experimentos com a Plz. A proximidade entre estas duas proteínas corrobora com a hipótese de que o *"leak"* de Na<sup>+</sup> que ocorre através dos SGLTs na ausência de um substrato glicídico possa influenciar a atividade do NHE3. Porém, experimentos adicionais são necessários para determinar esses mecanismos. Nossos dados também indicam que a interação funcional observada durante os experimentos com Plz, deve-se a inibição do SGLT2 e não do SGLT1, uma vez que não houve nenhum indício da co-expressão do NHE3 com o SGLT1. Porém, experimentos específicos para determinar a influência do SGLT2 sobre a atividade do NHE3 são necessários para elucidar estes mecanismos.

Recentemente foram desenvolvidas diversas drogas inibidoras específicas da isoforma 2 dos SGLTs. Todas as drogas dessa classe de fármacos são derivadas da Plz, com algumas mudanças estruturais que tornam a biodisponibilidade oral destas drogas maior, além de torná-las seletivas ao SGLT2 (43).

Alguns desses compostos já foram aprovados em diversos países para o tratamento da diabetes e estão disponíveis comercialmente (48-50). Porém, ainda não se sabe ao certo quais as consequências do uso prolongado destas drogas sobre o balanço de Na<sup>+</sup> e o equilíbrio ácido-base. Nossos dados indicam que o uso destas drogas pode inibir acentuadamente a atividade do NHE3 o que poderia modificar o manejo de Na<sup>+</sup> e o equilíbrio ácido-base.

Interessantemente, dados recentes da literatura demonstraram que o uso de inibidores específicos do SGLT2 ocasiona diurese e queda da pressão arterial (48). Nossos dados indicam que a natriurese promovida pela inibição do NHE3 frente à inibição do SGLT2 pode ser o mecanismo pelo qual estes fármacos promovem diurese e queda da pressão arterial. Assim, pacientes diabéticos que apresentam hipertensão ou outras doenças associadas à retenção de volume, poderiam se beneficiar da natriurese promovida pelo uso destes fármacos. Porém, pacientes que apresentam acidose, comum em indivíduos com controle glicêmico ineficiente, poderiam agravar seu quadro de acidose com o uso desses medicamentos, uma vez que animais knockout para o NHE3 apresentam acidose leve, o que demonstra o importante papel desta proteína na manutenção do pH do meio interno.

## 5.13 Estudos da interação física entre o SGLT2 e o NHE

Além da microscopia confocal, era nosso interesse realizar a co-imunopreciptação do NHE3 e dos SGLTs para determinar uma possível interação física proteína-proteína ou a interação destes com proteínas acessórias comuns, como a DPP-IV. Infelizmente, todos os anticorpos comerciais testados não eram adequados para experimentos de co-imunopreciptação. Pretendemos realizar futuramente experimentos de expressão heteróloga do SGLT2 em um modelo celular que expressa endogenamente o NHE3. Assim, poderíamos determinar com precisão a influência da expressão do SGLT2 na atividade do NHE3 e também realizar estudos da interação física destas proteínas através da expressão de uma *Tag* para realizar a imunopreciptação.

## 6 CONCLUSÃO

Pudemos verificar no presente trabalho que o NHE3 é modulado pela GLU. A perfusão da concentração fisiológica de GLU estimula o NHE3 (*vs* CTRL), enquanto que a perfusão de concentrações maiores inibe o NHE3. O efeito estimulatório produzido pela perfusão de GLU5 ocorre via metabolismo da GLU, preferencialmente pela via glicolítica.

O efeito inibitório, produzido pela perfusão de GLU40, ocorre devido ao fluxo de água e ao aumento de volume celular(produzido pelo aumento agudo do transporte de Na<sup>+</sup>/GLU através dos SGLTs), frente à perfusão de altas concentrações de GLU. Verificamos que após a reversão da injuria de volume, provocada pelo aumento da captação de GLU, ocorre um efeito estimulatório sobre o NHE3. Este efeito, tal como o verificado para GLU5, depende do metabolismo da GLU, demonstrando que a ativação de vias inibitórias (neste caso, ativadas por mudanças de volume) pode sobrepor-se às vias estimulatórias (neste caso, ativadas pelo metabolismo de GLU).

