RENATO DE OLIVEIRA CRAJOINAS

Regulação diferencial do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal renal antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial

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

2012

RENATO DE OLIVEIRA CRAJOINAS

Regulação diferencial do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal renal antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial

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

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Crajoinas, Renato de Oliveira

Regulação diferencial do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal renal antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial / Renato de Oliveira Crajoinas. -- São Paulo, 2012.

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.Hipertensão 2.Ratos endogâmicos SHR 3.Túbulos renais proximais 4.Trocador Na^+/H^+ 5.Proteínas quinases dependentes de AMP cíclico 6.Proteína fosfatase 1

USP/FM/DBD-373/12

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese aos meus pais (Darcio e Rita) e à minha
irmã (Eveline) não somente pelo apoio incondicional em
todos os momentos, principalmente nos de incerteza, mas
também por tudo o que fizeram e fazem para otimizar o
meu processo evolutivo.*

AGRADECIMENTOS

À Adriana Castello Costa Girardi por acreditar no meu potencial e pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém cuja competência é inquestionável. Meu respeito e admiração por sua capacidade de organização e de liderança.

Aos pesquisadores do laboratório de Biofísica Renal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), Prof. Dr. Gerhard Malnic e Thaissa Dantas Pessoa, pela colaboração nos experimentos de microperfusão.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor – HC-FMUSP, em especial aos alunos do Grupo Renal.

Aos meus amigos e colegas por terem feito parte da minha vida em todas as possíveis situações ao longo destes anos.

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

*“O pessimista queixa-se do vento,
o otimista espera que ele mude
e o realista ajusta as velas.”*

William George Ward

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Papel dos Rins na Fisiopatologia da Hipertensão Arterial	1
1.2 O Rim	5
1.3 O túbulo proximal e a reabsorção de Na^+	6
1.4 Trocador Na^+/H^+	10
1.5 Isoforma 3 do Trocador Na^+/H^+ (NHE3)	11
1.5.1 Regulação do Trocador Na^+/H^+ NHE3 em Túbulo Proximal Renal	12
1.6 Sinalização Celular	16
1.6.1 Proteína G	16
1.6.2 Proteína Cinase A	18
1.6.3 Proteína Fosfatase	20
1.7 Regulação do NHE3 em Ratos Espontaneamente Hipertensos	21
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24

3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Modelos experimentais	25
3.2 Aferição da pressão arterial	25
3.3 Determinação da atividade do NHE3	26
3.4 Preparação de proteínas de membranas de córtex renal	28
3.5 Fracionamento de membranas celulares por gradiente de centrifugação	29
3.6 Preparação de membranas de borda em escova de túbulos proximais renais	31
3.7 Determinação da concentração de proteínas	32
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS para proteína	32
3.9 <i>Immunoblotting</i>	33
3.10 Extração de RNA de córtex renal	35
3.11 Síntese de cDNA	37
3.12 Avaliação da expressão gênica do NHE3	38
3.13 Avaliação do efeito de um análogo de cAMP que ativa especificamente PKA (6MB-cAMP) sobre os níveis de fosforilação do NHE3	38
3.14 Atividade da PKA	39
3.15 Atividade da fosfatase PP1	40
3.16 Análises Estatísticas	41
 4. RESULTADOS	 42
4.1 Pressão Arterial	42
4.2 Reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 em túbulo proximal	43

4.3 Expressão do NHE3-mRNA em córtex renal	45
4.4 Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal	46
4.5 Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em microvilosidades de túbulo proximal	48
4.6 Distribuição subcelular do NHE3	50
4.7 Efeito do análogo ao cAMP sobre os níveis de fosforilação do NHE3 em córtex renal	53
4.8 Efeito do análogo ao cAMP na atividade do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal	56
4.9 Atividade da PKA e expressão das subunidades da PKA em córtex renal	58
4.10 Expressão da ezrin, da NHERF1 e da NHERF2 em córtex renal	61
4.11 Atividade da PP1 e expressão das subunidades da PP1 em córtex renal	63
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C: grau Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

20-HETE: ácido 20-hidroieicosatetraenoico

6MB-cAMP: 3',5'-monofosfato cíclico de N⁶-monobutiriladenosina

ABT: 1- aminobenzotriazole

Ag: prata

AgCl: cloreto de prata

Ang II: angiotensina II

A-SHR: rato espontaneamente hipertenso adulto com 14 semanas

ATP: adenosina trifosfato

A-WKY: rato Wistar Kyoto adulto com 14 semanas

BSA: albumina de soro bovino

cAMP: 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências de Animais de Laboratório

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

cGMP: 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina

Cl⁻: cloreto

cm: centímetro

CO₂: dióxido de carbono

DAG: 1,2-diacilglicerol

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato

DSP: fosfatase com dupla especificidade

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EETs: ácido epoxieicosatrienoico

EGTA: ácido etilenoglicol tetra-acético

ELISA: ensaio imunoenzimático

ENaC: canal epitelial para sódio

et al.: e outros

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GDP: guanosina difosfato

GLP-1: peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GPCR: receptor acoplado à proteína G

GTP: guanosina trifosfato

H⁺: hidrogênio

H₂CO₃: ácido carbônico

H₂O: água

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HCO₃⁻: bicarbonato

HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfônico

HRP: horseradish peroxidase

IgG: imunoglobulina G

IMV: microdomínio intermicrovilar das vesículas revestidas de clatrina

IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol

J_{HCO₃}: fluxo de bicarbonato

J-SHR: rato espontaneamente hipertenso jovem com 5 semanas

J-WKY: rato Wistar Kyoto jovem com 5 semanas

K⁺: potássio

K₂EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico

KCl: cloreto de potássio

kg: quilograma

KOH: hidróxido de potássio

L: litros

Li⁺: lítio

LiCl: cloreto de lítio

MgCl₂: cloreto de magnésio

min: minuto

mL: mililitro

mmHg: milímetros de mercúrio

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

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

mRNA: RNA mensageiro

mV: milivolt

Na⁺: sódio

NaCl: cloreto de sódio

NaF: fluoreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NHE: trocador sódio-hidrogênio

NHERF1: fator regulatório 1 de NHE

NHERF2: fator regulatório 2 de NHE

nm: nanômetro

nmol: nanomol

NO: óxido nítrico

NO₂: dióxido de nitrogênio

NOS: óxido nítrico sintase

PA: pressão arterial

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PE-50: catéter de polietileno com 50 mm de diâmetro externo

pH: potencial hidrogeniônico

Pi: fosfato inorgânico

PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PKA (C): subunidade catalítica da proteína cinase A

PKA (RI α), (RI β), (RII α) e (RII β): subunidades regulatórias I α , I β , II α e II β da proteína cinase A

PKA: proteína cinase dependente de cAMP

PKC: proteína cinase C

PKG: proteína cinase dependente de cGMP

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP4, PP5, PP6 e PP7: proteínas fosfatases do tipo 1, 2A, 2B, 2C, 4, 5, 6 e 7

PP1 α , PP1 β e PP1 γ : subunidades catalíticas α , β e γ da proteína fosfatase do tipo 1

PPM: fosfoproteína fosfatase dependente de magnésio

PPP: fosfoproteína fosfatase

PS552: serina 552 fosforilada

PS605: serina 605 fosforilada

PSTP: proteína serina/treonina fosfatase

PTP: proteína tirosina fosfatase

PVDF: fluoreto de polivinilideno

qRT-PCR: PCR quantitativo em tempo real

RFG: ritmo de filtração glomerular

RNA: ácido ribonucleico

RNAse: ribonuclease A

rpm: rotações por minuto

rRNA: RNA ribossomal

RT-PCR: transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

s: segundo

S1, S2 e S3: segmentos 1, 2 e 3 do túbulo proximal

S3226: 3-[2-(3-guanidino-2-metil-3-oxo-propenil)-5-metil-fenil]-N-isopropilideno-2-metil-acrilamida dihidro-cloreto

SDS: dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio

Ser: aminoácido serina

SHR: rato espontaneamente hipertenso

TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA

TBS: tampão Tris-HCl

Thr: aminoácido treonina

Tyr: aminoácido tirosina

U.V.: ultravioleta

WKY: Wistar Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curvas representativas da natriurese pressórica em normotenso e hipertenso	4
Figura 2 – Ilustração representativa de um rim e de um néfron	6
Figura 3 – Modelo que representa a localização dos segmentos S1 e S3 em túbulo proximal renal	7
Figura 4 – Modelo celular que representa a reabsorção de Na^+ acoplada ao H^+ pelo segmento S1 em túbulo proximal renal	8
Figura 5 – Modelo celular que representa a reabsorção de Na^+ acoplada ao Cl^- pelo segmento S3 em túbulo proximal renal	9
Figura 6 – Representação da estrutura secundária dos trocadores Na^+/H^+ (NHE)	10
Figura 7 – Modelo representativo do NHERF permitindo a inibição do NHE3 por PKA	15
Figura 8 – Representação da ativação da PKA	19
Figura 9 – Representação esquemática do sistema experimental utilizado para a microperfusão em túbulo proximal renal de ratos WKY e SHR	27
Figura 10 – Separação de membranas celulares de córtex renal de animais A-WKY por gradiente de centrifugação	30
Figura 11 – Atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade	44
Figura 12 – Avaliação da expressão gênica do NHE3 em córtex renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade	45

Figura 13 – Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal de WKY e SHR de 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	47
Figura 14 – Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em membranas microvilares da borda em escova de WKY e SHR de 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	49
Figura 15 – Distribuição do NHE3 nos microdomínios renais da borda em escova do J-SHR, do A-SHR e dos WKY de idade correspondente	51
Figura 16 – Efeito do 6MB-cAMP sobre os níveis de fosforilação do NHE3 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	54
Figura 17 – Efeito do 6MB-cAMP na atividade do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	57
Figura 18 – Atividade da PKA em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	59
Figura 19 – Expressão das subunidades catalítica (C) e regulatórias (RI α e RII α) da PKA em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	60
Figura 20 – Expressão das proteínas que interagem com o NHE3 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	62
Figura 21 – Atividade da fosfatase PP1 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	64
Figura 22 – Expressão das subunidades catalíticas (α , β e γ) da PP1 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade	65

Figura 23 – Modelo de como o NHE3 participa da resposta à natriurese pressórica e de como sua função transportadora é diminuída na hipertensão

74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação da Pressão Arterial (PA)	2
Tabela 2 – Principais fatores e hormônios que inibem a atividade do NHE3 via ativação da PKA	14
Tabela 3 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de <i>immunoblotting</i>	34
Tabela 4 – Peso corporal e pressão arterial de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade	42

RESUMO

Crajoínas RO. *Regulação diferencial do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal renal antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A hipertensão arterial essencial é caracterizada pela elevação crônica da pressão arterial e representa o principal fator de risco para doenças cardiovasculares e renais. O rim participa do controle da pressão arterial e alterações intrínsecas no manuseio renal de sódio desempenham papel importante na patogênese da hipertensão essencial. Os túbulos proximais renais são responsáveis pela reabsorção da maior parte do sódio filtrado nos glomérulos e a maior parte da reabsorção de sódio neste segmento faz-se através da troca de Na^+ por H^+ em membrana apical, mediada pela isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3). Entretanto, os dados existentes referentes à modulação renal do NHE3 em modelos de hipertensão são ainda conflitantes. Este estudo teve como objetivo avaliar as possíveis alterações funcionais do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal renal na linhagem SHR no estágio de pré-hipertensão (5 semanas) e de hipertensão (14 semanas) e investigar se estas alterações são acompanhadas de alterações na atividade e na expressão da proteína cinase A (PKA) e de proteínas fosfatase-1 (PP1). Por meio de microperfusão estacionária *in vivo* mediu-se a atividade do NHE3 em túbulo proximal e verificou-se que a reabsorção de bicarbonato foi reduzida em $62 \pm 6 \%$ ($P < 0,001$) na transição do J-SHR para o A-SHR enquanto foi aumentada em $113 \pm 10 \%$ ($P < 0,001$) na transição entre o J-WKY e o A-WKY. A atividade estimulada do NHE3 em J-SHR é decorrente da redistribuição do NHE3 do domínio intermicrovilar (IMV) para o domínio das microvilosidades (MMV) e do baixo nível de fosforilação da serina 552, sítio consenso para a PKA. Por outro lado, durante a fase de hipertensão, a atividade diminuída do NHE3 deve-se à sua redistribuição para o IMV e ao aumento da fosforilação na serina 552. Para testar a hipótese de que os níveis de fosforilação do NHE3 estariam aumentados em túbulo proximal de SHR adulto devido ao aumento da atividade da PKA e/ou à diminuição na atividade da PP1, foram avaliados tanto os níveis de fosforilação quanto a atividade do NHE3 em SHR jovens e adultos em resposta ao 6MB-cAMP (análogo ao cAMP que ativa especificamente a PKA). O J-SHR apresentou um aumento tanto nos níveis de fosforilação da serina 552 ($179 \pm 14 \%$, $P < 0,001$) quanto nos de inibição da atividade ($65 \pm 10 \%$, $P < 0,001$) do NHE3 em relação ao J-SHR em resposta ao 6MB-cAMP. Já no A-SHR, a fosforilação da serina 552 aumentou moderadamente ($36 \pm 4 \%$, $P < 0,01$), assim como inibiu moderadamente ($23 \pm 9 \%$, $P < 0,05$) a atividade do NHE3 em resposta ao 6MB-cAMP. Adicionalmente, verificou-se que não houve alteração da atividade da PKA entre os animais nem ao longo da idade e nem entre as linhagens. Por sua vez, o J-SHR apresentou maior atividade da PP1 que o A-SHR (1640 ± 107 vs. 940 ± 119 pM/ μg , $P < 0,01$). Além disso, houve uma diminuição na expressão da PP1 α no A-SHR ($32 \pm 8 \%$, $P < 0,01$) quando comparado ao J-SHR. Os dados sugerem que o NHE3 é diferencialmente regulado antes e após o desenvolvimento da hipertensão em SHR por mecanismos que envolvem modificações pós-transcricionais e distribuição subcelular. Além do mais, a regulação diferencial dos níveis de

fosforilação do NHE3 tubular proximal antes e após o desenvolvimento da hipertensão em SHR é devida, provavelmente, a alterações na atividade e na expressão da PP1.

Descritores: Hipertensão; Ratos endogâmicos SHR; Túbulos renais proximais; Trocador Na(+)-H(+); Proteínas quinases dependentes de AMP cíclico; Proteína fosfatase 1.

ABSTRACT

Crajoinas RO. *Differential regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in renal proximal tubule before and after development of hypertension* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Essential hypertension is characterized by chronic elevation of blood pressure and represents the major risk factor for cardiovascular and renal diseases. The kidney participates in the blood pressure control and intrinsic changes in renal sodium handling play an important role in the pathogenesis of essential hypertension. The renal proximal tubule is responsible for reabsorption of the great majority of sodium that is filtered by the glomerulus and the principal apical membrane mechanism for sodium reabsorption in this nephron is Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3)-mediated Na⁺/H⁺ exchange. However, conflicting data have been reported with regard to NHE3 modulation in experimental models of hypertension. This study aimed to evaluate the possible functional changes of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the renal proximal tubule of SHR both at the pre-hypertensive (5 weeks) and at hypertensive (14 weeks) stages and to investigate whether these changes were accompanied by changes in the activity and/or expression of protein kinase A (PKA) and protein phosphatase 1 (PP1). Proximal tubule NHE3 activity was measured by means of stationary microperfusion. Bicarbonate reabsorption was found to be decreased by 62 ± 6 % (P < 0.001) in the transition from youth to adulthood in SHR (Y-SHR to A-SHR), whereas in the transition from Y-WKY to A-WKY it increased by 113 ± 10 % (P < 0.001). Stimulated NHE3 activity in Y-SHR was due to redistribution of NHE3 from intermicrovillar domain (IMV) to microvillar domain (MMV) and to a lower level of serine 552 phosphorylation, a consensus site for PKA. Conversely, during the hypertensive stage, decreased NHE3 activity was due to increased redistribution of NHE3 to the IMV domain and increased phosphorylation at serine 552. To test the hypothesis that the increased levels of NHE3 phosphorylation in the proximal tubule of adult SHR were due to increased PKA activity and/or decreased PP1 activity, it was evaluated both phosphorylation levels and activity of NHE3 in young and adult SHR in response to 6MB-cAMP (an cAMP analog that specifically activates PKA). Y-SHR showed an increase both in the phosphorylation levels at serine 552 (179 ± 14 %, P < 0.001) and in the inhibition of NHE3 transport activity (65 ± 10 %, P < 0.001) compared to Y-SHR in response to 6MB-cAMP. With respect to A-SHR, the phosphorylation of serine 552 was slightly increased (36 ± 4 %, P < 0.01) and NHE3 activity was mildly inhibited (23 ± 9 %, P < 0.05) in response to 6MB-cAMP. Additionally, PKA activity remained unchanged with both age and strain. Nevertheless, Y-SHR exhibited higher PP1 activity than A-SHR (1640 ± 107 vs. 940 ± 119 pM/μg, P < 0.01). Furthermore, PP1α expression was decreased in the renal cortex of A-SHR (32 ± 8 %, P < 0.01) compared to Y-SHR. Taken together, these data suggest that NHE3 is differentially regulated before and after development of hypertension in SHR by mechanisms involving post-translational modifications and subcellular distribution. Moreover, the differential regulation of proximal tubule NHE3 phosphorylation levels before and

after development of hypertension in SHR is most likely due to changes on the activity and expression of PP1.

