RENATO DE OLIVEIRA CRAJOINAS

Papel da via receptor AT1/proteína Gi e da proteína motora miosina IIA no aumento da atividade do NHE3 pela angiotensina II em túbulo proximal renal

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Adriana
Castello Costa Girardi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2017

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

Papel da via receptor AT1/proteína Gi e da proteína motora miosina IIA no aumento da atividade do NHE3 pela angiotensina II em túbulo proximal renal / Renato de Oliveira Crajoinas -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1. Antiportador de sódio e hidrogênio 2.Túbulos renais proximais 3. Angiotensina II 4. Proteínas quinases dependentes de AMP cíclico 5. Miosina tipo II

USP/FM/DBD-297/17

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã que, com
muita paciência, incentivo, força, amor
e carinho, não mediram esforços para
que eu chegasse até esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Adriana Castello Costa Girardi por esses quase dez anos de orientação (desde minha Iniciação Científica). É uma imensa honra e orgulho ter como orientadora uma pessoa competente, dedicada, profissional e responsável. Obrigado pela confiança, por acreditar no meu potencial, por todas as oportunidades que me ofereceu ao longo desses anos e, principalmente, por contribuir a cada dia para o meu crescimento intelectual, profissional e pessoal.

À Dra. Alicia McDonough (*University of Southern California* – Los Angeles, CA) por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender novas técnicas e realizar alguns experimentos do meu Doutorado. Obrigado pela orientação e pelos ensinamentos.

À Donna Ralph por ter me ensinado novas técnicas durante os meses que estive no laboratório da Dra. Alicia McDonough.

Aos pesquisadores do laboratório de Biofísica Renal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), Prof. Dr. Gerhard Malnic e Regiane Cardoso Castello Branco, por me ensinarem e colaborarem nos experimentos de microperfusão.

Aos professores que participaram da Banca de Qualificação: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic, Profa. Dra. Nancy Amaral Rebouças e Profa. Dra. Sílvia Maria de Oliveira Titan. As discussões e sugestões foram essenciais para o enriquecimento do trabalho.

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 pelo apoio em todas as possíveis situações ao longo destes anos.

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

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

William George Ward

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O rim	1
1.1.1. O túbulo proximal e a reabsorção de Na ⁺	4
1.1.2. Trocador Na ⁺ /H ⁺ (NHE)	7
1.1.3. Isoforma 3 do trocador Na ⁺ /H ⁺ (NHE3)	9
1.1.3.1. Regulação do trocador Na ⁺ /H ⁺ NHE3 em túbulo proximal renal	11
1.2. Angiotensina II	17
1.2.1. Angiotensina II e túbulo proximal	22
1.2.2. Angiotensina II e NHE3	23
1.3. Miosinas	25
1.3.1. Miosina II	28
1.3.2. Miosina IIA e rim	28
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Estudos <i>in vitro</i> – Células OKP	32
3.2. Recuperação do pH intracelular em células OKP	32
3.3. Biotinilação de proteínas de membrana celular	35
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS para proteína	36

3.5.	<i>Immunoblotting</i>	37
3.6.	Atividade da PKA	39
3.7.	Níveis de cAMP	41
3.8.	Modelo Experimental – Rato	42
3.9.	Determinação da atividade do NHE3	43
3.10.	Imunofluorescência	47
3.11.	Fracionamento de membranas celulares por gradiente de densidade	48
3.12.	Determinação da concentração de proteínas	49
3.13.	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS para proteína <i>e immunoblotting</i>	50
3.14.	Avaliação de complexos proteicos com Blue Native-PAGE (BN-PAGE)Análises Estatísticas	52
3.15.	Análises Estatísticas	55
4.	RESULTADOS	56
4.1.	Papel da via AT1R/Gi no aumento da atividade do NHE3 pela Ang II em túbulo proximal renal	56
4.1.1.	Ang II não afeta os níveis de fosforilação do NHE3 mediados por PKA na serina 552 em células OKP em condições basais	56
4.1.2.	Ang II contrapõe-se à produção de cAMP e à ativação da PKA mediadas pela FSK em células OKP	63
4.1.3.	Ang II contrapõe-se à fosforilação do NHE3 mediada pela PKA em células OKP	66
4.1.4.	Ang II contrapõe-se aos efeitos da FSK sobre a atividade e os níveis de fosforilação do NHE3 via AT1R em células OKP	69
4.1.5.	O bloqueio da via da proteína Gi previne o efeito estimulatório da Ang II sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar	72
4.2.	Papel da proteína motora miosina IIA no aumento da	76

atividade do NHE3 pela Ang II em túbulo proximal renal	
4.2.1. A miosina IIA está envolvida na regulação do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar	76
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μ : micro

Ang II: angiotensina II

AT1R: receptor de angiotensina II tipo 1

ATP: adenosina trifosfato

BSA: albumina de soro bovino

Ca^{+2} : cálcio

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

Cl^- : cloreto

CO_2 : dióxido de carbono

CTRL: controle

DAG: 1,2-diacilglicerol

DPPIV: dipeptidil peptidase IV

ECA: enzima conversora de angiotensina

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FSK: forskolin

g: grama

GDP: guanosina difosfato

GLP-1: peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GPCR: receptore acoplado à proteína G

GTP: guanosina trifosfato

h: hora

H^+ : hidrogênio

H_2CO_3 : ácido carbônico

H_2O : água

HCO_3^- : bicarbonato

IP3: 1,4,5-trifosfato de inositol

IRBIT: *IP₃ receptor-binding protein released with IP₃*

$\text{J}_{\text{HCO}_3^-}$: fluxo de bicarbonato

K^+ : potássio

L: litro

m: mili

M: molar

Mg⁺²: magnésio

min: minuto

n: nano

Na⁺: sódio

NaCl: cloreto de sódio

NHE: trocador sódio-hidrogênio

°C: grau Celsius

OKP: células de túbulo proximal de opossum (*Didelphis marsupialis*)

pH: potencial hidrogeniônico

Pi: fosfato inorgânico

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PKA: proteína cinase dependente de cAMP

PKC: proteína cinase C

PS552: serina 552 fosforilada

PTH: paratormônio

PTX: toxina pertussis

PVDF: fluoreto de polivinilideno

SDS: dodecil-sulfato de sódio

Ser: aminoácido serina

SRA: Sistema Renina Angiotensina

Thr: aminoácido treonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração representativa de um rim e de um néfron	2
Figura 2 – Ilustração representativa do processo de formação da urina	3
Figura 3 – Modelo que representa a localização dos segmentos S1 e S3 em túbulo proximal renal	4
Figura 4 – Modelo celular simplificado que representa a reabsorção de Na^+ via trocador Na^+/H^+ em túbulo proximal renal	6
Figura 5 – Representação da estrutura secundária dos trocadores Na^+/H^+ (NHE)	8
Figura 6 – Representação da distribuição subcelular do NHE3 em túbulo proximal renal	15
Figura 7 – Representação simplificada do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona clássico	18
Figura 8 – Representação simplificada dos domínios de diferentes classes de miosinas	27
Figura 9 – <i>Immunoblotting</i> de lisado de células OKP	39
Figura 10 – Representação esquemática do sistema de microperfusão estacionária <i>in vivo</i> em túbulo proximal renal de rato	45
Figura 11 – Representação de curvas obtidas durante os experimentos de microperfusão estacionária <i>in vivo</i> em túbulo proximal renal de ratos Wistar	46
Figura 12 – <i>Immunoblotting</i> de fração obtida por fracionamento de membranas celulares por gradiente de densidade de córtex renal de	52

rato

Figura 13 – Distribuição dos complexos proteicos contendo NHE3 e DPPIV	54
Figura 14 – Efeito dose-dependente da Ang II sobre a atividade do NHE3 em células OKP	57
Figura 15 – Efeito tempo-dependente da Ang II sobre a atividade do NHE3 em células OKP	58
Figura 16 – Efeitos da Ang II na atividade do NHE3 e da PKA em células OKP	60
Figura 17 – Efeitos da Ang II sobre os níveis de fosforilação do NHE3 no sítio consenso para PKA em células OKP	63
Figura 18 – Efeito tempo-dependente da Ang II na via de sinalização cAMP/PKA e nos níveis de fosforilação dos substratos para PKA em células OKP expostas à Forskolin	66
Figura 19 – Efeito oposto da Ang II e da Forskolin na atividade do NHE3 em células OKP	67
Figura 20 – Efeito oposto da Ang II e da Forskolin nos níveis de fosforilação do NHE3 em células OKP	68
Figura 21 – Efeito do bloqueio do receptor AT1 na atividade do NHE3 em células OKP tratadas com Forskolin e/ou Ang II	69
Figura 22 – Efeito do bloqueio do receptor AT1 nos níveis de fosforilação do NHE3 em células OKP tratadas com Forskolin e/ou Ang II	71
Figura 23 – Efeito da toxina pertussis na atividade do NHE3 e nos seus níveis de fosforilação no sítio consenso para PKA em células OKP	74

Figura 24 – Efeito da toxina pertussis na atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de rato Wistar	75
Figura 25 – Efeito da blebistatina na atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de rato Wistar	77
Figura 26 – Expressão do NHE3 na superfície de células OKP	78
Figura 27 – Distribuição da miosina IIA, do NHE3 e da podocina	80
Figura 28 – Distribuição dos complexos proteicos contendo NHE3 e miosina IIA	81
Figura 29 – Efeitos da Ang II na localização do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de rato Wistar	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de <i>immunoblotting</i>	38
Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de <i>immunoblotting</i>	51
Tabela 3 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de <i>immunoblotting</i>	53

RESUMO

Crajoínas RO. Papel da via receptor AT1/proteína Gi e da proteína motora miosina IIA no aumento da atividade do NHE3 pela angiotensina II em túbulo proximal renal [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3), presente em membrana apical, é a proteína de transporte que medeia a maior parte da reabsorção de NaCl e NaHCO_3^- em túbulo proximal renal. A fosforilação direta do NHE3 por PKA na serina 552 é um dos mecanismos pelos quais a sua atividade pode ser inibida. A ligação da angiotensina II (Ang II) ao receptor AT1 (AT1R) em túbulo proximal estimula a atividade do NHE3 por diferentes vias de sinalização. Entretanto, não foram ainda bem estabelecidos os efeitos da ativação da via AT1R/Gi, com consequente diminuição nos níveis de cAMP, na regulação do NHE3. A Ang II pode ainda estimular a atividade do NHE3 por promover a sua translocação da base para o corpo das microvilosidades, entretanto, o papel da proteína motora miosina IIA nesta translocação em resposta à Ang II ainda não foi estabelecido. Sendo assim esta tese teve como objetivos: (1) testar a hipótese de que a Ang II diminui os níveis de fosforilação do NHE3 mediados pelo cAMP/PKA na serina 552 aumentando a sua atividade por reduzir os níveis de cAMP e (2) testar a hipótese de que a miosina IIA participa da redistribuição do NHE3 da base para o corpo das microvilosidades em túbulo proximal renal em condições de estímulo da reabsorção de sódio, como ocorre em resposta à Ang II. Visando avaliar os efeitos da ativação da via AT1R/Gi na regulação do NHE3, verificamos, por meio da técnica de recuperação do pH dependente de Na^+ , que, em condições basais, a Ang II estimulou a atividade do NHE3, mas não alterou a atividade da PKA e nem afetou os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 em uma linhagem de células de túbulo proximal (OKP). Entretanto, na presença da forskolin (FSK), agente que eleva os níveis intracelulares de cAMP, a Ang II foi capaz de contrapor-se ao efeito inibitório da FSK sobre o NHE3 por promover redução na concentração de cAMP, diminuição da atividade da PKA e, consequentemente, diminuição nos

níveis de fosforilação da serina 552. Todos os efeitos da Ang II foram bloqueados quando um pré-tratamento com Losartan, antagonista do receptor AT1, foi feito nas células OKP, destacando a contribuição da via AT1R/proteína Gi no aumento da atividade do NHE3 pela Ang II. Observamos que a inibição da proteína Gi com PTX (toxina pertussis) diminuiu a atividade do NHE3 em células OKP e que a PTX diminuiu a atividade do NHE3 assim como preveniu o efeito estimulatório da Ang II sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal de ratos Wistar. Adicionalmente, com a intenção de avaliar os efeitos da miosina IIA na redistribuição do NHE3, constatamos que a blebistatina, inibidor da miosina IIA, preveniu completamente o aumento de atividade do NHE3 mediado pela Ang II em ratos Wistar e que o uso da blebistatina foi capaz de prevenir o aumento do NHE3 na superfície de células OKP tratadas com Ang II. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a Ang II contrapõe-se aos efeitos do cAMP/PKA sobre a fosforilação e a atividade do NHE3 pela ativação da via AT1R/Gi e que a miosina IIA desempenha um papel na mediação da regulação da atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos em resposta à Ang II. Sugerem ainda que a desfosforilação do NHE3 na serina 552 pode representar um evento chave na regulação do manuseio de sal tubular proximal pela Ang II na presença de hormônios natriuréticos que promovem o aumento dos níveis de cAMP e da fosforilação do transportador e que a miosina IIA está envolvida na regulação do tráfego do NHE3 em túbulo proximal renal.