Verificamos também que o transporte de GLU é crucial para a manutenção da atividade do NHE3, uma vez que a inibição do transporte de GLU via SGLT pela perfusão de Plz foi capaz de inibir acentuadamente o  $JHCO_3^-$ , na ausência ou na presença de substratos glicídicos. Por fim, verificamos que o NHE3 se co-localiza acentuadamente com o SGLT2, porém não com o SGLT1. Mais experimentos são necessários para se determinar a real interação física ou proximidade física entre o SGLT2 e o NHE3.

As **figuras 20 e 21** resumem esquematicamente os achados aqui apresentados sobre o efeito do metabolismo da GLU e do aumento de volume celular sobre o NHE3 (respectivamente).



Figura 25 – Esquema do efeito do metabolismo da GLU sobre a atividade do NHE3.

A GLU perfundida na luz tubular é transportada para o meio intracelular através dos SGLTs 1 e 2. Na adjacência apical da membrana plasmática, a GLU é metabolizada pela via glicolítca. O ATP gerado, ou qualquer intermediário da glicólise, estimula o NHE3. A adição de PLZ à solução de GLU ocasiona inibição do NHE3, por diminuir o aporte de GLU para o meio intracelular e, portanto, inibir a glicólise. Além disso, a inibição dos SGLTs pode inibir diretamente o NHE3. A adição de 2-DG à solução perfusora promove a inibição do NHE3, por inibir a glicólise tanto da GLU, presente no meio intracelular, quanto daquela que está sendo captada pelos SGLTs a partir do lúmen.

Figura 26 – Esquema do efeito do aumento do aporte de GLU e o consequente aumento de volume celular sobre o NHE3.



Ao se perfundir os TP com altas concentrações de GLU ou  $\alpha$ -MG, aumenta-se o aporte de GLU/ $\alpha$ -MG para o meio intracelular, devido à alta capacidade absortiva do SGLT2. O aumento intracelular de Na<sup>+</sup> e GLU/ $\alpha$ -MG modifica a osmolaridade intracelular e promove o influxo de água e, consequentemente, aumento de volume celular. Este, por sua vez, inibe o NHE3 apical. A adição de manitol à luz tubular é capaz de impedir essa injúria de volume por se contrapor a este efeito osmótico, uma vez que o manitol não é absorvido pelas membranas biológicas e permanece na luz tubular. Após a correção da maior parte deste efeito de volume, o metabolismo da GLU promove efeito estimulatório, que não é verificado durante a perfusão de  $\alpha$ -MG.

## **REFERENCIAS**\*

- Hummel CS, Lu C, Loo DD, Hirayama BA, Voss AA, Wright EM. Glucose transport by human renal Na+/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Jan;300(1):C14-C21.
- (2) Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. Physiol Rev. 2007 Jul;87(3):825-72.
- (3) Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. Physiol Rev. 2011 Apr; 91(2):733-94.
- (4) Lee YJ, Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. Kidney Int Suppl. 2007 Aug;(106):S27-S35.
- (5) Vallon V. Molecular determinants of renal glucose reabsorption. Focus on "Glucose transport by human renal Na+/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2". Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Jan;300(1):C6-C8.
- (6) Orlowski J, Grinstein S. Na+/H+ Exchangers. Comprehensive Physiology. John Wiley *e* Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA; 2011.
- (7) Swenson ER. A comparative approach to carbonic anhydrase: the work of Thomas H. Maren. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular *e*amp; Integrative Physiology 2003 Oct;136(2):229-41.
- (8) Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. Physiol Rev. 1967 Oct;47(4):595-781.
- (9) Malnic G. Cell Biology of H+ Transport in Ephitelia. Ann Rev Biomed Sci. 2[2], 5-37. 1-2-2000. Botucatu.
- (10) Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, et al. NHE3: a Na+/H+ exchanger isoform of renal brush border. Am J Physiol. 1993 Nov;265(5 Pt 2):F736-F742.
- (11) Yun CH, Tse CM, Nath SK, Levine SA, Brant SR, Donowitz M. Mammalian Na+/H+ exchanger gene family: structure and function studies. Am J Physiol. 1995 Jul;269(1 Pt 1):G1-11.
- (12) Brant SR, Yun CH, Donowitz M, Tse CM. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na+/N+ exchanger isoform, NHE3. Am J Physiol. 1995 Jul;269(1 Pt 1):C198-C206.
- (13) Woo AL, Noonan WT, Schultheis PJ, Neumann JC, Manning PA, Lorenz JN, et al. Renal function in NHE3-deficient mice with transgenic rescue of small intestinal absorptive defect. Am J Physiol Renal Physiol. 2003 Jun;284(6):F1190-F1198.