Descriptors: Hypertension; Rats, inbred SHR; Kidney tubules, proximal; Sodium-Hydrogen antiporter; Cyclic AMP-dependent protein kinases; Protein phosphatase 1.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Papel dos Rins na Fisiopatologia da Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), uma condição clínica caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) (Tabela 1), é considerada um dos principais problemas de Saúde Pública no mundo devido à sua alta frequência, estimada em, aproximadamente, 25 %, e por ser um fator de risco para doenças cardiovasculares e renais (9, 35, 68, 126). Dados apresentados por Williams mostraram que, em 2001, aproximadamente 7,6 milhões de mortes no mundo foram devidas ao aumento da PA (14 % de todas as mortes). Entretanto, em apenas 10 % dos pacientes sabe-se a causa da doença, neste caso conhecida como hipertensão secundária. Nos 90 % restantes, a etiologia da doença ainda permanece indefinida e, por isso, é denominada hipertensão primária ou essencial. A HAS essencial é considerada uma doença complexa e multifatorial decorrente da interação entre fatores genéticos e ambientais.

Diferentes mecanismos estão envolvidos na regulação da PA como os hemodinâmicos, os neurais e os hormonais. Os dois principais determinantes da PA, o débito cardíaco e a resistência periférica total, são regulados por mecanismos que entram em ação em questão de segundos a minutos (curto prazo) e por outros que atingem o máximo de resposta apenas após horas ou dias (longo prazo). Os mecanismos de ajuste a curto prazo da PA agem, primeiramente, na resistência vascular periférica e no débito cardíaco enquanto que os de ajuste a longo prazo

estão intimamente relacionados à regulação do volume sanguíneo, do balanço de sódio e do volume do líquido extracelular (20, 45, 92).

Tabela 1 – Classificação da Pressão Arterial (PA)

Classificação da PA	PA Sistólica (mmHg)
Ótima	< 120
Normal	< 130
Limítrofe*	130 - 139
Hipertensão Estágio 1	140 – 159
Hipertensão Estágio 2	160 – 179
Hipertensão Estágio 3	≥ 180
Hipertensão Sistólica isolada	≥ 140

* Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura. (Reprodução modificada de VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão / Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2010) (1).

Entre os sistemas que contribuem para a regulação da PA e para o desenvolvimento da hipertensão, o renal destaca-se por apresentar um papel central. A maior evidência para o papel do rim na patogênese da HAS vem de estudos de transplante entre cepas de ratos normotensos e hipertensos (2, 67, 91, 103).

Em animais experimentais, quando se doa o rim de um rato geneticamente hipertenso para um rato normotenso este desenvolve hipertensão pós-transplante. Estas respostas têm sido observadas em pelo menos quatro diferentes modelos de hipertensão. Além disso, os ratos geneticamente hipertensos que sofreram nefrectomia bilateral e receberam o rim de um animal normotenso apresentaram

redução na PA (41, 61, 101, 102). Estudos clínicos também indicam que receptores de um doador com predisposição genética à hipertensão desenvolvem aumento de pressão em comparação a um doador normotenso e sem histórico familiar de hipertensão (40).

Estes estudos de transplante reforçam a ideia de que a hipertensão essencial envolve um distúrbio primário renal que pode ser responsável pelo início do aumento da pressão. Além disso, várias formas monogênicas de hipertensão são decorrentes de um comprometimento na habilidade do rim em responder adequadamente às variações na ingestão de sal (3, 91).

O maior defensor da ideia de que a HAS é, fundamentalmente, um distúrbio renal foi Guyton (56, 57). Guyton e colaboradores postularam que a hipertensão é caracterizada por distúrbios na função renal que comprometem a capacidade dos rins em manter um balanço de sódio em níveis normais de pressão (Figura 1). Dessa forma, há um acúmulo de sódio no corpo, promovendo uma expansão do volume extracelular, do volume sanguíneo e, conseqüentemente, do débito cardíaco. Com o aumento do débito cardíaco, há também um aumento do fluxo sanguíneo para todos os tecidos do corpo. Em resposta, o mecanismo de autorregulação para o controle local do fluxo sanguíneo causa um ajuste imediato no diâmetro dos vasos de resistência, restabelecendo uma perfusão adequada ao tecido. A autorregulação, portanto, aumenta a resistência vascular periférica e a pressão arterial. E o preço para esta adaptação biológica é a hipertensão.

Figura 1 – Curvas representativas da natriurese pressórica em normotenso e hipertenso. (Reprodução modificada de Zatz, R. / Bases Fisiológicas da Nefrologia, 2012) (133).

Buscando definir os determinantes moleculares da HAS, foram realizados, durante as últimas décadas, estudos associativos e de clonagem posicional nos quais foram identificados cerca de 20 genes relacionados com a HAS essencial humana ou com doenças mendelianas raras associadas à alta ou baixa pressão arterial (83). Curiosamente, muitos destes genes codificam para proteínas que medeiam ou que estão envolvidas no controle do manuseio renal de sódio, isto é, canais iônicos, transportadores de membrana ou componentes de vias de sinalização que regulam suas atividades.

Distúrbios nos mecanismos de transporte tubular renal podem causar hipertensão mesmo na ausência de prejuízos evidentes na hemodinâmica renal. Sob condições normais, menos do que 1 % da carga filtrada de sódio é excretada e pequenas alterações nos percentuais da fração de reabsorção de sódio podem causar grandes alterações na excreção de sódio diária. Portanto, qualquer fator que altere o equilíbrio existente entre a carga filtrada determinada hemodinamicamente e a taxa de reabsorção tubular pode levar à retenção inadequada de sal e água.

1.2 O Rim

Os rins são órgãos localizados junto à parede posterior do abdômen fora da cavidade peritoneal, um de cada lado da coluna vertebral. Uma função bastante conhecida dos rins é a de livrar o corpo dos produtos de degradação que são ingeridos ou produzidos pelo metabolismo nitrogenado. Entretanto, é importante salientar que este órgão desempenha a função vital de manter a constância do meio interno por meio da regulação do volume e da composição dos líquidos corporais, apesar da ampla variação na ingestão diária de água e solutos. Para tal finalidade, a atividade de várias proteínas de transporte ao longo do néfron é meticulosamente regulada (26).

O néfron é a unidade funcional dos rins, sendo que cada rim humano é constituído por cerca de um milhão de néfrons. Cada néfron apresenta um componente esférico filtrante, chamado de corpúsculo renal, e um túbulo longo. O corpúsculo renal é formado pelo glomérulo, onde ocorre a ultrafiltração do plasma, e pela cápsula de Bowman, de onde o filtrado sai em direção ao túbulo renal composto por túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (26, 133) (Figura 2).

Ao longo desse caminho, quando o plasma filtrado deixa a cápsula de Bowman e passa pelo túbulo, ele é modificado pela reabsorção de água e solutos específicos que retornam ao sangue e pela secreção de substâncias dos capilares peritubulares para o túbulo. A formação da urina envolve estes três processos básicos: ultrafiltração de plasma pelos glomérulos, reabsorção de água e solutos do ultrafiltrado e secreção de solutos específicos para o fluido tubular (26, 133).

Figura 2 – Ilustração representativa de um rim e de um néfron. PCT: túbulo proximal; TAL: alça ascendente espessa; DCT: túbulo distal; CCT: ducto coletor. (Reprodução modificada de Boron W. F., Boulpaep E. L. / Medical Physiology, 2008).

Embora, aproximadamente, 180 litros de plasma sejam filtrados pelos glomérulos todos os dias, menos do que 1 % da água, do NaCl e de outros solutos são excretados na urina. Por meio da reabsorção e da secreção, os túbulos renais determinam o volume e a composição da urina e, por isso, controlam precisamente o volume, a composição e o pH dos fluidos corporais. No processo reabsortivo, destaca-se a importância do túbulo proximal já que este segmento é responsável pela maior reabsorção de água, Na^+ , Cl^- e outros solutos filtrados pelos glomérulos (26, 133).

1.3 O túbulo proximal e a reabsorção de Na^+

O túbulo proximal renal pode ser dividido em três segmentos: S1, S2 e S3. Os dois primeiros, que são denominados S1 (Figura 3) e S2, correspondem à parte convoluta do túbulo (*pars convoluta*). O segmento final, denominado S3 (Figura 3), corresponde à porção retificada (*pars recta*). Do segmento S1 ao S3 a complexidade

celular diminui progressivamente o que está relacionado ao fato da diminuição gradual nas taxas de reabsorção pelo túbulo (26, 133).

Figura 3 – Modelo que representa a localização dos segmentos S1 e S3 em túbulo proximal renal. (Reprodução modificada de Boron W. F., Boulpaep E. L. / Medical Physiology, 2008).

A alta capacidade de reabsorção pelos segmentos iniciais do túbulo proximal decorre do fato de que suas células epiteliais possuem grande quantidade de mitocôndrias para manter os processos de transporte ativo além de apresentarem uma borda em escova no lado apical da membrana proporcionando uma extensa área para o transporte de íons e outras substâncias.

Nos segmentos S1, S2 e S3 a captação do Na^+ se dá acoplada ou ao H^+ ou a solutos orgânicos como glicose (Figura 4), aminoácidos, Pi e lactato. A reabsorção associada ao H^+ se dá pelo funcionamento do trocador Na^+/H^+ nas membranas apicais pelo qual ocorre a entrada de Na^+ nas células e a saída de H^+ para a luz tubular, sendo que esta secreção de H^+ resulta na reabsorção de bicarbonato de sódio (26, 133).

Figura 4 – Modelo celular que representa a reabsorção de Na^+ acoplada ao H^+ pelo segmento S1 em túbulo proximal renal. (Reprodução modificada de Boron W. F., Boulpaep E. L. / Medical Physiology, 2008.)

A reabsorção de bicarbonato pelo túbulo proximal regida pelo gradiente de Na^+ ocorre de forma indireta. O H^+ secretado pelo trocador Na^+/H^+ combina-se no líquido tubular com o HCO_3^- filtrado, formando ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia em H_2O e CO_2 . Esta dissociação é catalisada pela isoforma IV da enzima anidrase carbônica na membrana apical das células tubulares proximais. O CO_2 difunde-se passivamente através da membrana apical para dentro da célula, onde combina-se com a H_2O , formando H_2CO_3 . A hidratação intracelular de CO_2 é catalisada pela isoforma II da anidrase carbônica citoplasmática. O H_2CO_3 dissocia-se e forma H^+ e HCO_3^- no interior da célula. O HCO_3^- move-se através da membrana basolateral e volta ao sangue pelo cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. O H^+ é transportado para o líquido tubular através do trocador Na^+/H^+ , completando o ciclo (26).

No segmento S3, o Na^+ é principalmente reabsorvido com o Cl^- tanto pela via transcelular, na qual Na^+ e Cl^- atravessam as membranas apical e basolateral antes de chegarem ao sangue, quanto pela paracelular, na qual os íons percorrem um caminho entre as células para chegar ao sangue (Figura 5) (26).

A reabsorção de Na^+ pela via transcelular se dá por ação paralela entre os trocadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{ânion}$ e tem como consequência a captação de NaCl da luz

tubular para dentro da célula. Pela via paracelular a reabsorção de NaCl ocorre devido ao aumento na concentração de Cl^- no fluido tubular no segmento S1 que cria um gradiente de concentração que favorece a difusão do Cl^- da luz tubular para o espaço intercelular lateral no segmento S2. Além disso, a passagem do Cl^- faz com que o fluido tubular fique carregado positivamente em relação ao sangue, sendo que esta voltagem positiva induz o movimento de Na^+ em direção ao sangue. Ao longo de todo o túbulo proximal, a reabsorção de NaCl cria um gradiente osmótico que faz com que a água seja reabsorvida de forma passiva (26).

Em todos os casos em que há entrada de Na^+ para dentro da célula este íon sai em direção ao sangue via Na^+/K^+ -ATPase e via cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. A Na^+/K^+ -ATPase emprega energia do ATP para fazer com que três íons de Na^+ vão para o meio extracelular enquanto que dois íons K^+ vão para o meio intracelular. Assim, aproximadamente 67% do Na^+ filtrado é reabsorvido em túbulo proximal (26).

Figura 5 – Modelo celular que representa a reabsorção de Na^+ acoplada ao Cl^- pelo segmento S3 em túbulo proximal renal. (Reprodução modificada de Boron W. F., Boulpaep E. L. / Medical Physiology, 2008.)

1.4 Trocador Na^+/H^+

A família de trocadores ou permutadores Na^+/H^+ (NHE) medeia a troca eletroneutra de um íon Na^+ por um H^+ através das membranas celulares (10). Os NHEs têm distribuição ubíqua e diferentes isoformas já foram identificadas. Estas isoformas apresentam características, mecanismos regulatórios e distribuição tecidual e celular distintos. Entretanto, todos os membros da família de NHEs apresentam uma característica estrutural comum. O domínio transmembrana N-terminal, constituído por aproximadamente 500 aminoácidos, é responsável pela função de transporte dos NHEs realizando a troca Na^+/H^+ , enquanto que o domínio citoplasmático C-terminal exerce ação modulatória sobre o domínio funcional (42, 100) (Figura 6).

Figura 6 – Representação da estrutura secundária dos trocadores Na^+/H^+ (NHE). Todas as isoformas de NHE apresentam de 10-12 segmentos transmembrana. (Reprodução modificada de Donowitz M e Li X / Physiological reviews, 2007).

Os NHEs podem ser classificados em função da sua localização celular. As isoformas de 1-5 e 8 estão todas associadas à membrana plasmática, embora o

NHE3, o NHE5 e o NHE8 possam também se deslocar para um pool interno na célula. Já as isoformas de 6, 7 e 9 encontram-se, principalmente, em compartimentos internos da célula (5, 17, 22, 23, 32, 33, 96, 114).

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

O NHE3 está presente, principalmente, na membrana apical das células epiteliais renais e gastrointestinais (28, 60). Esta isoforma é muito abundante no rim e está localizada na membrana apical do túbulo proximal e no segmento espesso ascendente da alça de Henle. Em túbulo proximal 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 (Figuras 4 e 5) (2, 22, 24, 85, 109, 120). 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 importância do NHE3 na reabsorção de sódio em túbulo proximal renal e no controle da pressão arterial é claramente evidenciada pelo fenótipo apresentado nos camundongos nocaute para este transportador. Quando submetidos a uma dieta de sal normal, camundongos nocautes para o gene *Nhe3* são hipotensos e acidóticos (109) e quando submetidos à dieta hipossódica, eles não conseguem regular seu volume e acabam morrendo em poucos dias (78). A grande redução da reabsorção de fluido em túbulo proximal nesta linhagem de camundongos faz com que a carga de sais ofertada aos segmentos mais distais do néfron seja significativamente aumentada, fazendo-se necessário o desenvolvimento de respostas compensatórias para aumentar a reabsorção de fluido (123). Dentre estas adaptações cita-se a

ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento da expressão da subunidade α do canal epitelial para sódio (ENaC) (27) e o decréscimo do ritmo de filtração glomerular, que ocorre, ao menos em parte, por ativação do sistema de balanço túbulo-glomerular (2, 85, 127).

1.5.1 Regulação do Trocador Na^+/H^+ NHE3 em Túbulo Proximal Renal

Devido ao papel essencial na mediação da reabsorção de NaHCO_3 , NaCl e água em túbulo proximal, a atividade do NHE3 é regulada por uma grande variedade de alterações agudas e crônicas em parâmetros fisiológicos. A modulação da atividade do NHE3 em resposta a estímulos pode envolver alterações no número de transportadores presentes na membrana, portanto mecanismos moleculares como modificações na transcrição gênica e na síntese protéica podem ser os responsáveis por estas adaptações.

Por sua vez, uma série de evidências indica que a atividade do NHE3 pode ser modificada sem que ocorram alterações na expressão total deste trocador em córtex renal. A porção C-terminal do NHE3 possui vários sítios alvos possíveis de fosforilação e demonstrou-se que em células intactas, o NHE3 é fosforilado e inibido por proteína cinase A (PKA) (73). Kocinsky *et al.* (2005) desenvolveram anticorpos monoclonais fosfo-específicos que permitiram demonstrar que as serinas 552 e 605, sítios consenso para PKA, são regulados fisiologicamente tanto *in vitro* (72) como *in vivo* (71).

A cascata de transdução de sinal que medeia os efeitos de agonistas e de antagonistas do NHE3 envolve muitas vias. Muitos são os mecanismos regulatórios envolvidos no controle da atividade do NHE3, sendo que um dos mais estudados é a

inibição do trocador pela ativação da PKA. Hormônios que ativam a PKA podem reduzir a reabsorção de sódio e de bicarbonato em túbulo proximal por inibir a atividade do NHE3. A Tabela 2 apresenta resumidamente os hormônios e os mecanismos moleculares envolvidos na inibição do NHE3 pela PKA. Estes hormônios atuam via receptores acoplados à proteína G (GPCR) expressos na membrana apical do túbulo proximal.

Além da fosforilação, existem evidências experimentais de que outros mecanismos celulares estejam envolvidos na regulação da atividade do NHE3. A membrana de borda em escova das células de túbulo proximal renais é composta por dois microdomínios: o das microvilosidades (MMV) e o intermicrovilar das vesículas revestidas de clatrina (IMV) (105). Identificou-se que em condições fisiológicas o NHE3 é igualmente distribuído entre estes dois microdomínios (50).

Adicionalmente, Biemesderfer *et al.* (2001) observaram que uma fração do NHE3 que reside na IMV pode servir como um pool interno de reserva que é recrutado com a estimulação por agonistas (21). Estudos recentes demonstraram que o NHE3 pode transitar entre estes dois microdomínios da membrana apical e que estas translocações são acompanhadas por mudanças no transporte renal de sódio. Em resposta a antagonistas como paratormônio ou dopamina, o NHE3 migra das MMVs em direção às IMVs. Por sua vez, em condições como ativação do sistema nervoso simpático e tratamento com insulina que aumentam a atividade do trocador, notou-se que o NHE3 é redistribuído das IMVs para a superfície das MMVs da membrana apical (11, 19, 64, 134).

