Lívia Xavier Soares Farah

Efeito do peptídeo-1 semelhante ao glucagon endógeno
sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo

Orientadora: Dra. Adriana Castello
Costa Girardi

São Paulo

2015

Lívia Xavier Soares Farah

Efeito do peptídeo-1 semelhante ao glucagon endógeno
sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo

Orientadora: Dra. Adriana Castello
Costa Girardi

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Farah, Livia Xavier Soares

Efeito do peptídeo-1 semelhante ao glucagon endógeno sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal / Livia Xavier Soares Farah. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi

Descritores: 1.Túbulos renais proximais 2.Antiportador de sódio e hidrogênio 3.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon 4.Exedin-9.

USP/FM/DBD-172/15

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Silvia, por ter me apoiado e incentivado a realizar este trabalho no momento mais difícil de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem me ensinado o valor do estudo, da dedicação e do trabalho. Por constituírem os alicerces da minha educação, do meu caráter, da minha força e de tudo aquilo que eu tenho como verdade e correto na vida. Pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas mostrando sempre o caminho da vida moral. Minha eterna gratidão.

À Dra. Adriana Girardi pela oportunidade de executar um trabalho científico de relevância, pelo comprometimento com a pesquisa, dedicação, paciência, orientações, sugestões e críticas que foram de extrema importância para a realização e conclusão deste trabalho. Agradeço também, pela oportunidade de desenvolver o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada.

A todos do Grupo Renal do InCor pelo apoio, aprendizado, pela troca de conhecimentos, experiências de vida e sentimentos. Agradeço a todos pela oportunidade que me foi dada para meu próprio conhecimento.

Ao Renato Crajoinas por compartilhar seus conhecimentos e técnicas que muito contribuiu com os experimentos, pelos conselhos, generosidade, educação e pela parceria desde o início ao final deste trabalho. Foi um prazer trabalhar com você.

Ao Dr. Luiz Fernando Onuchic, Dr. Joel Heimann e Dra. Maria Oliveira de Souza, por todas as sugestões, críticas e elogios na banca de qualificação.

Aos pesquisadores da Fisiologia Renal do Instituto de Ciências Biológicas da USP, Dr. Gerhard Malnic e Dr. Thaissa Pessoa, pela colaboração com os experimentos de microperfusão estacionária.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro e Dra. Maria Heloísa Shimizu, pela colaboração com os experimentos de hemodinâmica renal e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores das disciplinas da pós-graduação que abriram novos horizontes e novas perspectivas de conhecimento.

À Dra. Patrícia Fiorino, pelo apoio e incentivo no meu ingresso na pós-graduação. Obrigada pela confiança.

A todos os meus amigos e amigas pela amizade sincera e verdadeira, por sempre proporcionarem momentos de alegria deixando a vida muito mais leve e divertida.

A todos os funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – HC/FMUSP pela manutenção e organização do laboratório.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por proporcionar um ambiente profissional de excelência em pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe pra ele. Por isso o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Efeito Incretina	1
1.2 Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)	4
1.2.1 Síntese, secreção e degradação do peptídeo-1 semelhante ao glucagon	4
1.3 O receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1R)	6
1.4 Terapia baseada em incretinas: agonistas do GLP-1R e inibidores da dipeptidil peptidase IV	12
1.5 Efeitos extra pancreáticos do peptídeo- 1 semelhante ao glucagon (GLP-1)	15
1.5.1 Efeitos do GLP-1 no sistema gastrointestinal	15
1.5.2 Efeitos do GLP-1 no cérebro	16
1.5.3 Efeitos cardiovasculares do GLP-1	17
1.5.4 GLP1 no músculo, tecido adiposo e fígado	17
1.5.5 Efeitos renais do GLP-1	19
1.6 Isoforma 3 do Trocador Na^+/H^+ (NHE3)	23
1.7 Hipótese de trabalho	26

2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 28
3.1 Modelos Experimentais	28
3.2 Análises do sangue	29
3.3 Avaliação da Função Renal	30
3.4 Excreção de AMPc urinário	31
3.5 Determinação da Atividade do Trocador NHE3	31
3.6 Preparação de proteínas de homogenato e membranas de córtex renal	34
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS para proteína	35
3.8 Immunoblotting	35
3.9 Análises estatísticas	37
 4. RESULTADOS	 38
4.1 Concentração de AMPc urinário e atividade da PKA	38
4.2 Expressão da EPAC1 em membrana de córtex renal	41
4.3 Efeitos do bloqueio da via da PKA e da EPAC sobre as ações inibitórias do GLP-1 na atividade do NHE3 em túbulo proximal	43
4.4 Efeitos do bloqueio do GLP-1R na hemodinâmica renal	45
4.5 Efeitos tubulares do bloqueio do GLP-1R	47

4.6 Reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 em túbulo proximal	49
4.7 Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

°C – grau Celsius

µg – microgramas

µL – microlitros

µM– micromolar

AC- Adenilil ciclase

AKAP – grupo de proteínas de ancoragem da PKA

ANP – Peptídeo natriurético atrial

ATP – Trifosfato de adenosina

AMPc – 3', 5'- monosfosfato cíclico de adenosina

BNP – peptídeo natriurético cerebral

BSA – Albumina de soro bovina

Ca²⁺ - cálcio

CAPPesq - Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa

Cl⁻ – Íon de cloreto

CLi – clearance de lítio

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DM2- diabetes mellitus tipo 2

DPPIV - enzima dipeptidil-peptidase-IV

ECL – *Enhanced chemiluminescence*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EP – Erro padrão

EPAC – proteína de troca ativada pelo AMPc

ESI- α- [2- (3-clorofenil) hidrazina] -5- (1,1-dimetiletil) propionitrilo oxo

EX-9 – exendin-9

FENa⁺(%) – porcentagem da excreção fracionária de sódio

FELi (%) – porcentagem da excreção fracionária de lítio

FPR- Fluxo plasmático renal

g – gramas

GEF – fator de troca de nucleotídeo guanina

GI – Sistema gastrointestinal

GIP – polipeptídeo inibidor gástrico

GLP-1 – Peptídeo- 1 semelhante ao glucagon

GPCR – Receptor acoplado à proteína G

GLP-1R – Receptor do peptídeo- 1 semelhante ao glucagon

h – hora

H⁺ – Íon hidrogênio

H89 - Dicloridrato

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCO₃⁻ - bicarbonato

HEPES – Ácido 2- [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfônico

HFD- “High fat diet”

HRP – Anticorpo secundário conjugado a peroxidase

ICV – Intra cérebro ventricular

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IMV- microdomínio intermicrovilar

J_{HCO3}- fluxo de bicarbonato

K2EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico

KCl – Cloreto de potássio

kDa – quilodalton

kg – quilogramas

L – litros

Li⁺ - lítio

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME- N(w)-nitro-L-arginina metil éster

M – molar

MAPK- Proteínas cinases ativadas por mitógenos

mg – miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

mmHg – milímetros de mercúrio

mmol – milimol

MMV - microdomínio das microvilosidades (membranas microvilares da borda em escova)

MOPS – ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico

mv – milivolts

Na⁺ – Íon de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ - bicarbonato de sódio

ng – nanogramas

NHE3 – trocador Na⁺/H⁺ 3

NHERF- fator regulador do NHE

nm – nanômetros

nM – nanomolar

NO – óxido nítrico

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PBS – Tampão fosfato-salino

PC1 – Hormônio convertase 1

PCr – Concentração plasmática de creatinina

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PCO₂ – pressão parcial de gás carbônico

PE- 60 – catéter de polietileno com 60 mm de diâmetro externo

PE- 240 - catéter de polietileno com 240 mm de diâmetro externo

pH- potencial hidrogeniônico

PI3K – fosfatidilinositol 3- quinase

PKA (C) - subunidade catalítica da proteína cinase A

PKA – proteína cinase dependente de AMPc

PKB – proteína cinase B

PLi – concentração plasmática de lítio

pmoles – picomoles

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PS552- serina 552 fosforilada

PS605- serina 605 fosforilada

PTH – Paratormônio

PVDF – Polímero de Fluoreto de Polivinilideno

r – Coeficiente de determinação de correlação de Pearson

RAP – Proteínas associadas ao receptor

RFG - Ritmo de filtração glomerular

RPM – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia pela polimerase

RVR – Resistência vascular renal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

Ser – aminoácido serina

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

SNC – sistema nervoso central

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBS – Tampão Tris- HCL

Thr – aminoácido treonina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TP- túbulo proximal

Tyr – aminoácido tirosina

Tris – Hidroximetil aminometano

U – Unidade internacional para quantificação de atividade enzimática

UCr – Concentração urinária de creatinina

ULi – concentração urinária de lítio

V – Fluxo urinário

v/v – volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito incretina	2
Figura 2 - Efeito incretina em pacientes saudáveis e acometidos pelo DM2	3
Figura 3 - Representação esquemática do proglucagon	5
Figura 4 – GLP-1/ GLP-1R ativa as vias PKA e EPAC	7
Figura 5 – Representação da ativação da PKA	8
Figura 6 - Funções da EPAC2 na secreção de insulina	11
Figura 7 - Ações farmacológicas do GLP-1 na função tubular modulam a atividade do NHE3	20
Figura 8 - Efeito vasodilatador promovido pelo GLP-1 sobre a artéria renal de ratos Wistar	22
Figura 9 – Estrutura secundária do NHE3	24
Figura 10 – Representação esquemática do sistema utilizado para medir a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar	33
Figura 11 - A infusão sistêmica do antagonista do GLP-1R bloqueia a sinalização do AMPc / PKA nos rins	40
Figura 12 - A infusão sistêmica do antagonista do receptor de GLP-1 exendin-9 não afeta a expressão ou localização da EPAC no córtex renal	42
Figura 13 - PKA medeia os efeitos inibidores do GLP-1 sobre a atividade de NHE3 no túbulo proximal	44
Figura 14 - Efeito do antagonista do GLP-1R na função renal: efeitos hemodinâmicos	46

Figura 15 - Efeito da infusão do antagonista do GLP-1R na função renal: efeitos tubulares	48
Figura 16 - Efeito do antagonista do GLP-1-R na atividade do NHE3 no túbulo proximal renal	50
Figura 17 - Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal de de ratos Wistar tratados com GLP-1 ou antagonista do GLP-1R	52
Figura 18 – Modelo esquemático da via de sinalização envolvida na regulação do NHE3	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista dos anticorpos primários utilizados no experimento de immunoblotting	37
Tabela 2 - Valores de peso corporal, pressão arterial, níveis glicose, insulina e GLP-1 plasmáticos em jejum	38

RESUMO

Farah LS. *Efeito do peptídeo-1 semelhante ao glucagon endógeno sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) é um hormônio incretina secretado pelas células L do trato gastrointestinal e liberado imediatamente após a ingestão de alimento. O GLP-1 estimula a secreção de insulina pós-prandial moderando a elevação precoce da glicose no sangue. Embora primariamente envolvido na homeostase da glicose, o GLP-1 é capaz de induzir a diurese e natriurese, quando administrado em doses farmacológicas em humanos e em roedores. Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que o mecanismo de ação renal do GLP-1, bem como de agonistas sintéticos do receptor GLP-1R, envolve o aumento do fluxo plasmático renal (FPR) e do ritmo de filtração glomerular (RFG) bem como a diminuição da reabsorção de sódio dependente da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) em túbulo proximal renal. Entretanto, até o momento, nenhum estudo investigou se o GLP-1 endógeno exerce efeitos sobre o manuseio renal de sal e água, nem o seu papel fisiológico sobre a regulação da atividade do NHE3. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese que o GLP-1 endógeno modula a função renal de ratos, ao menos em parte, via inibição da atividade do NHE3 em túbulo renal. Para este fim, ratos Wistar (2-3 meses de idade) foram devidamente anestesiados, submetidos à traqueostomia e tiveram a veia jugular e a bexiga canuladas para infusão de uma solução contendo 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ do antagonista do receptor GLP-1R exendin-9 (Ex-9, 40 $\mu\text{L}/\text{min}$) por um período de 30 minutos e para a coleta de urina, respectivamente. A infusão sistêmica de Ex-9 diminuiu a concentração de AMPc urinário e atividade da PKA cortical renal consistente com o bloqueio da sinalização deflagrada pela interação GLP-1/GLP-1R no rim. Além disso, a administração sistêmica de Ex-9 reduziu a diurese, natriurese, RFG, FPR, clearance de lítio e pH urinário. Em experimentos de microperfusão estacionária in vivo, não foram observadas diferenças no fluxo de bicarbonato dependente de NHE3 entre os túbulos proximais perfundidos com exendin-9 (2 μM) e os túbulos perfundidos com solução controle. No entanto, a perfusão tubular proximal com Ex-9 foi capaz de bloquear completamente as ações inibitórias do GLP-1 (20 nM) sobre a atividade do NHE3. Por outro lado, a infusão sistêmica do Ex-9 reduziu os níveis de fosforilação da serina 552, sítio consenso para a fosforilação por PKA localizado na região C-terminal do NHE3, e que está associado à inibição da atividade de troca Na^+/H^+ mediada por este transportador. Baseando-se nos achados que a infusão sistêmica do Ex-9 aumenta a reabsorção de sódio e secreção de H^+ , reduz o clearance do lítio e os diminui os níveis de fosforilação do NHE3 na serina

552 são consistentes com um aumento na atividade deste transportador na ausência/redução da sinalização mediada pela interação do GLP-1 endógeno com seu receptor no rim. Por sua vez, o fato do Ex-9 não afetar a atividade do NHE3 sob as condições experimentais da microperfusão estacionária in vivo é condizente com o fato do GLP-1 não ser sintetizado no néfron e sugere fortemente que é o GLP-1 filtrado que se liga ao seu receptor no túbulo proximal renal resultando na diminuição da reabsorção de bicarbonato de sódio mediada pelo NHE3. Em conjunto, estes resultados sugerem que o GLP-1 endógeno exerce efeito tônico sobre o manuseio renal de sódio e água, mediando portanto, uma relação funcional entre a homeostase glicêmica e volêmica.

Descritores: túbulos renais proximais; antiportador de sódio e hidrogênio; peptídeo 1 semelhante ao glucagon; exendin-9.