Descritores: Antiportador de sódio e hidrogênio; Túbulos renais proximais; Angiotensina II; Proteínas quinases dependentes de AMP cíclico; Miosina tipo II.

ABSTRACT

Crajoinas RO. Role of the AT1 receptor/Gi protein pathway and the myosin IIA motor protein in the upregulation of NHE3 activity by angiotensin II in the renal proximal tubule [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3), expressed on the apical membrane, is responsible for most NaCl and NaHCO₃⁻ reabsorption in the renal proximal tubule. Direct phosphorylation of NHE3 by PKA at serine 552 is one of the mechanisms by which its activity is inhibited. Binding of angiotensin II (Ang II) to the AT1 receptor (AT1R) in the proximal tubule stimulates NHE3 activity through multiple signaling pathways. However, the effects of AT1R/Gi activation and subsequent decrease in cAMP accumulation on NHE3 regulation are not well established. Ang II can also stimulate NHE3 activity by promoting its translocations from the base to the body of the microvilli, however, the role of the myosin IIA motor protein in this translocation in response to Ang II is not yet established. Therefore, the aims of this thesis are: (1) to test the hypothesis that Ang II decreases the cAMP/PKA-mediated NHE3 phosphorylation levels at serine 552 increasing its activity by reducing cAMP levels and (2) to test the hypothesis that myosin IIA participates in the NHE3 redistribution from the base to the body of the microvilli in the renal proximal tubule under conditions in which sodium reabsorption is stimulated, such as in response to Ang II. In order to evaluate the effects of AT1R/Gi pathway activation on NHE3 regulation, by means the intracellular pH recovery technique, we verified that under basal conditions, Ang II stimulated NHE3 activity but did not affect PKA-mediated NHE3 phosphorylation at serine 552 in opossum kidney (OKP) cells. However, in the presence of the cAMP-elevating agent forskolin (FSK), Ang II counteracted FSK-induced NHE3 inhibition, reduced intracellular cAMP concentrations, lowered PKA activity, and prevented the FSK-mediated increase in NHE3 serine 552 phosphorylation. All effects of Ang II were blocked by pretreating OKP cells with the AT1R antagonist Losartan, highlighting the contribution of the AT1R/Gi pathway in Ang II-mediated NHE3 upregulation

under cAMP-elevating conditions. We also verified that Gi protein inhibition by pertussis toxin treatment decreased NHE3 activity both *in vitro* and *in vivo* and, more importantly, prevented the stimulatory effect of Ang II on NHE3 activity in Wistar rat proximal tubules. Additionally, we assessed the effects of myosin IIA on NHE3 redistribution, and found that blebbistatin, a myosin IIA inhibitor, completely prevented the increase of Ang II-mediated NHE3 activity in Wistar rats and that blebbistatin was able to prevent the increase of NHE3 on the Ang II-treated OKP cells surface. Collectively, our results suggest that Ang II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 phosphorylation and inhibition by activating the AT1R/Gi pathway and that myosin IIA plays a role in mediating the NHE3 activity regulation in the rat renal proximal tubule in response to Ang II. Furthermore, these findings support the notion that NHE3 dephosphorylation at serine 552 may represent a key event in the regulation of renal proximal tubule sodium handling by Ang II in the presence of natriuretic hormones that promote cAMP accumulation and transporter phosphorylation, and that myosin IIA is involved in NHE3 trafficking regulation in the renal proximal tubule.

Descriptors: Sodium-hydrogen antiporter; Kidney tubules, proximal; Angiotensin II; Cyclic AMP-dependent protein kinases; Myosin type II.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O rim

Os rins são órgãos pares em forma de grão de feijão com uma borda convexa e outra côncava. Estão localizados junto à parede posterior do abdome fora da cavidade peritoneal, um de cada lado da coluna vertebral, sendo que o rim direito está posicionado ligeiramente mais abaixo que o rim esquerdo. Por meio da filtração diária de 180 L de plasma e pela produção de, aproximadamente, 1,5 a 2,0 L de urina, os rins contribuem para a manutenção dos níveis pressóricos, do volume sanguíneo e da regulação do equilíbrio ácido-base. Além disso, removem produtos finais do metabolismo dos aminoácidos, da creatina muscular, dos ácidos nucleicos, da hemoglobina e de hormônios. A função excretora dos rins permite também que produtos indesejáveis como fármacos, pesticidas, entre outras substâncias, sejam eliminados do organismo. Além das funções reguladora e excretora, o rim é também um órgão endócrino, produzindo e secretando renina, calcitriol e eritropoietina (16, 24, 203).

Ao realizar um corte frontal no rim é possível observar duas regiões distintas: o córtex e a medula. Na parte exterior, o córtex renal, que tipicamente apresenta uma cor acastanhada e com aparência granulosa, encontram-se os glomérulos, túbulos proximais, túbulos distais e os ductos coletores corticais. A parte mais interior, a medula renal, apresenta uma cor mais clara com

aparência estriada resultante do arranjo paralelo da alça de Henle, dos ductos coletores medulares e vasos sanguíneos da medula (203).

O néfron é a unidade funcional dos rins, sendo que cada rim é constituído por cerca de 1 milhão de néfrons. Cada néfron apresenta um componente esférico filtrante chamado de corpúsculo renal e um túbulo longo. O corpúsculo renal é formado pela cápsula de Bowman e por um enovelado capilar denominado glomérulo. No glomérulo ocorre a ultrafiltração do sangue e, pela cápsula de Bowman, o filtrado sai em direção ao túbulo renal que é composto por túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (Figura 1) (203).

Figura 1 – Ilustração representativa de um rim e de um néfron. Representação esquemática evidenciando as principais regiões do néfron. (Disponível em: <https://s0www.utdlab.com/contents/image?imageKey=PI/82497> – modificado).

Ao deixar a cápsula de Bowman e passar pelo túbulo, o plasma filtrado é modificado pela reabsorção de água e solutos específicos que retornam ao sangue ou pela secreção de outras substâncias dos capilares peritubulares para o túbulo. A formação da urina envolve estes três processos básicos: filtração de plasma pelos glomérulos, reabsorção de água e solutos do ultrafiltrado e secreção de solutos específicos para o fluido tubular (Figura 2) (203).

Figura 2 – Ilustração representativa do processo de formação da urina. Representação esquemática com os processos básicos envolvidos no processo de formação da urina: filtração (primeira seta laranja), reabsorção (setas azuis) e secreção (setas verdes). (Disponível em: <http://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/12/entendendo-o-que-e-filtracao-reabsorcao.html>).

Embora, aproximadamente, 180 L 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 de reabsorção e de 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. Neste processo, destaca-se a importância do túbulo proximal já que este segmento é responsável pela reabsorção de aproximadamente 70 % da água,

70 % de Na^+ , 55 % de Cl^- e 85 % de HCO_3^- , além de outros solutos, filtrados pelos glomérulos (24).

1.1.1. O túbulo proximal e a reabsorção de Na^+

O túbulo proximal renal possui uma porção inicial convoluta que é continuação direta do epitélio parietal da cápsula de Bowman e uma porção reta encontrada em regiões corticais mais profundas. Morfologicamente, o túbulo proximal pode ser dividido em três segmentos distintos: S1, S2 e S3. O segmento S1 é a porção inicial do túbulo proximal, começando no glomérulo e continuando por cerca de um terço da parte convoluta. O segmento S2 consiste no restante da parte convoluta e a parte inicial da reta. O segmento S3 compreende ao restante da parte reta que se estende até a medula. 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 (24, 203).

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 luminal da membrana proporcionando uma extensa área para o transporte de íons e outras substâncias.

No segmento S1 a captação do Na^+ se dá acoplada ou ao H^+ ou a solutos orgânicos como glicose, 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. Com relação à entrada na célula associada a solutos, nesta, tanto o Na^+ quanto os outros solutos entram na célula (16, 203).

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 fluido tubular com o HCO_3^- filtrado, formando ácido carbônico (H_2CO_3), que se dissocia em forma de H_2O e CO_2 . A dissociação é catalisada pela enzima anidrase carbônica tipo IV na membrana apical das células tubulares proximais. O CO_2 difunde-se passivamente através da membrana apical para dentro da célula, onde se combina com H_2O , formando H_2CO_3 . A hidratação intracelular de CO_2 é catalisada pela anidrase carbônica tipo II 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 (Figura 4) (16, 203).

Figura 4 – Modelo celular simplificado que representa a reabsorção de Na⁺ via trocador Na⁺/H⁺ em túbulo proximal renal. Ilustração representativa da absorção de bicarbonato de forma indireta em segmento S1 e da absorção de Na⁺ acoplada ao Cl⁻ pelo segmento S3 em túbulo proximal renal.

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 chegar ao sangue – quanto pela paracelular – na qual os íons têm um caminho extracelular para chegar ao sangue. Esta reabsorção preferencial por Cl⁻ se dá porque o fluido tubular que chega ao segmento contém poucos solutos orgânicos e alta concentração de Cl⁻ comparada ao segmento S1, sendo esta alta concentração em virtude da reabsorção preferencial de Na⁺ com HCO₃⁻ e solutos orgânicos no segmento S1 (16, 203).

A reabsorção de Na⁺ pela via transcelular se dá por ação paralela entre os trocadores Na⁺/H⁺ e ânion-Cl⁻ que tem como consequência a captação de NaCl da luz tubular para dentro da célula (Figura 4). 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 se torne carregado positivamente em relação ao sangue, sendo que esta voltagem positiva induz o movimento de Na^+ para fora do fluido tubular em direção ao sangue. Então, a reabsorção de NaCl acaba criando um gradiente osmótico que faz com que a água seja reabsorvida de forma passiva (16, 203).

Em todos os casos em que houve entrada de Na^+ para dentro da célula este sai em direção ao sangue via $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ e via cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. A $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 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 acaba sendo reabsorvido em TP.

1.1.2. Trocador Na^+/H^+ (NHE)

A atividade do trocador Na^+/H^+ foi inicialmente demonstrada na bactéria *Streptococcus faecalis* (72). Em mamíferos, o trocador foi primeiramente descrito em membranas de borda em escova isoladas do córtex renal e em intestino delgado de ratos (132). O gene do trocador foi identificado e clonado pela primeira vez em 1989 (157). Desde então, diferentes isoformas foram descritas em praticamente todas as células procarióticas e eucarióticas (159).