Tabela 2 – Principais fatores e hormônios que inibem a atividade do NHE3 via ativação da PKA

Hormônio / Condição	Mecanismo Associado	Referência
Paratormônio	↓ a afinidade do NHE3 por prótons devido à fosforilação do trocador; ↓ da velocidade máxima do NHE3 devido ao decréscimo no número de moléculas de NHE3 na membrana plasmática; ↓ da atividade promotora, do mRNA e da abundância do NHE3;	(19, 38, 46, 52, 134)
Dopamina	↓ a troca Na^+/H^+ mediada pelo NHE3 devido ao aumento na endocitose e pelo aumento da fosforilação dos resíduos S552 e S605 pela PKA;	(11, 55, 64)
Peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1)	↓ a atividade do NHE3 devido ao aumento de fosforilação do trocador;	(29, 39)
Glucagon	Agudamente, ↓ o NHE3 por meio da via da PKA; Cronicamente, ↑ o mRNA e a expressão do NHE3 na membrana plasmática;	(4)
Guanilinas	↓ a troca Na^+/H^+ mediada pelo NHE3 devido ao aumento nos níveis de fosforilação do NHE3 por PKA e à redução do trocador na membrana plasmática;	(7, 81)

(Reprodução modificada de Girardi ACC e Carraro-Lacroix LR / Protein Kinases, 2012) (53).

A identificação de proteínas que interagem com NHE3, tais como o fator regulatório 1 de NHE (NHERF1) (124), o fator regulatório 2 de NHE (NHERF2) (132), a ezrin (131) entre outras, tem sido essencial para a elucidação dos

mecanismos moleculares envolvidos na regulação deste transportador. Tanto a NHERF1 quanto a NHERF2 estão relacionadas à inibição do NHE3 pela PKA por mediar a interação NHE3-ezrin aproximando a PKA do NHE3 (Figura 7). Em células desprovidas de NHERF1 ou NHERF2, NHE3 não é responsivo a PKA. No entanto, a sensibilidade a PKA é observada quando estas células são transfectadas com uma destas proteínas reguladoras (2, 124, 125, 132). A proteína de membrana ezrin que se encontra ligada ao citoesqueleto de actina interage com o NHE3 de forma direta (31) ou de forma indireta (131), via membros da família NHERF. Do ponto de vista funcional, a associação direta da proteína ezrin ao NHE3 parece ser necessária para o tráfego deste transportador entre os microdomínios celulares (31).

Figura 7 – Modelo representativo do NHERF permitindo a inibição do NHE3 por PKA. NHERF medeia a regulação do NHE3 pela PKA por interagir com o citoesqueleto fazendo com que a PKA fosforile os sítios presentes no domínio citoplasmático do NHE3. MP: membrana plasmática. (Reprodução modificada de Girardi ACC e Carraro-Lacroix LR / Protein Kinases, 2012).

1.6 Sinalização Celular

1.6.1 Proteína G

As células estão expostas a vários sinais extracelulares e a manutenção da transdução de sinais intracelulares, que resulta na amplificação de respostas específicas, é essencial para desencadear uma resposta biológica. Os GPCR são as primeiras estruturas envolvidas na transdução de sinais celulares. As proteínas G fazem parte de uma superfamília de proteínas que se encontra acoplada a receptores no meio intracelular e, quando ativadas, podem migrar para o citosol ativando enzimas ou canais, garantindo, então, a ativação dos eventos intracelulares. As proteínas G são heterotriméricas e formadas por três polipeptídeos distintos: α , β e γ , sendo este o complexo transdutor de sinal melhor conservado entre os mamíferos (12, 58, 95, 104).

Os receptores que transmitem o sinal celular via proteína G possuem uma região extracelular e uma transmembrana com sete domínios hidrofóbicos, sendo, por isso, conhecidos também como receptores 7TM, receptores de serpentina, receptores de 7 hélices, entre outros. As diferenças em suas estruturas possivelmente contribuem para diferenças no reconhecimento de um ligante e no acoplamento específico a uma determinada proteína G.

Após a interação do primeiro mensageiro com o GPCR mudanças conformacionais ocorrem no receptor fazendo com que seja iniciado o ciclo de atividade da proteína G. A cascata de ativação inicia-se com a hidrólise da molécula de guanosina difosfato (GDP) tornando-se guanosina trifosfato (GTP), configurando o estado ativo da proteína, no qual a subunidade α se dissocia do dímero $\beta\gamma$ iniciando a ativação de diferentes cascatas de sinalização celular. Todo este mecanismo resulta

na ativação de efetores como adenilil ciclase, GTPases, fosfolipases e cinases (95, 112).

As proteínas G são classificadas de acordo com a estrutura e sequência da subunidade α , sendo três as principais isoformas: Gs, Gi e Gq. A proteína Gs (estimulatória) ativa a adenilil ciclase, uma enzima intracelular aderida à membrana plasmática que catalisa a formação do 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) a partir do ATP, e está relacionada ao aumento da resposta celular. Após a formação do complexo ligante/GPCR, a subunidade α da proteína Gs catalisa a troca de GDP por GTP, configurando a forma ativa. Então, a porção α da proteína desloca-se do dímero $\beta\gamma$ e ativa a adenilil ciclase, resultando no aumento da concentração de cAMP intracelular. Este aumento faz com que ocorra a ativação da PKA que, em seguida, poderá fosforilar diversas estruturas intracelulares (95, 111, 112).

As proteínas Gi (inibitória) inibem a atividade da enzima adenilil ciclase. Esta isoforma, relacionada à diminuição da resposta celular, é a responsável pela mediação dos efeitos inibitórios de receptores nesta via (112).

As proteínas Gq estão envolvidas na ativação da enzima fosfolipase C que, por ser um efector assim como a adenilil ciclase, participará da formação de segundos mensageiros. Uma vez ativa ela cliva o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) presente na membrana gerando 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG). Estes são os segundos mensageiros envolvidos nas respostas fisiológicas mediadas pela proteína Gq. O IP_3 por ser hidrossolúvel migra pelo citosol e liga-se a receptores específicos, enquanto que o DAG fica associado à membrana plasmática, devido à sua estrutura hidrofóbica, e ativa a proteína cinase C (PKC) que fosforila outras proteínas (54, 112).

A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional reversível que desempenha papel fundamental em vários processos fisiológicos e, muitas vezes, está desregulada em condições patológicas. O equilíbrio entre a ativação e a desativação de vias de sinalização é delicado e pode ser regulado não apenas pela fosforilação por cinases, mas também pela desfosforilação induzida por diversas fosfatases (30, 54, 110, 111, 122).

1.6.2 Proteína Cinase A

As proteínas cinases desempenham papel crítico na regulação das células eucarióticas, constituem uma família sofisticada de enzimas e fazem parte de uma das maiores superfamílias de proteína, representando cerca de 2% do genoma humano (12, 58, 104, 112, 115, 116).

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 cAMP, 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 cAMP ao dímero de subunidades regulatórias faz com que a holoenzima dissocie-se e libere a subunidade catalítica para que esta possa fosforilar resíduos específicos de serina e treonina de proteínas alvo (58, 112, 116) (Figura 8).

Figura 8 – Representação da ativação da PKA. R: subunidade regulatória; C: subunidade catalítica. (Reprodução modificada de Hansson *et al.* / Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2000).

Inicialmente, foram identificadas pelo menos duas isoformas de PKA, tipo I e tipo II por meio do seu padrão de eluição em colunas DEAE-celulose. Além disso, possuíam uma subunidade C associada a duas diferentes subunidades R: RI e RII. Entretanto, com o passar dos anos, técnicas de clonagem mostraram uma heterogeneidade muito grande tanto na subunidade R quanto na C, demonstrando, então, a existência de múltiplas isoformas de PKA (6, 12, 112).

A partir destas técnicas de clonagem quatro genes foram identificados que codificam para as subunidades R: RI α , RI β , RII α e RII β . A subunidade RI α tem distribuição ubíqua entre os tecidos enquanto que a RI β está localizada essencialmente no cérebro, no testículo e nos linfócitos B e T. A subunidade RII α é também ubíqua em sua distribuição, sendo a RII β encontrada principalmente no cérebro, no tecido adiposo e em alguns tecidos endócrinos (12, 58, 104, 112).

A subunidade R pode determinar a localização intracelular da PKA. Estudos focados na localização celular da PKA indicam que a PKAI é encontrada predominantemente no citosol e a PKAII associada principalmente às membranas, às organelas e ao citoesqueleto. Proteínas de ancoragem com locais de ligação

específicos, principalmente para as subunidades da RII, determinam a localização intracelular do tetrâmero PKA, podendo então ser a compartimentalização a base para muitas das funções específicas da PKA.

1.6.3 Proteína Fosfatase

As proteínas fosfatases podem ser classificadas de diferentes maneiras. Elas podem ser divididas em três classes de acordo com a especificidade do substrato: proteína Serina/Treonina (Ser/Thr) fosfatases (PSTPs), proteína tirosina fosfatases (PTPs) e fosfatases com dupla especificidade (DSPs). As duas classes de enzimas que catalisam a desfosforilação são as Ser/Thr fosfatases e as Tyr fosfatases. Baseando-se na sequência, na estrutura e nos mecanismos catalíticos, as proteínas fosfatases podem também ser divididas em subfamílias: fosfoproteína fosfatase (PPP), fosfoproteína fosfatase dependente de magnésio (PPM) e proteína tirosina fosfatase (PTP), sendo as subfamílias PPP e PPM responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de Ser e Thr em proteínas e a maioria dos membros da subfamília PTP pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de Tyr (110, 122).

Inicialmente, devido às suas características bioquímicas, as Ser/Thr fosfatases foram divididas em duas classes: fosfatases do tipo 1 (PP1) e fosfatases do tipo 2 (PP2). As PP1 são capazes de desfosforilar, preferencialmente, a subunidade β da fosforilase cinase e são sensíveis a duas proteínas termoestáveis denominadas inibidor-1 (I-1) e inibidor-2 (I-2). Por sua vez, as PP2 desfosforilam, preferencialmente, a subunidade α da fosforilase cinase e são insensíveis ao I-1 e ao I-2. As PP2 foram subdivididas em três enzimas de acordo com suas necessidades por cátions bivalentes: PP2A, PP2B e PP2C. As PP1, PP2A e PP2B exibem ampla

especificidade contra uma série de substratos, enquanto que a PP2C exibe especificidade estreita. PP1, PP2A e PP2B pertencem à família PPP e são Ser/Thr fosfatases importantes. Nesta mesma família, outras fosfatases foram caracterizadas como PP4, PP5, PP6 e PP7, entretanto elas ocorrem em baixa frequência e de forma tecido- e desenvolvimento-específico (36, 37, 94, 111, 122).

A PP1 é uma das principais Ser/Thr fosfatases encontradas nas células eucarióticas e participa de uma série de processos biológicos. Nas células, a PP1 é um heterodímero composto por uma subunidade catalítica associada a uma ou dezenas de diferentes subunidades regulatórias, modulando sua localização, sua especificidade ao substrato e sua atividade enzimática (2, 30, 113).

A sequência da subunidade catalítica é muito conservada ao longo da evolução, entretanto existem diferenças entre as espécies no que diz respeito ao número de genes codificantes para as isoformas desta subunidade. No genoma humano existem três diferentes genes que dão origem às isoformas PP1 α , PP1 β e PP1 γ . A participação destas diferentes isoformas nas distintas holoenzimas ainda não foi completamente esclarecida, embora a associação preferencial de isoformas por certas subunidades reguladoras tenha sido constatada em alguns tecidos (18, 36, 113, 121).

1.7 Regulação do NHE3 em Ratos Espontaneamente Hipertensos

O modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tem se revelado bastante útil para investigar a patogênese e o tratamento da hipertensão essencial humana (79, 98, 108). Este modelo experimental de hipertensão que não depende de intervenção fisiológica, farmacológica ou cirúrgica foi desenvolvido por Okamoto e

Aoki, no final da década de 1950, a partir da seleção de ratos Wistar Kyoto (WKY) que apresentavam pressão arterial superior a 150 mmHg. Em 1963, após cerca de 20 gerações de endogamia, estes ratos deram origem à linhagem de rato espontaneamente hipertenso (SHR) que desenvolve hipertensão espontaneamente, sem exceção, com a idade entre 7-15 semanas.

Dentre as semelhanças apresentadas entre a hipertensão essencial humana e a observada no SHR destacam-se: (1) a predisposição genética para a hipertensão sem etiologia específica; (2) igual resposta a tratamentos com drogas. Entretanto, Trippodo e Frohlich (119), ressaltaram que, embora o SHR seja um excelente modelo de hipertensão essencial humana, deve-se considerar que fatores ambientais tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais e alterações do ciclo claro/escuro afetam o seu desenvolvimento espontâneo da hipertensão, implicando que alterações secundárias possam ocorrer neste modelo.

Os dados existentes na literatura referentes à modulação renal do trocador NHE3 em modelos de hipertensão são ainda conflitantes. LaPointe *et al.* (2002) analisaram a função do trocador NHE3 em membranas de borda em escova isoladas de túbulos proximais de ratos SHR e WKY antes e durante o desenvolvimento de hipertensão. Estes autores verificaram que a atividade do NHE3 encontrava-se aumentada em túbulo proximal renal de ratos SHR pré-hipertensos (4-6 semanas) e permanecia elevada após o desenvolvimento da hipertensão (8-13 semanas), quando comparada aos ratos WKY de idade correspondente (76). Estas observações sugerem que a alteração da atividade do NHE3 pode ser, em parte, responsável pelas anormalidades do manuseio renal de sódio presentes na hipertensão.

Por sua vez, estudos realizados no laboratório da Dra. Alicia McDonough mostraram que em animais SHR com 12 semanas, estágio no qual a hipertensão arterial já se encontra estabelecida nesta linhagem, ocorre uma redistribuição do NHE3 das MMVs para as IMVs (88). Em paralelo a esta redistribuição, este grupo encontrou um aumento na fração de excreção de lítio, considerado um marcador da função reabsortiva do túbulo proximal renal. Em discordância às observações de LaPointe *et al.* (2002), os estudos do grupo da Dra. McDonough sugerem que o NHE3 sofre uma compensação homeostática ao aumento da pressão arterial (88). Sendo assim, diante das divergências existentes, constitui como objetivo principal deste trabalho avaliar as possíveis alterações funcionais do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial. Adicionalmente, será investigado o possível papel da PKA e da PP1 na modulação deste transportador em túbulo proximal renal na linhagem SHR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar as possíveis alterações funcionais do trocador Na^+/H^+ NHE3 em túbulo proximal renal na linhagem SHR no estágio de pré-hipertensão (5 semanas) e de hipertensão (14 semanas) e investigar se estas alterações são acompanhadas de alterações na atividade e na expressão da proteína cinase A (PKA) e de proteínas fosfatase-1 (PP1);

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade do trocador Na^+/H^+ NHE3 *in vivo* em túbulo proximal de SHR pré-hipertensos e hipertensos;
- Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na modulação do trocador Na^+/H^+ NHE3 em ratos pré-hipertensos e hipertensos;
- Investigar as possíveis alterações na atividade e/ou expressão da PKA em túbulos proximais renais de SHR durante a fase de pré-hipertensão e de hipertensão estabelecida;
- Investigar as possíveis alterações na atividade e/ou expressão das subunidades catalíticas da PP1 em túbulos proximais renais de SHR durante a fase de pré-hipertensão e de hipertensão estabelecida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com idades de 5 e 14 semanas, comprados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências de Animais de Laboratório (CEMIB), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, e 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.

Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pelo protocolo de pesquisa nº 080/11.

3.2 Aferição da pressão arterial

A pressão arterial sistólica em ratos WKY e SHR foi medida por meio do método indireto de pletismografia de cauda. Para tal procedimento, inicialmente, o sistema (BP-2000 Blood Pressure Analysis System™; Visitech Systems, Inc.) foi calibrado. Em seguida, os ratos foram acondicionados em um meio de contenção aquecido e a região proximal da cauda foi encaixada a um manguito de borracha acoplado a um transdutor de pulso (sensor) que capta os sinais a serem enviados e registrados em computador para a realização das medidas de pressão arterial

sistólica. O experimento só teve início após um período de três dias de adaptação dos animais e da estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca. A PAS foi considerada como a média de no mínimo dez medidas.

3.3 Determinação da atividade do NHE3

A atividade do NHE3 em túbulos proximais renais *in vivo* foi determinada por meio de microperfusão estacionária. Para isso, os ratos foram anestesiados com cetamina associada à xilasina (50 e 10 mg/kg/mL), 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 3 % manitol, 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 a 37 °C. A cauda do rato foi seccionada na extremidade e mergulhada em béquer contendo solução salina e fazia contato elétrico por ponte de ágar 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 (80). 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). 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 9).

Figura 9 – Representação esquemática do sistema experimental utilizado para a microperfusão em túbulo proximal renal de ratos WKY e SHR. À direita, uma micropipeta dupla; no meio, uma micropipeta de um ramo e à esquerda, um microeletrodo de dois ramos perfurando um segmento do néfron 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 (Fonte: Bruna Hitomi Inoue, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, 2011).

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 do íon bicarbonato (HCO_3^-) injetado ao nível estacionário. O nível de reabsorção de HCO_3^- ($J_{HCO_3^-}$) foi calculado através da equação (48):

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

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

3.4 Preparação de proteínas de membranas de córtex renal

A cápsula renal foi removida com o auxílio de uma pinça, cortou-se o rim ao meio, longitudinalmente, e retirou-se as porções referentes ao córtex, que foram imediatamente transferidas para um frasco contendo tampão PBS gelado (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; pH 7,4). Foram adicionados a este tampão os inibidores de protease pepstatina A (0,7 μ g/mL), leupeptina (0,5 μ g/mL), e PMSF (40 μ g/mL) e os inibidores de fosfatase fluoreto de sódio (50 mM) e pirofosfato sódico (15 mM), uma vez que esta preparação de proteínas foi também destinada ao estudo dos níveis de fosforilação do NHE3. Em seguida, homogeneizou-se as porções do córtex com homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.).