ABSTRACT

Farah LS. *Effect of endogenous glucagon like peptide-1 on NHE3 activity in the renal proximal tubule*. [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

The glucagon like peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone secreted by the L-cells of the gastrointestinal tract and released immediately after ingestion of food. GLP-1 stimulates postprandial insulin secretion moderating early increase in blood glucose. Although primarily involved in glucose homeostasis, GLP-1 is capable of inducing diuresis and natriuresis when administered in pharmacologic doses in humans and rodents. Previous studies from our laboratory have shown that the renal mechanism of action of GLP-1 and synthetic agonists of GLP-1R receptor, involves an increase of renal plasma flow (RPF) and glomerular filtration rate (GFR) as well a decrease in reabsorption of sodium mediated by the Na^+ / H^+ exchanger (NHE3) isoform 3 in the renal proximal tubule. However, to date, no study has investigated whether endogenous GLP-1 exerts effects on the renal handling of salt and water, or its physiological role in the regulation of the activity of NHE3. Therefore, the aim of this study was to test the hypothesis that endogenous GLP-1 modulates renal function in rats, at least in part, via inhibition of the NHE3 in renal tubule. To this end, male Wistar rats (2-3 months old) were properly anesthetized, tracheostomized and the jugular vein and the bladder were cannulated to the infusion of a solution containing 100 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{min}$ GLP-1R antagonist receiver exendin-9 (Ex-9, 40 $\mu\text{L}/\text{min}$) for a period of 30 minutes and to collect urine, respectively. Systemic infusion of Ex-9 reduced the urinary concentration of cAMP and the renal cortical PKA activity, consistent with the blockage of the signal triggered by the interaction of GLP-1 / GLP-1R in the kidney. Furthermore, systemic administration of ex-9 reduced diuresis, natriuresis, GFR, RPF, lithium clearance and urinary pH. In experiments of in vivo stationary microperfusion, no differences were observed in the NHE3-mediated net bicarbonate flow between proximal tubules perfused with exendin-9 (2 mM) and perfused tubules with control solution. However, the tubular proximal perfusion with Ex-9 was able to completely block the inhibitory actions of GLP-1 (20 nM) on the activity of NHE3. On the other hand, systemic infusion of Ex-9 reduced phosphorylation levels of serine 552, a consensus site for phosphorylation by PKA located in the C-terminal region of NHE3, which is associated with inhibition of exchange activity of Na^+/H^+ mediated by this transporter. Collectively, the findings that systemic infusion of Ex-9 increases sodium reabsorption and secretion of H^+ , reduces the lithium clearance and decreases the NHE3 phosphorylation at serine 552 levels are consistent with the idea that NHE3 activity is upregulated in the absence/reduction of the signaling cascade mediated by the interaction of the endogenous GLP-1 with its receptor in the kidney. In turn, the fact Ex-9 does not affect the activity of NHE3 under the

experimental conditions of stationary microperfusion in vivo is consistent with the fact that GLP-1 is not synthesized in the nephron. Besides, it strongly suggests that is the filtrated GLP-1 that binds to its receptor in renal proximal tubule, resulting in a decrease in NHE3-mediated sodium bicarbonate reabsorption. Taken together, these results suggest that endogenous GLP-1 exerts a tonic effect on renal sodium and water handling, mediating therefore a functional relationship between volume and glucose homeostasis.

Descriptors: Kidney tubules, proximal; sodium-hydrogen antiporter; glucagon-like peptide 1; exendin-9.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Efeito Incretina

A história do efeito incretina teve início no começo do século 20, e, desde então, o interesse científico e clínico em torno dela só aumentaram com o tempo. Em 1906, Moore e colaboradores (1) utilizaram extratos da mucosa de intestino delgado de porcos como um tratamento para o diabetes, baseados no trabalho prévio de William M. Bayliss and Ernest H. Starling (2) que deu origem à hipótese que a secreção pancreática pudesse ser estimulada por um hormônio produzido pela mucosa duodenal. Em 1932, La Barre foi o primeiro a introduzir o termo "incrétine" ("Intestine seCRETion of INsulin") para descrever uma substância extraída da mucosa do intestino delgado que era capaz de promover o aumento da secreção pancreática endócrina (3). Em 1964, dois grupos de pesquisa independentes, McIntyre e colaboradores (4) assim como Elrick e colaboradores (5), demonstraram que a glicose administrada oralmente promove uma secreção de insulina superior àquela da glicose administrada por via endovenosa (Figura 1), e ambos os grupos formularam a hipótese que fatores derivados do intestino poderiam ter efeitos de potenciação sobre a secreção de insulina após a ingestão oral de glucose. Alguns anos mais tarde, em 1967, este achado foi confirmado por Perley e Kipnis (6), que administraram glicose oral e, dias após, glicose intravenosa (iv) em indivíduos saudáveis e pacientes com diabetes. Eles concluíram que a secreção de insulina em resposta à administração de glicose endovenosa só ascendeu 30-40% comparada àquela observada após a administração de glicose oral em indivíduos saudáveis. Ademais, notaram que este efeito de potenciação sobre a secreção de insulina após a ingestão oral de glucose estava prejudicado em pacientes diabéticos.

Figura 1 – Efeito incretina (Adaptado de Nauck, 1986) (7).

Esta resposta aumentada da insulina em resposta à glicose oral ocorre devido aos hormônios gastrintestinais, também conhecidos como hormônios incretinas que são liberados em resposta às refeições, e que são capazes de potencializar a secreção de insulina estimulada por glicose. Os dois principais hormônios incretinas são o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) (8) e o polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) (9, 10). Essas incretinas fornecem um sinal antecipatório do trato gastrintestinal para as ilhotas pancreáticas, moderando a elevação precoce da glicose plasmática que se segue à ingestão e à absorção de uma refeição com carboidratos entre outros nutrientes.

Em indivíduos saudáveis, cerca de 70% da secreção de insulina estimulada pela ingestão de glicose ocorre através da liberação das incretinas. Por sua vez, o efeito incretina encontra-se reduzido ou ausente em pacientes com DM2 (Figura 2) (6, 7). Este prejuízo do efeito incretina leva à uma redução significativa da secreção de insulina estimulada pela ingestão de nutrientes em indivíduos acometidos pelo DM2, gerando uma hiperglicemia pós-prandial considerável (7).

Figura 2 – Efeito incretina em pacientes saudáveis e acometidos pelo DM2. (Reprodução de Nauck, 1986) (7).

De fato, camundongos nocaute para GIP e/ou GLP-1, apresentam diabetes mellitus em consequência da falta/redução do efeito incretina (11). Diversos estudos evidenciam que as ações insulínótropicas do GLP-1 são mais pronunciadas que as do GIP, isso se deve ao fato do GLP-1 ser o responsável por 70% do efeito incretina. Ademais, o GIP não é capaz de reduzir as concentrações de glicose no plasma em

pacientes com diabetes tipo 2, isto é, pacientes com DM2 possuem resposta insulínica refratária à administração exógena de GIP, no entanto possuem resposta preservada ao GLP-1 exógeno. Desta forma o GLP-1 tornou-se um forte candidato para o desenvolvimento terapêutico (11). Em termos clínicos, uma das propriedades mais importantes do GLP-1 é a sua capacidade de promover a secreção de insulina e manter a homeostase da glicose sem induzir hipoglicemia (12).

1.2 Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)

1.2.1 Síntese, secreção e degradação do peptídeo-1 semelhante ao glucagon

Os efeitos insulínicos do GLP-1 foram descritos pela primeira vez em 1985 em roedor (13) e em 1987 em humanos (14). A descoberta do hormônio incretina, GLP-1, foi feita após a clonagem e sequenciamento do gene que codifica para o proglucagon (15). O GLP-1 tem 30 aminoácidos e é sintetizado a partir da modificação pós-traducional do proglucagon, pela pró-hormônio convertase 1 (PC1) nas células L neuroendócrinas da mucosa do trato gastrointestinal, encontradas principalmente no cólon e no íleo (Figura 3). O gene do proglucagon é expresso nas células- α pancreáticas e nas células L intestinais, mas o processamento pós-traducional difere nestes dois tecidos (16-18). Já a PC1 é específica para a produção de GLP-1 nas células L (19, 20).

A concentração plasmática de GLP-1 é baixa durante o estado de jejum (~5-10 pmol), mas aumenta rapidamente após a ingestão de alimentos que contêm carboidratos (~50 pmol) (22). Vale ressaltar que tanto os indivíduos obesos (23) como os diabéticos tipo II (24) apresentam uma redução na secreção pós-absortiva de GLP-1. O GLP-1 exerce várias ações insulínicas que auxiliam na manutenção da glicemia,

sustentando o potencial terapêutico do GLP-1 para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2. O GLP-1 estimula a secreção de insulina, suprime a liberação de glucagon, desacelera o esvaziamento gástrico, melhora a sensibilidade à insulina e reduz o consumo de alimentos, tendo como resultado a redução da glicose circulante (16). Além disso, evidências experimentais demonstraram que o GLP-1 induz efeitos proliferativos e citoprotetores em ilhotas β pancreáticas (25-27).

Figura 3 - Representação esquemática do proglucagon. Estrutura de sequências do proglucagon e de aminoácidos de GLP-1 e GLP-2. PC1/3, hormônio convertase 1/3. As setas indicam o sítios de clivagem da DPP-IV. (Reprodução de Drucker, 2010) (21).

Comprovou-se que o tratamento com GLP-1 está associado a neogênese, proliferação, hipertrofia, além da apoptose reduzida em células pancreáticas β . Utilizando o modelo do rato obeso Zucker fa/fa, Farilla e colaboradores (26) constataram que depois do tratamento com GLP-1, a proliferação das células β aumentou substancialmente, ao passo que a apoptose destas células decresceu.

O tratamento com GLP-1 também reduziu expressivamente a porcentagem de células apoptóticas em cultura de ilhotas humanas isoladas (25). Estudos a longo prazo são necessários para averiguar se a terapia crônica com agonistas do GLP-1, tais como a exenatida, poderá prevenir a disfunção das células β , alteração comumente observada em indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo II.

In vivo, o GLP-1 tem uma meia-vida muito curta, cerca de 2 minutos, devido à rápida degradação proteolítica pela enzima dipeptidil-peptidase-IV (DPPIV), que cliva o GLP-1 ativo (7-36) formando GLP-1 (9-36) removendo os dois primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal do peptídeo (28, 29). Esta peptidase está localizada no endotélio dos capilares adjacentes às células L contendo GLP-1, e uma proporção significativa do GLP-1 recém-secretado é truncado antes mesmo que possa alcançar a circulação sistêmica (30).

1.3 O receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1R)

O potencial terapêutico do GLP-1 e de seus análogos gerou um grande interesse em compreender o mecanismo de ação pelo qual este peptídeo atua nas ilhotas pancreáticas. As células β pancreáticas possuem receptores específicos e de alta afinidade para o peptídeo GLP-1 (GLP1R). O receptor GLP1R não é apenas expresso em ilhotas pancreáticas, mas também em coração, rins, vasos, trato gastrointestinal, sistema nervoso central, e pulmões (31), sugerindo que esta incretina exerce ações fisiológicas além do benefício glicêmico.

O receptor GLP1R pertence à família dos receptores de membrana associados à proteína G. Quando o receptor GLP1R é acionado, forma-se um complexo GLP-1/GLP1R que ativa principalmente a via de transdução de sinal da adenilil ciclase, gerando aumento dos níveis celulares de AMP cíclico que ativa as vias PKA e EPAC (Figura 4) (32).

Figura 4 – GLP-1/ GLP-1R ativa as vias PKA e EPAC. (Reprodução de Leech CA *et al*, 2011) (33).

A via da PKA é conhecida por ser ativada por diferentes receptores que regulam diferentes processos celulares como o metabolismo, a atividade gênica, o crescimento, divisão e diferenciação celular, entre outros. Na ausência de AMPc, a PKA é um complexo enzimático tetramérico inativo composto por duas subunidades catalíticas (C) ligadas a um dímero de subunidades regulatórias (R). A ligação de quatro moléculas de AMPc ao dímero de subunidades regulatórias faz com que a holoenzima se dissocie e

libere a subunidade catalítica para que esta possa fosforilar resíduos específicos de serina e treonina das proteínas (Figura 5) (34-36).

Figura 5 – Representação da ativação da PKA. R: subunidade regulatória; C: subunidade catalítica. (Reprodução modificada de Hansson *et al*, 2000) (34).

A PKA constitui um componente chave na regulação da secreção de insulina por AMPc, mediando muitas das reações de fosforilação necessárias para secreção nas células β . A inibição da PKA em ilhotas isoladas e linhagens celulares de insulinoma diminuem o GLP-1 e a secreção de insulina mediada por glicose (37). Portanto, o nível basal (não estimulado) da atividade da PKA é necessário para a secreção de insulina mediada por glicose (38).

O direcionamento intracelular e compartimentalização da PKA são controlados em associação através da AKAP. AKAP é uma família estruturalmente diversa de proteínas de ancoragem funcionalmente relacionadas que incluem mais de 50 membros e são definidos com base na sua capacidade para se ligar a PKA e da atividade catalítica co-precipitada. No entanto, a importância funcional envolve também alvo da enzima para compartimentos subcelulares específicos proporcionando assim regulação espacial

e temporal dos eventos de sinalização da PKA. Todas as proteínas de ancoragem da PKA contêm um domínio de ligação e um domínio de direcionamento exclusivo dirigindo o complexo PKA-AKAP a estruturas subcelulares definidas, membranas, ou organelas (39).

O envolvimento de AKAPs na ativação da PKA, no contexto da sinalização de GLP-1 na célula β , ainda está em um estágio inicial de estudo, bem como a regulação das concentrações celulares de proteínas de ancoragem da PKA, que podem atuar como reguladoras na ativação da PKA e de seus efetores à jusante. Estes estudos podem potencialmente servir para integrar os diversos mecanismos de sinalização ativados por GLP-1. “Pools” similares de PKA associados às várias isoformas de AKAP podem existir nos pontos de ação à jusante da ativação do GLP-1R na célula β .

Por muitos anos, os efeitos do AMPc foram atribuídos unicamente à ativação da proteína quinase A (PKA) bem como à canais iônicos dependentes de AMPc, mas a contribuição de um alvo alternativo do AMPc, a EPAC (proteína de troca diretamente ativada por AMPc, também conhecida como AMPc-GEF), tem sido bastante explorada. A EPAC foi identificada para explicar a ativação independente da PKA da proteína Rap pelo AMPc (40). Estas proteínas de sinalização fazem parte de uma grande família de efetores não-cinases relacionadas à ativação de proteínas de ligação da superfamília GEF–Ras, as quais estão envolvidas na secreção de insulina (41).