A família de NHE medeia o contratransporte de um Na^+ extracelular por um H^+ intracelular pela membrana plasmática das células (5). Por estar envolvido com fluxos iônicos, o NHE é essencial para a homeostase do fluido intra e extracelular, a regulação do volume celular e o transporte epitelial de íons e água (76). A estrutura primária do NHE foi descrita primeiramente por

Sardet e colaboradores (157) e estudos posteriores de clonagem levaram à identificação das demais isoformas. Os NHEs têm distribuição ubíqua e as diferentes isoformas identificadas apresentam características, mecanismos regulatórios e distribuição tecidual e celular distintos. Apesar da heterogeneidade em suas sequências, existe uma similaridade de topologia na membrana entre todas as isoformas: o domínio N-terminal com 12 segmentos transmembrânicos constituído por aproximadamente 500 aminoácidos relativamente conservado entre as isoformas é responsável pela função de transporte dos NHEs realizando a troca Na^+/H^+ e o domínio C-terminal citoplasmático hidrofílico, com pouca similaridade entre as isoformas, que exerce a ação modulatória sobre o domínio funcional (Figura 5) (51, 145). As diferenças existentes no domínio C-terminal refletem as diferenças existentes na regulação diferencial das isoformas de NHE frente aos diversos estímulos.

Figura 5 – Representação da estrutura secundária dos trocadores Na^+/H^+ (NHE). Todas as isoformas de NHE apresentam de 10-12 segmentos transmembrana. [Reprodução modificada de (51)].

Atualmente, 13 isoformas de NHE conservadas evolutivamente são conhecidas em mamíferos e elas podem ser divididas em três subgrupos: o subgrupo SLC9A que engloba as isoformas associadas à membrana plasmática (NHE1-5) e as isoformas predominantemente intracelulares (NHE6-9), o subgrupo SLC9B (NHA1-2) que recentemente foi descrito como necessário para o controle da mobilidade do espermatozóide e da fertilidade masculina e o subgrupo SLC9C (NHE10-11) que consiste de uma isoforma específica de membrana plasmática de espermatozóide (SLC9C1) e uma isoforma ubíqua para a qual não há dados funcionais atualmente (SLC9C2) (36, 38, 52, 59).

1.1.3. Isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3)

O NHE3 está presente, principalmente, na membrana apical das células epiteliais renais e gastrointestinais (27, 79), mas também é expresso na vesícula biliar, no epidídimo, nos ovários, no timo, na próstata e em alguns neurônios respiratórios na medula ventrolateral (202). No rim é a mais abundante isoforma e está localizada na membrana apical do túbulo proximal e na alça fina e espessa ascendente. Em túbulos proximais de mamíferos, NHE3 é responsável pela reabsorção de grande parte do NaCl e NaHCO_3 filtrados nos glomérulos (1, 20, 21, 119, 160, 180). 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 fisiológica do NHE3 na manutenção do balanço de sal e fluido e da homeostase pressórica pôde ser evidenciada por meio da geração de camundongos nocautes global para o NHE3 (*Slc9a3^{-/-}*) e de camundongos

Slc9a3^{-/-} com *transgenic rescue* do gene para o NHE3 no intestino (106, 160, 192). Os camundongos *Slc9a3*^{-/-} quando submetidos a uma dieta normossódica são hipotensos e moderadamente acidóticos. A grande redução da reabsorção de fluido em túbulo proximal nesta linhagem de camundongos faz com que a carga de sal ofertada aos segmentos mais distais do nefro seja significativamente aumentada, fazendo-se necessário o desenvolvimento de respostas compensatórias para aumentar a reabsorção de fluido (184). Dentre estas adaptações cita-se a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento da expressão da subunidade α do canal epitelial para sódio (ENaC) (26) e o decréscimo do ritmo de filtração glomerular, que ocorre, ao menos em parte, por ativação do mecanismo de *feedback* túbulo-glomerular (1, 119, 192). Vale ressaltar, que estes processos adaptativos são insuficientes para compensar totalmente a redução na reabsorção de sal em túbulos proximais, uma vez que camundongos *Slc9a3*^{-/-} apresentam uma perda de sal significativa. Além disso, quando esses animais são submetidos à dieta hipossódica, eles não conseguem regular seu volume e acabam morrendo em poucos dias (106).

O camundongo *Slc9a3*^{-/-} apresenta uma irregularidade no processo absorptivo de fluido pelo trato gastrointestinal resultando em diminuição do volume vascular e, como consequência, redução na perfusão e função renal (160). Essas anormalidades, predominantemente devidas à perda de fluidos e eletrólitos no intestino, podem modular vias de sinalização e vias de transporte sistêmicas em outros tecidos, incluindo os túbulos renais. Dessa forma, as anormalidades no transporte tubular observada nos camundongos nocaute para o NHE3 podem, em parte, refletir o fenótipo secundário subsequente aos

distúrbios acima mencionados. Sendo assim, para compreender melhor ainda o papel do NHE3 tubular proximal foi gerado um camundongo *Slc9a3^{-/-}* com *transgenic rescue* do gene para o NHE3 no intestino. Estes camundongos toleram melhor a diminuição ou o aumento do Na^+ do que os camundongos *Slc9a3^{-/-}* e sua pressão arterial basal permanece praticamente tão baixa quanto à do camundongo *Slc9a3^{-/-}* (192). Estes trabalhos sugerem que o NHE3 tubular proximal desempenha papel importante na regulação da pressão arterial basal.

1.1.3.1. 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 túbulos proximais, a atividade do NHE3 pode ser finamente modulada por diversos fatores. Uma série de evidências indica que a atividade do NHE3 pode ser modificada de forma aguda sem que ocorram alterações na expressão total deste trocador em córtex renal. Neste caso, a regulação de sua atividade pode se dar por meio da fosforilação direta da cauda C-terminal do NHE3 por proteína cinase A (PKA), da sua redistribuição entre os microdomínios presentes na membrana apical do túbulo proximal e da interação com outras proteínas presentes nas células tubulares proximais (19, 51, 190, 200, 201).

Por sua vez, a modulação crônica 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, na síntese proteica ou mesmo ainda a degradação proteica podem ser os responsáveis por estas adaptações (64, 85, 90, 148).

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 (33, 65, 165, 182).

A fosforilação reversível de proteínas é um mecanismo regulatório chave em células eucaritóticas, pois regula muitos processos como ciclo celular, metabolismo geral, contração muscular, síntese protéica, entre outros. Cerca de um terço de todas as proteínas eucarióticas são controladas pela fosforilação de resíduos específicos de serina, treonina e tirosina (33, 65, 165, 182). 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 (172). Mesmo que a estrutura de muitas proteínas cinases tenha sido solucionada, o conhecimento de sua estrutura e função ainda é incompleto. Isso ocorre não somente porque as cinases muitas vezes façam parte de grandes complexos, mas também porque elas são altamente dinâmicas podendo alternar entre uma conformação ativa e inativa e entre diferentes localizações na célula (13, 71, 152, 167, 171, 172).

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 ligadas a um dímero de

subunidades regulatórias. A ligação de quatro moléculas de cAMP ao dímero de subunidades regulatórias faz com que a holoenzima se dissocie e libere a subunidade catalítica para que esta possa fosforilar resíduos específicos de serina e treonina das proteínas (71, 167, 172).

NHE3 é regulado por uma série de hormônios como paratormônio (PTH) (18, 43, 57, 64, 205), dopamina (7, 66, 86), peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) (32, 45) e glucagon (2) cujos receptores ativam a PKA levando à redução da reabsorção de sódio e de bicarbonato em túbulo proximal por inibir a sua atividade. Já foi demonstrado que não somente hormônios, mas também dieta rica em sal (197) e hipertensão (44) promovem inibição do NHE3 pela ativação da PKA. Kocinsky e colaboradores (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* (95) como *in vivo* (94) e que mutações tanto no sítio de fosforilação Ser 552 quanto no Ser 605 impedem que ocorra a inibição do NHE3 por 8-Br-cAMP, composto análogo ao cAMP que ativa especificamente a PKA (206).

Em 2013, Teranishi e colaboradores avaliaram o papel do NHE3 na osmorregulação renal em teleósteos, como a enguia, e mostraram que a sequência de aminoácidos do NHE3 nestes animais compartilha mais do que 56 % de identidade com o NHE3 de outras espécies de vertebrados. Vale mencionar que o resíduo de serina 552 da região C-terminal do NHE3 de mamíferos é também conservado no NHE3 da enguia, evidenciando a importância evolutiva deste sítio de regulação (173).

O mecanismo pelo qual a fosforilação mediada por PKA inibe a atividade do NHE3 ainda é desconhecido, entretanto se sabe que a fosforilação é

necessária para inibir a atividade do NHE3. Um estudo feito por Kocinsky e colaboradores mostrou que há uma dissociação temporal entre a fosforilação e a atividade do NHE3, ou seja, a fosforilação das serinas 552 e 605 precede a inibição da atividade do NHE3 por PKA, sugerindo que a fosforilação não afeta diretamente a atividade transportadora do NHE3, mas que é necessária para a sua regulação quer seja modulando o seu tráfego subcelular (redistribuição do trocador) ou a sua interação com proteínas reguladoras (94).

A membrana de borda em escova das células do túbulo proximal renal é composta por dois microdomínios: o corpo e a base das microvilosidades (Figura 6) (153). Identificou-se que o NHE3 pode ser encontrado tanto no corpo (92, 141, 146) quanto na base das microvilosidades (21, 48) e que em condições fisiológicas o NHE3 é igualmente distribuído entre estes dois microdomínios (61). Além disso, Biemesderfer e colaboradores (2001) observaram que uma fração do NHE3 que reside na base da microvilosidade é inativa, podendo esta servir como um *pool* interno de reserva que é recrutado com a estimulação por agonistas.

Estudos 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 (125). Em resposta a agentes que inibem a atividade do transportador como paratormônio (205), inibidores da enzima conversora de angiotensina (107, 196) ou dopamina (7), o NHE3 migra do corpo em direção à base. Por sua vez, a aldosterona (100) e condições como estimulação do nervo simpático renal (144) que aumentam a atividade do trocador, notou-se que o NHE3 é redistribuído da base para o corpo das microvilosidades da membrana apical. A importância da distribuição

subcelular do NHE3 entre os microdomínios está bem estabelecida, entretanto, os mecanismos envolvidos na sua translocação ainda não foram esclarecidos.

Figura 6 – Representação da distribuição subcelular do NHE3 em túbulo proximal renal. O NHE3 é encontrado tanto em membrana apical (corpo) quanto em um compartimento sub-apical (base) das microvilosidades. [Reprodução modificada de (125)].

A identificação de proteínas que interagem com NHE3 tem sido essencial para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação deste transportador. Em 1993 foi observado que um cofator adicional é necessário para que ocorra a inibição do NHE3 por PKA (189). Este cofator foi isolado, clonado e nomeado como NHERF1 (fator regulatório 1 de NHE) (190). Um segundo membro desta família foi identificado e nomeado de NHERF2 (fator regulatório 2 de NHE) (201). Os primeiros estudos funcionais envolvendo NHERF1 e NHERF2 foram feitos em fibroblastos PS120 (201). Esta linhagem de células, além de não expressar endogenamente NHEs, não expressa também NHERF1 e NHERF2. 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 (187, 190, 201).

Mostrou-se que tanto o NHERF1 quanto o NHERF2 se ligam ao NHE3 e a ezrin (105, 128, 149) e, por meio de estudos de co-imunoprecipitação feitos em células PS120 (188), mostrou-se que a ezrin funciona como uma proteína ancoradora da PKA e os NHERFs são responsáveis por trazer o complexo ezrin-PKA para as proximidades da cauda C-terminal do NHE3 facilitando a fosforilação do transportador e, conseqüentemente, a diminuição de sua atividade, ou seja, do ponto de vista funcional, a associação direta da proteína ezrin ao trocador NHE3 é necessária para o tráfego deste transportador entre sub-compartimentos celulares (34).