O homogenato foi então aliquotado em tubos para centrífuga. A fração correspondente à preparação de proteínas totais de membrana de córtex renal dos ratos foi isolada do homogenato por meio de centrifugações diferenciadas (C), assim efetuadas: C₁: 4000 rpm por 10 minutos; C₂: 28000 rpm por 90 minutos. Após a centrifugação C₁, salvou-se o sobrenadante e descartou-se o “pellet”. Após a centrifugação C₂, descartou-se o sobrenadante e o “pellet” final obtido foi ressuspense em tampão PBS contendo os inibidores de protease e fosfatase acima descritos.

3.5 Fracionamento de membranas celulares por gradiente de centrifugação

Extrato total de membranas renais foram preparados seguindo o método proposto por Sabolic & Burckhard (106), acompanhado de algumas modificações. Basicamente, esta técnica consiste em sujeitar uma suspensão de partículas com diferentes densidades a uma força centrífuga constante em um meio de densidade gradualmente variável. Para isso, tecido renal proveniente de ratos WKY e SHR de 5 e 14 semanas de idade foram homogeneizados em tampão de homogeneização [20 mM Tricina, pH 7,8; 8 % sacarose; inibidores de protease (0,7 µg/mL pepstatina A, 0,5 µg/mL leupeptina e 40 µg/mL PMSF)]. O homogenato resultante foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm, o “pellet” foi desprezado e a preparação foi novamente centrifugada por 90 minutos a 28000 rpm. Ao final desta etapa, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspense. Estas membranas correspondem ao extrato total de membranas renais purificado de membranas mitocondriais. O “pellet” obtido foi ressuspense em 5 % OptiPrep™ (Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega), previamente diluído utilizando-se Tricina 20 mM, pH

7,8 e 8 % sacarose. 2 mg de proteínas de membrana de córtex renal ressuspensas em 5 % Optiprep™ foram adicionadas à camada superior de um gradiente composto por Optiprep™ em concentrações equivalentes a 15-25 %. Os gradientes foram centrifugados por 18 horas a 28000 rpm para que atingissem equilíbrio. Frações em volumes equivalentes a 1 mL foram coletadas manualmente partindo da parte superior (frações menos densas) para a inferior (frações mais densas). Estas frações foram submetidas à SDS-PAGE e “immunoblotting” e analisadas para a presença de vilina (marcador de microvilosidades, ou seja, de frações menos densas), de megalina (marcador das vesículas revestidas de clatrina, ou seja, de frações mais densas) e de NHE3 (Figura 10). As frações correspondentes às vesículas densas, enriquecidas em megalina, foram combinadas e submetidas a alta centrifugação (100.000 g) por 60 minutos.

Figura 10 – Separação de membranas celulares de córtex renal de animais A-WKY por gradiente de centrifugação. Proteínas de membranas corticais renais foram separadas por centrifugação isopícnica utilizando gradientes de densidade OptiPrep de 15-30 %. Frações (1 mL) foram coletadas do gradiente e 25 µL de cada uma foi sujeita ao SDS-PAGE e immunoblotting. A Fração 1 representa a fração menos densa e a Fração 8 representa a mais densa do gradiente. A mesma membrana foi incubada com anticorpos contra a vilina, a megalina e o NHE3. A Fração 1 que está enriquecida com o marcador vilina refere-se à MMV e as Frações 5-6 que estão enriquecidas com o marcador megalina referem-se à IMV. O mesmo procedimento foi feito com amostras de córtex renal de animais J-WKY, J-SHR e A-SHR.

3.6 Preparação de membranas de borda em escova de túbulos proximais renais

Rins provenientes de ratos foram utilizados para a preparação de membranas de borda em escova de túbulos proximais. Esta preparação foi efetuada segundo Booth & Kenny (25) e baseia-se no fato de que frações subcelulares formam agregados na presença de metais bivalentes.

A cápsula renal foi removida, cortou-se o rim ao meio, longitudinalmente, e retirou-se as porções referentes ao córtex, que foram colocadas em um frasco contendo tampão K-HEPES gelado (80 mM HEPES; 200 mM manitol; 41 mM KOH; pH 7,4). Foram adicionados a este tampão os inibidores de protease pepstatina A (0,7 µg/mL), leupeptina (0,5 µg/mL), e PMSF (40 µg/mL) e os inibidores de fosfatase fluoreto de sódio (50 mM) e pirofosfato sódico (15 mM). Em seguida, os córtices foram pesados e homogeneizados com uma quantidade de tampão equivalente a quatro vezes a massa cortical em um homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.). Adicionou-se gluconato de magnésio ao homogenato a fim de atingir uma concentração final de 0,01 M e incubou-se por 15 minutos no gelo. O homogenato foi então aliqotado em tubos para centrífuga.

A fração correspondente à membrana de borda em escova de túbulos proximais foi isolada do homogenato através de centrifugações diferenciadas (C), assim efetuadas: C₁: 4500 rpm por 10 minutos; C₂: 16000 rpm por 20 minutos; C₃: 5000 rpm por 10 minutos; C₄: 16000 rpm por 20 minutos; C₅: 5500 rpm por 10 minutos; C₆: 16000 rpm por 20 minutos; C₇: 16000 rpm por 20 minutos. Após cada centrifugação lenta (C₁, C₃ e C₅), salvou-se o sobrenadante e descartou-se o “pellet”. Após cada centrifugação rápida (C₂, C₄, C₆ e C₇), descartou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspenso em tampão K-HEPES gelado contendo 0,01 M de gluconato

de magnésio e inibidores de proteases e de fosfatases. Entre as centrifugações C₂ e C₃, C₄ e C₅, as amostras foram incubadas por 15 minutos no gelo. O “pellet” final, obtido após a centrifugação C₇, foi ressuspenso em tampão K-HEPES.

3.7 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas da preparação foi obtida pelo método de Lowry (86). 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.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS para proteína

As amostras de proteínas obtidas pelas técnicas acima descritas foram ressuspensas em 50 µL de 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 %). Para monitorar o progresso da corrida e para determinar a massa molecular aproximada das proteínas foram colocados 15 µL de um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad) A eletroforese foi feita segundo Laemmli (74), cujo gel de corrida era constituído de 7,5 % acrilamida; o de empilhamento 3 % e a espessura do gel era de 1,5 mm. As amostras foram aplicadas nos poços do gel contendo tampão de eletroforese (25 mM Tris-base pH

7,4; 192 mM glicina) e em seguida a corrida foi iniciada. Quando a linha do corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel, a corrida foi interrompida.

3.9 Immunoblotting

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). Para isso, a membrana foi hidratada com metanol 100 % por 2 minutos, lavada com água MilliQ por 2 minutos e equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, metanol 20 %) por pelo menos 5 minutos. Para a transferência utilizou-se um sistema tipo sanduíche (GE Healthcare, TE62) submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 350 mA durante a noite a 4 °C. Em seguida, a membrana foi corada por 10 minutos com Ponceau (Ponceau S, Sigma) e descorada com água MilliQ até que as bandas pudessem ser visualizadas. As posições correspondentes aos padrões de peso molecular foram marcadas para auxiliarem na identificação.

Após a transferência, a membrana foi colocada numa solução de bloqueio ou com leite seco desnatado (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; leite em pó desnatado 5 %, Tween 20 0,1 %) ou com albumina de soro bovino (BSA) (150 mM NaCl; 50 mM Tris-base; BSA 5 %, Tween 20 0,1 %) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário (Tabela 3) mantendo-o durante a noite a 4 °C com leve agitação.

Tabela 3 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de immunoblotting

Anticorpo	Marca	Diluição	Solução Bloqueio	Referência
NHE3 (clone 2B9)	doação	1:1000	Leite	(24)
NHE3 (clone 3H3)	doação	1:500	Leite	(72)
NHE3-PS552 (clone 14D5)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Leite	(72)
NHE3-PS605 (clone 10A8)	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Leite	(72)
Actina	Merck	1:50000	Leite	(84)
Vilina	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Leite	-
Megalina	doação	1:50000	Leite	(136)
DPPIV (clone 5E8)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Leite	(8)
PKA (C)	BD Biosciences	1:2000	Leite	-
PKA (RIα)	BD Biosciences	1:2000	Leite	-
PKA (RIIα)	BD Biosciences	1:2000	Leite	-
Ezrin	Invitrogen	1:1000	Leite	-
NHERF1	Alamone Labs	1:2000	Leite	-
NHERF2	Alpha Diagnostic Intl.	1:750	Leite	-
PP1α	Millipore	1:2000	BSA	-
PP1β	Millipore	1:2000	BSA	-
PP1γ	Millipore	1:2000	BSA	-

Foram feitas a seguir cinco lavagens, de 10 minutos cada, com solução bloqueio. A membrana foi então incubada por 1 hora com anticorpo secundário [goat anti-mouse ou goat anti-rabbit ou rabbit anti-goat (Invitrogen)] em solução de

bloqueio (1:2000 v/v) à temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada como acima descrito. Em seguida, adicionou-se ou PBS 1X ou TBS 1X para retirar o excesso de solução bloqueio, 2 vezes durante 2 minutos cada e incubou-se a membrana durante 1 minuto, sob leve agitação, com ECL (reagente para imunodeteção através de quimioluminescência). Em seguida, a membrana foi colocada em um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) para visualização das bandas para depois serem analisadas por densitometria (Image J).

3.10 Extração de RNA de córtex renal

O RNA foi isolado através da extração com isotiocianato de guanidina-fenolclorofórmio, conforme descrito por Puissant & Houdebine (1990). Uma vez isolado o córtex renal, este foi imediatamente colocado em 10 mL de “solução D” (4 M isotiocianato de guanidina; 1 M citrato de sódio, pH 7,0; lauril sarcosinato de sódio 0,5 %; 1 M β -mercaptoetanol). Esta suspensão foi submetida à homogeneização por meio de homogeneizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific) por aproximadamente 15 segundos. Seguiu-se a extração de RNA pela adição de 1 mL de acetato de sódio 2 M (pH 4,0) e 12 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamil (125:24:1 v/v) com posterior agitação em vórtex. A solução foi centrifugada a 3800 rpm por 45 minutos. No final da centrifugação, três fases distintas foram visualizadas. Na fase inferior encontrava-se o fenol-clorofórmio, na interfase o DNA e as proteínas e na fase superior (aquosa) estava o RNA, o qual foi cuidadosamente aspirado e transferido para outro tubo. A este tubo adicionou-se 10 mL de isopropanol (-20 °C), deixando a solução a -20 °C por 1 hora para que houvesse precipitação do RNA. Centrifugou-se a solução a 3800 rpm por 15

minutos a 4 °C, desprezando-se o sobrenadante e dissolvendo-se o “pellet” de RNA em 2 mL de 4 M LiCl para obter uma purificação mais eficiente do RNA. Outra centrifugação foi efetuada a 3800 rpm por 15 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o “pellet” ressuspensão em 2 mL de solução 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA e 0,5 % SDS. A esta solução adicionou-se 2 mL de clorofórmio-isoamil (24:1 v/v) e agitou-se em vórtex. Após as mesmas condições de centrifugação, coletou-se cerca de 2 mL do sobrenadante, adicionou-se 2 M acetato de sódio (pH 5,0) e 2 mL de isopropanol. Incubou-se em freezer -70 °C por 30 minutos. Após uma centrifugação a 3800 rpm por 20 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” de RNA obtido em água tratada com DEPC.

A concentração do RNA foi estimada por densidade óptica da solução por meio de espectrofotometria utilizando uma absorbância de 260 nm. Para a análise da pureza do RNA dividiu-se o valor da absorbância a 260 nm pelo valor obtido a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas). A faixa ideal que sugere boa qualidade da preparação deve variar entre 1,6 a 2,0. Em seguida, faz-se eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão 1X MOPS (40 mM MOPS, pH 7,0; 3 M acetato de sódio, pH 5,2) sob condições desnaturantes (formaldeído 1,7 %) para que as moléculas de RNA sejam fracionadas.

Amostras contendo 20 µg de RNA total foram aliqüotadas e, a estas, adicionou-se 25 µL de tampão de corrida (0,75 mL formamida; 0,15 mL 10X MOPS; 0,24 mL formaldeído 37 %; 0,1 mL água DEPC, glicerol 0,1 % e 0,08 mL de azul de bromofenol 10 %). As amostras foram então desnaturadas a 96 °C por 15 minutos e colocadas diretamente no gelo. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de agarose, imersas em tampão de corrida 1X MOPS e sujeitas a 50 mV. Ao término da

corrida, os RNA ribossômicos foram visualizados através de fluorescência proporcionada pela adição do corante fluorescente SYBRTM Green II (Molecular Probes, Inc.) ao gel. Este corante liga-se por interação eletrostática à cadeia principal das molecular de RNA. O gel foi incubado por 20 minutos, sob agitação, em solução contendo corante “SYBR Green II para RNA, diluído 200 vezes em tampão TBE 1X (89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8,0). Em seguida, a imagem foi digitalizada permitindo a visualização dos RNAs ribossômicos e, portanto, a verificação da integridade das moléculas de RNA.

3.11 Síntese de cDNA

Após a extração do RNA total do tecido renal, o passo seguinte foi a preparação do cDNA. Inicialmente, calculou-se o volume ideal de RNA a ser pipetado para cada amostra levando-se em conta uma concentração de 5 µg de RNA total /µL para cada amostra. Feito isso, as amostras tiveram seu volume completado para 10 µL com água isenta de RNases e foram deixadas incubando por 5 minutos a 65 °C. Após isso, elas foram diretamente para o gelo.

Em seguida foi preparada uma mistura de água livre de RNases, 1X First Strand Buffer, 0,01 M DTT, 0,5 nM dNTP, 0,025 nM Oligo dT, 1 U/uL RNAsin e 10 U/uL supertranscriptase reversa para cada amostra que então foi incubada a 50 °C por 2 horas, seguido de um aquecimento a 95 °C por 5 minutos. Ao final da reação obteve-se um estoque de cDNA na concentração de 250 ng/µL. As amostras foram armazenadas a -20 °C até o uso.

3.12 Avaliação da expressão gênica do NHE3

O conteúdo de mRNA NHE3 foi determinado pela reação de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time RT-PCR). Para a reação de Real-Time RT-PCR (SYBR[®] Green PCR Master Mix-PE Applied Biosystems) em um ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usou-se 15 ng de cDNA. O gene controle 28S foi usado para normalizar os resultados. O método CT comparativo foi usado para análise dos dados. Os primers utilizados foram: NHE3, 5'-ACTGCTTA-ATGACGCGGTGACTGT-3' (forward) e 5'-AAAGACGAAGCCAGGCTCGATGAT-3' (reverse), e 28S, 5'-TCATCAGACCCCAGAAAAGG-3' (forward) e 5'-GATTCGGCAGGTGAGTTG-3' (reverse).

3.13 Avaliação do efeito de um análogo de cAMP que ativa especificamente PKA (6MB-cAMP) sobre os níveis de fosforilação do NHE3

No dia do experimento, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina-xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente) e colocados em uma mesa cirúrgica aquecida para manter a temperatura constante. Depois de feita a traqueostomia, um cateter PE-50 foi inserido na veia jugular. Após o procedimento cirúrgico ter sido feito, uma infusão constante de 6MB-cAMP (5,0 µg/kg×min diluído em salina) ou de veículo (salina) foi iniciada a 0,04 mL/min por um período de uma hora. Os animais foram mortos por decapitação, os rins foram então removidos e sujeitos à extração de proteínas de membranas de córtex renal conforme descrito na página 28.

3.14 Atividade da PKA

A medição da atividade da PKA de forma quantitativa na fração correspondente às proteínas de membrana de córtex renal foi feita por meio de ELISA (PKA Kinase Activity – Enzo Life Sciences) utilizando um peptídeo sintético específico como substrato para a PKA e um anticorpo policlonal que reconhece a forma fosforilada deste substrato. Inicialmente, adicionou-se 5 mL de tampão de lise (20 mM MOPS, 50 mM β -glicerolfosfato, 50 mM NaF, 1 mM vanadato de sódio, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1% Triton, 1 mM DTT, 0,7 μ g/mL pepstatina A, 0,5 μ g/mL leupeptina e 40 μ g/mL PMSF) a cada 1 g de tecido. Em seguida, foi feita a homogeneização e a preparação de proteínas de membranas de córtex renal como já descrito (página 28). Das amostras resultantes, foi utilizado 1 μ g de proteína.

Fundamentalmente, o procedimento consiste em, primeiramente, colocar 50 μ L do tampão de diluição nos poços da microplaca contendo o substrato por 10 minutos. Ao retirá-lo, colocou-se 30 μ L do tampão de diluição (branco), da PKA ativa (diluída serialmente) e de amostra (em triplicata) para, em seguida, adicionar 10 μ L de ATP (exceto no branco) para iniciar a reação que ocorreu em uma incubação a 30°C por 90 minutos a 60 rpm. Tendo feito isso, descartou-se todo o conteúdo e foram adicionados 40 μ L do anticorpo fosfoespecífico para deixar incubando a 30°C por 60 minutos a 60 rpm.

Em sequência, os poços foram lavados com o tampão de lavagem 1X por quatro vezes e adicionou-se 40 μ L de anticorpo anti-rabbit IgG conjugado à HRP para incubar a 30°C por 30 minutos a 60 rpm. Quatro novas lavagens foram feitas para então adicionar 60 μ L do substrato TMB para incubar por 45 minutos. Atingindo-se a coloração azul, 20 μ L da solução de parada foram colocados em cada

poço para parar a reação produzindo uma coloração final amarela. A absorbância foi obtida medindo-se um comprimento de onda de 450 nm.