Existem duas variantes de GEF que exibem uma elevada especificidade para a ativação por AMPc em relação a outros nucleotídeos cíclicos e eles são referidos como EPAC1 e EPAC2 (42), ambos os quais são encontrados em ilhotas de ratos e em linhagens de células β (43). EPAC 1 e EPAC 2 estão presentes na maioria dos tecidos,

embora com diferentes níveis de expressão. A EPAC 1 é altamente abundante no rim, vasos sanguíneos, tecido adiposo, sistema nervoso central, ovários e útero, enquanto a EPAC 2 é majoritariamente expressa no sistema nervoso central, glândula supra-renal e pâncreas (44, 45).

A glicose constitui o sinal primário para a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, a qual é mediada pela sinalização via AMPc, através da ação de cooperação dos efetores PKA e EPAC (Figura 6). O metabolismo da glicose resulta em um influxo de Ca^{2+} via canais dependentes de voltagem, provoca a secreção de grânulos de insulina ancorados na membrana plasmática. Esta primeira fase de secreção de insulina é seguido pela mobilização de grânulos de insulina adicionais, mediando uma segunda fase de secreção de insulina (46).

A utilização de camundongos nocaute para EPAC2, a principal isoforma de EPAC expressa em células β pancreáticas (33), mostrou que esta proteína de sinalização é essencial para a ação completa do GLP-1/GIP sobre a exocitose de insulina (47, 48). Em particular, experimentos realizados com células primárias de camundongos nocaute para EPAC2 revelou que a sinalização EPAC2-Rap1 desempenha um papel essencial na primeira fase de secreção de grânulos de insulina, provavelmente através do controle da densidade do grânulo perto da membrana plasmática (49). Parte do papel da EPAC2 na secreção de insulina é mediada pelos seus efeitos sobre a sinalização de Ca^{2+} . O receptor de GLP-1 estimula aumento de níveis intracelulares de Ca^{2+} dependentes de glicose em linhagens de células β e cultura primária que é parcialmente dependente da EPAC2 (47, 50, 51).

Figura 6 - Funções da EPAC2 na secreção de insulina. Glicose induz a exocitose da insulina, aumentando a razão ATP / ADP citossólica e o fechamento de canais sensível a ATP- K^+ (canais KATP). Este processo resulta na despolarização da membrana e abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCCs), que desencadeiam a secreção de grânulos de insulina ancorados na membrana plasmática. EPAC2 participa de várias maneiras: inibindo canais KATP; por ativação do canal de Ca^{2+} sensível à rianodina, RYR2, que está envolvido na indução e secreção de Ca^{2+} (CICR) a partir do retículo endoplasmático; e pelo recrutamento de grânulos de insulina na membrana plasmática. Abreviaturas: AC, a adenilil ciclase; IP3R, receptor trifosfato inositol. (Reprodução de Ponsioen *et al*, 2009) (52).

A EPAC1 é altamente expressa em todos os segmentos dos túbulos renais (40, 53-55). A sua localização nas bordas em escova sugere um papel para EPAC1 na regulação mediada por AMPc em processos apicais, tais como reabsorção de íons e água. Com efeito, no túbulo proximal, a ativação da PKA e EPAC resulta na redução da atividade da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ , NHE3 (56, 57). Embora a proteína EPAC1 esteja presente no íleo intestinal, a regulação do NHE3 mediada por AMPc nestas células é unicamente mediada por PKA, demonstrando que o AMPc utiliza diferentes vias de sinalização para regular o transporte de íons em diferentes tecidos (57, 58).

No ducto coletor cortical, diversos tipos de células regulam a reabsorção de íons e água em resposta à elevação do AMPc. Hormônios distintos medeiam este aumento do AMPc nas diferentes células e agem sobre os receptores β adrenérgico, calcitonina e vasopressina. A ativação da EPAC1 demonstra ser responsável pela estimulação da secreção de H^+ nas células intercaladas- α , via atividade da H^+/K -ATPase do ducto coletor renal de ratos (55).

1.4 Terapia baseada em incretinas: agonistas do GLP-1R e inibidores da dipeptidil peptidase IV

O maior obstáculo para o uso terapêutico do GLP-1 é a sua instabilidade metabólica devido a sua rápida inativação pela DPPIV. Na tentativa de contornar essa limitação, foram desenvolvidas estratégias terapêuticas nomeadas “baseadas incretinas” constituídas pela administração de incretinomiméticos, ou seja, agonistas do receptor do GLP-1 como o exendin-4, e análogos do GLP-1 resistentes à inativação enzimática como o liraglutide; bem como a criação de agentes inibidores da DPPIV, as denominadas “gliptinas” (59-61).

O exendin-4, um agonista do GLP-1-R, é um composto natural encontrado na glândula salivar do lagarto *Heloderma suspectum* (monstro de Gila) (62). O exendin-4 cai na circulação sanguínea do monstro de Gila quando este deglute a sua presa, o que equivale a uma secreção prandial. O exendin-4 é resistente à ação da DPPIV de mamíferos e tem uma meia-vida muito mais longa que o GLP-1 endógeno (aproximadamente 3.3–4 h vs. menos que 2 minutos) (61, 63). Ele compartilha 53% da

sua sequência primária de aminoácidos com o GLP-1, liga-se a GLP-1R, e exerce um efeito glicorregulador semelhante (64, 65). O exendin- 4 tem uma modificação estrutural em uma alanina em relação ao GLP-1 o que o faz escapar ao reconhecimento e degradação por DPPIV, o que explica o fato deste peptídeo possuir uma meia vida plasmática mais longa que a do GLP-1.

Já a versão truncada do Exendin-4, o Exendin-9, comporta-se como um antagonista do receptor do GLP-1, comportando-se como um inibidor competitivo. É capaz de diminuir os níveis basais de AMPc e de diminuir drasticamente a secreção de insulina dependente da glicose (66).

Substâncias com propriedades análogas ao GLP-1 têm sido desenvolvidas, com a característica principal de serem resistentes à ação da enzima DPPIV. Duas substâncias: liraglutida (Novo 4 Nordisk, Dinamarca) e CJC-1131 (Conjunchem, Canadá) têm sido as mais estudadas e testadas clinicamente e são análogas ao GLP-1. Estas substâncias exercem sua ação anti-hiperglicêmica por diversos modos, assim como as incretinas, inclusive aumentando a secreção de insulina de forma glicose-dependente (61).

Os inibidores da atividade catalítica da DPPIV representam uma nova classe de agentes hipoglicemiantes orais para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2. A utilidade destes inibidores repousa sobre a sua capacidade de prevenir a rápida degradação do peptídeo-1 semelhante ao glucagon pela DPPIV (67). As gliptinas são peptídeo-miméticos altamente específicos para a inibição desta peptidase. Muitos deles tem meias-vidas longas, permitindo a terapia oral uma vez ao dia. Há aproximadamente 85% de inibição da DPPIV após 24 horas da administração dos inibidores. Em pacientes com diabetes tipo 2, os fármacos restauram de forma eficaz concentrações circulantes de

GLP-1 pós-prandial para uma resposta de uma pessoa não-diabética. Estes agentes reduzem também a glicemia de jejum em pacientes com diabetes tipo 2, predominantemente, reduzindo a secreção de glucagon. Em modelos animais de diabetes tipo 2, tanto a sitagliptina como a vildagliptina preservam a função e a massa de células β (59).

Estudos em camundongos nocaute para o gene da DPPIV mostraram que a inibição da atividade desta enzima contribui para a homeostase da glicose promovendo a estimulação de secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas. Além destes efeitos, foram observados em estudos posteriores (68) que a obliteração do gene da DPPIV também apresenta efeitos benéficos adicionais sobre o metabolismo. Camundongos nocaute para DPPIV são refratários ao desenvolvimento de hiperinsulinemia e obesidade, quando submetidos à dieta rica em gorduras (HFD, “high fat diet”) estes animais apresentam redução da ingestão de alimentos, aumento do gasto energético, aumento da sensibilidade à insulina e redução da hipertrofia das células β pancreáticas, quando comparados a camundongos controle também alimentados com HFD.

Estas observações indicam que a abolição crônica da atividade da DPPIV possui impacto relevante sobre o controle do peso corporal e da homeostase energética, validando o uso de inibidores desta peptidase como uma terapia viável para o tratamento de desordens metabólicas associadas ao DM2 e obesidade. Foi com base nestes achados, provenientes da pesquisa básica e dos ensaios pré-clínicos, que atualmente os inibidores da DPPIV estão sendo largamente empregados, com eficácia e segurança, na prática clínica.

1.5 Efeitos extra pancreáticos do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)

1.5.1 Efeitos do GLP-1 no sistema gastrointestinal

Conforme mencionado acima, o receptor GLP1R não é apenas expresso em ilhotas pancreáticas, mas também em diversos outros órgãos (31). No sistema gastrointestinal (GI), o GLP-1 exerce efeitos inibitórios sobre a motilidade e secreção, em particular, no esvaziamento gástrico (69). A administração de GLP-1 em doses fisiológicas em voluntários saudáveis resulta em uma diminuição dependente da dose do esvaziamento gástrico e a absorção de glicose, os quais participam na redução das concentrações de glicose plasmática pós-prandial (69). Isto sugere que o GLP-1 participa no fenômeno “freio ileal” através do qual os nutrientes na parte distal do intestino delgado induzem uma redução da motilidade intestinal superior e atividade secretora. As ações do GLP-1 na mobilidade e secreção do GI provavelmente envolve mecanismos mediados por vias neurais, incluindo as vias vago-vagal. Em estados patológicos, tais como diabetes, os efeitos inibidores de GLP-1 na motilidade gastrointestinal, em particular o esvaziamento gástrico, são de especial interesse porque pode potencialmente reduzir a glicose pós-prandial.

O retardamento do esvaziamento gástrico reduz a entrada de glicose pós-prandial para a circulação sistêmica e, portanto, embota as variações da glicemia pós-prandial (70). Isso ressalta a importância do esvaziamento gástrico em determinar as variações da glicemia pós-prandial. Estas propriedades do GLP-1, tomadas em conjunto com a forte correlação entre os níveis circulantes de GLP-1 e taxa de esvaziamento gástrico (71), levaram alguns autores a sugerir que as ações de esvaziamento gástrico de

GLP-1 podem ser tão ou ainda mais importantes do que as ações incretinas do GLP-1, conforme delineado e revisado por Nauck e colaboradores (69, 72).

1.5.2 Efeitos do GLP-1 no cérebro

A síntese de GLP-1 também foi detectada em corpos celulares dos neurônios do núcleo do trato solitário, nas partes dorsal e ventral do sistema reticular medular do tronco cerebral (73). No entanto, o GLP-1 tem sido encontrado em fibras nervosas peptidénrgicas por toda parte do cérebro, onde serve como um neurotransmissor, com maiores concentrações nas áreas do hipotálamo; região que está intimamente envolvida no controle da ingestão alimentar e do apetite.

No cérebro, os receptores de GLP-1 são expressos principalmente nas regiões responsáveis pela regulação da ingestão de alimentos (74). A administração de doses baixas de GLP-1 na intra-cérebro ventricular (ICV) resultou na inibição da ingestão de alimentos (75-77). A administração periférica de GLP-1 em humanos aumenta a saciedade e reduz a ingestão de alimentos (78, 79), por meio de um mecanismo que ainda não é claro, mas que possivelmente engloba as ações centrais deste peptídeo. Uma possibilidade é que o GLP-1 periférico atue em fibras aferentes vagais, permitindo a modulação do GLP-1 na transmissão neuronal no sistema nervoso central (SNC) (80).

Em primatas e roedores saudáveis e diabéticos, a administração sistêmica de um análogo do GLP-1 induziu uma redução significativa da ingestão de alimentos e, conseqüentemente, menor ganho de peso foi também observado (80). Em indivíduos normais, a administração intravenosa de GLP-1 em níveis fisiológicos aumentou a sensação de saciedade e reduziu a ingestão de alimentos (78). Efeitos semelhantes

foram observados em indivíduos obesos, bem como em pacientes com diabetes tipo 2 (79, 81). Em pacientes diabéticos tipo 2 tratados com uma infusão subcutânea de GLP-1, a redução de ingestão de alimentos foi sustentada e associada com a perda de peso (81).

1.5.3 Efeitos cardiovasculares do GLP-1

Uma série de evidências indica que o GLP-1 tem efeitos benéficos sobre a função do miocárdio. *In vitro*, os agonistas do GLP-1R ativam vias citoprotetoras e exercem ações anti-apoptóticas em cardiomiócitos expostos a diferentes estímulos como ceramida, palmitato, estaurosporina e fator de necrose tumoral alfa, TNF- α (82, 83). Adicionalmente, o GLP-1 nativo atenua o tamanho do infarto após isquemia/reperfusão in vivo bem como em corações isolados perfundidos (84), e o liraglutide melhora o desfecho pós-infarto do miocárdio tanto em camundongos não-diabéticos como diabéticos (85). Cabe ressaltar que estes resultados em estudos in vitro e pré-clínicos, são corroborados por estudos clínicos, haja vista que o tratamento com GLP-1 ou exenatida melhoraram significativamente a função cardíaca em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio e/ou disfunção ventricular esquerda e que não apresentavam histórico diabetes ou intolerância à glicose (86, 87).

1.5.4 GLP1 no músculo, tecido adiposo e fígado

O GLP-1 parece ter efeitos semelhantes à insulina nos principais tecidos extra pancreáticos, participa na homeostase da glicose e do metabolismo lipídico em tecidos como o músculo, fígado e tecido adiposo. O GLP-1 também estimula a captação de glicose, a lipogênese e lipólise em adipócitos e tem a capacidade de estimular a síntese

de ácidos gordos em cultura de tecido adiposo (88). Vários estudos mostram que a injeção de um adenovírus recombinante que expressa GLP-1 em ratos diabéticos obesos aumenta a absorção de glicose estimulada por insulina, em adipócitos (89), e o GLP-1 também aumenta a absorção de glicose estimulada por insulina, juntamente com um aumento dos níveis de transportadores de glicose na linhagem células 3T3- L1 (90).

Em adipócitos humanos, o GLP-1 e o exendin-4, ao contrário do exendin-9, aumentam a captação de glicose em associação com a ativação da PI-3K e MAPK, e este efeito é prejudicado em pacientes obesos (91). As vias PI-3K e MAPK também estão envolvidas na lipogênese e lipólise em adipócitos de rato mediadas por GLP-1 (92).

A infusão de GLP-1 em ratos também reduz o fluxo linfático intestinal, absorção de triglicérides, e produção de apolipoproteína, embora não afeta a absorção de colesterol, sugerindo o efeito do GLP-1 em limitar os níveis de lipídeos, como a glicose, após as refeições (93).