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org.

- (14) Amemiya M, Loffing J, Lotscher M, Kaissling B, Alpern RJ, Moe OW. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. Kidney Int. 1995 Oct;48(4):1206-15.
- (15) Riquier AD, Lee DH, McDonough AA. Renal NHE3 and NaPi2 partition into distinct membrane domains. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Apr;296(4):C900-C910.
- (16) Donowitz M, Mohan S, Zhu CX, Chen TE, Lin R, Cha B, et al. NHE3 regulatory complexes. J Exp Biol. 2009 Jun;212(Pt 11):1638-46.
- (17) Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, et al. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na+/H+ exchanger. Nat Genet. 1998 Jul;19(3):282-5.
- (18) Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. Diabetes. 2005 Oct;54(10):3056-62.
- (19) Ledoussal C, Lorenz JN, Nieman ML, Soleimani M, Schultheis PJ, Shull GE. Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na+/H+ exchanger but not in mice lacking NHE2. Am J Physiol Renal Physiol. 2001 Oct;281(4):F718-F727.
- (20) Moe OW. Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. J Am Soc Nephrol. 1999 Nov;10(11):2412-25.
- (21) Woo AL, Noonan WT, Schultheis PJ, Neumann JC, Manning PA, Lorenz JN, et al. Renal function in NHE3-deficient mice with transgenic rescue of small intestinal absorptive defect. Am J Physiol Renal Physiol. 2003 Jun;284(6):F1190-F1198.
- (22) Crajoinas RO, Lessa LM, Carraro-Lacroix LR, Davel AP, Pacheco BP, Rossoni LV, et al. Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Oct;299(4):F872-F881.
- (23) Inoue BH, Dos SL, Pessoa TD, Antonio EL, Pacheco BP, Savignano FA, et al. Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2012 Jan;302(1):R166-R174.
- (24) Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport. Int J Hypertens. 2011;2011:391762.
- (25) Clayburgh DR, Musch MW, Leitges M, Fu YX, Turner JR. Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo. J Clin Invest. 2006 Oct;116(10):2682-94.
- (26) Hayashi H, Szaszi K, Coady-Osberg N, Furuya W, Bretscher AP, Orlowski J, et al. Inhibition and redistribution of NHE3, the apical Na+/H+ exchanger, by Clostridium difficile toxin B. J Gen Physiol. 2004 May;123(5):491-504.

- (27) He P, Yun CC. Mechanisms of the regulation of the intestinal Na+/H+ exchanger NHE3. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:238080.
- (28) Klisic J, Nief V, Reyes L, Ambuhl PM. Acute and chronic regulation of the renal Na/H+ exchanger NHE3 in rats with STZ-induced diabetes mellitus. Nephron Physiol. 2006;102(2):27-35.
- (29) Wang T, Egbert AL, Jr., Aronson PS, Giebisch G. Effect of metabolic acidosis on NaCl transport in the proximal tubule. Am J Physiol. 1998 Jun;274(6 Pt 2):F1015-F1019.
- (30) Carraro-Lacroix LR, Malnic G, Girardi AC. Regulation of Na+/H+ exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Dec;297(6):F1647-F1655.
- (31) Girardi AC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, Aronson PS. Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule. J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):46671-7.
- (32) Girardi AC, Fukuda LE, Rossoni LV, Malnic G, Reboucas NA. Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na+ H+ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Feb;294(2):F414-F422.
- (33) Girardi AC, Knauf F, Demuth HU, Aronson PS. Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na+/H+ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2004 Nov;287(5):C1238-C1245.
- (34) Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel AP, Lessa LM, Rossoni LV, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 2011 Mar;29(3):520-8.
- (35) Thwaites DT, Ford D, Glanville M, Simmons NL. H(+)/solute-induced intracellular acidification leads to selective activation of apical Na(+)/H(+) exchange in human intestinal epithelial cells. J Clin Invest. 1999 Sep;104(5):629-35.
- (36) Turner JR, Black ED, Ward J, Tse CM, Uchwat FA, Alli HA, et al. Transepithelial resistance can be regulated by the intestinal brush-border Na(+)/H(+) exchanger NHE3. Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Dec;279(6):C1918-C1924.
- (37) Turner JR, Black ED. NHE3-dependent cytoplasmic alkalinization is triggered by Na(+)glucose cotransport in intestinal epithelia. Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Nov;281(5):C1533-C1541.
- (38) Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. Pflugers Arch. 2004 Feb;447(5):510-8.
- (39) Gorboulev V, Schurmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, et al. Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. Diabetes. 2012 Jan;61(1):187-96.