3.15 Atividade da fosfatase PP1

A medição da atividade da fosfatase de forma quantitativa na fração correspondente às proteínas de membrana de córtex renal foi feita por meio de ELISA (RediPlate™ 96 EnzChek® Serine/Threonine Phosphatase Assay – Molecular Probes) utilizando o substrato fluorogênico DiFMUP (6,8-difluor-4-metil-umbeliferil fosfatase). Fundamentalmente, o procedimento consiste em, primeiramente, adicionar 100 µL do tampão de reação 1X nos poços do padrão de referência da microplaca. Em seguida, foram adicionados 50 µL do tampão de reação 1X nos poços de teste misturando por pipetagem para solubilizar totalmente o substrato DiFMU antes de adicionar as amostras.

Em sequência, as amostras, o controle positivo e o controle negativo foram preparados, em duplicata. Diluiu-se as amostras no tampão de reação 1X de tal forma a se obter no fim um volume de 50 µL para ser adicionado em cada poço. Para validar a eficiência do substrato fluorogênico, nos poços referentes ao controle positivo diluiu-se no tampão de reação 1X um padrão enzimático apropriado com atividade conhecida, sendo o volume final também de 50 µL,. Para os poços referentes ao controle negativo foram adicionar apenas 50 µL do tampão de reação 1X.

Após o preparo, foram adicionados os 50 µL das amostras, do controle positivo e do controle negativo nos respectivos poços. Protegeu-se a microplaca da luz deixando-a incubar a 30 °C por, aproximadamente, 30 minutos. Este tempo pode

variar, pois, como o ensaio é contínuo, a fluorescência emitida pode ser medida em pontos de tempo múltiplos para seguir a cinética das reações. A fluorescência foi obtida medindo-se um comprimento de onda de 460 nm.

3.16 Análises Estatísticas

Os resultados apresentados são expressos como média $\pm$ erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por teste-t não pareado ou por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas (Software *GraphPad Prism 5*). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. n representa o número de experimentos realizados.

4. RESULTADOS

4.1 Pressão Arterial

Inicialmente, baseando-se nas caracterizações da Tabela 1, certificou-se de que a PA dos SHR adequava-se à classificação de pré-hipertensão e de hipertensão. Comparando-se tanto os animais jovens quanto os adultos observa-se que o SHR apresenta uma maior PA em relação ao WKY (Tabela 4). Embora a PA esteja elevada no J-SHR comparada ao controle, estes ratos ainda não desenvolveram a hipertensão e, por isso, estão em um estágio de pré-hipertensão. Já o A-SHR, por outro lado, está no estágio de hipertensão.

Tabela 4 – Peso corporal e pressão arterial de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade

	J-WKY	A-WKY	J-SHR	A-SHR
Peso (g)	132 ± 5 (16)	301 ± 8*** (16)	98 ± 3*** (18)	272 ± 5 ^{###} (16) %%
PAS (mmHg)	107 ± 4 (16)	106 ± 4 (15)	125 ± 2*** (18)	189 ± 5 ^{###} (16) %%%

A pressão arterial (PA) foi medida pelo método indireto de pletismografia de cauda. O número de animais por grupo está indicado dentro do parêntesis. ***P < 0,001 vs. J-WKY; ^{###}P < 0,001 vs. J-SHR; %%P < 0,01 e %%%P < 0,001 vs. A-WKY.

4.2 Reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 em túbulo proximal

Em virtude das discrepâncias encontradas na literatura com relação à modulação da atividade do NHE3 em SHR, um dos nossos objetivos foi avaliar a atividade do trocador Na^+/H^+ NHE3 *in vivo* em túbulo proximal de SHR pré-hipertensos e hipertensos. Para isso, realizamos experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* para determinar o fluxo de bicarbonato (J_{HCO_3}) dependente do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de ratos J-SHR e A-SHR e em ratos WKY de idade correspondente. Os experimentos foram feitos ou na presença ou na ausência de $2\mu\text{M}$ de S3226 (120), inibidor seletivo do NHE3. Conforme atesta a Figura 11A, ratos A-WKY apresentam aumento significativo da reabsorção de bicarbonato em túbulo proximal renal em comparação ao J-WKY ($2,04 \pm 0,19$ vs. $1,36 \pm 0,13$ $\text{nmol}/\text{cm}^2 \times \text{s}$, $P < 0,05$). Por sua vez, a reabsorção de bicarbonato em túbulo proximal foi significativamente mais baixa no A-SHR comparada à do J-SHR ($1,21 \pm 0,09$ vs. $1,90 \pm 0,19$ $\text{nmol}/\text{cm}^2 \times \text{s}$, $P < 0,001$). A reabsorção de bicarbonato insensível ao NHE3 foi equivalente entre as duas linhagens.

A diferença do J_{HCO_3} entre WKY e SHR foi ainda mais pronunciada quando se levou em conta apenas a reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3, ou seja, a reabsorção total de bicarbonato menos a reabsorção deste íon na presença do S3226 (Figura 11B). Os resultados mostrados na Figura 11B demonstram que a atividade *in vivo* do NHE3 foi reduzida em 62 ± 6 % ($P < 0,001$) na transição do J-SHR para o A-SHR enquanto foi aumentada em 113 ± 10 % ($P < 0,001$) na transição entre o J-WKY e o A-WKY (Figura 11B).

Figura 11 – Atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade. A reabsorção de bicarbonato (J_{HCO_3}) foi avaliada por meio de microperfusão estacionária e por medição contínua do pH luminal na ausência ou na presença de 2 μ M S3226. O número de túbulos perfundidos é indicado nas barras. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs. J-WKY; ### $P < 0,001$ vs. J-SHR. (A) Reabsorção de bicarbonato em túbulo proximal na presença ou na ausência de 2 μ M S3226. (B) Componente da reabsorção de bicarbonato em túbulo proximal sensível ao S3226.

4.3 Expressão do NHE3-mRNA em córtex renal

Nosso próximo objetivo foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos na modulação do NHE3 em túbulo proximal de ratos normotensos, pré-hipertensos e hipertensos.

Para isso, a quantidade relativa de NHE3-mRNA em córtex renal de ratos WKY e SHR foi determinada por real time RT-PCR usando primers específicos correspondentes à cauda C-terminal do NHE3. A expressão do NHE3 transcrito foi normalizada pela subunidade ribossômica 28S (28S-rRNA). A Figura 12 mostra que a expressão do NHE3-mRNA foi significativamente maior tanto no A-WKY quanto no A-SHR quando comparada aos ratos jovens da mesma linhagem.

Figura 12 – Avaliação da expressão gênica do NHE3 em córtex renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade. O conteúdo de mRNA do NHE3 foi determinado por reação de PCR em tempo real e os valores obtidos foram normalizados pela 28S-rRNA. N = 3 animais/grupo. **P < 0,01 vs. J-WKY; #P < 0,05 vs. J-SHR.

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

Similar ao padrão observado nas análises de expressão do NHE3-mRNA (Figura 12), observou-se que a expressão do NHE3 foi significativamente maior tanto no A-WKY quanto no A-SHR quando comparada aos ratos jovens da mesma linhagem (Figuras 13A e B).

Os níveis de fosforilação do NHE3 foram determinados usando um anticorpo monoclonal fosfoespecífico que reconhece o NHE3 somente quando este transportador está fosforilado na serina 552. Como visto nas Figuras 13A e C, a razão relativa do NHE3 fosforilado neste resíduo (P-NHE3/total) foi menor no córtex renal do A-WKY comparado à do J-WKY ($56 \pm 2 \%$, $P < 0,001$). Já o A-SHR exibiu maior P-NHE3/total em córtex renal em relação ao J-SHR ($71 \pm 2 \%$, $P < 0,001$). Os resultados mostrados nas Figuras 11 e 13C demonstram que as mudanças na razão P-NHE3/total que ocorrem em córtex renal correlacionam-se, inversamente, com as mudanças na função do NHE3.

Figura 13 – Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em córtex renal de WKY e SHR de 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Amostras equivalentes (15 μ g para o NHE3, 5 μ g para o NHE3-PS552 e 2,5 μ g para actina) de proteínas de membrana isoladas de córtex renal de ratos WKY e SHR foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para a membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". (A) As membranas PVDF foram incubadas com anticorpo monoclonal contra o NHE3 total (1:1000), contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (1:1000) e contra actina (1:50000). (B) Representação gráfica do nível de expressão relativo do NHE3 total normalizado pela actina e (C) da razão do NHE3-PS552 pelo NHE3 total (P-NHE3/total) em membranas de córtex renal. n = 5/grupo. **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. J-WKY; ##P < 0,01 e ###P < 0,001 vs. J-SHR.

4.5 Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em microvilosidades de túbulo proximal

O estado de fosforilação do NHE3 e o conteúdo protéico também foram avaliados nas MMVs do túbulo proximal provenientes de ratos WKY e SHR. Os dados da Figura 14 mostram que a expressão do NHE3 total nas MMV dos A-WKY está maior ($132 \pm 15 \%$, $P < 0,01$) e que a razão relativa do P-NHE3/total está significativamente menor do que no J-WKY ($41 \pm 6 \%$, $P < 0,01$). Já a expressão do NHE3 total nas MMV não variou entre o J-SHR e o A-SHR. Entretanto, a razão relativa do P-NHE3/total nas MMV está significativamente maior no A-SHR em relação ao J-SHR ($193 \pm 7 \%$, $P < 0,01$).

A)

B)

C)

Figura 14 – Expressão do NHE3 total e do fosforilado na serina 552 em membranas microvilares da borda em escova de WKY e SHR de 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Amostras equivalentes (15 μ g para o NHE3, 5 μ g para o NHE3-PS552 e 2,5 μ g para actina) de proteínas de MMV preparadas por agregação de cátion divalente de ratos WKY e SHR foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para a membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". (A) As membranas PVDF foram incubadas com anticorpo monoclonal contra o NHE3 total (1:1000), contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (1:1000) e contra actina (1:50000). (B) Representação gráfica do nível de expressão relativo do NHE3 total normalizado pela actina e (C) da razão do NHE3-PS552 pelo NHE3 total (P-NHE3/total) em MMV. n = 5/grupo. *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. J-WKY; ##P < 0,01 vs. J-SHR.

4.6 Distribuição subcelular do NHE3

Tendo verificado que a regulação diferencial da atividade do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão tem relação direta com o estado de fosforilação da serina 552 do mesmo, fomos avaliar a distribuição do NHE3 entre os subcompartimentos celulares já que foi demonstrado haver relação entre a fosforilação da serina 552 e o tráfego subcelular (71, 72).

A distribuição do NHE3 nos subcompartimentos da borda em escova foi avaliada no WKY e no SHR por meio de fracionamento subcelular e *immunoblotting*, sendo que para este último foram usados volumes equivalentes de amostras tanto do domínio microvilar (MMV) quanto do intermicrovilar (IMV). Ilustrada nas Figuras 15A-D, o marcador vilina está predominantemente expresso em MMV enquanto que o marcador megalina está muito mais expresso no IMV.

Como mostrado nas Figuras 15E e 15F, o NHE3 está praticamente igualmente distribuído entre os microdomínios tanto do J-WKY quanto do A-WKY. Por sua vez, este padrão de distribuição está alterado em SHR. De acordo com a Figura 14, verifica-se que o NHE3 está predominantemente confinado na MMV da borda em escova de túbulo proximal do J-SHR (Figura 15E), enquanto que no A-SHR está predominantemente confinado na IMV da borda em escova de túbulo proximal (Figura 15F).

A)

B)

C)

D)

Figura 15 – Distribuição do NHE3 nos microdomínios renais da borda em escova do J-SHR, do A-SHR e dos WKY de idade correspondente. Volumes equivalentes (25 μ L) de amostras de membranas microvilares (MMV) e de membranas intermicrovilares (IMV) obtidas dos rins do J (A, C e E)- ou do A (B, D e F)-SHR e do WKY por fracionamento foram analisadas por immunoblotting. As membranas PVDF foram incubadas com anticorpo para a vilina (A, B), para a megalina (C, D) e para o NHE3 (E, F). n = 5/grupo, [#]P < 0,05 vs. MMV-J-SHR; ^{&&}P < 0,01 vs. MMV-A-SHR.

Os dados até o momento mostram que as mudanças que ocorrem na atividade do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial estão relacionadas às alterações nos níveis de fosforilação e à redistribuição do NHE3 entre os microdomínios da borda em escova do túbulo proximal renal no modelo SHR.

4.7 Efeito do análogo ao cAMP sobre os níveis de fosforilação do NHE3 em córtex renal

Dada a importância da relação entre a fosforilação do sítio consenso para a PKA, serina 552, com a atividade do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR sob condições basais, examinamos o comportamento desta relação frente à ativação da PKA. Para tanto, ratos WKY e SHR de 5 e 14 semanas foram infundidos, por 60 min, com salina ou com o composto 6MB-cAMP (análogo ao cAMP que ativa especificamente a PKA) (5 µg/kg/min). Imediatamente após o término das infusões, proteínas de membrana de córtex renal foram isoladas destes animais seguindo o protocolo descrito na página 28. Primeiramente, fizemos experimentos de *immunoblotting* para verificar como estavam os níveis de fosforilação do NHE3 da serina 552 e da serina 605 em córtex renal (Figura 16).

A infusão de 6MB-cAMP aumentou a razão do NHE3 fosforilado na serina 552 em relação ao NHE3 total (PS552-NHE3/NHE3) nos quatro grupos de animais estudados (Figuras 16A e C). Contudo, ao compararmos o efeito do 6MB-cAMP sobre os níveis de fosforilação da serina 552 entre animais da mesma linhagem, verifica-se que há um aumento muito mais pronunciado da relação PS552-NHE3/NHE3 em J-SHR em comparação aos A-SHR (Figura 16D). Entretanto, esta variação não ocorre em ratos WKY (Figura 16D).

Por sua vez, observa-se que os níveis basais de PS605-NHE3/NHE3 são praticamente indetectáveis entre os grupos (Figuras 16A e E), que os aumentos nos níveis de PS605-NHE3/NHE3 foram semelhantes entre as diferentes idades dentro da mesma linhagem e que nos J- e A-WKY o aumento nos níveis de PS605-NHE3/NHE3 foi maior do que nos J- e A-SHR (Figura 16E).

Figura 16 – Efeito do 6MB-cAMP sobre os níveis de fosforilação do NHE3 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade foram infundidos com salina (barra sólida) ou com 6MB-cAMP (barra hachurada) a 5 µg/kg/min por 60 min. Os rins foram removidos, os córtices isolados e sujeitos a centrifugações para isolar a fração de membrana. As amostras resultantes foram quantificadas pelo Método de Lowry (15 µg para 3H3, 5 µg para PS552 e 100 µg para PS605) e submetidas à SDS-PAGE, transferidas para membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". **(A)** As membranas PVDF foram incubadas com anticorpo contra o NHE3 total (1:500), contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (1:2000), contra o NHE3 fosforilado na serina 605 (1:200) e contra a actina (1:50000). Representação gráfica do nível de expressão do **(B)** NHE3 total, do **(C)** NHE3 fosforilado na serina 552 e do **(E)** NHE3 fosforilado na serina 605. A porcentagem de aumento **(D e F)** foi obtida avaliando-se o quanto os níveis de fosforilação do NHE3 do grupo infundido com 6MB-cAMP foram aumentados em relação aos níveis de fosforilação do NHE3 do grupo de ratos infundidos com salina de mesma idade e linhagem. n = 4/grupo. ***P < 0,001 vs. J-WKY; *P < 0,05 vs. J-WKY + 6MB-cAMP; ###P < 0,001 vs. J-SHR; #P < 0,05 vs. J-SHR + 6MB-cAMP; %%%P < 0,001 vs. A-WKY; &&P < 0,01 vs. A-SHR. N.D. (não detectado).

4.8 Efeito do análogo ao cAMP na atividade do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal

A seguir, realizamos a análise do efeito do 6MB-cAMP sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal de ratos WKY e SHR por meio de experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* (Figura 17). Em consonância com os dados apresentados previamente, as análises funcionais apresentaram uma relação inversa com a fosforilação do sítio consenso para a PKA, serina 552. A perfusão de túbulos proximais renais com 6MB-cAMP (barra hachurada) causou uma diminuição da atividade do NHE3 em todos os grupos estudados (barra sólida) (Figura 17A). Na Figura 17B, observa-se que, assim como ocorre com os níveis de fosforilação da serina 552, há uma diminuição da resposta ao 6MB-cAMP no grupo A-SHR quando comparado ao J-SHR, ou seja, a ativação da PKA inibe muito mais pronunciadamente a atividade do NHE3 em J-SHR do que em A-SHR. De forma

similar ao observado nas análises moleculares, esta variação na resposta ao 6MB-cAMP não ocorre entre as idades em ratos WKY (Figura 17B).

Figura 17 – Efeito do 6MB-cAMP na atividade do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. A reabsorção de bicarbonato (J_{HCO_3}) em túbulo proximal foi avaliada por meio de microperfusão estacionária e por medição contínua do pH luminal na ausência (barra sólida) ou na presença (barra hachurada) do 6MB-cAMP. A porcentagem de inibição da atividade foi obtida avaliando-se o quanto o fluxo da reabsorção de bicarbonato (J_{HCO_3}) em túbulo proximal na presença do 6MB-cAMP foi diminuído em relação ao fluxo da reabsorção de bicarbonato (J_{HCO_3}) em túbulo proximal em condições fisiológicas nos ratos de mesma idade e linhagem. O número de túbulos perfundidos é indicado nas barras. *** $P < 0,001$ vs. J-WKY; %%% $P < 0,001$ vs. A-WKY; ### $P < 0,001$ vs. J-SHR; & $P < 0,05$ vs. A-SHR.