Estudos realizados no laboratório do Prof. Peter Aronson, Yale University, demonstraram que o NHE3 forma complexos multiméricos com outras proteínas também presentes em membrana de borda em escova de tecido renal. Com a intenção de identificar tais proteínas e suas interações com NHE3, anticorpos monoclonais foram desenvolvidos contra os complexos protéicos formados com a proteína NHE3. Demonstrou-se que um destes anticorpos monoclonais, direcionado contra a serino-protease dipeptidil peptidase IV (DPPIV), co-precipita NHE3 a partir de membranas de microvilosidades, indicando que NHE3 e DPPIV formam um complexo oligomérico (61).

Estudos posteriores foram realizados com a intenção de avaliar os aspectos funcionais desta interação (62, 63). Verificou-se que a administração crônica de um inibidor competitivo da DPPIV inibe a atividade do NHE3 em túbulos proximais renais de ratos Wistar. Esta inibição ocorre em decorrência

da translocação do NHE3, juntamente com a DPPIV, para a base das microvilosidades (62).

A investigação dos aspectos fisiológicos da interação entre NHE3 e DPPIV sugere que a inibição da atividade desta enzima inibe também a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal, ao menos em parte, por aumentar a meia vida do GLP-1 que é substrato da DPPIV. Os efeitos do GLP-1 e da DPPIV sobre a regulação da reabsorção de Na^+ em túbulo proximal via NHE3 (32, 45) assim como na hipertensão arterial e na insuficiência cardíaca já foram demonstrados por nosso grupo de pesquisa (53, 88, 142).

1.2. Angiotensina II

A Angiotensina II (Ang II) é o principal produto biologicamente ativo do Sistema Renina Angiotensina (SRA). Este sistema é reconhecido por desempenhar papel fundamental na regulação da pressão arterial e no balanço hidroeletrólítico. A visão clássica do SRA admite que a renina, produzida pelas células granulares do aparelho justaglomerular, atua sobre o angiotensinogênio plasmático liberado pelo fígado produzindo angiotensina I que, por sua vez, é convertida em Ang II por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), a qual é altamente expressa na superfície das células endoteliais da circulação pulmonar (Figura 7) (198).

A Ang II é um peptídeo responsável por promover a contração das células musculares lisas vasculares, aumentar a contratilidade miocárdica, estimular a produção de aldosterona, estimular a liberação de catecolaminas da medula da adrenal e das terminações nervosas simpáticas, aumentar a atividade do sistema nervoso simpático e estimular a sede e o apetite para o sal (126). A

Ang II também regula o transporte de sódio pelas células epiteliais do intestino e do rim (209). Além de seus papéis fisiológicos, a Ang II produzida localmente pode induzir inflamação, crescimento celular, mitogênese, apoptose, migração e diferenciação, pode regular a expressão gênica de substâncias bioativas e pode ativar múltiplas vias de sinalização intracelular podendo, então, contribuir para a lesão tecidual (30, 56, 93).

Figura 7 – Representação simplificada do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona clássico. Componentes do sistema e os principais efeitos nos diferentes órgãos-alvo. [Reprodução modificada de (8)].

As respostas celulares a estímulos externos são mediadas por uma série de vias de sinalização intracelular. Os receptores acoplados à proteína G (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 (13, 71, 134, 152).

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 se inicie o ciclo de atividade da proteína G. A cascata de ativação se inicia com a troca 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 (134, 165).

As proteínas G são classificadas de acordo com a estrutura e sequência da sua 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 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 proteínas.

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.

As proteínas Gq estão envolvidas na ativação da enzima fosfolipase C que, por ser um efetor assim como a adenilil ciclase, participará da formação de segundos mensageiros. Depois de ativada ela degrada o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) presente na membrana em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) e 1,2-diacylglicerol (DAG). Estes são os segundos mensageiros envolvidos nas respostas fisiológicas mediadas pela proteína Gq. O IP₃ por ser hidrossolúvel migra pelo citosol e se liga a receptores específicos enquanto que o DAG fica associado à membrana plasmática devido à sua estrutura hidrofóbica e ativa a PKC que pode também fosforilar outras proteínas.

As ações da Ang II são decorrentes da ativação de receptores que estão amplamente distribuídos em diversos tipos celulares. Dois tipos de receptores, tipo 1 (AT1R) e tipo 2 (AT2R), ambos GPCRs, já foram descritos, farmacologicamente caracterizados e clonados (133, 135, 158), sendo que a maioria das ações da Ang II é mediada pelo AT1R. Em roedores, há duas

isoformas distintas de AT1R: AT1a e AT1b, que compartilham 94 % de similaridade, sendo que a maioria dos efeitos da Ang II nesta Ordem ocorre por meio de AT1a (8, 77, 175). Os AT1a são predominantemente encontrados nos rins, células musculares lisas vasculares, coração, fígado e pulmão, enquanto que os AT1b são expressos principalmente nas adrenais e pituitária anterior (11, 129). A caracterização dos subtipos de receptor para Ang II foi possível devido à descoberta e o desenvolvimento de antagonistas para os receptores: losartan (seletivo para AT1) e PD123319 (seletivo para AT2) (175).

A ligação da Ang II ao AT1R pode desencadear as seguintes vias clássicas de sinalização: ativação da fosfolipase A_2 , da fosfolipase C, da fosfolipase D, dos canais de Ca^{+2} do tipo L, da via MAPK e a inibição de adenilil ciclase. A mais bem descrita via de sinalização intracelular é a da fosfolipase C- β que está acoplada à proteína $G_{q/11}$, cuja resposta é estimular a liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares e estimular a atividade da PKC (69). Por sua vez, a ativação da fosfolipase A_2 e da fosfolipase D estimula a liberação de ácido araquidônico, molécula precursora para a geração de prostaglandinas (29). A Ang II quando acoplada ao AT1R também está envolvida na abertura de canais de Ca^{+2} com consequente influxo de Ca^{+2} extracelular para dentro das células (155). A ativação do AT1R está também associada com o aumento nos níveis de fosforilação em tirosina assim como com a ativação das MAPK, processos envolvidos com fatores de crescimento e citocinas (17, 126). Por fim, a ativação da via da proteína G_i/o promove a atenuação da formação de cAMP em órgãos como rim e fígado (49).

O SRA é reconhecido como um sistema endócrino, mas também tem sido demonstrado a existência de SRA locais em diversos tecidos com função e

regulação independentes. Dentre os diversos SRA locais, destaca-se o SRA intrarrenal que desempenha função parácrina, autócrina e intrácrina. Estudos já demonstraram que tanto a Ang II sistêmica quanto a local desempenham um papel na regulação da reabsorção tubular de Na^+ e no controle da pressão arterial (47, 67, 109, 137).

Nos rins, a Ang II desempenha funções importantes como modular a resistência arteriolar e o transporte de íons ao longo do néfron, regular ciclo celular induzindo proliferação ou hipertrofia, além de agir no córtex da glândula adrenal estimulando a liberação de aldosterona que também age modulando a reabsorção de Na^+ (177, 191).

1.2.1. Angiotensina II e túbulo proximal

Os efeitos da Ang II no transporte tubular proximal já estão bem caracterizados: baixas concentrações de Ang II ($< 10^{-9}$ M) estimulam a reabsorção de Na^+ e bicarbonato via ativação do NHE3 apical, do cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ basolateral, da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ basolateral e via inserção da H^+-ATPase na membrana apical enquanto que altas concentrações de Ang II ($>10^{-9}$ M) reduzem a reabsorção de Na^+ e bicarbonato via inibição do NHE3 apical, do cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ basolateral e da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ basolateral, sendo que ambos efeitos são mediados pelo AT1R (74, 82, 208).

Uma característica do SRA intrarrenal é o elevado nível de Ang II intratubular que excede a concentração do plasma (136, 138). Todos os componentes chave do SRA incluindo angiotensinogênio, renina, ECA e receptores AT1 e AT2 já foram demonstrados estarem presentes no túbulo proximal renal e a presença de todos eles em túbulo proximal assegura a

produção local de Ang II independentemente do SRA sistêmico enquanto que a expressão de AT1R e AT2R permite que a Ang II promova seus efeitos fisiológicos (31, 136, 210).

1.2.2. Angiotensina II e NHE3

O NHE3 é o principal alvo da Ang II circulante, parácrina e intracelular em túbulo proximal renal. Embora sua expressão e atividade sejam reguladas por diversos fatores vasoativos, a Ang II é um dos mais importantes deles (22, 78, 124, 130, 139). Os efeitos da Ang II sobre o NHE3 têm sido muito estudados (50, 113, 194) e vários deles identificaram diferentes vias de sinalização envolvidas na regulação do NHE3 pela Ang II.

Estudos desenvolvidos por Cogan e colaboradores demonstraram que a Ang II promove a secreção de H^+ e a reabsorção de HCO_3^- em túbulo proximal de rato por mecanismos dependentes da diminuição de cAMP (116), aumento da concentração de Ca^{+2} (117) e ativação da PKC (118). Já foi também demonstrado os papéis da c-Src e da PI3K na regulação do NHE3 pela Ang II por meio da sua exocitose e consequente ativação (54, 176). A proteína IRBIT (IP_3 receptor-binding protein released with IP_3) pode regular muitas proteínas incluindo canais e transportadores (4). Mais recentemente foi demonstrado que a IRBIT, em resposta à Ang II, se liga e ativa o NHE3 por promover sua exocitose e que esta regulação é dependente da via Ca^{+2} -calmodulina cinase II (78, 80). Além disso, visando identificar se *scaffold proteins* pudessem se ligar e facilitar o tráfego do NHE3 em resposta à Ang II, foi demonstrado que esta ativação depende da interação entre o domínio PDZ1 do NHERF-1 e a IRBIT (81).

Embora a ligação da Ang II ao AT1R possa também ativar a via da proteína Gi (110, 143, 174, 193), a qual, por sua vez, inibe a geração de cAMP e, conseqüentemente, reduz a ativação da PKA (3, 10, 116), não se sabe se e como a ativação da proteína Gi e a posterior diminuição do cAMP regula a atividade do NHE3. Existem divergências na literatura sugerindo que a ativação do NHE3 mediada pelo AT1R pode ou não ser dependente da inibição de adenilil ciclase pela via da Gi (28, 116), sendo que em nenhum desses estudos foi avaliado os níveis de fosforilação do NHE3. Considerando que o NHE3 é inibido por vários agonistas que promovem a formação de cAMP e a ativação da PKA (43, 45, 86, 103) e que a fosforilação do NHE3 na serina 552 por PKA é regulada fisiologicamente tanto *in vitro* quando *in vivo* (94, 95, 206), um dos nossos objetivos foi avaliar se a Ang II afeta a atividade e os níveis de fosforilação do NHE3 por inibir respostas celulares induzidas por condições de elevação dos níveis de cAMP no túbulo proximal renal.

A Ang II induz aumento de expressão e de atividade do NHE3 em cultura *in vitro* de células de túbulo proximal (54, 84, 111, 112), enquanto que estudos *in vivo* já mostraram que as respostas do NHE3 em túbulo proximal são distintas quando comparadas as infusões aguda e crônica de Ang II (108, 124, 139, 140, 195). Agudamente, sem alterações na pressão arterial e/ou no ritmo de filtração glomerular, a Ang II promove a redistribuição do NHE3 para o corpo das microvilosidades (151) enquanto que durante a infusão crônica de Ang II, com a vasoconstrição e o aumento de pressão, o NHE3 é redistribuído para a base das microvilosidades, causando diminuição da reabsorção de sódio em túbulo proximal desempenhando papel chave na resposta de natriurese pressórica que neutraliza aumentos na pressão (140).