- (40) Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, et al. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. Diabetes Ther. 2010 Dec;1(2):57-92.
- (41) Balen D, Ljubojevic M, Breljak D, Brzica H, Zlender V, Koepsell H, et al. Revised immunolocalization of the Na+-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Aug;295(2):C475-C489.
- (42) Sabolic I, Vrhovac I, Balen ED, Gerasimova M, Rose M, Breljak D, et al. Expression of Na+-Dglucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Jan 18.
- (43) Hummel CS, Lu C, Liu J, Ghezzi C, Hirayama BA, Loo DD, et al. Structural selectivity of human SGLT inhibitors. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Jan;302(2):C373-C382.
- (44) Wright EM. Renal Na(+)-glucose cotransporters. Am J Physiol Renal Physiol. 2001 Jan;280(1):F10-F18.
- (45) Mackenzie B, Loo DD, Panayotova-Heiermann M, Wright EM. Biophysical characteristics of the pig kidney Na+/glucose cotransporter SGLT2 reveal a common mechanism for SGLT1 and SGLT2. J Biol Chem. 1996 Dec 20;271(51):32678-83.
- (46) Sabolic I, Vrhovac I, Balen ED, Gerasimova M, Rose M, Breljak D, et al. Expression of Na+-Dglucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences. Am J Physiol Cell Physiol. 2012 Jan 18.
- (47) Loo DD, Hirayama BA, Gallardo EM, Lam JT, Turk E, Wright EM. Conformational changes couple Na+ and glucose transport. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 23;95(13):7789-94.
- (48) Heerspink HJ, de ZD, Wie L, Leslie B, List J. Dapagliflozin a Glucose-Regulating Drug With Diuretic Properties in Subjects With Type 2 Diabetes. Diabetes Obes Metab. 2013 May 13.
- (49) Polidori D, Sha S, Mudaliar S, Ciaraldi TP, Ghosh A, Vaccaro N, et al. Canagliflozin Lowers Postprandial Glucose and Insulin by Delaying Intestinal Glucose Absorption in Addition to Increasing Urinary Glucose Excretion: Results of a randomized, placebo-controlled study. Diabetes Care. 2013 Feb 14.
- (50) Raskin P. Sodium-glucose cotransporter inhibition: therapeutic potential for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev. 2013 Mar 5.
- (51) Xin B, Wang H. Multiple sequence variations in SLC5A1 gene are associated with glucosegalactose malabsorption in a large cohort of Old Order Amish. Clin Genet. 2011 Jan;79(1):86-91.
- (52) Loo DD, Hirayama BA, Gallardo EM, Lam JT, Turk E, Wright EM. Conformational changes couple Na+ and glucose transport. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 23;95(13):7789-94.
- (53) Santer R, Calado J. Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target. Clin J Am Soc Nephrol. 2010 Jan;5(1):133-41.