Estes dados mostram que os níveis de fosforilação e a função do NHE3 são diferencialmente modulados em túbulo proximal renal de animais WKY e SHR em

resposta à ativação da via da PKA, confirmando nossos achados prévios que definiram a importância da fosforilação da serina 552 na regulação do NHE3 nos períodos de pré-hipertensão e hipertensão. Além disso, sugerem que este mecanismo de regulação está sendo recrutado e quase saturado durante a hipertensão.

4.9 Atividade da PKA e expressão das subunidades da PKA em córtex renal

Subsequentemente, examinamos se a regulação diferencial do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão em SHR estava associada a alterações na atividade da PKA (Figura 18) e/ou na expressão das subunidades catalítica e regulatórias desta cinase (Figura 19). A medição da atividade da PKA nas preparações de proteínas de membranas de córtex renal foi feita por meio de ELISA utilizando-se um kit que contém um peptídeo sintético específico como substrato para a PKA e um anticorpo policlonal que reconhece a forma fosforilada deste substrato. Conforme mostrado na Figura 18, o ensaio realizado não apresentou diferença de atividade da PKA nas amostras provenientes dos quatro grupos de ratos analisados.

Figura 18 – Atividade da PKA em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Amostras de proteínas de membrana de córtex renal foram adicionadas aos poços contendo um substrato específico para a PKA seguidas da adição de ATP para iniciar a reação. Ao se encerrar a reação, adicionou-se um anticorpo primário fosfoespecífico que se ligou especificamente ao substrato fosforilado. Em seguida, os poços foram lavados e adicionou-se o anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Após novas lavagens, adicionou-se o substrato TMB (tetrametilbenzidina) que tornou visível o imunocomplexo formado (coloração azul). Por fim, um ácido foi adicionado para parar a reação produzindo uma coloração final amarela. A absorbância medida foi de 450 nm. N=4/grupo.

Os níveis de expressão das subunidades da PKA foram obtidos por *immunoblotting* usando anticorpos que reconhecem as subunidades regulatórias (RI α e RII α) e catalítica (C) da PKA. Os resultados mostram que não há diferença de expressão entre as linhagens, por idade, tanto da PKA (C) (Figura 19A) quanto da PKA (RII α) (Figura 19C). Entretanto, há um aumento da expressão da PKA (RI α) (Figura 19B) no A- SHR quando comparado ao J-SHR.

Figura 19 – Expressão das subunidades catalítica (C) e regulatórias (RI α e RII α) da PKA em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Amostras equivalentes (15 μ g) de proteínas de membrana isoladas de córtex renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para a membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". (A) Membranas PVDF incubadas com anticorpo contra a PKA (C) (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. (B) Membranas incubadas com anticorpo contra a PKA (RI α) (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. (C) Membranas incubadas com anticorpo contra a PKA (RII α) (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. Número de animais mostrado no gráfico de barras. [#]P < 0,05 vs. J-SHR.

4.10 Expressão da ezrin, da NHERF1 e da NHERF2 em córtex renal

Os experimentos feitos até agora sugerem que as alterações funcionais do NHE3 nos SHR não estão diretamente relacionadas com a atividade da PKA. Sendo assim, verificamos se estas alterações poderiam ser explicadas por meio de alterações na expressão de proteínas reguladoras que estão envolvidas na mediação da inibição do NHE3 por esta cinase tais como ezrin, NHERF1 e NHERF2. Os dados mostram não haver diferença de expressão entre os grupos com relação à ezrin (Figura 20A). Com relação à NHERF1, observa-se que não há diferença de expressão entre as

idades dentro da mesma linhagem (Figura 20B). Já a NHERF2 apresentou uma maior expressão no A-WKY em relação ao J-WKY enquanto não foi observado este aumento na linhagem SHR (Figura 20C) o que, possivelmente, possa causar um prejuízo.

Figura 20 – Expressão das proteínas que interagem com o NHE3 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Amostras equivalentes (15 µg para ezrin, 5 µg para NHERF1 e 15 µg para NHERF2) de proteínas de membrana isoladas de córtex renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para a membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". (A) Membranas PVDF incubadas com anticorpo contra a ezrin (1:1000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. (B) Membranas incubadas com anticorpo contra a NHERF1 (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. (C) Membranas incubadas com anticorpo contra a NHERF2 (1:750) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. Número de animais mostrado no gráfico de barras. ***P < 0,001 vs. J-WKY.

4.11 Atividade da PP1 e expressão das subunidades da PP1 em córtex renal

Nosso próximo objetivo foi investigar se existiriam possíveis alterações na atividade e/ou expressão das subunidades catalíticas da PP1 em túbulos proximais renais que contribuiriam para haver as alterações funcionais do NHE3 de SHR, tendo em vista que foi demonstrado que PP1 é a principal fosfatase envolvida na regulação e desforforilação do NHE3 no sítio 552 (44). Sendo assim, a medição da atividade da fosfatase nas preparações de córtex renal foi feita por meio de ELISA utilizando-se

um kit que contém o substrato fluorogênico DiFMU. O uso de inibidores específicos durante o ensaio assegurou a especificidade do kit à PP1. Conforme mostrado na Figura 21, o ensaio realizado mostrou haver uma diminuição de atividade da PP1 no A-SHR quando comparado ao J-SHR. Entretanto, não houve diferença na atividade catalítica desta fosfatase entre as idades no grupo WKY.

Figura 21 – Atividade da fosfatase PP1 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Inicialmente, solubilizou-se totalmente o substrato fluorogênico DiFMUP para, em seguida, serem adicionadas as amostras de proteínas de membrana de córtex renal possibilitando o início da reação. A placa foi deixada incubando a 30 °C por, aproximadamente, 30 minutos para, posteriormente, a fluorescência emitida ser medida usando-se uma excitação de 355 nm e uma detecção de 460 nm. N = 4/grupo. **P < 0,01 vs. J-SHR.

A seguir, avaliamos também os níveis de expressão das subunidades da PP1 por *immunoblotting* usando anticorpos que reconhecem as subunidades catalíticas (α , β e γ) da PP1. Coerente com a diminuição na atividade da PP1 em A-SHR em relação ao J-SHR observa-se que há uma diminuição na expressão da PP1 α em córtex renal no A-SHR em relação ao J-SHR (Figura 22A). Por sua vez, há um aumento na expressão da PP1 γ com a idade em ratos WKY e este aumento não ocorre na linhagem SHR (Figura 22C). Nenhuma variação foi observada no que se refere à expressão da PP1 β (Figura 22B).

A)

B)

Figura 22 – Expressão das subunidades catalíticas (α , β e γ) da PP1 em córtex renal de animais WKY e SHR com 5 (J) e 14 semanas (A) de idade. Amostras equivalentes (15 μ g) de proteínas de membrana isoladas de córtex renal de ratos WKY e SHR com 5 e 14 semanas de idade foram sujeitas à SDS-PAGE, transferidas para a membrana PVDF e analisadas por "immunoblotting". (A) Membranas incubadas com anticorpo contra a PP1 α (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. (B) Membranas incubadas com anticorpo contra a PP1 β (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. (C) Membranas incubadas com anticorpo contra a PP1 γ (1:2000) e contra a actina (1:50000) e a representação gráfica correspondente. Número de animais mostrado no gráfico de barras. ***P < 0,001 vs. J-WKY; ##P < 0,01 vs. J-SHR.

5. DISCUSSÃO

Os fatores que desencadeiam o aumento da pressão arterial em SHR não foram completamente elucidados. Entretanto, assim como na hipertensão essencial humana, anormalidades no manuseio renal de sódio, nos sistemas renina-angiotensina e simpático renal parecem ter papel crítico no início, no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão arterial.

LaPointe *et al.* (2002) reportaram que tanto a função como a abundância dos níveis de proteína do NHE3 encontram-se aumentados em borda em escova de túbulos proximais renais de SHR pré-hipertensos (4-6 semanas) e permanecem elevados após desenvolvimento de hipertensão moderada (6-7 semanas) e severa (8-13 semanas) quando comparados aos ratos WKY de idade correspondente (76). Estas observações sugerem que o aumento da atividade do NHE3 pode ser, em parte, responsável pelas anormalidades do manuseio renal de sódio presentes na hipertensão essencial. Por sua vez, Magyar *et al.* (2000) mostraram que o NHE3 encontra-se principalmente confinado no microdomínio das IMVs em túbulos proximais renais de SHR com hipertensão estabelecida (12 semanas). Além disso, em modelo experimental de hipertensão aguda, estes autores observaram que há uma redistribuição do NHE3 das MMVs para as IMVs e que esta redistribuição é acompanhada pelo aumento na fração de excreção de lítio, considerado um marcador da função reabsortiva do túbulo proximal renal (88). Portanto, os estudos de Magyar e colaboradores sugerem que o NHE3 desempenha papel compensatório frente ao aumento da pressão arterial.

Em virtude das discrepâncias encontradas na literatura com relação à modulação da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) em SHR, um dos objetivos

deste estudo foi examinar a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal na linhagem SHR no estágio de pré-hipertensão e hipertensão. A atividade deste transportador foi determinada por meio da taxa de reabsorção de bicarbonato mediada especificamente por NHE3 através de ensaios de microperfusão estacionária *in vivo*.

A análise destes experimentos indicou que a reabsorção de bicarbonato mediada pelo NHE3 foi aproximadamente 80 % maior no J-SHR do que no J-WKY e aproximadamente 70 % diminuída no A-SHR comparado ao A-WKY. Estes dados confirmam os de trabalhos anteriores que descreveram elevação da atividade do NHE3 antes do desenvolvimento da hipertensão em modelos genéticos de hipertensão essencial (59, 70, 76, 117).

Nossos dados são contrários aos de LaPointe *et al.* (2002) e aos de Kobayashi *et al.* (2004) os quais demonstraram que a atividade do NHE3 permanecia aumentada após o desenvolvimento da hipertensão no SHR. Tal divergência é provavelmente atribuída ao fato de que nossos estudos funcionais tenham sido realizados no túbulo proximal nativo em contraste aos modelos de cultura celular (70) ou às preparações *ex-vivo* (76). Embora os modelos *in vitro* sejam ferramentas valiosas para isolar e identificar determinados eventos, a aplicabilidade destes recursos para a elucidação de processos fisiológicos e fisiopatológicos pode ser limitada. Além disso, a inibição da atividade do NHE3 em A-SHR pode depender de fatores que não estejam presentes ou funcionais nas preparações *ex-vivo*.

Neste contexto, Panico *et al.* (2009), hipotetizaram que o aumento na produção renal de superóxido prejudica a função tubular proximal durante a hipertensão no SHR adulto. Para isso, foi medida a reabsorção de fluido em túbulo

proximal renal em ratos WKY e em ratos SHR. Os autores propõem que esta diminuição esteja relacionada ao aumento das espécies reativas de oxigênio, uma vez que a microperfusão direta de agentes redutores restabeleceu a função transportadora tubular proximal nestes animais. Além disso, sugerem que a reabsorção de fluido em túbulo proximal seja regulada pelo balanço redox (99). Os dados estão de acordo com nossos achados, já que a reabsorção de fluido em túbulo proximal estava reduzida no A-SHR em aproximadamente 60 % comparada a do A-WKY.

Outros estudos já haviam demonstrado uma diferença na reabsorção tubular proximal de fluido entre WKY e SHR. Thomas *et al.* (1988) investigaram as alterações na reabsorção tubular proximal de fluido relacionadas à idade. Em condições fisiológicas, a reabsorção foi maior no SHR de 5 e menor no de 7 e 12 semanas em relação ao WKY de idade correspondente, o que sugere a existência de uma fase de retenção de sódio no SHR de 5 semanas. Ao realizarem estes experimentos na presença do inibidor da enzima conversora de angiotensina, enalapril, os ratos WKY de todas as idades apresentaram uma redução de aproximadamente 15 % na reabsorção de fluido em relação ao seu controle. Já nos SHR esta redução só foi observada com 5 e 7 semanas (117). Além disso, Thomas *et al.* (1990) testaram a hipótese de que as alterações na reabsorção estimulada pela angiotensina II (Ang II) seriam associadas à responsividade alterada das células do túbulo proximal à Ang II. Eles verificaram que nos estágios iniciais de desenvolvimento da hipertensão no SHR, as alterações na resposta à Ang II peritubular contribuem para a retenção de sódio e consequente expansão do volume do fluido extracelular (118). Após cerca de uma década, um estudo feito por Cheng *et al.* (1998) evidenciou que este aumento na retenção de Na^+ dependente de Ang II

em SHR pré-hipertensos é, possivelmente, devido à maior abundância de receptores AT1 de Ang II em túbulo proximal renal (34).

Numerosos estudos têm tentado investigar as bases moleculares para a retenção de sódio e a expansão de volume no SHR. No que diz respeito à modulação do NHE3, a maioria destes estudos não encontrou diferenças significativas nos transcritos ou na abundância protéica do NHE3 entre linhagens de ratos hipertensos e normotensos (69, 88, 99, 130). De acordo com estes estudos, nós não encontramos qualquer variação significativa nos níveis de expressão do NHE3 entre o SHR e o WKY de mesma idade. Curiosamente, o NHE3-mRNA e a expressão protéica foram significativamente maiores tanto no A-WKY quanto no A-SHR em relação às linhagens correspondentes jovens. Este aumento é provavelmente devido às alterações ontogenéticas nas isoformas do trocador Na^+/H^+ em túbulos proximais (17).

Dados atuais apoiam a existência de uma mudança de expressão do NHE8 e do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal durante o desenvolvimento em virtude das demandas sobre o rim de mamíferos diferirem drasticamente da fase embrionária até o neonato e, posteriormente, da adulta. Com a maturação, há um aumento paralelo na atividade (13, 14, 16), na abundância protéica e nos transcritos do NHE3 (15). Portanto, no adulto, o NHE3 é o trocador Na^+/H^+ predominante na mediação da acidificação tubular proximal (109, 123, 128). Há dados que apóiam que o NHE8 seja a isoforma mais abundante no túbulo proximal do neonato e que a diminuição da expressão do NHE8 com o envelhecimento está associada à diminuição na reabsorção de bicarbonato em túbulo proximal observada em ratos adultos. A indução para que ocorra esta mudança do NHE8 para o NHE3 pode ser

intrínseca ao rim, secundária a fatores circulantes ou ambos. Até o momento, existem evidências apenas do controle endócrino (17, 49).

Por meio de microperfusão estacionária *in vivo* observou-se que a atividade do NHE3 foi reduzida em aproximadamente 60 % na transição do J-SHR para o A-SHR enquanto que aumentou em aproximadamente 110 % na transição do J-WKY para o A-WKY. Embora a função e a expressão do NHE3 aumentem simultaneamente com a idade no WKY, tal correlação não pode ser observada no SHR já que neste modelo ocorre diminuição tanto da função quanto da expressão do trocador com a idade. Isso implica que as mudanças que ocorrem na atividade do NHE3 durante o intervalo de 5 a 14 semanas na linhagem hipertensa são principalmente causadas por mecanismos pós-traducionais.

A fosforilação da serina 552 na região C-terminal do NHE3 é necessária para que a PKA exerça inibição da troca Na^+/H^+ e esta modificação covalente tem sido implicada no tráfego subcelular do transportador. O NHE3 fosforilado na serina 552 está predominantemente localizado na IMV, onde a reabsorção de sódio está reduzida, provavelmente, em virtude da baixa proximidade ao fluido tubular. Foi demonstrado por meio de fracionamento subcelular e por microscopia confocal que o NHE3 está redistribuído da MMV para a IMV em vários modelos animais experimentais de hipertensão aguda e crônica (92, 130). Estes achados sugerem que a inibição na reabsorção tubular proximal de sódio em resposta ao aumento da PA é mediada, pelo menos em parte, pela redistribuição do NHE3 da MMV em direção à IMV, a qual pode ser desencadeada pela fosforilação do NHE3 da serina 552. Além disso, a diminuição da distribuição do NHE3 na MMV em túbulo proximal renal

pode representar um dos mais importantes mecanismos mediadores da natriurese pressórica.

Estudos foram feitos para identificar os fatores intrarenais que relacionam hipertensão, redistribuição do NHE3 entre os microdomínios e diminuição no transporte tubular proximal de sódio. Estudos demonstraram que o cloreto de cobalto, um inibidor do metabolismo do citocromo P450, previne a redistribuição do NHE3 e atenua o fluxo urinário e o clearance do lítio após elevação da pressão de perfusão renal (63). Subsequentemente, estudos feitos demonstraram que o bloqueio crônico da formação renal de metabólitos do ácido aracdônico do citocromo P450, o ácido 20-hidroxicicosatetraenoico (20-HETE) e o ácido epoxieicosatrienoico (EETs), pelo composto 1-aminobenzotriazole (ABT), atenua a natriurese pressórica em ratos. Estes achados sugerem que os metabólitos do ácido aracdônico dependentes do citocromo P450 são fatores chave na mediação da inibição do transporte tubular proximal de sódio na natriurese pressórica. Além do mais, estes achados são consistentes com o fato de que o 20-HETE e o EETs estejam alterados na hipertensão e que a indução ou inibição crônica destes compostos seja capaz de modificar a PA tanto nos animais normotensos quanto nos hipertensos. No entanto, os mecanismos pelos quais o aumento da perfusão renal afeta a formação destes metabólitos precisam ainda ser elucidados (93).