Em 2006, um estudo liderado pela Dra. Alicia McDonough determinou as mudanças fisiológicas e moleculares em túbulo proximal renal de ratos Sprague-Dawley provocadas pelo tratamento agudo com captopril, inibidor da ECA (107). Foi demonstrado que o tratamento com captopril promoveu a redistribuição para a base das microvilosidades tanto do NHE3 quanto de proteínas associadas à membrana que poderiam contribuir para a regulação da reabsorção de Na^+ em túbulo proximal. Dentre as proteínas identificadas destaca-se a megalina, miosina IIA, DPPIV, ezrin e NHERF-1, sendo que destas, megalina (19), DPPIV (63), ezrin (102) e NHERF-1 (181) sabe-se ou se postula que regulem a atividade do NHE3 por meio da interação proteína-proteína. Com relação à miosina IIA, sua função é ainda indefinida, mas pode ser que a sua redistribuição durante o tratamento com captopril facilite o tráfego do transportador entre os microdomínios da membrana de borda em escova do túbulo proximal. Adicionalmente, Riquier-Brison e colaboradores mostraram que quando a Ang II + captopril são infundidos, a miosina IIA redistribui para o domínio microvilar (151).

1.3. Miosinas

O citoesqueleto é uma rede interconectada que proporciona sustentação e organização celular. Em eucariotos, seus principais componentes incluem a actina e os microtúbulos, dois tipos de filamentos dinâmicos. Além de desempenharem papel estrutural, estes filamentos agem como se fossem trilhos para o movimento de moléculas motoras que convertem energia química derivada da hidrólise de ATP em trabalho mecânico ao transportarem ou ancorarem organelas, vesículas e outros componentes intracelulares. As

proteínas motoras cinesina e dineína se valem dos microtúbulos para transportarem enquanto que as miosinas se valem dos filamentos de actina (68, 75, 154).

As miosinas são proteínas motoras que são mais comumente lembradas por formarem o sistema actina-miosina por sua ação na contração muscular. Entretanto, este sistema está presente em uma vasta série de atividades celulares como migração e adesão celular, transporte e localização de macromoléculas, transdução de sinais, supressão tumoral, morfogênese celular, contração e fluxo citoplasmático (9, 127).

As miosinas são capazes de caminhar ao longo dos filamentos de actina e, ao mesmo tempo, se ligar a alvos celulares denominados cargas. No geral, elas compartilham três regiões distintas denominadas cabeça, pescoço e cauda (Figura 8). A cabeça mecanoquímica (domínio motor) fica, na grande maioria das classes de miosina, na região N-terminal e suas cadeias pesadas têm propriedades ATPásicas. O pescoço é uma região regulatória do domínio motor que consiste de um ou mais motivos IQ cuja sequência consenso é IQXXRGXXR. O motivo IQ tem como função a ligação de cadeias leves como calmodulina. O domínio cauda situado na região C-terminal é extremamente variável em tamanho e estrutura. A região proximal e medial da cauda pode apresentar uma conformação de dupla α -helicoidal (*coiled-coil*) que coordena a dimerização das cadeias pesadas das miosinas. A região distal da cauda, também denominada de cauda globular, apresenta sequência e estrutura únicas responsáveis por determinar a especificidade no reconhecimento das cargas em cada uma das classes (75, 99, 162, 170).

Inicialmente, as miosinas eram divididas em dois grupos (I e II) dependendo do seu arranjo quaternário funcional: as do grupo I eram monoméricas e as do grupo II diméricas. Com a crescente descoberta de novas classes, convencionou-se a denominação das miosinas de classe II como convencionais e as demais classes de não-convencionais que foram classificadas em ordem cronológica de acordo com sua descoberta (162). Mais do que 35 classes de miosina já foram descobertas, sendo 13 em humanos. Todas as classes estudadas se movem em direção à extremidade mais (+) do filamento de actina, com exceção da classe VI de miosina cuja direção é a extremidade menos (-) (170).

Figura 8 – Representação simplificada dos domínios de diferentes classes de miosinas. Domínios funcionais característicos das miosinas: domínio motor (cabeça), domínio regulatório (pescoço) e domínio cauda. [Reprodução modificada de (55)]

1.3.1. Miosina II

A miosina II não muscular é expressa exclusivamente em células não musculares e, por isso, é nomeada como miosina II não muscular (99). Ela é uma proteína hexamérica composta por duas cadeias pesadas diméricas, um par de cadeias leves regulatórias e um par de cadeias leves essenciais. Além de sua participação no processo contrátil, ela também participa de processos como divisão celular, locomoção, manutenção da forma celular, adesão célula-célula e adesão célula-matriz.

Em mamíferos, três diferentes genes (*Myh9*, *Myh10* e *Myh14*) codificam para três diferentes isoformas de miosinas II não musculares: miosina IIA, miosina IIB e miosina IIC. Elas exibem de 60 – 80 % de identidade em sua sequência de aminoácidos. Nenhum tecido ou célula parece expressar as três isoformas, mas muitos tipos celulares expressam pelo menos uma ou duas delas em condições fisiológicas normais (99, 162).

1.3.2. Miosina IIA e rim

A miosina IIA é expressa na maioria das células e tecidos (162, 186). Nos rins ela é altamente expressa no glomérulo, mas também é expressa nas células tubulares proximais e nas células endoteliais das artérias interlobulares, das arteríolas e dos capilares peritubulares (6). A maioria dos estudos com miosina IIA e rim estão relacionados a mutações no gene *Myh9*, sendo as Síndromes associadas: Fechtner, Sebastian e Epstein além da anomalia de May-Hegglin. As características clínicas incluem perda auditiva neuro-sensorial, catarata e glomerulopatia. Estas doenças são autossômicas dominantes e se

caracterizam pela tríade trombocitopenia, macro-plaquetas e corpúsculos de inclusão em leucócitos (corpúsculos *Döhle-like*) (101, 163, 166).

Existem estudos demonstrando que a miosina IIA está envolvida no processo de tráfego em modelos celulares não renais (40, 115), entretanto, já foi também demonstrada a importância dela em células tubulares proximais (83). Este estudo demonstra que a megalina e a miosina IIA estão ligadas via proteína adaptadora Dab-2 em linhagem de célula de túbulo proximal e que esta interação está provavelmente envolvida na endocitose mediada por megalina.

Existem diversos estudos que se valem do uso de inibidores para estudar a função das proteínas. No caso da miosina IIA, o inibidor mais comumente usado é a blebistatina. Ela tem sido amplamente aceita e usada como um inibidor altamente seletivo para miosina II. Sua rápida permeabilidade celular e sua especificidade à miosina II faz com que esta molécula seja adequada para estudos da função da miosina II *in vivo* e *in vitro* (39, 164, 169, 185). Além disso, o fato de seus efeitos inibitórios serem reversíveis faz com que a blebistatina seja uma poderosa ferramenta para caracterizar eventos celulares precisos (98).

Vale ressaltar que a blebistatina pode também ser utilizada para o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos para muitas doenças associadas à função da miosina II. Por exemplo, os efeitos antiinflamatórios da inibição da miosina II por blebistatina têm demonstrado uma melhora na progressão da doença renal em um modelo de rato (164).

A identificação de complexos proteicos é de fundamental importância para a compreensão de processos fisiológicos. Como já dito anteriormente, Girardi e

colaboradores demonstraram que o NHE3 e a DPPIV formam um complexo oligomérico (61). Além disso, identificaram o domínio do NHE3 que medeia a interação com a DPPIV além da região que se associa a ele, verificando que a associação do NHE3 com a DPPIV é indireta, ou seja, requer a presença de outras proteínas presentes na membrana apical de túbulo proximal. Em seguida, experimentos de cromatografia de afinidade e espectrometria de massa foram realizados visando identificar tais proteínas. Os dados obtidos mostraram que a miosina IIA faz parte do complexo NHE3-DPPIV em túbulos proximais renais (dados não publicados) e que a miosina IIA interage diretamente com o NHE3, mas indiretamente com a DPPIV.

Sabendo da possibilidade de interação entre a miosina IIA e o NHE3 e que a miosina IIA medeia o tráfego de transportadores e de vesículas citoplasmáticas para a membrana (35, 40, 115), um outro objetivo foi avaliar se a proteína motora miosina IIA está envolvida na redistribuição do NHE3 da base para o corpo das microvilosidades da membrana apical do túbulo proximal em resposta à Ang II.

2. OBJETIVOS

1 – Testar a hipótese de que a Ang II diminui os níveis de fosforilação do NHE3 mediados pelo cAMP/PKA na serina 552 aumentando a sua atividade por reduzir os níveis de cAMP em túbulo proximal renal;

2 – Testar a hipótese de que a miosina IIA participa da redistribuição do NHE3 da base para o corpo das microvilosidades em túbulo proximal renal em resposta à Ang II;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estudos *in vitro* – Células OKP

Para os experimentos *in vitro*, células OKP foram utilizadas. Esta linhagem celular é um subclone da linhagem de células OK e foi descrita pela primeira vez por Cole e colaboradores (42). Células OKP foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco™, Gaithersburg, MD, USA) com alta concentração de glicose suplementado com 10 % (v/v) soro fetal bovino (Gibco™, Gaithersburg, MD, USA), 1 mM piruvato de sódio (Gibco™, Gaithersburg, MD, USA), 100 U/mL penicilina (Gibco™, Gaithersburg, MD, USA) e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco™, Gaithersburg, MD, USA), a 37 °C, em estufa com 5 % CO₂ atmosférico. Para as subculturas, as células foram lavadas em PBS e, em seguida, em 0,25 % tripsina-EDTA (Gibco™, Gaithersburg, MD, USA) para então serem transferidas para outros frascos de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Para os experimentos, as células foram subcultivadas em placas de cultura de 24 poços e, após atingirem a confluência, foram privadas de soro por 24 h antes do procedimento. Os experimentos foram realizados utilizando-se as células entre as passagens 6 e 12.

3.2. Recuperação do pH intracelular em células OKP

Para avaliar a atividade do NHE3 em células OKP, a taxa de recuperação do pH_i foi medida por meio da técnica do pré-pulso de NH₄Cl. Lamínulas contendo células OKP foram colocadas em uma câmara de acrílico equipada

com um sistema de perfusão aquecido que permite a perfusão contínua das células e mudanças rápidas na solução. Esta câmara foi mantida a 37 °C e montada em um microscópio de fluorescência invertido (DMI6000B; Leica Microsystems). A fluorescência das células expostas ao BCECF foi monitorada excitando alternadamente os comprimentos de onda de 490 nm (ponto sensível ao pH) e 440 nm (ponto isobéstico) com uma lâmpada de xênon de 150 W e adquirindo a fluorescência emitida a 530 nm com um sistema de fluorescência à base de fotomultiplicador em intervalos de tempo de 2 segundos. As intensidades de fluorescência emitidas (F390 e F340) foram corrigidas para o sinal do *background* e a relação de fluorescência ($R = F390 / F340$) foi determinada durante o experimento.

Células OKP confluentes, cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas dentro de cada poço foram tratadas com:

- veículo (CTRL) por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-6} M Los por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-6} M Los por 30 min;
- 10^{-4} M FSK e 10^{-6} M Los por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-4} M FSK e 10^{-6} M Los por 5, 15 e 30 min;
- 10 ng/ μ L PTX por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-5} M Blebistatina por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-5} M Blebistatina por 30 min;

As células OKP foram expostas a 5 μ M de BCECF-AM (Molecular Probes) em solução controle (132 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM glicose, pH 7,4) por 10 min. As células foram lavadas com solução controle para remover o fluoróforo não incorporado e banhadas com a mesma solução até a estabilização do pH_i . Em seguida, foram acidificadas por meio do pré-pulso de NH_4Cl (122 mM NaCl, 10 mM NH_4Cl , 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM glicose, pH 7,4) durante 2 min, para depois retornar à perfusão com solução controle. A recuperação do pH_i após a acidificação celular foi monitorada até valores estacionários do pH_i . Para a calibração, as células foram subsequentemente expostas a soluções contendo 10 μ M de nigericina em altas concentrações de K^+ (130 mM KCl, 9,5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) nos pH 5,0 e 9,0.