Efeitos estimulantes do GLP-1 sobre a atividade da glicogênio-sintetase α e da síntese de glicogênio têm sido demonstrados em hepatócitos isolados de ratos normais e diabéticos (94), e estes efeitos parecem ocorrer através de uma via de sinalização celular que envolve a ativação de PI-3K, PKB e PKC (94). Estudos recentes demonstraram que a transdução de GLP-1 utilizando o sistema de adenovírus em ratos diabéticos obesos reduz a gliconeogênese hepática e a expressão hepática de fosfoenolpiruvato carboxicinase, glicose-6-fosfatase e síntese de ácido graxo, melhora a sinalização e sensibilidade à insulina (89).

1.5.5 Efeitos renais do GLP-1

Vários trabalhos realizados em humanos e em animais de experimentação constataram e confirmaram as propriedades diuréticas e natriuréticas resultantes da infusão sistêmica de doses farmacológicas de GLP-1 e de seus análogos (95-101). Em um destes trabalhos, verificou-se que a infusão intravenosa contínua de GLP-1 por três horas em indivíduos saudáveis e obesos aumentou o fluxo urinário, a excreção de sódio e reduziu a secreção de hidrogênio (96). Estes dados implicam que as ações diuréticas e natriuréticas do GLP-1 podem ser mediadas, ao menos em parte, pela inibição da atividade da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) em túbulo proximal renal. Esta hipótese foi validada pelo nosso grupo de pesquisa por meio de experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* nos quais observamos que a perfusão tubular proximal com GLP-1 (20 nM) reduz significativamente a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal (97). Esta inibição da atividade do NHE3 induzida pelo GLP-1 é acompanhada por um aumento dos níveis de fosforilação dos resíduos de serina 552 e 605, sítios consenso para proteína cinase A (PKA), presentes na cauda citoplasmática do transportador (Figura 7) (97).

Figura 7 - Ações farmacológicas do GLP-1 na função tubular modulam a atividade do NHE3. A) Proteínas de membrana de córtex renal de ratos infundidos com solução controle ou GLP-1 (1 µg/kg/min) foram submetidas à SDS-PAGE, transferidas para membranas PVDF e incubadas com anticorpo monoclonal contra serina 552, serina 605, NHE3 total e anti-actina. B) Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do NHE3 total e fosforilada em membranas microvilares e C) Papel da PKA na mediação dos efeitos do GLP-1 sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal. (Reprodução de Crajoinas *et al*, 2011) (97).

Observou-se também que a infusão sistêmica de GLP-1 em roedores está também associada com alterações na hemodinâmica renal, uma vez que tal peptídeo aumenta o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração glomerular (97, 98). Estes achados sugerem que além de exercer ações inibitórias sobre a reabsorção de sódio em túbulo proximal, o GLP-1 também pode exercer efeitos vasodilatadores sobre a vasculatura renal.

Estudos conduzidos em nosso laboratório (manuscrito em revisão) foi observado que o GLP-1 promove vasodilatação em anéis isolados de artérias renais provenientes de ratos Wistar, como mostra a Figura 8. Foi observado também que a ação vasodilatadora do GLP-1 independe do endotélio, uma vez que a remoção destas células não bloqueou o relaxamento; além disso, a pré-incubação de alguns anéis de artéria renal com o inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N(w)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME dicloridrato, 100 μ M), não modificou a resposta do vaso ao GLP-1. Este efeito parece não envolver a participação de prostanóides, já que a resposta vascular a tal peptídeo não se alterou na presença de indometacina. Estes achados estão ilustrados na Figura 8. Ademais, para analisar o possível papel da via de sinalização do AMPc, ativada pela ligação do GLP-1 ao seu receptor GLP-1R no leito vascular renal, foi observado um aumento estatisticamente significativo na concentração de AMPc na presença de 20nM GLP-1 ($81,7 \pm 14,0$ vs. $8,7 \pm 1,2$ pmol/mg proteína/30 min) em relação à condição basal.

Figura 8. Efeito vasodilatador promovido pelo GLP-1 sobre a artéria renal de ratos Wistar. Artérias renais de ratos Wistar foram removidas e divididas em segmentos cilíndricos (3-4 mm), livres dos tecidos conectivo e adiposo. Em algumas artérias, a camada endotelial foi removida mecanicamente. Cada anel foi colocado em cuba contendo solução de Krebs-Henseleit, a fim de obter o registro de tensão isométrica. Após a obtenção de um platô, foram realizadas curvas concentração-resposta, cumulativas, ao GLP-1 (10^{-10} a 10^{-6} M). Alguns anéis foram pré-incubados com o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N(w)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME dicloridrato, $100 \mu\text{M}$), ou indometacina, por 30 minutos antes da curva concentração-resposta ao GLP-1 resposta vascular a este peptídeo.

1.6 Isoforma 3 do Trocador Na^+/H^+ (NHE3)

O NHE3 está presente, principalmente, na membrana apical das células epiteliais renais e gastrointestinais (102, 103). Esta isoforma de trocador Na^+/H^+ é a mais abundante no rim e está localizada na membrana apical do túbulo proximal e na alça fina e espessa ascendente. Em túbulos proximais de mamíferos, NHE3 é a isoforma do trocador Na^+/H^+ mais abundante em membrana apical, sendo responsável pela reabsorção de grande parte do NaCl e NaHCO_3 filtrados nos glomérulos (104-109). Esta isoforma de trocador tem, portanto, papel essencial na homeostase de volume, na homeostase ácido-base e na determinação dos níveis de pressão arterial sistêmica.

A regulação do NHE3 pode ocorrer via múltiplos mecanismos celulares e moleculares que incluem a fosforilação direta da cauda citoplasmática do trocador por proteína cinase A (110-112) (Figura 9), a translocação do NHE3 da superfície da membrana plasmática para vesículas subapicais (113-116) e a interação com proteínas acessórias (112, 117-120).

O NHE3 é inibido por uma série de hormônios cujos receptores específicos ativam a proteína cinase A (PKA), fosforilando diretamente a porção citoplasmática deste trocador. Em 2005, Kocinsky e colaboradores (110) publicaram um trabalho caracterizando dois anticorpos monoclonais fosfo-específicos, sendo que um deles reconhece o NHE3 somente quando a serina 552 está fosforilada e outro que reconhece o NHE3 somente quando a serina 605 está fosforilada. A geração destes reagentes permitiu demonstrar que estes dois sítios consenso para a PKA são regulados fisiologicamente tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudos posteriores demonstraram que, embora seja essencial para desencadear a inibição da atividade deste transportador, a

fosforilação das serinas 552 e 605 precede a inibição da troca Na^+/H^+ mediada por NHE3 (121). Os mecanismos pelos quais a fosforilação destas serinas pode resultar em subsequente inibição do trocador possivelmente envolvem alterações no tráfego subcelular do NHE3 e/ou modulação da interação deste transportador com proteínas reguladoras.

Figura 9 – Estrutura secundária do NHE3. O NHE3 é composto por 12 domínios transmembranares e um grande domínio C-terminal citosólico. Os domínios transmembranares implicados no transporte de íons estão destacados em amarelo. A figura indica também os NHERFs (porção regulatória) e as serinas P 552 e P605 que são fosforiladas por uma proteína quinase A (PKA), além de mostrar o sítio de interação da DPPIV com este permutador. (Reprodução adaptada de Alexander RT *et al*; The J. Exp. Biol , 2009) (122).

A membrana de borda em escova das células de túbulos proximais renais é composta por dois microdomínios que são bem distintos do ponto de vista estrutural e funcional. As microvilosidades consistem de filamentos de actina dispostos paralelamente e interligados pela proteína vilina. Sua função é amplificar a área de superfície da membrana apical do túbulo proximal, aumentando a capacidade destas células de transportar substâncias presentes no fluido luminal. Na base da borda em escova, a membrana plasmática forma invaginações citoplasmáticas originando a região intermicrovilar das vesículas revestidas de clatrina. O microdomínio intermicrovilar (IMV) é enriquecido na proteína megalina e está envolvido nas etapas iniciais da endocitose de proteínas que ocorre nas células do túbulo proximal (113, 123). Identificou-se que em condições fisiológicas o NHE3 é igualmente distribuído entre estes dois microdomínios (113).

Adicionalmente, Biemesderfer e colaboradores (14) observaram que uma fração do NHE3 que reside na base das microvilosidades pode servir como um pool interno de reserva que é recrutado com a estimulação por agonistas. Estudos recentes demonstraram que o NHE3 pode transitar entre o corpo e a base das microvilosidades da membrana apical e que estas translocações são acompanhadas por mudanças no transporte renal de sódio (114). Em resposta a agentes natriuréticos como o aumento da pressão de perfusão renal, o NHE3 migra do corpo para a base das microvilosidades (124). Por sua vez, notou-se que, em condições como ativação do sistema nervoso simpático e tratamento com insulina, que aumentam a atividade deste transportador, o NHE3 é redistribuído da base para a superfície das MMVs da membrana apical (116).

1.7 Hipótese de trabalho

Apesar de existirem fortes evidências que o GLP-1 é capaz de promover natriurese e diurese, e que estes efeitos ocorrem através da modulação do NHE3, todos os experimentos conduzidos até o momento utilizaram análogos do GLP-1 ou o GLP-1 administrado de forma exógena ou foram conduzidos in vitro. Não existe nenhum estudo que tenha avaliado o papel do GLP-1 endógeno na homeostase de sódio e água nem o papel fisiológico deste hormônio incretina na modulação do NHE3. Neste estudo, testamos a hipótese que o GLP-1 endógeno exerce efeitos sobre a função renal. Ademais, investigamos os mecanismos pelos quais este hormônio, anteriormente relacionado apenas ao controle da glicemia, controla a excreção renal de bicarbonato de sódio e água.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Testar a hipótese que o GLP-1 endógeno exerce efeitos sobre a função renal e investigar os possíveis mecanismos envolvidos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Testar a hipótese que a administração sistêmica do antagonista do receptor GLP-1R exendin-9 diminui o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração.
- ✓ Testar a hipótese que o antagonismo do receptor GLP-1R estimula a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos Experimentais

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (CAPPesq), de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados ratos Wistar com idade entre 2-3 meses de vida (230-280 g), comprados no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em gaiolas, sob condições controle de temperatura (22°C), de umidade (60%) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação.

No dia do experimento os animais foram anestesiados com tiopental (50mg/Kg) por via intraperitoneal e colocados em uma mesa cirúrgica aquecida (37°C) para manter a temperatura corporal. A traqueia foi canulada com um cateter PE-240 e para a infusão do exendin-9 (100ug/kg), outro cateter, PE-60, foi inserido na veia jugular esquerda. Para coleta de urina, a bexiga foi canulada com um cateter PE-100. O exendin-9 na dose de 100ug/kg (125) ou veículo (4% BSA/salina) foi infundido em uma taxa de 40 µl/min por um período de 30 minutos. É digno de nota que todos os animais foram submetidos a uma infusão prévia de solução salina com 4% de BSA por 30 minutos para minimizar as diferenças de hidratação de cada animal. Vale ressaltar que os efeitos renais agudos do GLP-1 por bloqueio do GLP-1R pelo antagonista exendin-9 foram avaliados em ratos

submetidos ao jejum de 8 horas para evitar possíveis diferenças pós-prandiais nos níveis circulantes de GLP-1.

Para monitorar a pressão arterial média (MP100; Biopac Systems, Inc. Santa Barbara, CA) e permitir a coleta de sangue arterial durante o LVT-MV, um cateter PE-60 foi inserido na artéria carótida direita. No final do experimento, o fluxo sanguíneo renal foi medido com uma sonda de monitorização constante invasiva inserido na artéria renal (fluxômetro 1RB4051 - Transonic Systems Inc TS 402, medidor de fluxo perivascular).

A resistência vascular renal foi calculada pelo quociente entre a pressão arterial e o fluxo sanguíneo renal, e expressa em mmHg/ml/min. O sangue arterial foi coletado no momento do sacrifício para determinar as concentrações de sódio, lítio, bicarbonato, creatinina, glicose e insulina plasmáticos. Os rins foram removidos em seguida, para a preparação de proteínas de membrana a partir do córtex renal.

3.2 Análises do sangue

O sódio, bicarbonato e pH plasmáticos foram medidos pelo analisador de eletrólitos (ABL800 FLEX, Radiometer Copenhagen). Os níveis circulantes de insulina foram determinados no estado de jejum e foi determinada por ensaio imuno-enzimático (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante. Para a determinação do GLP-1 ativo no estado de jejum, o sangue recém retirado foi transferido para tubos contendo EDTA (1 mg/ml) para evitar a coagulação do sangue e 10 μ M do inibidor da enzima DPP-IV P32/98 (Abcam, Cambridge, MA) para evitar a degradação do GLP-1. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 RPM a 4 °C durante 10 min.

As amostras de soro foram aliquotadas em tubos de microcentrifuga e armazenadas a -80°C . As concentrações de GLP-1 ativo (7-36) foram obtidas por ensaio imunoenzimático (Millipore, Billerica, MA).

3.3 Avaliação da Função Renal

O volume urinário foi avaliado pelo método gravimétrico, pela diferença do peso do tubo antes e após a coleta da urina e o fluxo urinário foi estimado dividindo-se o volume urinário pelo tempo de coleta corrigido pelo peso do rato. Os resultados foram expressos em $\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$.

O ritmo de filtração glomerular foi estimado por meio do clearance da creatinina, calculado pela fórmula $(U_{\text{Cr}} \times V / P_{\text{Cr}})$, sendo U_{Cr} correspondente à concentração urinária de creatinina, V o fluxo urinário e P a concentração plasmática de creatinina. Os resultados foram expressos em $\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$. A concentração de creatinina urinária foi determinada por meio de um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e a creatinina plasmática foi medida em um aparelho Beckman Coulter Synchron CX7 Analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

A carga excretada de Na^{+} representa a quantidade de sódio excretada na urina por unidade de tempo, calculado pela fórmula $(U_{\text{Na}} \times V)$, sendo U_{Na} a concentração urinária de sódio e V o fluxo urinário. Os resultados são expressos em $\text{mEq}/\text{min}/\text{kg}$.