- (54) Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, et al. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. J Am Soc Nephrol. 2011 Jan;22(1):104-12.
- (55) Gustavson SM, Chu CA, Nishizawa M, Neal D, Farmer B, Yang Y, et al. Effects of hyperglycemia, glucagon, and epinephrine on renal glucose release in the conscious dog. Metabolism. 2004 Jul;53(7):933-41.
- (56) Mogensen CE. Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamcis during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects. Scand J Clin Lab Invest. 1971 Sep;28(1):101-9.
- (57) Ferrannini E. Learning from glycosuria. Diabetes 2011 Mar;60(3):695-6.
- (58) Wright EM, Loo DD. Coupling between Na+, sugar, and water transport across the intestine. Ann N Y Acad Sci. 2000;915:54-66.
- (59) Dhar-Chowdhury P, Malester B, Rajacic P, Coetzee WA. The regulation of ion channels and transporters by glycolytically derived ATP. Cell Mol Life Sci. 2007 Dec;64(23):3069-83.
- (60) Aw TY, Jones DP. ATP concentration gradients in cytosol of liver cells during hypoxia. Am J Physiol. 1985 Nov;249(5 Pt 1):C385-C392.
- (61) Jones DP. Intracellular diffusion gradients of O2 and ATP. Am J Physiol. 1986 May;250(5 Pt 1):C663-C675.
- (62) Wu ML, Vaughan-Jones RD. Effect of metabolic inhibitors and second messengers upon Na(+)-H+ exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre. J Physiol. 1994 Jul 15;478 (Pt 2):301-13.
- (63) Knight T, Sansom S, Weinman EJ. Renal tubular absorption of D-glucose, 3-O-methyl-D-glucose, and 2-deoxy-D-glucose. Am J Physiol. 1977 Oct;233(4):F274-F277.
- (64) Thoden JB, Timson DJ, Reece RJ, Holden HM. Molecular structure of human galactokinase: implications for type II galactosemia. J Biol Chem. 2005 Mar 11;280(10):9662-70.
- (65) Stumvoll M, Meyer C, Mitrakou A, Gerich JE. Important role of the kidney in human carbohydrate metabolism. Med Hypotheses. 1999 May;52(5):363-6.
- (66) Guder WG, Ross BD. Enzyme distribution along the nephron. Kidney Int. 1984 Aug;26(2):101-11.
- (67) Lawrence GM, Jepson MA, Trayer IP, Walker DG. The compartmentation of glycolytic and gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver and its significance to renal and hepatic metabolism. Histochem J. 1986 Jan;18(1):45-53.
- (68) Crajoinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BP, Lessa LM, Malnic G, et al. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. Am J Physiol Renal Physiol. 2011 Aug;301(2):F355-F363.

- (69) Shiue H, Musch MW, Wang Y, Chang EB, Turner JR. Akt2 phosphorylates ezrin to trigger NHE3 translocation and activation. J Biol Chem. 2005 Jan 14;280(2):1688-95.
- (70) Zhao H, Shiue H, Palkon S, Wang Y, Cullinan P, Burkhardt JK, et al. Ezrin regulates NHE3 translocation and activation after Na+-glucose cotransport. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9485-90.
- (71) Hu Z, Wang Y, Graham WV, Su L, Musch MW, Turner JR. MAPKAPK-2 is a critical signaling intermediate in NHE3 activation following Na+-glucose cotransport. J Biol Chem. 2006 Aug 25;281(34):24247-53.
- (72) Turner JR, Black ED. NHE3-dependent cytoplasmic alkalinization is triggered by Na(+)glucose cotransport in intestinal epithelia. Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Nov;281(5):C1533-C1541.
- (73) Malnic G, de Mello-Aires M. Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. Am J Physiol. 1971 Jun;220(6):1759-67.
- (74) Amorim JB, Musa-Aziz R, Lessa LM, Malnic G, Fonteles MC. Effect of uroguanylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. Can J Physiol Pharmacol. 2006 Oct;84(10):1003-10.
- (75) Lessa LM, Amorim JB, Fonteles MC, Malnic G. Effect of renoguanylin on hydrogen/bicarbonate ion transport in rat renal tubules. Regul Pept. 2009 Oct 9;157(1-3):37-43.
- (76) Malnic G, de Mello-Aires M. Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. Am J Physiol. 1971 Jun;220(6):1759-67.
- (77) Carraro-Lacroix LR, Lessa LM, Fernandez R, Malnic G. Physiological implications of the regulation of vacuolar H+-ATPase by chloride ions. Braz J Med Biol Res. 2009 Feb;42(2):155-63.
- (78) De Mello AM, Lopes MJ, Malnic G. PCO2 in renal cortex. Am J Physiol. 1990 Aug;259 (2 Pt 2):F357-F365.
- (79) Ammann D, Lanter F, Steiner RA, Schulthess P, Shijo Y, Simon W. Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies. Anal Chem. 1981 Dec;53(14):2267-9.
- (80) Demaurex N, Romanek RR, Orlowski J, Grinstein S. ATP dependence of Na+/H+ exchange. Nucleotide specificity and assessment of the role of phospholipids. J Gen Physiol. 1997 Feb;109(2):117-28.
- (81) Burke SJ, Collier JJ, Scott DK. cAMP prevents glucose-mediated modifications of histone H3 and recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme to the L-PK gene promoter. J Mol Biol. 2009 Sep 25;392(3):578-88.