Estudos indicam que o aumento da atividade do óxido nítrico (NO) intrarenal durante o aumento da pressão de perfusão renal possa também ser responsável pela natriurese pressórica (47, 89, 90, 107). O aumento na excreção de metabólitos do NO tem sido associado ao aumento da pressão de perfusão renal (87, 107). Além disso, a administração sistêmica de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) atenuou a

natriurese causada pelo rápido aumento da pressão (89, 90, 92, 107). Jin e colaboradores demonstraram que a natriurese pressórica é mediada por um mecanismo intrarenal por meio do qual um aumento na pressão de perfusão libera NO_2 resultando na extrusão de cGMP no interstício renal (66). O cGMP atua em túbulo proximal inibindo a reabsorção de Na^+ e induz a natriurese via PKG. Estudos futuros precisam ser realizados para definir se fatores intrarenais como metabólitos do citocromo P450 ou o NO são capazes de induzir a fosforilação no sítio consenso para a PKA na cauda C-terminal do NHE3, a serina 552, e se a fosforilação do NHE3 neste resíduo é necessária para induzir mudanças na redistribuição do NHE3 (Figura 23).

Deve ser mencionado que o NHE3 é altamente expresso no intestino delgado e que seus efeitos no volume extracelular e na PA são também mediados por uma diminuição na absorção intestinal de sal e água (109). Na tentativa de definir o papel do NHE3 renal na manutenção da PA sistêmica e na natriurese pressórica, Woo *et al.* geraram camundongos nocaute para o NHE3 com expressão transgênica do NHE3 no intestino delgado (tgNhe3^{-/-}). Eles observaram que os animais apresentaram algum grau de melhora em seu estado de depleção crônica de volume e toleraram maior amplitude de variações no consumo de sódio comparado ao camundongo nocaute para o NHE3 (Nhe3^{-/-}). Entretanto, eles permaneceram moderadamente hipotensos e tiveram redução do RFG em comparação ao camundongo selvagem (127). Em seguida, Noonan *et al.* demonstraram que a linhagem tgNhe3^{-/-} exibia uma resposta atenuada da natriurese pressórica em baixa pressão de perfusão renal (97) (Figura 23).

Figura 23 – Modelo de como o NHE3 participa da resposta à natriurese pressórica e de como sua função transportadora é diminuída na hipertensão. (A) Um aumento agudo e crônico da PA causa alterações na pressão de perfusão renal (PPR) que são percebidas pelos rins. Em resposta a estas alterações, a produção intrarenal de moléculas sinalizadoras tais como NO (87) e metabólitos do citocromo P450 (43, 135) aumentam. Algumas dessas moléculas sinalizadoras fazem com que o NHE3 mova-se para o domínio IMV. Ainda precisa ser estabelecido se alguns desses fatores são capazes de causar fosforilação no sítio consenso para a PKA (RRX/SLY) na cauda C-terminal do NHE3, a serina 552, e se a fosforilação do NHE3 neste resíduo é necessária para causar alterações na redistribuição do NHE3. A distribuição do NHE3 das MMVs para o domínio IMV leva à diminuição na reabsorção de Na^+ mediada pelo NHE3 em túbulo proximal e ao aumento na excreção de Na^+ . Tendo em vista o fato de que a distribuição subcelular do NHE3 não pode funcionar como um mecanismo natriurético em camundongos nocaute para o NHE3 com expressão transgênica do NHE3 no intestino delgado (tgNhe3-/-), a resposta da natriurese pressórica é atenuada nestes animais (97). (B) A hipertensão aguda e crônica provoca redistribuição do NHE3 para o domínio IMV a qual pode ser dependente do aumento da fosforilação do NHE3. Quando o NHE3 está fosforilado na serina 552 ele está predominantemente localizado no IMV aonde se postula que a reabsorção de Na^+ mediada pelo NHE3 esteja inibida. TP: túbulo proximal. (Reprodução modificada de Girardi ACC e Di Sole F / American Journal of Physiology – Cell Physiology, 2012) (51).

Uma das descobertas do nosso estudo é que as mudanças na reabsorção de bicarbonato (J_{HCO_3}) mediada pelo NHE3 em túbulo proximal renal do J-SHR e do A-SHR vs. WKY de idade correspondente correlacionam-se, negativamente, com as mudanças nos níveis de fosforilação do trocador na serina 552, *i. e.*, quanto maior a atividade, menor os níveis de fosforilação e, positivamente, com as mudanças na distribuição do NHE3 entre as MMV. No J-SHR, a razão do NHE3 fosforilado pelo NHE3 total em córtex renal foi significativamente menor comparada à do J-WKY (aproximadamente 70%) e similar em magnitude ao estímulo na atividade transportadora do NHE3 (aproximadamente 80%). Quando considerado esse quociente em termos de idade-dependência, a razão P-NHE3/total aumentou com a idade no SHR (aproximadamente 70%) correlacionando bem com a diminuição da atividade do NHE3 (aproximadamente 60%). Estes resultados sugerem que o

aumento da função do NHE3 em túbulo proximal no J-SHR é atribuído a alterações nas vias de sinalização que ou previnem a ativação de cinases ou superativam fosfatases.

Há evidências de que a capacidade dos agonistas do receptor D1 da dopamina em inibir o NHE3 tubular proximal renal e em induzir a natriurese esteja comprometida no SHR (82). Nestes animais, o receptor D1 está desacoplado do seu efetor adenilil ciclase e, por isso, não ativa a PKA. Semelhante ao NHE3, a fosforilação da subunidade α -1 da Na^+/K^+ -ATPase na serina 18 está diminuída em túbulos proximais do SHR jovem (62). Esta alteração no padrão de fosforilação aumenta o recrutamento da subunidade α -1 da Na^+/K^+ -ATPase para a membrana basolateral e, conseqüentemente, aumenta a reabsorção tubular proximal de sódio (77). Foi demonstrado que o aumento na entrada apical de sódio via NHE3 induz a um aumento na atividade da Na^+/K^+ -ATPase contribuindo para a retenção de sódio e para o aumento da pressão no SHR jovem (62). Os achados de que a elevação da concentração de sódio intracelular leva à desfosforilação da Na^+/K^+ -ATPase e os nossos dados apresentados na Figura 19 em que demonstramos que várias fosfoproteínas encontram-se menos fosforiladas por PKA em J-SHR comparados aos J-WKY reforçam esta hipótese (65). Dessa forma, ao elucidarmos as vias de sinalização que modulam a fosforilação de proteínas que medeiam o transporte renal de sódio revelamos importantes mecanismos relacionados com fisiopatologia da hipertensão arterial.

Tendo verificado uma correlação existente entre níveis de fosforilação da serina 552 e a atividade do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR, foi de interesse verificar se a via da PKA estaria alterada nessa

linhagem. Para isso, testamos a hipótese de que os níveis de fosforilação e a função do NHE3 seriam diferencialmente modulados em túbulo proximal de animais SHR em resposta à ativação da via da PKA. Em resposta ao 6MB-cAMP observou-se que quanto maior a fosforilação da serina 552 do NHE3 menor a atividade do trocador, da mesma maneira que em condições basais. Além disso, em A-SHR, a porcentagem de aumento do PS552-NHE3 e a porcentagem de inibição do NHE3 estão muito baixas em relação ao J-SHR sugerindo que haja uma fosforilação quase que máxima do NHE3 na serina 552 e uma inibição quase que máxima da atividade do mesmo por esta via, portanto, estímulos exógenos que ativem a PKA são capazes de causar pouca inibição adicional da atividade do trocador, sugerindo que no A-SHR, a fosforilação do NHE3 esteja contribuindo de forma expressiva na resposta compensatória do organismo ao aumento de pressão (natriurese pressórica).

A fosforilação do NHE3 da serina 552 é muito maior em relação à da 605 em uma situação basal. Entretanto, na presença de um estímulo exógeno a fosforilação na serina 605 torna-se muito evidente (72). Os resultados relacionados à fosforilação do NHE3 da serina 605 não se correlacionam com a atividade deste trocador, mas sugerem que o aumento de fosforilação em resposta a um estímulo exógeno que ativa a PKA possa estar prejudicado em SHR.

Em conjunto nossos dados sugerem que as alterações nos níveis de fosforilação do NHE3 entre os SHR jovem e adulto não podem ser atribuídos a variações na atividade da PKA. Sendo assim, verificamos se estas alterações poderiam ser explicadas por diferenças na expressão de proteínas reguladoras essenciais na mediação da fosforilação do trocador. O NHE3 está ancorado ao citoesqueleto em duas regiões: uma de ligação direta à ezrin e outra de ligação

indireta à ezrin por meio da família NHERF (31). Além disso, a inibição do NHE3 pela PKA depende da presença ou do NHERF1 ou do NHERF2, os quais permitem que a subunidade catalítica da PKA fosforile o NHE3 (Figura 7) (75, 132). Nossos resultados mostram que não há diferença de expressão da ezrin, do NHERF1 e nem do NHERF2 entre o J-SHR e o A-SHR. Embora os resultados referentes a estas proteínas acessórias mostrem que elas não contribuem diretamente para a diferença de atividade do NHE3 existente entre as duas idades do SHR, há trabalhos que demonstraram um aumento tanto em níveis protéicos (99) quanto em níveis de mRNA (70) do NHERF2 em túbulo proximal de SHR após o desenvolvimento da hipertensão, o que poderia contribuir para um maior nível de fosforilação do NHE3 em A-SHR.

Muito se sabe sobre a regulação do NHE3 por meio de cinases. Entretanto, o papel das fosfatases na desfosforilação e na regulação deste trocador é pouco estudado. Diante disso, Dynia *et al.* (2009) avaliaram os efeitos da caliculina A (inibidor da PP1 e PP2A) e do ácido ocadaico (inibidor da PP2A) nos níveis de fosforilação do NHE3. Os experimentos feitos em células OKP mostraram que a alteração na atividade do NHE3 por meio da desfosforilação é devida, principalmente, à PP1, já que o tratamento com caliculina A levou a um aumento nos níveis de fosforilação das serinas 552 e 605 enquanto que o com ácido ocadaico nenhuma alteração nos níveis de fosforilação foi detectada (44). Sendo assim, verificamos o possível papel de fosfatases na regulação diferencial do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR. Nossos dados correlacionam-se com o fato de se ter menor fosforilação e maior atividade do NHE3 no J-SHR e maior fosforilação e menor atividade deste trocador no A-SHR, ou seja,

correlacionam-se com o fato de a atividade do NHE3 estar aumentada antes do desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR jovem pré-hipertenso e diminuída após o desenvolvimento da hipertensão. Isso nos sugere que seja a ação de fosfatases a maior responsável pela diferença nos níveis de fosforilação do NHE3 antes e após o desenvolvimento da hipertensão arterial em SHR.

6. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados apresentados indicam que a função transportadora do NHE3 está aumentada em túbulo proximal do SHR antes do desenvolvimento da hipertensão e diminuída após esta estar estabelecida comparada ao controle normotenso WKY de idade correspondente. Notavelmente, a atividade do NHE3 é reduzida com a idade no SHR enquanto que no WKY ela é aumentada na transição entre jovem e adulto. O aumento na atividade do NHE3 no J-SHR (comparado ou ao J-WKY ou ao A-SHR) é acompanhado pela redistribuição do NHE3 da IMV para a MMV e pela diminuição nos níveis de fosforilação na serina 552. No A-SHR, todos estes mecanismos regulatórios parecem funcionar de maneira oposta para reduzir a reabsorção tubular proximal de sódio. Nossos dados são consistentes com a idéia de que o aumento da atividade do NHE3 em túbulo proximal contribui para o desenvolvimento da hipertensão no J-SHR (59, 70, 76, 117). Ademais, nossos dados sugerem que, uma vez estabelecida a hipertensão, a redução na atividade do NHE3 represente uma parte integral da resposta do mecanismo de natriurese-pressórica para contrabalancear o aumento da pressão (2, 88, 129, 131).

Por fim, conclui-se também que a fosfatase (PP1) é, possivelmente, a responsável por manter o NHE3 menos fosforilado no resíduo 552 em SHR de 5 semanas e mais fosforilado no SHR de 14 semanas.

7. REFERÊNCIAS

1. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol* 95: 1-51, 2010.
2. **Aggen JB, Nairn AC, and Chamberlin R.** Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 7: R13-23, 2000.
3. **Altun B, and Arici M.** Salt and blood pressure: time to challenge. *Cardiology* 105: 9-16, 2006.
4. **Amemiya M, Kusano E, Muto S, Tabei K, Ando Y, Alpern RJ, and Asano Y.** Glucagon acutely inhibits but chronically activates Na(+)/H(+) antiporter 3 activity in OKP cells. *Exp Nephrol* 10: 26-33, 2002.
5. **Amemiya M, Loffing J, Lotscher M, Kaissling B, Alpern RJ, and Moe OW.** Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. *Kidney Int* 48: 1206-1215, 1995.
6. **Amieux PS, and McKnight GS.** The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann N Y Acad Sci* 968: 75-95, 2002.
7. **Amorim JB, Musa-Aziz R, Lessa LM, Malnic G, and Fonteles MC.** Effect of uroganylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 1003-1010, 2006.
8. **Ariyoshi M, Mizuno M, Morisue Y, Shimada M, Fujita S, Nasu J, Okada H, Shimomura H, Yamamoto K, and Tsuji T.** Identification of a target antigen recognized by a mouse monoclonal antibody to the bile canalicular surface of rat hepatocytes with a random phage display library. *Acta medica Okayama* 56: 187-191, 2002.
9. **Aronow WS, Fleg JL, Pepine CJ, Artinian NT, Bakris G, Brown AS, Ferdinand KC, Ann Forciea M, Frishman WH, Jaigobin C, Kostis JB, Mancia G, Oparil S, Ortiz E, Reisin E, Rich MW, Schocken DD, Weber MA, and Wesley DJ.** ACCF/AHA 2011 expert consensus document on hypertension in the elderly: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus documents developed in collaboration with the American Academy of Neurology, American Geriatrics Society, American Society for Preventive Cardiology, American Society of Hypertension, American Society of Nephrology, Association of Black Cardiologists, and European Society of Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 57: 2037-2114, 2011.
10. **Aronson PS.** Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annu Rev Physiol* 47: 545-560, 1985.
11. **Bacic D, Kaissling B, McLeroy P, Zou L, Baum M, and Moe OW.** Dopamine acutely decreases apical membrane Na/H exchanger NHE3 protein in mouse renal proximal tubule. *Kidney Int* 64: 2133-2141, 2003.

12. **Barradeau S, Imaizumi-Scherrer T, Weiss MC, and Faust DM.** Intracellular targeting of the type-I alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Trends Cardiovasc Med* 12: 235-241, 2002.
13. **Baum M.** Developmental changes in rabbit juxtamedullary proximal convoluted tubule acidification. *Pediatr Res* 31: 411-414, 1992.
14. **Baum M.** Neonatal rabbit juxtamedullary proximal convoluted tubule acidification. *J Clin Invest* 85: 499-506, 1990.
15. **Baum M, Biemesderfer D, Gentry D, and Aronson PS.** Ontogeny of rabbit renal cortical NHE3 and NHE1: effect of glucocorticoids. *Am J Physiol* 268: F815-820, 1995.
16. **Beck JC, Lipkowitz MS, and Abramson RG.** Ontogeny of Na/H antiporter activity in rabbit renal brush border membrane vesicles. *J Clin Invest* 87: 2067-2076, 1991.
17. **Becker AM, Zhang J, Goyal S, Dwarakanath V, Aronson PS, Moe OW, and Baum M.** Ontogeny of NHE8 in the rat proximal tubule. *American journal of physiology* 293: F255-261, 2007.
18. **Bennett D, Lyulcheva E, Alphey L, and Hawcroft G.** Towards a comprehensive analysis of the protein phosphatase 1 interactome in *Drosophila*. *J Mol Biol* 364: 196-212, 2006.
19. **Bezerra CN, Girardi AC, Carraro-Lacroix LR, and Reboucas NA.** Mechanisms underlying the long-term regulation of NHE3 by parathyroid hormone. *American journal of physiology* 294: F1232-1237, 2008.
20. **Bie P, Wamberg S, and Kjolby M.** Volume natriuresis vs. pressure natriuresis. *Acta Physiol Scand* 181: 495-503, 2004.
21. **Biemesderfer D, DeGray B, and Aronson PS.** Active (9.6 s) and inactive (21 s) oligomers of NHE3 in microdomains of the renal brush border. *The Journal of biological chemistry* 276: 10161-10167, 2001.
22. **Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, and Aronson PS.** NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *Am J Physiol* 265: F736-742, 1993.
23. **Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, and Aronson PS.** Immunocytochemical characterization of Na(+)-H⁺ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am J Physiol* 263: F833-840, 1992.
24. **Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, and Aronson PS.** Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol* 273: F289-299, 1997.

25. **Booth AG, and Kenny AJ.** A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem J* 142: 575-581, 1974.
26. **Boron WF, and Boulpaep EL.** *Medical Physiology*. 2008.
27. **Brooks HL, Sorensen AM, Terris J, Schultheis PJ, Lorenz JN, Shull GE, and Knepper MA.** Profiling of renal tubule Na⁺ transporter abundances in NHE3 and NCC null mice using targeted proteomics. *J Physiol* 530: 359-366, 2001.
28. **Cano A.** Characterization of the rat NHE3 promoter. *Am J Physiol* 271: F629-636, 1996.
29. **Carraro-Lacroix LR, Malnic G, and Girardi AC.** Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells. *American journal of physiology* 297: F1647-1655, 2009.
30. **Ceulemans H, and Bollen M.** Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84: 1-39, 2004.
31. **Cha B, Tse M, Yun C, Kovbasnjuk O, Mohan S, Hubbard A, Arpin M, and Donowitz M.** The NHE3 juxtamembrane cytoplasmic domain directly binds ezrin: dual role in NHE3 trafficking and mobility in the brush border. *Mol Biol Cell* 17: 2661-2673, 2006.
32. **Chambrey R, Achard JM, St John PL, Abrahamson DR, and Warnock DG.** Evidence for an amiloride-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger in rat renal cortical tubules. *Am J Physiol* 273: C1064-1074, 1997.
33. **Chambrey R, Warnock DG, Podevin RA, Bruneval P, Mandet C, Belair MF, Bariety J, and Paillard M.** Immunolocalization of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE2 in rat kidney. *Am J Physiol* 275: F379-386, 1998.
34. **Cheng HF, Wang JL, Vinson GP, and Harris RC.** Young SHR express increased type 1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 274: F10-17, 1998.
35. **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ, Joint National Committee on Prevention DE, Treatment of High Blood Pressure. National Heart L, Blood I, and National High Blood Pressure Education Program Coordinating C.** Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42: 1206-1252, 2003.
36. **Cohen PT.** Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115: 241-256, 2002.