De acordo com as instruções do fabricante, os valores de pH_i foram determinados plotando a relação dos dados na seguinte equação: $\text{pH} = \text{pK} + \log [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)]$, onde $R_{\min}$ e $R_{\max}$ são as razões mínima e máxima de emissão obtidas nos pontos ácido e básico do procedimento de calibração, respectivamente. O pK foi determinado submetendo as células expostas ao BCECF às soluções contendo nigericina e alta concentração de K^+ nos pHs 5,0 e 9,0. Ao ajustar os dados de diferentes experimentos usando o software Origin 2016 (Origin Lab), prevemos um pK de $7,00492 \pm 0,01153$, que é muito semelhante ao valor do pK obtido *in vitro*.

Todas as medições das taxas de recuperação do pH_i foram obtidas nos primeiros 2 min por análise de regressão linear e apresentadas como dpH_i/dt (unidades de pH/min).

3.3. Biotinilação de proteínas de membrana celular

Células OKP confluentes, cultivadas em placas de 6 poços foram tratadas com:

- veículo (CTRL) por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-5} M Blebistatina por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-5} M Blebistatina por 30 min;

Em seguida, a placa foi colocada no gelo por 10 min e mantida a 4 °C durante todo o experimento. Passados os 10 min, as células foram lavadas duas vezes por 2 min com solução PBS- Ca^{+2} - Mg^{+2} (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; 0,1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 , pH 7,4), incubadas duas vezes por 25 min com tampão de biotinilação + biotina [150 mM NaCl; 10 mM triethanolamine; 2 mM CaCl_2 , pH 7,4 + 1,5 mg/mL biotina (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin)], lavadas duas vezes por 2 min com solução PBS- Ca^{+2} - Mg^{+2} + 100 mM glicina, lavadas uma vez por 20 min com solução PBS- Ca^{+2} - Mg^{+2} + 100 mM glicina e lavadas duas vezes por 2 min com PBS- Ca^{+2} - Mg^{+2} . Uma vez feito isso, as células foram solubilizadas adicionando-se RIPA modificado (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,5 % $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$) por 1 h. Feito isso, as células solubilizadas foram centrifugadas por 10 min a 14000 rpm a 4 °C e o sobrenadante coletado foi incubado durante a noite com 50 µL de *beads* de streptavidina-agarose. As *beads* foram então lavadas três vezes com RIPA modificado. Por fim, 60 µL de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % SDS 10 %; 20 % glicerol; 100 mM ditiotretol; 0,01 % azul de bromofenol)

foram adicionados às *beads*, incubadas por 3 min a 98 °C e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS para proteína

Células OKP confluentes, cultivadas em placas de 24 poços foram tratadas com:

- veículo (CTRL) por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-6} M Los por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-6} M Los por 30 min;
- 10^{-4} M FSK e 10^{-6} M Los por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-4} M FSK e 10^{-6} M Los por 5, 15 e 30 min;
- 10 ng/ μ L PTX por 5, 15 e 30 min.

Em cada poço foram adicionados 200 μ L de tampão de amostra para eletroforese (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2,0 % SDS; 20 % glicerol; 1,96 % β -mercaptoetanol; 0,01 % azul de bromofenol). Em seguida, a placa foi colocada sob agitação constante em temperatura ambiente por 10 min. Um *pool* de três poços referente a cada tratamento foi feito após a solubilização (32, 63, 95). Para demonstrar a especificidade do anticorpo fosfoespecífico para a serina 552 do NHE3, o lisado de células OKP foi desfosforilado antes da eletroforese de gel poliacrilamida-SDS com o tratamento com 1 U/ μ L de *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) (Promega, Madison, WI). 25 μ L (anticorpo contra pSer/Thr PKA), 40 μ L (anticorpo contra PS552-NHE3 e actina) e 60 μ L

(anticorpo contra NHE3) de lisado celular com tampão de amostra foi adicionado aos poços do gel. Para monitorar o progresso da corrida e para determinar a massa molecular aproximada das proteínas foram colocados 10 µL de um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Bio-Rad) A eletroforese foi feita segundo Laemmli (104), cujo gel de corrida era constituído de 7,5 % acrilamida; o de empilhamento de 3 % e a espessura do gel era de 1,5 mm. As amostras foram aplicadas nos poços do gel que continham 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.

3.5. 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 min, lavada com água MilliQ por 2 min e equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, metanol 20 %) por pelo menos 5 min. Para a transferência utilizou-se um sistema tipo sanduíche (GE Healthcare, TE62) submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma corrente de 350 mA durante a noite a 4 °C. Em seguida, a membrana foi corada por 10 min 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 em pó 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 1 h, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário (Tabela 1) mantendo-o durante a noite a 4 °C com leve agitação.

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de *immunoblotting*

Anticorpo primário	Fornecedor do primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição	Solução	Ref.
NHE3 (clone 3H3)	doação	1:1000	Mouse IgG	1:2000	leite	(95)
PS552-NHE3 (clone 14D5)	Santa Cruz Biotechnology (sc-53962)	1:1000	Mouse IgG	1:2000	leite	(95)
Actina (clone JLA20)	Merck	1:50000	Mouse IgM	1:2000	leite	(114)
pSer/Thr	Cell Signaling Technology	1:2000	Rabbit	1:2000	BSA	(70)

Ref.: referências.

Em seguida, foram feitas cinco lavagens, de 10 min cada, com solução de bloqueio. A membrana foi então incubada por 1 h com anticorpo secundário (Jackson ImmunoResearch) 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 min cada e incubou-se a membrana durante 1 min,

sob leve agitação, com ECL (reagente para imuno-deteção através de quimioluminescência). Em seguida, a membrana foi colocada em um fotodocumentador (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) para visualização das bandas (Figura 9) para depois serem analisadas por densitometria (Image J) (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Figura 9 – Immunoblotting de lisado de células OKP. Lisado de células OKP foi sujeito ao SDS-PAGE, transferido para membrana PVDF e incubado com anticorpos contra NHE3, PS552-NHE3, Actina e pSer/Thr.

3.6. Atividade da PKA

A medição da atividade da PKA de forma quantitativa no lisado de células OKP foi feita por meio de ensaio imunoenzimático (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. Células OKP confluentes, cultivadas em placas de 24 poços foram tratadas com:

- veículo (CTRL) por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min.

Inicialmente, adicionou-se 200 μ L 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) em cada poço. Em seguida, a placa foi colocada sob agitação constante a 4 °C por 1 h. Um *pool* de três poços referente a cada tratamento foi feito, submetido à centrifugação de 14 000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante coletado.

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 min 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 min a 60 rpm.

Em sequência, os poços foram lavados com o tampão de lavagem por quatro vezes e adicionou-se 40 μ L de anticorpo anti-rabbit IgG conjugado à HRP para incubar a 30°C por 30 min a 60 rpm. Quatro novas lavagens foram feitas para então adicionar 60 μ L do substrato TMB para incubar por 45 min

Atingindo-se a coloração azul, 20 µL 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.

A atividade da PKA nas células OKP foi também medida de forma indireta (qualitativa) por meio do uso de um anticorpo que reconhece todos os substratos fosforilados por PKA em serina e treonina.

3.7. Níveis de cAMP

A medição dos níveis de cAMP no lisado de células OKP foi feita por meio de ensaio imunoenzimático (cyclic AMP direct EIA kit – Arbor Assays) que contém um diluente especialmente desenvolvido para lisar células, inativar a ação das fosfodiesterases e estabilizar o cAMP. Células OKP confluentes, cultivadas em placas de 24 poços foram tratadas com:

- veículo (CTRL) por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II por 30 min;
- 10^{-4} M FSK por 30 min;
- 10^{-10} M Ang II e 10^{-4} M FSK por 5, 15 e 30 min.

Inicialmente, adicionou-se 200 µL do diluente da amostra em cada poço para, em seguida, deixar a placa sob leve agitação por 10 min a temperatura ambiente. Um *pool* de três poços referente a cada tratamento foi feito, submetido à centrifugação de 10 000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante coletado.

Fundamentalmente, o procedimento consiste em, primeiramente, colocar 25 µL do *Plate Primer* em todos os poços, para depois colocar 50 µL do *Sample Diluent* no poço referente ao branco, 50 µL das amostras e da curva,

25 µL do DetectX cAMP Conjugate e 25 µL do DetectX cAMP Antibody (exceto no branco) para iniciar a reação que ocorreu em uma incubação de 30 °C por 2 h a 100 rpm. Tendo feito isso, descartou-se todo o conteúdo e os poços foram lavados com o tampão de lavagem por quatro vezes para então adicionar 100 µL do substrato TMB para incubar por 30 min sem agitação. Atingindo-se a coloração azul, 50 µL da *Stop Solution* 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.

3.8. Modelo Experimental - Rato

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 090/15. Para os experimentos de microperfusão estacionária foram utilizados ratos Wistar de 2-3 meses de idade pesando aproximadamente 300 g, fornecidos pelo Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB I 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.

Para os experimentos de imunofluorescência e fracionamento de membranas celulares por gradiente de centrifugação foram utilizados ratos Wistar pesando aproximadamente 300 g, fornecidos pela empresa ENVIGO e mantidos no biotério do *Mudd Memorial Research Building* 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 *Institutional Animal Care and Use Committee* da *University of Southern California* (USC).

3.9. Determinação da atividade do NHE3

A atividade do NHE3 em túbulos proximais renais *in vivo* foi determinada por meio de microperfusão estacionária. Para isso, ratos Wistar foram anestesiados com uma injeção intramuscular de Zoletil (tiletamina + zolazepam) associado à Xilasina (50 e 5 mg/kg/mL, respectivamente), 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 0,05 mL/min, mediante bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus Compact Infusion, MA, USA) 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. Durante todo o procedimento, o rim foi 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 + 3 M KCl com uma hemicélula de Ag/AgCl.

Após este prévio preparo, foram iniciados os experimentos de microperfusão estacionária que foram realizados da forma como descrita

anteriormente (121). Para a medida do pH intratubular foi utilizado um microeletrodo duplo contendo em um ramo 1 M KCl corado com verde-FDC (referência) e, no outro ramo, resina neutra de troca iônica sensível ao H^+ (Fluka Chemika, Buchs, Suíça) sendo o restante do ramo preenchido com solução de complemento (130 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,0). Para o preparo das micropipetas duplas foram utilizados capilares duplos tipo Theta (R & D. Optical Systems, Inc., Spencerville, MD, USA) contendo um ramo preenchido com óleo de rícino corado com Sudan-black e outro ramo preenchido com a solução perfusora tubular [100 mM NaCl; 25 mM $NaHCO_3$; 5 mM KCl; 1 mM $CaCl_2$; 1,2 mM $MgSO_4$; rafinose (0,6 g/10mL)] corada com verde-FDC a 0,05 %. Tanto as micropipetas quanto os microeletrodos foram manipulados por meio de micromanipuladores mecânicos (Leitz, Wetzlar).

A taxa de acidificação tubular proximal foi avaliada por meio de medidas contínuas do pH intratubular. O pH intratubular foi medido pelo microeletrodo duplo introduzido em um túbulo proximal que estivesse com a solução perfusora isolada do fluido tubular por duas gotas de óleo (Figura 10). A diferença de potencial entre os dois ramos do microeletrodo duplo é função do pH do fluido onde o microeletrodo está imerso enquanto que a diferença de potencial transepitelial corresponde à diferença entre o ramo de referência e a terra. Desta forma, o compartimento extracelular do animal constituía o potencial de referência para as medidas de voltagem transepitelial, isto é, entre o microeletrodo de referência intratubular e o compartimento extracelular.