- (82) Manea SA, Manea A, Heltianu C. Inhibition of JAK/STAT signaling pathway prevents highglucose-induced increase in endothelin-1 synthesis in human endothelial cells. Cell Tissue Res. 2010 Apr;340(1):71-9.
- (83) MacLeod RJ, Hamilton JR. Volume regulation initiated by Na(+)-nutrient cotransport in isolated mammalian villus enterocytes. Am J Physiol. 1991 Jan;260(1 Pt 1):G26-G33.
- (84) Turner JR, Black ED, Ward J, Tse CM, Uchwat FA, Alli HA, et al. Transepithelial resistance can be regulated by the intestinal brush-border Na(+)/H(+) exchanger NHE3. Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Dec;279(6):C1918-C1924.
- (85) Beloto-Silva Ov, Machado U, Oliveira-Souza M. Glucose-Induced Regulation of NHEs Activity and SGLTs Expression Involves the PKA Signaling Pathway. Journal of Membrane Biology. 2011 Feb 1;239(3):157-65.
- (86) Montgomery RK, Buller HA, Rings EH, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. FASEB J. 1991 Oct;5(13):2824-32.
- (87) CUATRECASAS P, Segal S. MAMMALIAN GALACTOKINASE. DEVELOPMENTAL AND ADAPTIVE CHARACTERISTICS IN THE RAT LIVER. J Biol Chem. 1965 Jun;240:2382-8.
- (88) Ai Y, Jenkins NA, Copeland NG, Gilbert DH, Bergsma DJ, Stambolian D. Mouse galactokinase: isolation, characterization, and location on chromosome 11. Genome Res. 1995 Aug;5(1):53-9.
- (89) Kleinzeller A, McAvoy EM. Transport and phosphorylation of D-galactose in renal cortical cells. Biochim Biophys Acta. 1976 Nov 11;455(1):109-25.
- (90) Kleinzeller A, McAvoy EM. Transport and phosphorylation of D-galactose in renal cortical cells. Biochim Biophys Acta. 1976 Nov 11;455(1):109-25.
- (91) Demaurex N, Grinstein S. Na+/H+ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. J Exp Biol. 1994 Nov;196:389-404.
- (92) Goss GG, Woodside M, Wakabayashi S, Pouyssegur J, Waddell T, Downey GP, et al. ATP dependence of NHE-1, the ubiquitous isoform of the Na+/H+ antiporter. Analysis of phosphorylation and subcellular localization. J Biol Chem. 1994 Mar 25;269(12):8741-8.
- (93) Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orlowski J. Functional characterization of three isoforms of the Na+/H+ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. J Biol Chem. 1994 Sep 23;269(38):23544-52.
- (94) Aharonovitz O, Demaurex N, Woodside M, Grinstein S. ATP dependence is not an intrinsic property of Na+/H+ exchanger NHE1: requirement for an ancillary factor. Am J Physiol. 1999 Jun;276(6 Pt 1):C1303-C1311.
- (95) Cassel D, Katz M, Rotman M. Depletion of cellular ATP inhibits Na+/H+ antiport in cultured human cells. Modulation of the regulatory effect of intracellular protons on the antiporter activity. J Biol Chem. 1986 Apr 25;261(12):5460-6.
- (96) Little PJ, Weissberg PL, Cragoe EJ, Jr., Bobik A. Dependence of Na+/H+ antiport activation in cultured rat aortic smooth muscle on calmodulin, calcium, and ATP. Evidence for the involvement of calmodulin-dependent kinases. J Biol Chem. 1988 Nov 15;263(32):16780-6.
- (97) Weissberg PL, Little PJ, Cragoe EJ, Jr., Bobik A. The pH of spontaneously beating cultured rat heart cells is regulated by an ATP-calmodulin-dependent Na+/H+ antiport. Circ Res. 1989 Apr;64(4):676-85.
- (98) Burns KD, Homma T, Harris RC. Regulation of Na(+)-H+ exchange by ATP depletion and calmodulin antagonism in renal epithelial cells. Am J Physiol. 1991 Oct;261(4 Pt 2):F607-F616.
- (99) Levine SA, Montrose MH, Tse CM, Donowitz M. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na+/H+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. J Biol Chem. 1993 Dec 5;268(34):25527-35.
- (100) Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouyssegur J. The Na+/H+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 15;89(6):2424-8.
- (101) Demaurex N, Romanek RR, Orlowski J, Grinstein S. ATP dependence of Na+/H+ exchange. Nucleotide specificity and assessment of the role of phospholipids. J Gen Physiol. 1997 Feb;109(2):117-28.
- (102) Fuster D, Moe OW, Hilgemann DW. Lipid- and mechanosensitivities of sodium/hydrogen exchangers analyzed by electrical methods. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 13;101(28):10482-7.
- (103) Maunsbach AB, Christensen EI. Functional Ultrastructure of the Proximal Tubule. Comprehensive Physiology. John Wiley *e* Sons, Honoken, NJ; 2010.
- (104) Green DE, Murer E, Hultin HO, Richardson SH, Salmon B, Brierley GP, et al. Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of the red blood corpuscle and yeast. Arch Biochem Biophys. 1965 Dec;112(3):635-47.
- (105) McDaniel CF, Kirtley ME, Tanner MJ. The interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. J Biol Chem. 1974 Oct 25;249(20):6478-85.
- (106) Tillman W, Cordua A, Schroter W. Organization of enzymes of glycolysis and of glutathione metabolism in human red cell membranes. Biochim Biophys Acta. 1975 Mar 13;382(2):157-71.