37. **Cohen PT, Brewis ND, Hughes V, and Mann DJ.** Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett* 268: 355-359, 1990.
38. **Collazo R, Fan L, Hu MC, Zhao H, Wiederkehr MR, and Moe OW.** Acute regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 275: 31601-31608, 2000.
39. **Crajoinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BP, Lessa LM, Malnic G, and Girardi AC.** Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *American journal of physiology* 301: F355-363, 2011.
40. **Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, Kashgarian M, Whelchel JD, Jones P, and Diethelm AG.** Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med* 309: 1009-1015, 1983.
41. **Dahl LK, Heine M, and Thompson K.** Genetic influence of the kidneys on blood pressure. Evidence from chronic renal homografts in rats with opposite predispositions to hypertension. *Circ Res* 40: 94-101, 1974.
42. **Donowitz M, and Li X.** Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev* 87: 825-872, 2007.
43. **Dos Santos EA, Dahly-Vernon AJ, Hoagland KM, and Roman RJ.** Inhibition of the formation of EETs and 20-HETE with 1-aminobenzotriazole attenuates pressure natriuresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R58-68, 2004.
44. **Dynia DW, Steinmetz AG, and Kocinsky HS.** NHE3 function and phosphorylation are regulated by a calyculin A-sensitive phosphatase. *American journal of physiology* 298: F745-753, 2010.
45. **Evans RG, Majid DS, and Eppel GA.** Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 400-409, 2005.
46. **Fan L, Wiederkehr MR, Collazo R, Wang H, Crowder LA, and Moe OW.** Dual mechanisms of regulation of Na/H exchanger NHE-3 by parathyroid hormone in rat kidney. *The Journal of biological chemistry* 274: 11289-11295, 1999.
47. **Fenoy FJ, Ferrer P, Carbonell L, and Garcia-Salom M.** Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis. *Hypertension* 25: 408-414, 1995.
48. **Fernandez R, Lopes MJ, de Lira RF, Dantas WF, Cragoe Junior EJ, and Malnic G.** Mechanism of acidification along cortical distal tubule of the rat. *Am J Physiol* 266: F218-226, 1994.

49. **Fiori M, Gras EG, and Amorena C.** Decreased NHE8 isoform expression and defective acidification in proximal convoluted tubules of senile rats. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 31: 77-84, 2009.
50. **Girardi AC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, and Aronson PS.** Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule. *The Journal of biological chemistry* 276: 46671-46677, 2001.
51. **Girardi AC, and Di Sole F.** Deciphering the mechanisms of the Na⁺/H⁺ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *American journal of physiology Cell physiology* 302: C1569-1587, 2012.
52. **Girardi AC, Titan SM, Malnic G, and Reboucas NA.** Chronic effect of parathyroid hormone on NHE3 expression in rat renal proximal tubules. *Kidney Int* 58: 1623-1631, 2000.
53. **Girardi ACC, and Carraro-Lacroix LR.** Regulation of Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 3 by Protein Kinase A in the Renal Proximal Tubule. In: *Protein Kinases*, edited by Xavier GdS2012.
54. **Gold MG, Barford D, and Komander D.** Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr Opin Struct Biol* 16: 693-701, 2006.
55. **Gomes P, and Soares-da-Silva P.** Dopamine acutely decreases type 3 Na(+)/H(+) exchanger activity in renal OK cells through the activation of protein kinases A and C signalling cascades. *Eur J Pharmacol* 488: 51-59, 2004.
56. **Guyton AC.** Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816, 1991.
57. **Guyton AC, Cowley AW, Jr., Coleman TG, DeClue JW, Norman RA, and Manning RD.** Hypertension: a disease of abnormal circulatory control. *Chest* 65: 328-338, 1974.
58. **Hansson V, Skalhogg BS, and Tasken 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* 73: 81-92, 2000.
59. **Hayashi M, Yoshida T, Monkawa T, Yamaji Y, Sato S, and Saruta T.** Na⁺/H⁺-exchanger 3 activity and its gene in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Journal of hypertension* 15: 43-48, 1997.
60. **He P, and Yun CC.** Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. *J Biomed Biotechnol* 2010: 238080, 2010.

61. **Heller J, Schubert G, Havlickova J, and Thureau K.** The role of the kidney in the development of hypertension: a transplantation study in the Prague hypertensive rat. *Pflugers Arch* 425: 208-212, 1993.
62. **Hinojos CA, and Doris PA.** Altered subcellular distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in proximal tubules in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 44: 95-100, 2004.
63. **Hoagland KM, Flasch AK, and Roman RJ.** Inhibitors of 20-HETE formation promote salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension* 42: 669-673, 2003.
64. **Hu MC, Fan L, Crowder LA, Karim-Jimenez Z, Murer H, and Moe OW.** Dopamine acutely stimulates Na⁺/H⁺ exchanger (NHE3) endocytosis via clathrin-coated vesicles: dependence on protein kinase A-mediated NHE3 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 276: 26906-26915, 2001.
65. **Ibarra FR, Cheng SX, Agren M, Svensson LB, Aizman O, and Aperia A.** Intracellular sodium modulates the state of protein kinase C phosphorylation of rat proximal tubule Na⁺,K⁺-ATPase. *Acta Physiol Scand* 175: 165-171, 2002.
66. **Jin XH, McGrath HE, Gildea JJ, Siragy HM, Felder RA, and Carey RM.** Renal interstitial guanosine cyclic 3', 5'-monophosphate mediates pressure-natriuresis via protein kinase G. *Hypertension* 43: 1133-1139, 2004.
67. **Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, and Rodriguez-Iturbe B.** Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *Journal of hypertension* 26: 381-391, 2008.
68. **Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, and He J.** Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217-223, 2005.
69. **Kim SW, Wang W, Kwon TH, Knepper MA, Frokiaer J, and Nielsen S.** Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology* 289: F957-968, 2005.
70. **Kobayashi K, Monkawa T, Hayashi M, and Saruta T.** Expression of the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory protein family in genetically hypertensive rats. *Journal of hypertension* 22: 1723-1730, 2004.
71. **Kocinsky HS, Dynia DW, Wang T, and Aronson PS.** NHE3 phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity. *American journal of physiology* 293: F212-218, 2007.

72. **Kocinsky HS, Girardi AC, Biemesderfer D, Nguyen T, Mentone S, Orlowski J, and Aronson PS.** Use of phospho-specific antibodies to determine the phosphorylation of endogenous Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 at PKA consensus sites. *American journal of physiology* 289: F249-258, 2005.
73. **Kurashima K, Yu FH, Cabado AG, Szabo EZ, Grinstein S, and 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. *The Journal of biological chemistry* 272: 28672-28679, 1997.
74. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
75. **Lamprecht G, Weinman EJ, and Yun CH.** The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *The Journal of biological chemistry* 273: 29972-29978, 1998.
76. **LaPointe MS, Sodhi C, Sahai A, and Batlle D.** Na⁺/H⁺ exchange activity and NHE-3 expression in renal tubules from the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int* 62: 157-165, 2002.
77. **Lecuona E, Dada LA, Sun H, Butti ML, Zhou G, Chew TL, and Sznajder JI.** Na,K-ATPase alpha1-subunit dephosphorylation by protein phosphatase 2A is necessary for its recruitment to the plasma membrane. *FASEB J* 20: 2618-2620, 2006.
78. **Ledoussal C, Lorenz JN, Nieman ML, Soleimani M, Schultheis PJ, and Shull GE.** Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger but not in mice lacking NHE2. *American journal of physiology* 281: F718-727, 2001.
79. **Lerman LO, Chade AR, Sica V, and Napoli C.** Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* 146: 160-173, 2005.
80. **Lessa LM, Amorim JB, Fonteles MC, and Malnic G.** Effect of renoguanlylin on hydrogen/bicarbonate ion transport in rat renal tubules. *Regul Pept* 157: 37-43, 2009.
81. **Lessa LM, Carraro-Lacroix LR, Crajoinas RO, Bezerra CN, Dariolli R, Girardi AC, Fonteles MC, and Malnic G.** Mechanisms underlying the inhibitory effects of uroguanylin on NHE3 transport activity in renal proximal tubule. *American journal of physiology* 2012.
82. **Li XX, Xu J, Zheng S, Albrecht FE, Robillard JE, Eisner GM, and Jose PA.** D(1) dopamine receptor regulation of NHE3 during development in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1650-1656, 2001.

83. **Lifton RP, Gharavi AG, and Geller DS.** Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556, 2001.
84. **Lin JJ.** Monoclonal antibodies against myofibrillar components of rat skeletal muscle decorate the intermediate filaments of cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 2335-2339, 1981.
85. **Lorenz JN, Schultheis PJ, Traynor T, Shull GE, and Schnermann J.** Micropuncture analysis of single-nephron function in NHE3-deficient mice. *Am J Physiol* 277: F447-453, 1999.
86. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193: 265-275, 1951.
87. **Madrid MI, Salom MG, Tornel J, Lopez E, and Fenoy FJ.** Interactions between nitric oxide and renal nerves on pressure-diuresis and natriuresis. *J Am Soc Nephrol* 9: 1588-1595, 1998.
88. **Magyar CE, Zhang Y, Holstein-Rathlou NH, and McDonough AA.** Proximal tubule Na transporter responses are the same during acute and chronic hypertension. *American journal of physiology* 279: F358-369, 2000.
89. **Majid DS, Omoro SA, Chin SY, and Navar LG.** Intrarenal nitric oxide activity and pressure natriuresis in anesthetized dogs. *Hypertension* 32: 266-272, 1998.
90. **Majid DS, Said KE, and Omoro SA.** Responses to acute changes in arterial pressure on renal medullary nitric oxide activity in dogs. *Hypertension* 34: 832-836, 1999.
91. **Mayer G.** An update on the relationship between the kidney, salt and hypertension. *Wien Med Wochenschr* 158: 365-369, 2008.
92. **McDonough AA, Leong PK, and Yang LE.** Mechanisms of pressure natriuresis: how blood pressure regulates renal sodium transport. *Ann N Y Acad Sci* 986: 669-677, 2003.
93. **Moreno C, Maier KG, Hoagland KM, Yu M, and Roman RJ.** Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Am J Hypertens* 14: 90S-97S, 2001.
94. **Mumby MC, and Walter G.** Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 73: 673-699, 1993.
95. **Murray AJ.** Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 1: re4, 2008.

96. **Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, and Kanazawa H.** Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *The Journal of biological chemistry* 280: 1561-1572, 2005.
97. **Noonan WT, Woo AL, Nieman ML, Prasad V, Schultheis PJ, Shull GE, and Lorenz JN.** Blood pressure maintenance in NHE3-deficient mice with transgenic expression of NHE3 in small intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R685-691, 2005.
98. **Okamoto K, and Aoki K.** Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27: 282-293, 1963.
99. **Panico C, Luo Z, Damiano S, Artigiano F, Gill P, and Welch WJ.** Renal proximal tubular reabsorption is reduced in adult spontaneously hypertensive rats: roles of superoxide and Na⁺/H⁺ exchanger 3. *Hypertension* 54: 1291-1297, 2009.
100. **Pouyssegur J.** Molecular biology and hormonal regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Ren Physiol Biochem* 17: 190-193, 1994.
101. **Rettig R, Folberth C, Stauss H, Kopf D, Waldherr R, and Unger T.** Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol* 258: F606-611, 1990.
102. **Rettig R, Folberth CG, Graf C, Kopf D, Stauss H, and Unger T.** Post-transplantation hypertension in recipients of renal grafts from hypertensive donor rats. *Clin Invest Med* 14: 492-498, 1991.
103. **Ritz E, Adamczak M, and Zeier M.** Kidney and hypertension-causes. Update 2003. *Herz* 28: 663-667, 2003.
104. **Robinson-White A, and Stratakis CA.** Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Ann N Y Acad Sci* 968: 256-270, 2002.
105. **Rodman JS, Seidman L, and Farquhar MG.** The membrane composition of coated pits, microvilli, endosomes, and lysosomes is distinctive in the rat kidney proximal tubule cell. *J Cell Biol* 102: 77-87, 1986.
106. **Sabolic I, and Burckhardt G.** ATP-driven proton transport in vesicles from the kidney cortex. *Methods Enzymol* 191: 505-520, 1990.
107. **Salom MG, Lahera V, Miranda-Guardiola F, and Romero JC.** Blockade of pressure natriuresis induced by inhibition of renal synthesis of nitric oxide in dogs. *Am J Physiol* 262: F718-722, 1992.
108. **Sarikonda KV, Watson RE, Opara OC, and Dipette DJ.** Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens* 3: 158-165, 2009.

109. **Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, and Shull GE.** Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 19: 282-285, 1998.
110. **Shi Y.** Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139: 468-484, 2009.
111. **Sim AT, and Scott JD.** Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26: 209-217, 1999.
112. **Skalhegg BS, and Tasken K.** Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci* 5: D678-693, 2000.
113. **Strack S, Kini S, Ebner FF, Wadzinski BE, and Colbran RJ.** Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J Comp Neurol* 413: 373-384, 1999.
114. **Szaszi K, Paulsen A, Szabo EZ, Numata M, Grinstein S, and Orlowski J.** Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 isoform. Regulation by phosphatidylinositol 3'-kinase and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 277: 42623-42632, 2002.
115. **Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, and Anand GS.** Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta* 1754: 25-37, 2005.
116. **Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E, and Anand G.** PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697: 259-269, 2004.
117. **Thomas D, Harris PJ, and Morgan TO.** Age-related changes in angiotensin II-stimulated proximal tubule fluid reabsorption in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens Suppl* 6: S449-451, 1988.
118. **Thomas D, Harris PJ, and Morgan TO.** Altered responsiveness of proximal tubule fluid reabsorption of peritubular angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 8: 407-410, 1990.
119. **Trippodo NC, and Frohlich ED.** Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 48: 309-319, 1981.
120. **Vallon V, Schwark JR, Richter K, and Hropot M.** Role of Na(+)/H(+) exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *American journal of physiology* 278: F375-379, 2000.

121. **Vereshchagina N, Bennett D, Szoor B, Kirchner J, Gross S, Vissi E, White-Cooper H, and Alphey L.** The essential role of PP1 β in *Drosophila* is to regulate nonmuscle myosin. *Mol Biol Cell* 15: 4395-4405, 2004.
122. **Wang B, Zhang P, and Wei Q.** Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Sci China C Life Sci* 51: 487-494, 2008.
123. **Wang T, Yang CL, Abbiati T, Schultheis PJ, Shull GE, Giebisch G, and Aronson PS.** Mechanism of proximal tubule bicarbonate absorption in NHE3 null mice. *Am J Physiol* 277: F298-302, 1999.
124. **Weinman EJ, Dubinsky WP, and Shenolikar S.** Reconstitution of cAMP-dependent protein kinase regulated renal Na⁺-H⁺ exchanger. *J Membr Biol* 101: 11-18, 1988.
125. **Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, and 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* 95: 2143-2149, 1995.
126. **Williams B.** The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol* 55: 65-73, 2010.
127. **Woo AL, Noonan WT, Schultheis PJ, Neumann JC, Manning PA, Lorenz JN, and Shull GE.** Renal function in NHE3-deficient mice with transgenic rescue of small intestinal absorptive defect. *American journal of physiology* 284: F1190-1198, 2003.
128. **Wu MS, Biemesderfer D, Giebisch G, and Aronson PS.** Role of NHE3 in mediating renal brush border Na⁺-H⁺ exchange. Adaptation to metabolic acidosis. *The Journal of biological chemistry* 271: 32749-32752, 1996.
129. **Yang LE, Leong PK, and McDonough AA.** Reducing blood pressure in SHR with enalapril provokes redistribution of NHE3, NaPi2, and NCC and decreases NaPi2 and ACE abundance. *American journal of physiology* 293: F1197-1208, 2007.
130. **Yip KP, Tse CM, McDonough AA, and Marsh DJ.** Redistribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubules induced by acute and chronic hypertension. *Am J Physiol* 275: F565-575, 1998.
131. **Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, and Sidor A.** NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *The Journal of biological chemistry* 273: 25856-25863, 1998.
132. **Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, and Donowitz M.** cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3010-3015, 1997.

133. **Zatz R.** *Bases Fisiológicas da Nefrologia*. São Paulo: 2012, p. 416.
134. **Zhang Y, Norian JM, Magyar CE, Holstein-Rathlou NH, Mircheff AK, and McDonough AA.** In vivo PTH provokes apical NHE3 and NaPi2 redistribution and Na-K-ATPase inhibition. *Am J Physiol* 276: F711-719, 1999.
135. **Zhang YB, Magyar CE, Holstein-Rathlou NH, and McDonough AA.** The cytochrome P-450 inhibitor cobalt chloride prevents inhibition of renal Na,K-ATPase and redistribution of apical NHE-3 during acute hypertension. *J Am Soc Nephrol* 9: 531-537, 1998.
136. **Zou Z, Chung B, Nguyen T, Mentone S, Thomson B, and Biemesderfer D.** Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. *The Journal of biological chemistry* 279: 34302-34310, 2004.