Figura 10 – Representação esquemática do sistema de microperfusão estacionária *in vivo* em túbulo proximal renal de rato. À esquerda, um microeletrodo de dois ramos e à direita, uma micropipeta dupla (ambos perfurando o mesmo 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 perfusora luminal; C: óleo de ricino; R: solução de referência; IE: resina de troca iônica sensível a H^+ . (Fonte: Bruna Hitomi Inoue, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, 2011 - modificado).

Estas voltagens foram lidas por um voltímetro de alta impedância de entrada (electrometer, Model FD223-F, WPI, New Haven, CT, USA), cuja saída era continuamente registrada por um polígrafo ECB de dois canais. Estes valores foram então digitalizados em intervalos de 1 s por microcomputador AT 386 (Dell 333D) acoplado a um conversor analógico digital (Data Translation DT 2801, Marlborough, MS), através do qual os dados foram adquiridos (Figura 11) e processados. O programa de aquisição de dados foi elaborado a partir do software Asyst (Asyst Software Technologies Inc., Rochester, USA). Os valores

de pH para cada ponto do registro foram calculados por interpolação a partir das curvas de calibração dos eletrodos.

Figura 11 – Representação de curvas obtidas durante os experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* em túbulo proximal renal de ratos Wistar. A curva representa o registro do potencial obtido pelo eletrodo durante a perfusão tubular de uma solução controle, de uma que estimula e de uma que inibe a atividade do transportador. Em 1 está o potencial que representa o pH tubular inicial. Em 2 é o momento no qual a solução de interesse é perfundida no túbulo. Em 3 está representada a recuperação do pH dependente de CO_2 . Em 4 a recuperação do pH dependente de transportadores de H^+ . Em 5 o potencial do pH estacionário no fim da perfusão.

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^- ($J_{\text{HCO}_3^-}$) foi calculado através da equação:

$$J_{\text{HCO}_3^-} = k [(\text{HCO}_3^-)_i - (\text{HCO}_3^-)_s] \times r/2$$

onde k é a constante de redução de bicarbonato na luz [$k = \ln 2 / (t_{1/2})$], $t_{1/2}$ é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio tubular e $(\text{HCO}_3^-)_i$ e $(\text{HCO}_3^-)_s$ são as concentrações de HCO_3^- injetada e a nível estacionário, respectivamente.

3.10. Imunofluorescência

No dia do experimento, os animais se mantiveram anestesiados com 2 % isoflurano a um fluxo de 1,5 L O₂/min em uma mesa cirúrgica aquecida a 37 °C para manter a temperatura constante. Um cateter PE-50 foi inserido na artéria carótida para monitoramento da pressão arterial e outro inserido na veia jugular para infusão de 4 % BSA em salina para manter a euvolemia. Após o procedimento cirúrgico ter sido feito, uma infusão constante de salina com BSA foi feita por 20 min para, em seguida, infundir ou BSA + salina (Controle) ou BSA + salina + Ang II (50 ng/kg/min) por 30 min.

Ao fim do procedimento, a cápsula do rim esquerdo foi removida e o rim banhado por 5 min com PLP (2 % paraformaldeído, 75 mM lisina e 10 mM periodato de sódio, pH 7.4) para que este pudesse ser fixado *in situ*. Em seguida, o rim foi removido, cortado ao meio e imerso em PLP por 4 h a temperatura ambiente. O tecido fixado foi crioprottegido por meio de uma incubação durante a noite com 30 % sacarose em PBS, coberto com o composto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) e congelado em nitrogênio líquido. Crioseções de 5 µm foram cortadas e transferidas para lâminas de vidro Fisherbrand™ Superfrost™ Plus (ThermoFisher Scientific, Gaithersburg, MD, USA).

As secções foram hidratadas em PBS seguida de uma lavagem de 10 min em 50 mM NH₄Cl em PBS e incubadas em 1 % SDS em PBS por 5 min para recuperação de antígeno. Após duas lavagens de 5 min com PBS, as secções foram bloqueadas em tampão de bloqueio (5 % BSA, 0,3 % Triton-X em PBS) por 30 min, incubadas no anticorpo primário por 2 h, lavadas três vezes por 5 min em PBS, incubadas por 1 h no escuro com o anticorpo secundário, lavadas

novamente como descrito anteriormente, para então serem deixadas para secar para posterior análise. As análises das lâminas foram feitas em microscópio confocal Zeiss LSM 510.

3.11. Fracionamento de membranas celulares por gradiente de densidade

No dia do experimento, os animais se mantiveram anestesiados com 2 % isoflurano a um fluxo de 1,5 L O₂/min em uma mesa cirúrgica aquecida a 37 °C para manter a temperatura constante. Um cateter PE-50 foi inserido na artéria carótida para monitoramento da pressão arterial e outro inserido na veia jugular para infusão de 4 % BSA em salina para manter a euvolemia. Após o procedimento cirúrgico ter sido feito, uma infusão constante de salina com BSA foi feita por 20 min para, em seguida, infundir ou BSA + salina (Controle) ou BSA + salina + Ang II (50 ng/kg/min) por 30 min.

Os rins foram removidos, cortados ao meio e a região cortical dos rins dos ratos de cada grupo foi submetida ao fracionamento subcelular por gradiente de densidade em sorbitol. Os gradientes foram montados em tubos para centrífuga na seguinte ordem: 1 mL de 5 % sorbitol, um primeiro gradiente de 35-55 % sorbitol gerado pela adição de 18 mL de 55 % sorbitol a um volume de 8,9 mL de 35 % sorbitol em uma câmara de agitação, um segundo gradiente de 55-70 % sorbitol gerado pela mistura de 8,2 mL de 70 % sorbitol com 6,3 mL de 55 % sorbitol e, por fim, 1 mL de 80 % sorbitol. Para o procedimento de fracionamento subcelular, os rins dos ratos anestesiados foram resfriados *in situ* com PBS gelado para bloquear o tráfego membranar e depois removidos para que a porção cortical fosse submetida à homogeneização em 5 % sorbitol, 0,5 mM EDTA disódico, 0,2 mM PMSF, 9 g/mL aprotinina e 5 mM histidina-

imidazol (pH 7,5) em um homogeneizador de tecidos (Tekmar Instruments) e centrifugada a 2000 x g por 10 min. Ao fim desta primeira centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o pellet remanescente foi re-homogeneizado e centrifugado. O novo sobrenadante foi adicionado ao sobrenadante obtido na primeira centrifugação. 4 mL deste sobrenadante final foram misturados com 6 mL de 87,4 % sorbitol, resfriados no gelo por 1 h, colocados entre os dois gradientes de sorbitol e centrifugado a 100 000 x g por 5 h. Doze frações foram coletadas e a densidade de cada uma foi medida usando um DA-100M *Density/Specific Gravity meter* (Mettler Toledo). As frações foram diluídas, sedimentadas a 250 000 x g por 75 min, ressuspensas em 1 mL de tampão de homogeneização e congeladas em freezer – 80 °C para posterior análise.

3.12. Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi feita pelo método BCA. Este método é também conhecido como método do ácido bicinconínico. O ensaio com BCA é disponível em kit comercial. Este procedimento é muito aplicado para análises em microplacas e é usado para os mesmos objetivos do método de Lowry. O BCA segue o princípio do reagente Folin do ensaio de Lowry, ou seja, reage com os complexos entre os íons cobre e o peptídeo para produzir um produto de cor roxa que absorve fortemente a 562 nm.

3.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS para proteína e immunoblotting

Para determinar o padrão de distribuição das proteínas nos gradientes de densidade, um volume constante de cada fração foi avaliado em um mesmo gel e em uma mesma membrana. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (Bio-Rad) por 20 min a 60 °C, aplicadas em um gel de corrida de 7,5 % (Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel, Bio-Rad) e, em seguida, a corrida foi iniciada. Para monitorar o progresso da corrida e para determinar a massa molecular aproximada das proteínas foram colocados 2 µL de um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, Bio-Rad). Quando a linha do corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel, a corrida foi interrompida.

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-FL Transfer Membrane, Millipore). Para isso, a membrana foi hidratada com metanol 100 % e equilibrada em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 250 mM glicina, metanol 15 %). Para a transferência utilizou-se um sistema tipo sanduíche (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad) submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 100 V durante 1 h a 4 °C.

Após a transferência, a membrana foi deixada secando e o gel corado com Coomassie. Depois de seca, as posições correspondentes aos padrões de peso molecular foram marcadas para auxiliarem na identificação. A membrana foi então hidratada em metanol 100 %, lavada em TBS (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl) por duas vezes e colocada em uma solução de bloqueio (Odyssey®

Blocking Buffer, LI-COR) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. A membrana foi novamente lavada com TBS por duas vezes e incubada com anticorpo primário (Tabela 2) durante a noite a 4 °C com leve agitação.

Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de *immunoblotting*

Anticorpo primário	Fornecedor do primário	Diluição	Anticorpo secundário	Fornecedor do secundário	Diluição
NHE3	Alicia McDonough	1:2000	GAR 680	Invitrogen (A21109)	1:5000
Miosina IIA	Biomedical Technology Inc. (BT561)	1:2000	GAR 680	Invitrogen (A21109)	1:5000
Podocina	GeneTex (GTX38523)	1:1000	GAR 680	Invitrogen (A21109)	1:5000

GAR: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 680).

Foram feitas a seguir três lavagens de 10 min cada com TBST (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, Tween 20 0,05 %). A membrana foi então incubada por 1 hora com anticorpo secundário (Tabela 2) à temperatura ambiente. A membrana foi lavada duas vezes com TBST e uma vez com TBS por 10 min. Os sinais foram detectados (Figura 12) e quantificados com o Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) e com o software LI-COR que acompanha. A linearidade do sistema de detecção foi verificada para cada proteína comparando o sinal das amostras aplicadas em um volume X e em um volume X/2 e, se não linear, o volume da amostra foi reajustado.

Figura 12 – Immunoblotting de fração obtida por fracionamento de membranas celulares por gradiente de densidade de córtex renal de rato. Fração de membrana de córtex renal foi sujeita ao SDS-PAGE, transferida para membrana PVDF e incubada com anticorpos contra NHE3, miosina IIA e podocina.

3.14. Avaliação de complexos proteicos com Blue Native-PAGE (BN-PAGE)

Um conjunto formado pelas frações F5 até F9 (frações enriquecidas em miosina IIA tubular e NHE3) obtidas por meio do gradiente de densidade em sorbitol foi utilizado para se avaliar os complexos proteicos. A concentração de proteínas deste *pool* de amostras dos diferentes grupos experimentais foi medida e ajustada para uma mesma concentração usando 5 % de tampão sorbitol. Basicamente, as frações foram incubadas no gelo por 20 min com n-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) a uma concentração final de 1 % para então serem centrifugadas a 100 000 x g por 10 min. A eletroforese *Blue Native* foi

realizada utilizando-se a fração correspondente ao sobrenadante por meio do *Native-PAGE Novex 3–12 % Bis-Tris gels* (Invitrogen).

Para isso, as amostras foram preparadas adicionando-se *NativePAGE™ Sample Buffer* e *NativePAGE™ 5% G-250 Sample Additive*, aplicadas com um volume constante ao gel e a corrida iniciada a 4 °C a 150 V na primeira hora e a 250 V na segunda hora. Os complexos proteicos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de PVDF (Immobilon-FL Transfer Membrane, Millipore) e esta foi incubada por 15 min em solução 8 % ácido acético, lavada com água deionizada, descorada com 100 % metanol e, novamente, lavada com água deionizada. Posteriormente, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio durante a noite a 4 °C, lavada em TBS, incubada (Tabela 3) e os complexos proteicos quantificados.