A concentração urinária de lítio foi medida por fotometria de chama (Micronal B262, São Paulo, SP, Brasil). O clearance do lítio representa a depuração plasmática do lítio por minuto, calculada pela fórmula $(U_{\text{Li}} \times V / P_{\text{Li}})$, sendo U_{Li} a concentração

urinaria de lítio, V o fluxo urinário e P_{Li} a concentração plasmática de lítio. Os resultados são expressos em mL/min/kg.

3.4 Excreção de AMPc urinário

A concentração de AMPc na urina foi determinada por ensaio imuno-enzimático (Arbor Assays, Michigan, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. A excreção de AMPc foi calculada multiplicando o volume de urina pela concentração de AMPc na urina.

3.5 Determinação da Atividade do Trocador NHE3

A atividade do NHE3 em túbulos proximais renais *in vivo* foi determinada pelo processo de microperfusão estacionária. Para isso, os ratos foram anestesiados e levados a uma gaiola de Faraday e colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica aquecida a 37°C. Foi feita uma incisão na porção ventral do pescoço para realizar a traqueostomia. Em seguida, a jugular foi canulada para infundir uma solução fisiológica com manitol 3%, a 0,5 mL/min, com o intuito de tornar os túbulos mais visíveis. Feito isso, os ratos tiveram o rim esquerdo exposto, fixado e imobilizado com solução de Ringer Agar 5% *in situ* em um suporte.

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

extremidade e mergulhada em becker contendo solução salina e fazia contato elétrico por ponte de agar de KCl com uma hemicélula de Ag/AgCl.

Após este prévio preparo, foram iniciados os experimentos de microperfusão estacionária que foram realizados da forma descrita anteriormente (126). Túbulos proximais foram perfundidos por meio de uma micropipeta dupla: um ramo da micropipeta foi utilizado para injetar solução de perfusão corada com verde-FDC (100 mM NaCl e 25 mM NaHCO₃) e o outro para injetar óleo de rícino corado com Sudan-black. A taxa de acidificação tubular foi medida injetando-se uma gota de solução de perfusão entre as colunas de óleo e seguindo mudanças do pH luminal em direção a um nível estacionário (perfusão estacionária). Para avaliar o papel do GLP-1/GLP-1R na taxa de reabsorção de bicarbonato (J_{HCO₃⁻}) no túbulo proximal, adicionou-se à solução de HCO₃⁻ 20 nM GLP-1 e/ou 2 μM exendin-9 (Ex-9), ou apenas salina (CRTL). O pH luminal foi medido por meio de um microeletrodo de dois ramos, sendo um preenchido com H⁺ ionóforo (cocktail B; Fluka, Buchs, Alemanha) e o outro com solução de referência corada com verde-FDC (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática do sistema utilizado para medir a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar. À direita, uma micropipeta dupla; no meio, uma micropipeta de um ramo e à esquerda, um microeletrodo de dois ramos perfurando um segmento do nefro proximal. O túbulo proximal foi perfundido por meio de uma micropipeta dupla. A taxa de acidificação tubular foi medida injetando-se uma solução de perfusão entre as colunas de óleo seguindo as mudanças do pH luminal em direção a um nível estacionário (perfusão estacionária). P: solução de perfusão; C: óleo de rícino; R: solução de referência; IE: resina de troca iônica sensível a H^+ ; S: solução experimental.

A voltagem entre os ramos do microeletrodo, representando a atividade luminal do H^+ , foi continuamente digitalizada por um microcomputador acoplado a um conversor análogo-digital (Lynx, São Paulo, Brasil) pelo qual os dados foram obtidos e processados. A taxa de acidificação tubular ($t_{1/2}$) foi calculada como a meia vida da redução da concentração de íon bicarbonato (HCO_3^-) injetado ao nível estacionário. O nível de reabsorção de HCO_3^- ($J_{HCO_3^-}$) foi calculado através da equação (127):

$$J_{HCO_3^-} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \left[(HCO_3^-)_0 - (HCO_3^-)_s \right] \times \frac{r}{2}$$

Onde $t^{1/2}$ é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio do túbulo, e $(\text{HCO}_3^-)_0$ e $(\text{HCO}_3^-)_s$ são as concentrações de HCO_3^- injetada e HCO_3^- a nível estacionário, respectivamente.

3.6 Preparação de proteínas de homogenato e membranas de córtex renal

A cápsula renal foi removida com o auxílio de uma pinça, cortou-se o rim ao meio e retiraram-se as porções referentes ao córtex, que foram imediatamente transferidas para um frasco contendo tampão fosfato-salino (PBS), gelado, constituído por 150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico e 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; pH 7,4). Os seguintes inibidores de protease foram adicionados a este tampão: pepstatina A (0,7 µg/ml), leupeptina (0,5 µg/ml) e PMSF (40 µg/ml). Em seguida, homogeneizou-se com homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.). O homogenato foi então aliquotado e acondicionado em -80°C. A fração correspondente à preparação de proteínas totais de membrana de córtex renal foi isolada do homogenato por meio de centrifugações diferenciadas (P), assim efetuadas: P1: 4000 rpm por 10 minutos e P2: 28000 rpm por 90 minutos. Após a centrifugação P1, salvou-se o sobrenadante e descartou-se o “pellet”. Após a centrifugação P2, descartou-se o sobrenadante. O “pellet” final obtido foi ressuspenso em tampão PBS, aliquotado e acondicionado em -80°C.

A determinação da concentração de proteínas da preparação de proteínas de membrana de córtex renal foi obtida pelo método de Lowry (128). O método consiste na adição de hidróxido de sódio, de carbonato de cálcio, de sulfato de cobre e de tartarato de sódio a uma mistura contendo proteínas. Adiciona-se ainda Folin-fenol Ciocalteau no

qual há um constituinte ativo que sofre redução quando reage com proteínas na presença do cobre em solução alcalina produzindo um complexo de coloração azul com absorção máxima em 750 nm.

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS para proteína

Amostras de proteínas de membranas corticais renais foram ressuspensas em tampão de amostra para eletroforese (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; SDS 2,0%; glicerol 20%; β -mercaptoetanol 1,96%; azul de bromofenol 0,01%). Adicionou-se aos géis um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope, Bio-Rad) para estimar a massa das proteínas extraídas de córtex renal. Para separação das proteínas, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi feita segundo Laemmli (129), onde o gel de corrida era constituído de acrilamida 7,5%; o de empilhamento 3% e a espessura do gel 1,5 mm. As amostras de eletroforese foram aplicadas no gel imerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,4; glicina 192 mM). A corrida foi interrompida de acordo com o tamanho das proteínas de interesse, tomando como base o padrão de massa molecular.

3.8 Immunoblotting

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas isoladas de córtex renal de ratos Wistar contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). A membrana havia sido previamente tratada com metanol 100% por 2 minutos, água MilliQ por 2 minutos e

equilibrada em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por pelo menos 5 minutos. Para a transferência utilizou-se um sistema tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 500 mV por tempo 4 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi corada por 10 minutos com Ponceau (Ponceau S – Sigma - 0,1%; ácido acético 10%) e descorada com água MilliQ, até que as bandas desejadas pudessem ser visualizadas.

Após a transferência, a membrana foi colocada numa solução de bloqueio (NaCl 150mM; fosfato de sódio monobásico 2,8 mM; fosfato de sódio dibásico 7,2 mM; leite em pó desnatado 5%, Tween-20 0,1%) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário (Tabela 1) mantendo-o por 12 horas a 4°C com leve agitação. Foram feitas a seguir cinco lavagens, de 5 minutos cada, com solução bloqueio.

A membrana foi então incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), em solução de bloqueio (Tabela 1). A membrana foi novamente lavada conforme acima descrito. Em seguida, adicionou-se PBS 1% para retirar o excesso de solução bloqueio e incubou-se a membrana durante 1 minuto, sob leve agitação, com ECL (Amersham); reagente para imuno-deteção através de luminescência. Em seguida, a membrana foi colocada em um fotodocumentador (GE Healthcare) para visualização das bandas e captura pelo software ImageQuant LAS 4000 (GEHealthcare) para posteriormente serem analisadas por densitometria por meio do software Image J (Scion).

Tabela 1 – Lista dos anticorpos primários utilizados no experimento de immunoblotting

Anticorpo	Marca	Diluição	Solução Bloqueio	Referência
NHE3 (clone 3H3)	Doação PSA (Yale)	1:500	Leite	(110)
NHE3-PS552 (clone 14D5)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Leite	(110)
Actina	Merck	1:50000	Leite	(130)
p-Ser/Thr PKA	Cell Signaling Technology	1:2000	BSA	(131)
EPAC 1	Cell Signaling Technology	1:2000	Leite	-

3.9 Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados através do teste t de Student para comparações entre dois grupos e One-way ANOVA complementado pelo teste post-hoc de Bonferroni foi utilizado para detectar diferenças entre três grupos ou mais grupos com distribuição normal. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ SE, com n indicando o número de observações.

4. RESULTADOS

4.1 Concentração de AMPc urinário e atividade da PKA

Com a intenção de avaliar se o GLP-1 endógeno regula a função renal de ratos normotensos, infundimos, agudamente, 100 µg/kg exendin-9, antagonista do receptor de GLP-1 (GLP-1R). Ratos que receberam salina foram utilizados como controle. Tendo em vista o fato da concentração de GLP-1 circulante depender diretamente do estado pós-prandial, os ratos dos dois grupos foram mantidos em jejum por 8 horas. A Tabela 2 mostra que as concentrações plasmáticas de glicose, insulina e GLP-1 eram similares entre os ratos tratados com exendin-9 e aqueles tratados com veículo.

Tabela 2. Valores de peso corporal, pressão arterial, níveis glicose, insulina e GLP-1 plasmáticos em jejum.

	CTRL	EXENDIN-9
Peso corporal (g)	254 ± 5 (18)	253 ± 9 (16)
Glicose (mg/dL)	106 ± 8 (14)	113 ± 12 (12)
Insulina (ng/mL)	0,41 ± 0,04 (14)	0,44 ± 0,07 (12)
GLP-1 ativo (pg/mL)	11,5 ± 0,6 (14)	11,3 ± 0,9 (12)
PAM inicial (mm Hg)	112 ± 5 (14)	111 ± 4 (12)
PAM final (mm Hg)	117 ± 9 (14)	122 ± 4 (12)

Número de ratos por grupo está indicado em parênteses.

O GLP-1R é um receptor acoplado à proteína Gs, e, quando ativado por seu ligante, ativa a adenil ciclase, levando a um aumento dos níveis de cAMP intracelular e consequente ativação da atividade da PKA bem como da EPAC. Este último efector, no entanto, parece ser órgão dependente. A Figura 11 mostra que foi possível bloquearmos a sinalização do GLP-1R no rim ao administrarmos exendin-9 por via sistêmica, uma vez que os níveis de cAMP urinário (Figura 11A) bem como a atividade da PKA (Figura 11B-C) foram reduzidos nos ratos que receberam droga comparados aos que receberam veículo. Cabe mencionar que a atividade da PKA foi avaliada por meio de immunoblotting, utilizando um anticorpo que reconhece substratos fosforilados desta cinase. Como pode ser visto na Figura 11C, a percentagem de proteínas fosforiladas por PKA foi significativamente menor nos animais infundidos com EX-9 em comparação com os animais controles.

Figura 11 - A infusão sistêmica do antagonista do GLP-1R bloqueia a sinalização do AMPc / PKA nos rins. A) A concentração de AMPc na urina foi determinada por ensaio imuno enzimático (DetectX AMP cíclico direta Ensaio Arbor, MI) de acordo com instruções do fabricante. A excreção urinária de AMPc foi calculado através da multiplicação do volume de urina obtidas na concentração de AMPc por ELISA. Controle (n = 10) e EX-9 (n = 7). N representa o número de animais por grupo. Os valores são expressos em média $\pm$ SE. * P < 0,05 vs. CTRL. B) Os níveis de fosforilação de substratos de PKA (pSer/Thr) no córtex renal de ratos tratados com exendin-9 (EX-9) ou solução salina (Ctrl). Amostras equivalentes de proteína de membrana (25 μ g) isolada a partir do córtex renal de ratos Wistar foram sujeitos a SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e analisadas por imunoblotting. As membranas foram incubadas com anticorpo que reconhece substratos fosforilados PKA (1: 2000) e, subsequentemente, com um anticorpo contra actina (1: 50000) o qual foi utilizado como um controle interno. N = 6 / grupo. C) Representação gráfica da expressão dos níveis de fosforilação de substratos de PKA no córtex renal de ratos tratados com exendin-9 (EX-9) ou solução salina (Ctrl). Valores expressos em média $\pm$ SE. *** P < 0,0001 vs. CTRL.

4.2 Expressão da EPAC1 em membrana de córtex renal

A cascata de sinalização induzida pela ligação do GLP-1 ao receptor de GLP-1R também pode envolver a ativação da proteína diretamente ligada ao AMPc (EPAC) (132). Além disso, foi demonstrado em cardiomiócitos de ratos expostos ao análogo de GLP-1 (liraglutide) que a ativação do GLP-1R promove a translocação da EPAC do citoplasma para a membrana da célula, subcompartimento celular em que EPAC é ativa (133). Diante do exposto, a expressão da proteína EPAC1 foi avaliada em homogenato de córtex de rim e na fração de membrana de córtex renal para determinar se o antagonismo do GLP-1R por exendin-9 poderia diminuir a expressão da EPAC na membrana do córtex renal de ratos. Como pode ser visto nas Figuras 12A e 12B, não houve alteração na expressão de EPAC1 na superfície celular, sugerindo que a via GLP-1R/AMPc/ EPAC não está envolvida nos efeitos renais do GLP-1 endógeno.

Figura 12 - A infusão sistêmica do antagonista do receptor de GLP-1 exendin-9 não afeta a expressão ou localização da EPAC no córtex renal. A) Amostras equivalentes (75 μ g) proteína isolada de membrana do córtex renal de ratos tratados com exendin-9 (EX-9) ou veículo (CTRL) foram sujeitos a SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e analisadas por "immunoblotting". B) Representação gráfica da expressão da EPAC1 em membrana de córtex renal. C) Amostras equivalentes (150 μ g) de proteína de homogenato de córtex renal de ratos tratados com exendin-9 (EX-9) ou veículo (CTRL) foram submetidas a SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e analisadas por "immunoblotting". D) Representação gráfica da expressão da EPAC1 em homogenato de córtex renal. (n = 4 / grupo).