- (108) Daum G, Keller K, Lange K. Association of glycolytic enzymes with the cytoplasmic side of the plasma membrane of glioma cells. Biochim Biophys Acta. 1988 Apr 7;939(2):277-81.
- (109) Xu KY, Becker LC. Ultrastructural localization of glycolytic enzymes on sarcoplasmic reticulum vesticles. J Histochem Cytochem. 1998 Apr;46(4):419-27.
- (110) Hsu SC, Molday RS. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a major protein associated with the plasma membrane of retinal photoreceptor outer segments. J Biol Chem. 1990 Aug 5;265(22):13308-13.
- (111) Paul RJ, Hardin CD, Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R. Preferential support of Ca2+ uptake in smooth muscle plasma membrane vesicles by an endogenous glycolytic cascade. FASEB J. 1989 Sep;3(11):2298-301.
- (112) Hardin CD, Raeymaekers L, Paul RJ. Comparison of endogenous and exogenous sources of ATP in fueling Ca2+ uptake in smooth muscle plasma membrane vesicles. J Gen Physiol. 1992 Jan;99(1):21-40.
- (113) Solti M, Friedrich P. Partial reversible inactivation of enzymes due to binding to the human erythrocyte membrane. Mol Cell Biochem. 1976 Feb 25;10(3):145-52.
- (114) Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport. Circ Res. 1995 Jul;77(1):88-97.
- (115) Rogalski-Wilk AA, Cohen RS. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and Factin associations in synaptosomes and postsynaptic densities of porcine cerebral cortex. Cell Mol Neurobiol. 1997 Feb;17(1):51-70.
- (116) Knull HR, Walsh JL. Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. Curr Top Cell Regul. 1992;33:15-30.
- (117) Mercer RW, Dunham PB. Membrane-bound ATP fuels the Na/K pump. Studies on membrane-bound glycolytic enzymes on inside-out vesicles from human red cell membranes. J Gen Physiol. 1981 Nov;78(5):547-68.
- (118) Lee GH, Yan C, Shin SJ, Hong SC, Ahn T, Moon A, et al. BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. Oncogene. 2010 Apr 8;29(14):2130-41.
- (119) Brown SE, Heming TA, Benedict CR, Bidani A. ATP-sensitive Na(+)-H+ antiport in type II alveolar epithelial cells. Am J Physiol. 1991 Dec;261(6 Pt 1):C954-C963.
- (120) Satoh H, Sugiyama S, Nomura N, Terada H, Hayashi H. Importance of glycolytically derived ATP for Na+ loading via Na+/H+ exchange during metabolic inhibition in guinea pig ventricular myocytes. Clin Sci (Lond). 2001 Sep;101(3):243-51.