4.3 Efeitos do bloqueio da via da PKA e da EPAC sobre as ações inibitórias do GLP-1 na atividade do NHE3 em túbulo proximal

Visando confirmar os achados da Figura 12, ou seja, que a EPAC não medeia os efeitos renais do GLP-1, nós procuramos examinar se o efeito inibitório do GLP-1 sobre o NHE3 envolve apenas a ativação da PKA e não da EPAC. Por meio da microperfusão estacionária in vivo, nós fomos capazes de verificar que o inibidor da PKA, H89 (10 μ M), impediu completamente o efeito inibitório do GLP-1 na reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal renal (Figura 13). Quando H89 foi adicionado por si só ao fluido luminal, não foi observado influência na taxa de reabsorção de bicarbonato basal. No entanto, o inibidor da EPAC, ESI (50 μ M), não bloqueou o efeito do GLP-1 sobre o NHE3, e quando o ESI foi adicionado sozinho nenhuma influência foi observada. Os achados das Figuras 12 e 13 indicam que a EPAC não está envolvida nos efeitos renais do GLP-1 endógeno e que esta via também não está envolvida na regulação do NHE3 por GLP-1.

Figura 13 - PKA medeia os efeitos inibidores do GLP-1 sobre a atividade de NHE3 no túbulo proximal. A atividade do NHE3 foi medida in vivo através de microperfusão estacionária. Taxa de bicarbonato ($J_{HCO_3^-}$) nos túbulos proximais perfundidos com solução controle (n = 14), 20 nM GLP-1 (n = 8), 20 nM GLP-1 + 10 μ M de inibidor de PKA H89 (n = 9), ou 10 μ M de H89 (n = 6), 20 nM GLP-1 + ESI (n = 12), 20 nM GLP-1 + 10 μ M de H89 + 50 μ M ESI (n = 9), 50 μ M ESI (n = 11). Os valores são expressos em média $\pm$ SE. *P<0,05 e **P<0,01 vs. CTRL.

4.4 Efeitos do bloqueio do GLP-1R na hemodinâmica renal

Os dados apresentados na Figura 14A, B e C, mostram que o bloqueio do receptor de GLP-1R por exendin-9 reduziu significativamente o fluxo urinário, a carga excretada de sódio e ritmo de filtração glomerular (RFG), estimado pelo clearance da creatinina. O efeito do bloqueio da ação do GLP-1 endógeno pelo exendin-9 também causou diminuição do fluxo plasmático renal (Figura 14D) e da fração de filtração (Figura 14E). Estas alterações hemodinâmicas devem-se, ao menos em parte, ao aumento da resistência do leito vascular renal (RVR) (Figura 14F).

Figura 14 - Efeito do antagonista do GLP-1R na função renal: efeitos hemodinâmicos.

A) O fluxo de urina de ratos infundidos com solução salina e a exendin-9 (Ex-9), foi medida por análise gravimétrica. B) O sódio urinário excretado a partir de ratos com infusão de solução salina (n = 10), exendin-9 (n = 6), foi calculado como $U_{Na} \times V$, em que V é o fluxo de urina e U_{Na} é a concentração de sódio na urina. C) A taxa de filtração glomerular (TFG) em ratos infundidos com solução salina (n = 10), exendin-9 (n = 6), foi estimado pela depuração da creatinina calculada pela fórmula ($U_{Cr} \times V / P_{Cr}$) e correspondendo a U_{Cr} concentração de creatinina urinária, V do fluxo de urina e P_{Cr} concentração de creatinina plasmática. D) MAP foi monitorada continuamente com uma sonda invasiva (MP100, Biopac Systems, Inc Santa Barbara, CA) inserida na artéria carótida durante a infusão. Para a infusão de solução salina (n = 8) e Ex-9 (n = 7), outro cateter PE-60 foi inserida na veia jugular esquerda. E) A fração de filtração foi medida através da razão do RFG com o FPR. Ctrl (n=8), ex-9 (n=6). F) A resistência vascular renal foi medida dividindo a pressão arterial média com o fluxo plasmático renal. Ctrl (n = 7), ex-9 (n = 7). Os valores são expressos em média $\pm$ SE. ** P <0,05 vs. CTRL.

4.5 Efeitos tubulares do bloqueio do GLP-1R

Os efeitos tubulares da infusão sistêmica do antagonista GLP-1R, exendin-9, também foram avaliados. Observa-se na Figura 15A, que a infusão de exendin-9 reduziu a fração de excreção de sódio $FENa^{+}(\%)$ em comparação aos ratos que receberam infusão salina (controle, CTRL). Além disso, o grupo de animais infundidos com Ex-9 apresentaram pH urinário, clearance de lítio e fração de excreção de lítio $FELi(\%)$ significativamente menor do que os ratos tratados com salina (Figura 15B-D). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a infusão sistêmica de exendin-9 aumenta a reabsorção de sódio e a secreção de hidrogênio em túbulo proximal, sugerindo que o bloqueio do GLP-1 endógeno aumenta a atividade de transporte do NHE3 em túbulo proximal renal.

Figura 15 - Efeito da infusão do antagonista do GLP-1R na função renal: efeitos tubulares.

A) A excreção fracionada de sódio em ratos infundidos com solução salina (n=12) ou exendin-9 (n=12) foi calculada como $[(U_{Na} \times P_{Cr}) / (P_{Na} \times U_{Cr})] \times 100(\%)$ sendo U_{Na} é a concentração de sódio na urina, P_{Cr} as concentrações plasmáticas de creatinina, P_{Na} concentração plasmática de sódio e concentração urinária de creatinina U_{Cr} . B) Excreção fracionada de lítio em ratos infundidos com solução salina (n=10) ou exendin-9 (n=11) foi calculada como $ULi \times V / PLi \times CLi$ onde V é o fluxo urinário, ULi é a concentração de lítio urinária, PLi é a concentração de lítio plasmática e CLi é o clearance de lítio. Os valores são expressos em média $\pm$ SE. *** $P < 0,05$ vs. CTRL. C) A depuração plasmática de lítio por minuto em ratos infundidos com solução salina (n=10) ou exendin-9 (n=15), calculada pela fórmula $ULi \times V / PLi$ onde V é o fluxo urinário, ULi é a concentração de lítio urinária e PLi é a concentração de lítio plasmática. Os valores são expressos em média $\pm$ SE. ** $P < 0,05$ vs. CTRL. D) o pH da urina de ratos Wistar tratados com solução salina (n=17) ou exendin-9 (n=17). Os valores são expressos em média $\pm$ SE. * $P < 0,05$ vs. CTRL.

4.6 Reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 em túbulo proximal

NHE3 é a isoforma apical predominante do trocador de Na^+/H^+ nos rins e nós demonstramos previamente que o GLP-1 inibe de forma aguda a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal (97). Com base em nossos resultados atuais e anteriores, realizamos experimentos de microperfusão estacionária in vivo para avaliar se o antagonista do GLP-1R exendin-9, adicionado ao fluido tubular, aumentaria a atividade do NHE3 no túbulo proximal.

Como mostrado na Figura 16, a reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 nos túbulos proximais em ratos perfundidos com exendin-9 foi muito semelhante ao daqueles perfundidos com a solução controle. Esse resultado, no entanto, não refuta a nossa hipótese, que o GLP-1 pode exercer inibição tônica do NHE3. Cabe ressaltar que o efeito do bloqueio do GLP-1R sobre o NHE3 foi avaliado em condições nas quais há um bloqueio do fluxo tubular e o túbulo proximal esta apenas exposto à solução de perfusão. Dado que o túbulo proximal não sintetiza ou secreta GLP-1, o bloqueio de GLP-1R na ausência do seu ligante, não afeta a função tubular proximal. Com efeito, a perfusão tubular proximal com exendin-9 (100:1) bloqueou completamente o efeito inibidor de GLP-1 na atividade do NHE3.

Figura 16 - Efeito do antagonista do GLP-1-R na atividade do NHE3 no túbulo proximal renal. A reabsorção de bicarbonato ($J_{HCO_3^-}$) foi avaliada por microperfusão estacionária e medida contínua de pH luminal em ratos perfundidos com solução controle (n = 14), GLP-1 (n = 11), exendin-9 (n = 18), e GLP-1 + EX-9 (n = 8). Os valores são expressos em média $\pm$ SE. *** P <0,001 vs CTRL.

4.7 Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal

Como descrito por Crajoinas e colaboradores (97), quando o GLP-1 ou exendin-4 são infundidos sistemicamente, filtrados pelo glomérulo e ligam-se ao receptor de GLP-1R em túbulo proximal renal, há um aumento nos níveis de AMPc renal, o que por sua vez aumenta a atividade da PKA, aumentando também a fosforilação do NHE3 nos sítios consenso para esta cinase, ou seja, as serina 552 e 605, que por conseguinte, levam a uma diminuição da troca de Na^+/H^+ mediada pelo NHE3 no túbulo proximal renal.

Postulamos, portanto que, o bloqueio do GLP-1R em túbulo proximal poderia diminuir os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552. Os níveis de fosforilação da serina 605 não foram avaliados, uma vez que este resíduo não é fosforilado em condições basais.

Consistente com os resultados publicados anteriormente (97), a Figura 17 mostra que a infusão de GLP-1 causou aumento significativo da fosforilação do resíduo 552 da cauda C-terminal do NHE3, já o exendin-9 reduziu os níveis de fosforilação do NHE3 em comparação aos níveis observados em proteínas de membrana de córtex renal isoladas de ratos controle. Semelhante aos resultados de microperfusão estacionária in vivo, o exendin-9 foi capaz de prevenir os efeitos do GLP-1 no NHE3. Coletivamente, estes resultados sugerem que a administração sistêmica aguda do exendin-9 em ratos Wistar pode aumentar a atividade do NHE3 no túbulo proximal, diminuindo a ativação da PKA e, portanto, diminuindo a inibição do NHE3 mediada por PKA.

Figura 17 - Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal de ratos Wistar tratados com GLP-1 ou antagonista do GLP-1R. Amostras equivalentes (15 μ g de proteína para o NHE3, 5 μ g para o NHE3 e PS552-actina) proteína isolada de membrana do córtex renal de ratos Wistar tratados com solução salina (n = 6), GLP-1 (n = 6), ex-9 (n = 6) foram sujeitos a SDS-PAGE, transferidos para membrana de PVDF e analisadas por "immunoblotting". A) As membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal contra o NHE3 total (1:1000), contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (1:1000) e contra a actina (1:50.000). Representação gráfica do nível de expressão do (B) NHE3 fosforilado na serina 552 e do (C) NHE3 total. Os valores são médias $\pm$ SE: ** P <0,05 e *** P <0,05 vs. CTRL.

5. DISCUSSÃO

As propriedades diuréticas e natriuréticas resultantes da infusão sistêmica de doses farmacológicas do GLP-1 e de seus análogos foram demonstradas em vários estudos clínicos e experimentais (95-101). No presente estudo, foi testada a hipótese que o GLP-1 exerce efeitos endógenos sobre a função renal e os mecanismos moleculares pelos quais o bloqueio do receptor de GLP-1R diminui os efeitos diuréticos e natriuréticos foram explorados e elucidados. Nossos achados indicam que o bloqueio das ações endógenas do GLP-1, avaliados por meio da infusão sistêmica de exendin-9, diminui o fluxo urinário e a excreção urinária de sódio. Estes efeitos anti-diuréticos e anti-natriuréticos são acompanhados por um aumento da resistência vascular renal (RVR) e consequente redução do fluxo plasmático renal e do ritmo de filtração glomerular. Além disso, a fração de excreção de sódio, o pH urinário e o clearance do lítio (marcador de função tubular proximal) são inferiores no grupo de ratos que receberam exendin-9 do que em ratos nos quais administrou-se salina. Estes resultados sugerem que o bloqueio do GLP-1R exerce efeitos anti-diuréticos e anti-natriuréticos por reduzirem o RFG e inibirem a reabsorção de sódio dependente do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal.

Publicações anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que ratos que tiveram o fluido tubular proximal interrompido e perfundido com exendin-4 ou GLP-1 (97) apresentaram uma diminuição significativa na atividade NHE3 comparado aos túbulos perfundidos com solução controle. Estes efeitos do GLP-1 sobre a atividade do NHE3 foram demonstrados *in vitro* e *in vivo* (97, 134) e foram mensurados na presença

do inibidor específico do NHE3, S3226, permitindo-nos concluir que o GLP-1 diminuiu de forma significativa a reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 e que o efeito do GLP-1 não está associado com outros mecanismos envolvidos na secreção de H^+ em túbulo proximal renal. De modo contrário, o antagonista de GLP-1R não estimulou a atividade do NHE3 *in situ*, mas consistente com o aumento da atividade de transporte deste trocador, diminuiu a fração de excreção de sódio, lítio e o pH urinário. Adicionalmente, dado que o túbulo proximal não sintetiza ou secreta GLP-1, este resultado é condizente com o fato que o bloqueio de GLP-1R na ausência do seu ligante, não é capaz de ativar/desativar vias de sinalização. Estes dados também permitem inferir que é o GLP-1 filtrado que se liga ao seu receptor em túbulo proximal renal, levando à inibição tônica da atividade do NHE3. Por fim, mostramos que há uma queda significativa nos níveis de fosforilação da serina 552 do NHE3 em ratos tratados com exendin-9, resíduo que inibe a atividade de transporte do NHE3, consistente com os achados que a infusão sistêmica de exendin-9 diminui os níveis de AMPc e a atividade da PKA em córtex renal (Figura 18).

Os efeitos diuréticos e natriuréticos do GLP-1 podem também ser mediados por mudanças na hemodinâmica renal (97, 98, 101). Nossos dados mostram que ratos infundidos com exendin-9 exibem diminuição do fluxo plasmático renal e do ritmo de filtração glomerular em comparação ao grupo infundido com salina, ao menos em parte devido ao aumento da resistência vascular renal. Presumivelmente, este aumento da RVR ocorre preferencialmente nos vasos pré-glomerulares, ou seja, na arteríola aferente, levando a uma diminuição no fluxo sanguíneo renal. De fato, estudos de micropunção

realizados em ratos Wistar indicou que o exenatide, versão sintética de exendin-4, diminui a resistência preglomerular (135), indicando que este peptídeo exerce um efeito direto sobre a vasculatura renal.

Estudos recentes demonstram que o receptor de GLP-1 é expresso na vasculatura renal, incluindo a arteríola aferente (136). A ativação aguda destes receptores reduz significativamente a resposta autoreguladora aferente aos aumentos agudos de pressão. Além disso, o GLP-1 aumentou o fluxo plasmático renal e a pressão arterial independentemente da via de administração (sistêmica ou intrarrenal). O antagonista do receptor GLP-1, exendin-9, reduziu significativamente o aumento o fluxo plasmático renal mediado pelo GLP-1. Os resultados deste trabalho sugerem que a ativação aguda do receptor de GLP-1 diminui a eficiência de auto regulação renal e, assim, diminui a capacidade da arteríola aferente para controle do ritmo de filtração glomerular e fluxo plasmático renal. Por conseguinte, a manutenção da homeostase de Na^+ e a proteção dos capilares glomerulares poderia ser reduzida (136).

Figura 18 – Modelo esquemático da via de sinalização envolvida na regulação do NHE3. Quando o GLP-1 liga-se ao receptor, ativa a via de transdução de sinal da adenil ciclase, gerando um aumento dos níveis de AMPc intracelular, o que aumenta a atividade da PKA, levando à fosforilação do NHE3 e portanto à diminuição na troca de Na^+/H^+ mediada pelo NHE3 no túbulo proximal renal. Quando o exendin-9 se liga ao receptor de GLP-1 no túbulo proximal renal, impede que o GLP-1 filtrado ligue-se ao GLP-1R em túbulo proximal, diminuindo a geração de AMPc, ativação de PKA, diminuindo os níveis de fosforilação do NHE3, podendo então estimular a reabsorção de Na^+ , HCO_3^- e água mediadas por este transportador em túbulo proximal renal.

As ações vasoativas do GLP-1 foram demonstradas numa variedade de leitos vasculares incluindo vasos de condutância e resistência os efeitos vasorelaxantes induzidos por este peptídeo parecem ocorrer tanto por mecanismos que dependem (137, 138) como que independem do endotélio (139, 140). O efeito vasodilatador do GLP-1 e do exendin-4 sobre a arteríola aferente renal perdurou após a inibição da síntese de óxido nítrico e prostanóides, mostrando que este efeito é independente de vasodilatadores endoteliais (141). O relaxamento vascular induzido por GLP-1 tem sido sugerido ser mediado por canais de K^+ sensíveis a ATP (KATP) (140) ativados por

PKA. Os canais de KATP foram encontrados em arteríolas aferentes de ratos (142, 143), podendo desta forma mediar a vasodilatação renal induzida por GLP-1 (144). No entanto, Ban e colaboradores (137) mostraram que a inibição da produção de óxido nítrico aboliu o efeito vasodilatador do GLP-1 em artérias mesentéricas de ratos.

Os achados ainda não publicados pelo nosso grupo de pesquisa nos quais investigamos o efeito do GLP-1 sobre a reatividade da artéria renal (Figura 8) estão em consonância com o estudo recém publicado por Jensen e colaboradores (136). Nós observamos que o GLP-1 induz um efeito de relaxamento na artéria renal de ratos normotensos por um mecanismo que envolve as células musculares lisas e a via de sinalização de GLP-1R/AMPC. Além disso, verificamos que a vasculatura renal de ratos hipertensos é refratária aos efeitos relaxantes do GLP-1. Os efeitos do GLP-1 na produção de AMPC e relaxamento das artérias renais isoladas foram completamente bloqueadas pelo antagonista de GLP-1R, exendin-9. Esta ação vasodilatadora do GLP-1 também é consistente com estudos anteriores em aorta de rato isolada em que a ativação do receptor GLP-1 aumentou a formação de AMPC e induziu relaxamento independente do endotélio (140).

O efeito da administração crônica do GLP-1 foi explorado em um modelo genético de hipertensão experimental, ratos Dahl sensíveis a sal (Dahl S), alimentados com dieta rica em cloreto de sódio por duas semanas (145). Nesta cepa, a administração crônica de GLP-1 atenuou de modo significativo o desenvolvimento de hipertensão, reduziu a injúria cardíaca e renal e melhorou a função vascular. Estes ratos apresentaram aumento do fluxo urinário e da fração de excreção de sódio, indicando que o GLP-1

possui propriedades diuréticas e natriuréticas que contribuem para o seu efeito anti-hipertensivo (145).

Estudos prévios desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração do inibidor da DPPIV fosfato de sitagliptina reduz significativamente os níveis pressóricos em SHR jovens pré-hipertensos (146). Verificou-se também que as variações na pressão arterial induzidas pelo inibidor da DPPIV nestes ratos são acompanhadas por aumento da diurese e da natriurese. Mais precisamente, este aumento do fluxo urinário e da excreção de sódio foi decorrente da diminuição da atividade do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal renal e do aumento do ritmo de filtração glomerular. O aumento do ritmo de filtração glomerular dos animais tratados com o inibidor da DPPIV pode ter ocorrido em consequência do aumento da meia-vida de peptídeos circulantes vasodilatadores que são substratos da DPPIV, dentre os quais o próprio GLP-1. Por sua vez, nos animais SHR adultos (13-14 semanas de idade) não foram observadas quedas significativas nos níveis de pressão arterial nem alterações da função renal em resposta ao tratamento com o inibidor da DPPIV (146). Esta observação pode ser em parte explicada pelo fato do NHE3 encontrar-se bastante inibido (~70%) em SHR adultos comparados a animais normotensos (124). Uma possível explicação para a ausência de alterações no ritmo de filtração glomerular pode ser decorrente da diminuição do efeito de substâncias vasodilatadoras ao longo dos vasos pré-glomerulares de ratos espontaneamente hipertensos, em consonância com nossos achados que artérias renais de SHR são refratárias às ações do GLP-1.

Notadamente, ensaios clínicos recentes também evidenciaram que a administração de agentes incretinomiméticos é capaz de causar reduções significativas nos níveis de pressão arterial em pacientes obesos, com DM2 e portadores de síndrome metabólica (64, 65, 147-149). Os inibidores da DPPIV também parecem promissores no manejo da hipertensão. Um efeito moderado na redução da pressão arterial foi observado com o uso de sitagliptina em pacientes diabéticos (150) e não diabéticos (151). Em outro estudo randomizado, a saxagliptina reduziu tanto a pressão arterial sistólica como a pressão arterial diastólica em pacientes com DM2 (152). Os ensaios clínicos empregando agentes incretinomiméticos e inibidores da DPPIV foram e são geralmente realizados em pacientes com DM2, muitos dos quais são também obesos e apresentam síndrome metabólica associada com a reabsorção de sódio elevada, edema e hipertensão sensível ao sal. Dado que os efeitos anti-hipertensivos dos análogos de GLP-1, agonistas de GLP-1R e dos inibidores da DPPIV parecem ser maiores sobre pacientes com sobrepeso e/ou hipertensos, presume-se que as ações destes fármacos são mediadas, ao menos em parte, por meio de efeitos renoprotetores, como exemplo, indução de diurese e natriurese.

Recentemente, Kim e colaboradores demonstraram que o peptídeo natriurético atrial, ANP, é um mediador essencial à jusante das ações anti-hipertensivas do GLP-1. Além disso, eles identificaram um papel essencial da EPAC2 como para a sinalização deflagrada pelo agonismo do GLP-1R em cardiomiócitos. Entretanto, estudos em humanos (153, 154) demonstraram que os efeitos natriuréticos e diuréticos do GLP-1 são mediados exclusivamente pelo seu receptor e que o ANP não está envolvido nos efeitos renais e pressóricos deste peptídeo (153).

O papel da EPAC na regulação da atividade do NHE3 foi demonstrado por Honegger e colaboradores (12). No entanto, o mecanismo pelo qual a ativação da EPAC leva a inibição do NHE3 ainda é indescritível. Descobertas anteriores do nosso grupo (1) e confirmadas neste estudo, através de microperfusão estacionária *in vivo*, mostrou que o inibidor da PKA preveniu totalmente o efeito inibitório do GLP-1 na reabsorção de bicarbonato no túbulo proximal renal. No entanto, o inibidor da EPAC não preveniu/bloqueou o efeito do GLP-1. Além disso, não houve translocação da EPAC1 da membrana para o citossol em ratos tratados com exendin-9, sugerindo que a EPAC não está envolvida nos efeitos renais do GLP-1 endógeno e que esta via também não está envolvida na regulação do NHE3 por GLP-1.

Há hoje várias evidências na literatura sobre a inter-relação entre a homeostase da glicose e a regulação da atividade do NHE3, seja através da modulação direta deste transportador ou por condições patológicas que indiretamente levam à alteração da sua atividade. O diabetes é uma das doenças capazes de modular a atividade do NHE3 (155). Esta doença pode modulá-lo diretamente ou indiretamente, uma vez que pode ocasionar acidose e hipertensão, e estas também podem atuar sobre o NHE3 (124, 156). Além disso, hormônios e compostos associados à regulação do metabolismo da glicose incluindo a insulina (157) e o ATP (158), bem como a própria glicose (159-162) regulam a atividade do NHE3 tanto nos rins como no intestino, estabelecendo uma relação entre a homeostase glicêmica e volêmica. Durante os últimos 15 anos, os trabalhos realizados pelo grupo da Dra. Adriana Girardi vem reforçando esta relação, demonstrando que a enzima DPPIV responsável por clivar o GLP-1 encontra-se associada fisicamente com o NHE3 em túbulos proximais (118) e que a inibição da

DPPIV (146, 163-165) assim como infusão sistêmica/local de GLP-1 (97, 134) inibem a atividade deste transportador em túbulo proximal renal. Os resultados do presente estudo mostram, pela primeira vez, que o GLP-1 endógeno exerce efeito tônico sobre o manuseio renal de sódio e água, ao menos em parte via inibição do NHE3.

Sabe-se que tanto a obesidade como o DM2 levam a expansão de volume causada pelo aumento da reabsorção de sódio em túbulo renal (166). É plausível que a diminuição da liberação do GLP-1 em indivíduos obesos (23) e diabéticos tipo II (24) possa, em parte, ser responsável pelo aumento da reabsorção de sódio, resultando em expansão de volume e potencial risco do desenvolvimento de hipertensão. O GLP-1, pode ser, portanto, um peptídeo que protege o organismo do excesso de sódio ingerido durante as refeições por propiciar o aumento da excreção urinária deste íon. Estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa almejam validar esta hipótese.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que o GLP-1 endógeno exerce ação tônica sobre a função renal, aumentando o ritmo de filtração glomerular e o fluxo plasmático renal de roedores. Após filtrado, o GLP-1 liga-se ao seu receptor GLP-1R e inibe a secreção de H^+ dependente de sódio mediada pelo NHE3 em túbulo proximal renal. Por fim, conclui-se que o peptídeo GLP-1, primariamente envolvido na homeostase da glicose, modula também, tonicamente, o manuseio renal de sal e água.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moore B. On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J.* 1906;1(1):28-38.
2. Bayliss WM, Starling EH. The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol.* 1902;28(5):325-53.
3. Creutzfeldt W. The [pre-] history of the incretin concept. *Regul Pept.* 2005;128(2):87-91.
4. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. New Interpretation of Oral Glucose Tolerance. *Lancet.* 1964;2(7349):20-1.
5. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964;24:1076-82.
6. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest.* 1967;46(12):1954-62.
7. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986;29(1):46-52.
8. Lund PK. The discovery of glucagon-like peptide 1. *Regul Pept.* 2005;128(2):93-6.
9. Brown JC, Dryburgh JR. A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Can J Biochem.* 1971;49(8):867-72.
10. Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;37(5):826-8.
11. Hansotia T, Drucker DJ. GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. *Regul Pept.* 2005;128(2):125-34.
12. Ranganath LR. Incretins: pathophysiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *J Clin Pathol.* 2008;61(4):401-9.
13. Schmidt WE, Siegel EG, Creutzfeldt W. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 1985;28(9):704-7.
14. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet.* 1987;2(8571):1300-4.
15. Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature.* 1983;302(5910):716-8.

16. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1409-39.
17. Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS, Kirkegaard P. Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia.* 1987;30(11):874-81.
18. Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology.* 1986;119(4):1467-75.
19. Dhanvantari S, Izzo A, Jansen E, Brubaker PL. Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology.* 2001;142(1):37-42.
20. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem.* 1986;261(25):11880-9.
21. Drucker DJ, Sherman SI, Gorelick FS, Bergenstal RM, Sherwin RS, Buse JB. Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits. *Diabetes Care.* 2010;33(2):428-33.
22. Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes.* 1994;43(4):535-9.
23. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, Wright JW, Howland R, Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut.* 1996;38(6):916-9.
24. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2001;50(3):609-13.
25. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noshmehr H, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology.* 2003;144(12):5149-58.
26. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology.* 2002;143(11):4397-408.
27. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes.* 1999;48(12):2270-6.
28. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 1995;136(8):3585-96.

29. Montrose-Rafizadeh C, Yang H, Rodgers BD, Beday A, Pritchette LA, Eng J. High potency antagonists of the pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(34):21201-6.
30. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology.* 1999;140(11):5356-63.
31. Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology.* 1996;137(7):2968-78.
32. Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng XH, Chen C, Boyd AE. Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology.* 1993;133(1):57-62.
33. Leech CA, Holz GG, Chepurny O, Habener JF. Expression of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278(1):44-7.
34. Hansson V, Skålhegg BS, Taskén K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;73(1-2):81-92.
35. Skålhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2000;5:D678-93.
36. Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, Anand G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1697(1-2):259-69.
37. Wang X, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinology.* 2001;142(5):1820-7.
38. Eliasson L, Ma X, Renström E, Barg S, Berggren PO, Galvanovskis J, et al. SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol.* 2003;121(3):181-97.
39. Pidoux G, Taskén K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol.* 2010;44(5):271-84.
40. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 1998;396(6710):474-7.
41. Yaekura K, Julyan R, Wicksteed BL, Hays LB, Alarcon C, Sommers S, et al. Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9715-21.

42. Rehmann H, Schwede F, Døskeland SO, Wittinghofer A, Bos JL. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38548-56.
43. Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, et al. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(11):805-11.
44. Knox AL, Brown NH. Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion. *Science.* 2002;295(5558):1285-8.
45. Baillie GS. Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J.* 2009;276(7):1790-9.
46. Barg S, Lindqvist A, Obermüller S. Granule docking and cargo release in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 3):294-9.
47. Kang G, Chepurny OG, Holz GG. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol.* 2001;536(Pt 2):375-85.
48. Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, et al. Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46046-53.
49. Shibasaki T, Takahashi H, Miki T, Sunaga Y, Matsumura K, Yamanaka M, et al. Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19333-8.
50. Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, et al. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8279-85.
51. Tsuboi T, da Silva Xavier G, Holz GG, Jouaville LS, Thomas AP, Rutter GA. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca^{2+} and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem J.* 2003;369(Pt 2):287-99.
52. Ponsioen B, Gloerich M, Ritsma L, Rehmann H, Bos JL, Jalink K. Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol Cell Biol.* 2009;29(10):2521-31.
53. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science.* 1998;282(5397):2275-9.
54. Li Y, Konings IB, Zhao J, Price LS, de Heer E, Deen PM. Renal expression of exchange protein directly activated by cAMP (Epac) 1 and 2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(2):F525-33.
55. Laroche-Joubert N, Marsy S, Michelet S, Imbert-Teboul M, Doucet A. Protein kinase A-independent activation of ERK and H,K-ATPase by cAMP in native kidney cells: role of Epac I. *J Biol Chem.* 2002;277(21):18598-604.