- (121) Sugiyama S, Satoh H, Nomura N, Terada H, Watanabe H, Hayashi H. The importance of glycolytically-derived ATP for the Na+/H+ exchange activity in guinea pig ventricular myocytes. Mol Cell Biochem. 2001 Jan;217(1-2):153-61.
- (122) Green J, Foellmer O, Kleeman CR, Basic MM. Acute phosphate depletion inhibits the Na+/H+ antiporter in a cultured renal cell line. Am J Physiol. 1993 Sep;265(3 Pt 2):F440-F448.
- (123) Southworth R, Parry CR, Parkes HG, Medina RA, Garlick PB. Tissue-specific differences in 2fluoro-2-deoxyglucose metabolism beyond FDG-6-P: a 19F NMR spectroscopy study in the rat. NMR Biomed. 2003;16(8):494-502.
- (124) Thorens B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. Am J Physiol. 1996 Apr;270(4 Pt 1):G541-G553.
- (125) Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, Klaerke DA. Isotonic transport by the Na+glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. J Physiol. 2001 Mar 15;531(Pt 3):631-44.
- (126) Loo DD, Hirayama BA, Meinild AK, Chandy G, Zeuthen T, Wright EM. Passive water and ion transport by cotransporters. J Physiol. 1999 Jul 1;518 (Pt 1):195-202.
- (127) Soleimani M, Bookstein C, McAteer JA, Hattabaugh YJ, Bizal GL, Musch MW, et al. Effect of high osmolality on Na+/H+ exchange in renal proximal tubule cells. J Biol Chem. 1994 Jun 3;269(22):15613-8.
- (128) Nath SK, Hang CY, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Donowitz M, et al. Hyperosmolarity inhibits the Na+/H+ exchanger isoforms NHE2 and NHE3: an effect opposite to that on NHE1. Am J Physiol. 1996 Mar;270(3 Pt 1):G431-G441.
- (129) Ahmed KH, Pelster B, Krumschnabel G. Signalling pathways involved in hypertonicity- and acidification-induced activation of Na+/H+ exchange in trout hepatocytes. J Exp Biol. 2006 Aug;209(Pt 16):3101-13.
- (130) Heming TA, Bidani A. Na(+)-H+ exchange in resident alveolar macrophages: activation by osmotic cell shrinkage. J Leukoc Biol. 1995 Apr;57(4):609-16.
- (131) Watts BA, III, Good DW. Hyposmolality stimulates apical membrane Na(+)/H(+) exchange and HCO(3)(-) absorption in renal thick ascending limb. J Clin Invest. 1999 Dec;104(11):1593-602.
- (132) Alexander RT, Malevanets A, Durkan AM, Kocinsky HS, Aronson PS, Orlowski J, et al. Membrane curvature alters the activation kinetics of the epithelial Na+/H+ exchanger, NHE3. J Biol Chem. 2007 Mar 9;282(10):7376-84.
- (133) Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol Rev. 2009 Jan;89(1):193-277.

- (134) Su X, Pang T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Evidence for involvement of the putative first extracellular loop in differential volume sensitivity of the Na+/H+ exchangers NHE1 and NHE2. Biochemistry. 2003 Feb 4;42(4):1086-94.
- (135) Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Tse CM, et al. NHERF family and NHE3 regulation. J Physiol. 2005 Aug 15;567(Pt 1):3-11.
- (136) Koivusalo M, Kapus A, Grinstein S. Sensors, transducers, and effectors that regulate cell size and shape. J Biol Chem. 2009 Mar 13;284(11):6595-9.
- (137) Del Valle PL, Trifillis A, Ruegg CE, Kane AS. Characterization of glucose transport by cultured rabbit kidney proximal convoluted and proximal straight tubule cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2002 Apr;38(4):218-27.
- (138) Shehata AT, Lerner J, Miller DS. Development of brush-border membrane hexose transport system in chick jejunum. Am J Physiol. 1981 Feb;240(2):G102-G108.
- (139) Britten JS, Blank M. The action of phloridzin and sugars on Na-Activated ATPase. Journal of Membrane Biology. 1969 Dec 1;1(1):238-47.
- (140) CRANE RK. Intestinal absorption of sugars. Physiol Rev. 1960 Oct;40:789-825.
- (141) Chesney R, Sacktor B, Kleinzeller A. The binding of phloridzin to the isolated luminal membrane of the renal proximal tubule. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes. 1974 Jan 24;332(2):263-77.