56. Honegger KJ, Capuano P, Winter C, Basic D, Stange G, Wagner CA, et al. Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(3):803-8.
57. Murtazina R, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Li X, Chen Y, Hubbard A, et al. Tissue-specific regulation of sodium/proton exchanger isoform 3 activity in Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) null mice. cAMP inhibition is differentially dependent on NHERF1 and exchange protein directly activated by cAMP in ileum versus proximal tubule. *J Biol Chem*. 2007;282(34):25141-51.
58. Broere N, Chen M, Cinar A, Singh AK, Hillesheim J, Riederer B, et al. Defective jejunal and colonic salt absorption and altered Na(+)/H(+) exchanger 3 (NHE3) activity in NHE regulatory factor 1 (NHERF1) adaptor protein-deficient mice. *Pflugers Arch*. 2009;457(5):1079-91.
59. Holst JJ, Deacon CF. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1998;47(11):1663-70.
60. Gupta V, Kalra S. Choosing a gliptin. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011;15(4):298-308.
61. Drucker DJ. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2005;1(1):22-31.
62. Christel CM, Denardo DF. Release of exendin-4 is controlled by mechanical action in Gila monsters, *Heloderma suspectum*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006;143(1):85-8.
63. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-705.
64. Malone J, Trautmann M, Wilhelm K, Taylor K, Kendall DM. Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(3):359-67.
65. Nielsen LL, Okerson T, Holcombe J, Hoogwerf B. Effects of exenatide on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors, and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(2):255-60.
66. Goke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19650-5.
67. Ussher JR, Drucker DJ. Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev*. 2012;33(2):187-215.
68. Conarello SL, Li Z, Ronan J, Roy RS, Zhu L, Jiang G, et al. Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(11):6825-30.

69. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol*. 1997;273(5 Pt 1):E981-8.
70. Woerle HJ, Albrecht M, Linke R, Zschau S, Neumann C, Nicolaus M, et al. Importance of changes in gastric emptying for postprandial plasma glucose fluxes in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(1):E103-9.
71. Wishart JM, Horowitz M, Morris HA, Jones KL, Nauck MA. Relation between gastric emptying of glucose and plasma concentrations of glucagon-like peptide-1. *Peptides*. 1998;19(6):1049-53.
72. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1239-46.
73. Lui EY, Asa SL, Drucker DJ, Lee YC, Brubaker PL. Glucagon and related peptides in fetal rat hypothalamus in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 1990;126(1):110-7.
74. Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP. Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci*. 1995;7(11):2294-300.
75. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, et al. Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 2):R848-56.
76. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996;379(6560):69-72.
77. van Dijk G, Thiele TE. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide: a central regulator of satiety and interoceptive stress. *Neuropeptides*. 1999;33(5):406-14.
78. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest*. 1998;101(3):515-20.
79. Gutzwiller JP, Goke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, et al. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut*. 1999;44(1):81-6.
80. Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol*. 2002;440(2-3):269-79.
81. Näslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, Blundell JE, Holst JJ, et al. Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23(3):304-11.

82. Ravassa S, Zudaire A, Carr RD, Diez J. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(4):H1361-72.
83. Picatoste B, Ramirez E, Caro-Vadillo A, Iborra C, Ares-Carrasco S, Egido J, et al. Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential roles of GLP-1 isoforms. *PLoS One*. 2013;8(10):e78330.
84. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes*. 2005;54(1):146-51.
85. Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes*. 2009;58(4):975-83.
86. Lonborg J, Vejstrup N, Kelbaek H, Nepper-Christensen L, Jorgensen E, Helqvist S, et al. Impact of acute hyperglycemia on myocardial infarct size, area at risk, and salvage in patients with STEMI and the association with exenatide treatment: results from a randomized study. *Diabetes*. 2014;63(7):2474-85.
87. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*. 2004;109(8):962-5.
88. Márquez L, Trapote MA, Luque MA, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue. *Cell Biochem Funct*. 1998;16(1):51-6.
89. Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, Han J, et al. Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes*. 2007;56(6):1671-9.
90. Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM. Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol*. 1997;19(3):241-8.
91. Sancho V, Nuche B, Arnés L, Cancelas J, González N, Díaz-Miguel M, et al. The action of GLP-1 and exendins upon glucose transport in normal human adipocytes, and on kinase activity as compared to morbidly obese patients. *Int J Mol Med*. 2007;19(6):961-6.
92. Sancho V, Trigo MV, González N, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol*. 2005;35(1):27-38.
93. Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, Zheng S, Sabo M, et al. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G943-9.

94. Redondo A, Trigo MV, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;204(1-2):43-50.
95. Gutzwiller JP, Hruz P, Huber AR, Hamel C, Zehnder C, Drewe J, et al. Glucagon-like peptide-1 is involved in sodium and water homeostasis in humans. *Digestion*. 2006;73(2-3):142-50.
96. Gutzwiller JP, Tschopp S, Bock A, Zehnder CE, Huber AR, Kreyenbuehl M, et al. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):3055-61.
97. 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;301(2):F355-63.
98. Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002;434(3):163-7.
99. Rieg T, Gerasimova M, Murray F, Masuda T, Tang T, Rose M, et al. Natriuretic effect by exendin-4, but not the DPP-4 inhibitor alogliptin, is mediated via the GLP-1 receptor and preserved in obese type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(7):F963-71.
100. Skov J, Dejgaard A, Frokiaer J, Holst JJ, Jonassen T, Rittig S, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): effect on kidney hemodynamics and renin-angiotensin-aldosterone system in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):E664-71.
101. Thomson SC, Kashkouli A, Singh P. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases GFR and suppresses proximal reabsorption in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;304(2):F137-44.
102. Cano A. Characterization of the rat NHE3 promoter. *The American journal of physiology*. 1996;271(3 Pt 2):F629-36.
103. He P, Yun CC. Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:238080.
104. Aggen JB, Nairn AC, Chamberlin R. Regulation of protein phosphatase-1. *Chemistry & biology*. 2000;7(1):R13-23.
105. 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. *The American journal of physiology*. 1993;265(5 Pt 2):F736-42.
106. Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, Aronson PS. Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *The American journal of physiology*. 1997;273(2 Pt 2):F289-99.

107. Lorenz JN, Schultheis PJ, Traynor T, Shull GE, Schnermann J. Micropuncture analysis of single-nephron function in NHE3-deficient mice. *The American journal of physiology*. 1999;277(3 Pt 2):F447-53.
108. 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. *Nature genetics*. 1998;19(3):282-5.
109. Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M. Role of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *American journal of physiology Renal physiology*. 2000;278(3):F375-9.
110. Kocinsky HS, Girardi AC, Biemesderfer D, Nguyen T, Mentone S, Orlowski J, et al. Use of phospho-specific antibodies to determine the phosphorylation of endogenous Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 at PKA consensus sites. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;289(2):F249-58.
111. Kurashima K, Yu FH, Cabado AG, Szabo EZ, Grinstein S, Orlowski J. Identification of sites required for down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase. phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 1997;272(45):28672-9.
112. Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev*. 2007;87(3):825-72.
113. Biemesderfer D, DeGray B, Aronson PS. Active (9.6 s) and inactive (21 s) oligomers of NHE3 in microdomains of the renal brush border. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10161-7.
114. McDonough AA, Biemesderfer D. Does membrane trafficking play a role in regulating the sodium/hydrogen exchanger isoform 3 in the proximal tubule? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(5):533-41.
115. McDonough AA. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(4):R851-61.
116. Pontes RB, Crajoinas RO, Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Girardi AC, Campos RR, et al. Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;ajprenal 00515 2014.
117. Biemesderfer D, Nagy T, DeGray B, Aronson PS. Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17518-24.
118. 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;276(49):46671-7.

119. Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, et al. cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3010-5.
120. Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S. Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2143-9.
121. Kocinsky HS, Dynia DW, Wang T, Aronson PS. NHE3 phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(1):F212-8.
122. Alexander RT, Grinstein S. Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. *J Exp Biol*. 2009;212(Pt 11):1630-7.
123. Brasen JC, Burford JL, McDonough AA, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J. Local pH domains regulate NHE3-mediated Na⁺ reabsorption in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(11):F1249-62.
124. 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;299(4):F872-81.
125. Serre V, Dolci W, Schaerer E, Scrocchi L, Drucker D, Efrat S, et al. Exendin-(9-39) is an inverse agonist of the murine glucagon-like peptide-1 receptor: implications for basal intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and beta-cell glucose competence. *Endocrinology*. 1998;139(11):4448-54.
126. Lessa LM, Amorim JB, Fonteles MC, Malnic G. Effect of renoguanlylin on hydrogen/bicarbonate ion transport in rat renal tubules. *Regulatory peptides*. 2009;157(1-3):37-43.
127. Fernandez R, Lopes MJ, de Lira RF, Dantas WF, Cragoe Junior EJ, Malnic G. Mechanism of acidification along cortical distal tubule of the rat. *The American journal of physiology*. 1994;266(2 Pt 2):F218-26.
128. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
129. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
130. Lin JJ. Monoclonal antibodies against myofibrillar components of rat skeletal muscle decorate the intermediate filaments of cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(4):2335-9.
131. Gronborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, et al. A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a

novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002;1(7):517-27.

132. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther*. 2007;113(3):546-93.

133. Amieux PS, McKnight GS. The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;968:75-95.

134. 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;297(6):F1647-55.

135. Thomson SC, Kashkouli A, Singh P. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases GFR and suppresses proximal reabsorption in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;304(2):F137-44.

136. Jensen EP, Poulsen SS, Kissow H, Holstein-Rathlou NH, Deacon CF, Jensen BL, et al. Activation of GLP-1 receptors on vascular smooth muscle cells reduces the autoregulatory response in afferent arterioles and increases renal blood flow. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;ajprenal 00527 2014.

137. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*. 2008;117(18):2340-50.

138. Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Ahren B, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(6):E1209-15.

139. Nystrom T, Gonon AT, Sjöholm A, Pernow J. Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regul Pept*. 2005;125(1-3):173-7.

140. Green BD, Hand KV, Dougan JE, McDonnell BM, Cassidy RS, Grieve DJ. GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch Biochem Biophys*. 2008;478(2):136-42.

141. Sorensen C, Jensen E, Poulsen S, Holst J, Holstein-Rathlou N-H. Direct effect of glucagon-like peptide-1 on the autoregulatory response of the afferent arteriole (692.2). *The FASEB Journal*. 2014;28(1 Supplement).

142. Metzger F, Quast U. Binding of [3H]-P1075, an opener of ATP-sensitive K⁺ channels, to rat glomerular preparations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996;354(4):452-9.

143. Sorensen CM, Giese I, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Closure of multiple types of K⁺ channels is necessary to induce changes in renal vascular resistance in vivo in rats. *Pflugers Arch*. 2011;462(5):655-67.

144. Jensen BL, Gambaryan S, Scholz H, Kurtz A. KATP channels are not essential for pressure-dependent control of renin secretion. *Pflugers Arch*. 1998;435(5):670-7.
145. Yu M, Moreno C, Hoagland KM, Dahly A, Ditter K, Mistry M, et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*. 2003;21(6):1125-35.
146. 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;29(3):520-8.
147. Apovian CM, Bergenstal RM, Cuddihy RM, Qu Y, Lenox S, Lewis MS, et al. Effects of exenatide combined with lifestyle modification in patients with type 2 diabetes. *Am J Med*. 2010;123(5):468 e9-17.
148. Astrup A, Rossner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M, et al. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2009;374(9701):1606-16.
149. Okerson T, Yan P, Stonehouse A, Brodows R. Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes. *Am J Hypertens*. 2010;23(3):334-9.
150. Ogawa S, Ishiki M, Nako K, Okamura M, Senda M, Mori T, et al. Sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases systolic blood pressure in Japanese hypertensive patients with type 2 diabetes. *Tohoku J Exp Med*. 2011;223(2):133-5.
151. Mistry GC, Maes AL, Lasseter KC, Davies MJ, Gottesdiener KM, Wagner JA, et al. Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on blood pressure in nondiabetic patients with mild to moderate hypertension. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(5):592-8.
152. Jadzinsky M, Pfutzner A, Paz-Pacheco E, Xu Z, Allen E, Chen R. Saxagliptin given in combination with metformin as initial therapy improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes compared with either monotherapy: a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11(6):611-22.
153. Skov J, Holst JJ, Gøtze JP, Frøkiær J, Christiansen JS. Glucagon-like peptide-1: effect on pro-atrial natriuretic peptide in healthy males. *Endocr Connect*. 2014;3(1):11-6.
154. Filippatos TD, Elisaf MS. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on renal function. *World J Diabetes*. 2013;4(5):190-201.
155. 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):p27-35.
156. Crajoinas RO, Pessoa TD, Rodrigues MV, Malnic G, Girardi AC. Changes in the activity and expression of protein phosphatase-1 accompany the differential regulation of NHE3 before and after the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;211(2):395-408.

157. Fuster DG, Bobulescu IA, Zhang J, Wade J, Moe OW. Characterization of the regulation of renal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by insulin. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(2):F577-85.
158. 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;261(12):5460-6.
159. Pessoa TD, Campos LC, Carraro-Lacroix L, Girardi AC, Malnic G. Functional role of glucose metabolism, osmotic stress, and sodium-glucose cotransporter isoform-mediated transport on Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 activity in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(9):2028-39.
160. Turner JR, Black ED. NHE3-dependent cytoplasmic alkalization is triggered by Na(+)-glucose cotransport in intestinal epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(5):C1533-41.
161. 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;101(25):9485-90.
162. 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;281(34):24247-53.
163. 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;287(5):C1238-45.
164. 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;294(2):F414-22.
165. dos Santos L, Salles TA, Arruda-Junior DF, Campos LC, Pereira AC, Barreto AL, et al. Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure. *Circ Heart Fail*. 2013;6(5):1029-38.
166. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ, Jr. Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension*. 1993;22(3):292-9.