Tabela 3 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de *immunoblotting*

Anticorpo primário	Fornecedor do primário	Diluição	Anticorpo secundário	Fornecedor do secundário	Diluição
NHE3	Alicia McDonough	1:1000	GAR 680	Invitrogen (A21109)	1:5000
Miosina IIA	Biomedical Technology Inc. (BT561)	1:1000	GAR 680	Invitrogen (A21109)	1:500
DPPIV (clone 5E8)	Santa Cruz Biotechnology (sc-52642)	1:1000	GAM 680	Invitrogen (982289)	1:5000

GAR: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 680) e GAM: Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 680).

Como controle positivo do experimento de BN-PAGE, incubamos uma mesma membrana com anticorpo contra o NHE3 (secundário fluorescente verde) e contra a DPPIV (secundário fluorescente vermelho) e avaliamos a coloração dos complexos independentemente e a coloração dos complexos sobrepostos. Como esperado, o NHE3 e a DPPIV estão em um mesmo complexo proteico (complexo amarelo) (Figura 13).

Figura 13 – Distribuição dos complexos proteicos contendo NHE3 e DPPIV. Um *pool* de frações (F5-F9) obtido por meio de fracionamento de membranas celulares por gradiente de densidade de córtex renal de rato foi sujeito ao BN-PAGE, à transferência para uma membrana PVDF e ao *immunoblotting*. As membranas foram incubadas com anticorpos contra NHE3 (verde) e DPPIV (vermelho). A sobreposição das imagens evidencia os complexos nos quais o NHE3 e a DPPIV estão presentes (amarelo).

3.15. Análises Estatísticas

Os resultados apresentados são expressos como média $\pm$ erro padrão. As análises estatísticas foram feitas por teste t ou Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey ou pelo teste Kruskal-Wallis não paramétrico seguido pelo pós-teste de Dunn. $P < 0,05$ foi considerado significativo. N indicado nas barras representa o número de experimentos realizados.

4. RESULTADOS

4.1. Papel da via AT1R/Gi no aumento da atividade do NHE3 pela Ang II em túbulo proximal renal:

4.1.1. Ang II não afeta os níveis de fosforilação do NHE3 mediados por PKA na serina 552 em células OKP em condições basais

Primeiramente, foram realizados experimentos em células de túbulo proximal (OKP) tratadas com diferentes concentrações de Ang II (10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11} M), por 30 minutos, para verificar em qual concentração a Ang II seria capaz de induzir máxima estimulação do NHE3 (Figura 14), já que se é sabido que o efeito agudo da Ang II sobre a atividade do NHE3 é dose-dependente: em concentrações inferiores a 10^{-9} M a Ang II ativa e em concentrações maiores diminui a atividade do NHE3 (73). A partir dos dados obtidos, realizamos os experimentos com 10^{-10} M Ang II.

Figura 14 – Efeito dose-dependente da Ang II sobre a atividade do NHE3 em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram incubadas com Ang II nas concentrações de 0 (Controle), 10^{-11} , 10^{-10} e 10^{-9} M por 30 min e, em seguida, sujeitas à técnica do pré-pulso de NH_4Cl para se avaliar a taxa de recuperação do pH_i. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. N indicado nas barras. *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. CTRL.

Após isso, foram feitos experimentos de tempo-dependência da Ang II (10^{-10} M) sobre o NHE3 em células OKP (Figura 15) nos tempos 5, 15 e 30 min. Verificou-se que o aumento na atividade do NHE3 deu-se após 15 e 30 min de exposição à Ang II.

Figura 15 – Efeito tempo-dependente da Ang II sobre a atividade do NHE3 em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram incubadas com 10^{-10} M Ang II durante 0 (Controle), 15 e 30 min e, em seguida, sujeitas à técnica do pré-pulso de NH_4Cl para se avaliar a taxa de recuperação do pHi. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. N indicado nas barras. **P < 0,01 vs. CTRL.

Sabendo-se que o NHE3 é inibido por fosforilação por PKA, a redução nos níveis de cAMP poderia ser um dos mecanismos pelos quais o NHE3 seria ativado pela Ang II. Sendo assim, visando avaliar se o efeito estimulatório tempo-dependente da Ang II sobre a atividade do NHE3 em condições basais estaria associado com baixos níveis de fosforilação do NHE3 pela PKA na serina 552 em células OKP, o efeito da Ang II (10^{-10} M) sobre a atividade e sobre os níveis de fosforilação da serina 552 do NHE3 após 5, 15 e 30 min de tratamento foram avaliados nestas células. Por meio da taxa de recuperação do pH intracelular (pHi) (Figura 16A) observa-se que a Ang II não promove alteração na atividade do NHE3 após 5 min de tratamento ($0,380 \pm 0,020$ vs. $0,304 \pm 0,023$ unidades de pH/min; $P < 0,05$), mas promove aumento aos 15

($0,528 \pm 0,019$ unidades de pH/min; $P < 0,001$) e aos 30 min ($0,508 \pm 0,022$ unidades de pH/min; $P < 0,001$) quando comparada ao controle ($0,304 \pm 0,023$ unidades de pH/min). Por outro lado, como esperado, a forskolin (FSK) (10^{-4} M), composto que ativa a adenilil ciclase, diminuiu a atividade do NHE3 em todos os tempos.

Em seguida, avaliamos se o aumento de atividade do NHE3 promovido pela Ang II em condições basais diminuiria a atividade da PKA e, consequentemente, os níveis de fosforilação do NHE3 no seu sítio consenso para a PKA, a serina 552. Para isso, células OKP foram tratadas com 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min além de terem sido tratadas, nos mesmos tempos, com 10^{-4} M Forskolin (FSK) como controle positivo para a ativação da PKA. Como pode ser observado na Figura 16B, a atividade da PKA não foi alterada em resposta ao tratamento com Ang II.

A)

B)

Figura 16 – Efeitos da Ang II na atividade do NHE3 e da PKA em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram incubadas com veículo, 10^{-10} M Ang II ou 10^{-4} M Forskolin (FSK) por 5, 15 ou 30 min. **(A)** Taxa de recuperação do pHi após pulso ácido com NH_4Cl . **(B)** Atividade da PKA medida por ensaio imunoenzimático em lisado de células OKP. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. N indicado nas barras. *P < 0,05 e ***P < 0,001 vs. CTRL.

De forma semelhante, a Ang II foi incapaz de promover alteração nos níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 em células OKP em condições basais (Figuras 17A e 17B). Por outro lado, as células OKP tratadas com FSK apresentaram um aumento tanto na atividade da PKA (Figura 16B) quanto nos níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 (Figuras 17A e 17B). Sendo assim, a Ang II não afeta os níveis de fosforilação do NHE3 mediados por PKA na serina 552 em células OKP em condições basais.

Visando demonstrar a especificidade do anticorpo fosfoespecífico para o NHE3, o lisado de células OKP foi desforsforilado por meio do tratamento com *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) antes de ser submetido à SDS-PAGE. Conforme demonstrado na Figura 17C, a banda que geralmente aparece por volta de 80 kDa quando a membrana é incubada com o anticorpo contra o NHE3 fosforilado na serina 552, não foi detectada no lisado de células OKP tratadas com CIP.

A)

B)

C)

Figura 17 – Efeitos da Ang II sobre os níveis de fosforilação do NHE3 no sítio consenso para PKA em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram incubadas com veículo, 10^{-10} M Ang II ou 10^{-4} M Forskolin (FSK) por 5, 15 ou 30 min. **(A)** Lisado de células OKP foi preparado para *immunoblotting* e incubado com anticorpo contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (PS552-NHE3, 1:1000), NHE3 (1:1000) e actina (1:50000). **(B)** A abundância relativa foi quantificada por densitometria e os dados estão representados como a razão entre os níveis de fosforilação do NHE3 e os níveis do NHE3 total, normalizados pelo Controle. **(C)** Lisado de células OKP foi preparado para *immunoblotting* e incubado com anticorpo contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (PS552-NHE3, 1:1000), NHE3 (1:1000) e actina (1:50 000). Para confirmar a especificidade da banda referente ao PS552-NHE3, lisados de células foram tratados (+) ou não (-) com 1 U/ μ L de *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) antes de serem submetidos à SDS-PAGE. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando o teste Kruskal-Wallis não paramétrico seguido pelo pós-teste de Dunn. N indicado nas barras. **P < 0,01 vs. CTRL.

4.1.2. Ang II contrapõe-se à produção de cAMP e à ativação da PKA mediadas pela FSK em células OKP

Tendo em vista determinar se a Ang II seria capaz de reduzir a formação de cAMP e, conseqüentemente, a atividade da PKA em células OKP sob uma situação de elevados níveis de cAMP, os níveis de cAMP e a atividade da PKA foram avaliados em células OKP pré-tratadas por 30 min com 10^{-4} M FSK na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min. A Figura 18A mostra que o tratamento com Ang II leva à diminuição tempo-dependente da

produção de cAMP promovida pela FSK [74 ± 11 (tratamento somente com FSK), 48 ± 3 (FSK + Ang II por 5 min), 41 ± 12 (FSK + Ang II por 15 min) e 29 ± 5 pmol/ml (FSK + Ang II simultaneamente, isto é, por 30 min)]. Nestas mesmas condições, foi observado que tanto os substratos fosforilados pela PKA (Figura 18B) quando a atividade da PKA (Figura 18C) apresentam diminuição na produção de cAMP promovida pela FSK ao longo do tempo, indicando que a Ang II contrapõe-se à produção de cAMP e à ativação da PKA mediadas pela FSK em células OKP.

A)

B)

C)

Figura 18 – Efeito tempo-dependente da Ang II na via de sinalização cAMP/PKA e nos níveis de fosforilação dos substratos para PKA em células OKP expostas à Forskolin. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram tratadas por 30 min com 10^{-4} M Forskolin (FSK) ou veículo na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II por 5, 15 ou 30 min. **(A)** Níveis de cAMP medidos por ensaio imunoenzimático e **(B)** 25 μ L de lisado celular foi preparado para *immunoblotting* e incubado com anticorpo contra os substratos fosforilados por PKA (pSer/Thr, 1:1000) e actina (1:50000). **(C)** Atividade da PKA foi medida por ensaio imunoenzimático. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. N indicado nas barras. *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. CTRL.

4.1.3. Ang II contrapõe-se à fosforilação do NHE3 mediada pela PKA em células OKP

Em seguida, avaliamos se a diminuição nos níveis de cAMP mediada pelo tratamento com Ang II resultaria em menores níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 com consequente aumento em sua atividade transportadora. Para isso, a atividade do NHE3 foi medida por meio da taxa de recuperação do pHi em células OKP pré-incubadas por 30 min com 10^{-4} M FSK na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min. A Figura 19 mostra que a incubação simultânea de FSK com Ang II por 30 min ($0,329 \pm 0,032$ unidades

de pH/min) bloqueou completamente o efeito inibitório da FSK sobre a atividade do NHE3 ($0,170 \pm 0,019$ vs. $0,293 \pm 0,022$ unidades de pH/min no CTRL).

Figura 19 – Efeito oposto da Ang II e da Forskolin na atividade do NHE3 em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram tratadas por 30 min com 10^{-4} M Forskolin (FSK) ou veículo na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II por 5, 15 ou 30 min e, em seguida, sujeitas à técnica do pré-pulso de NH_4Cl para se avaliar a taxa de recuperação do pH_i. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. N indicado nas barras. **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. CTRL; ##P < 0,01 vs. FSK.

Conforme indicado na Figura 20, a Ang II tanto em 15 (106 ± 8 %) quanto em 30 min (92 ± 4 %) de incubação foi também capaz de contrapor-se aos efeitos da FSK sobre os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 (161 ± 6 vs. 100 ± 2 %, P < 0,001 vs. CTRL) mostrando que a Ang II contrapõe-se à fosforilação do NHE3 mediada pela PKA em células OKP.

A)

B)

Figura 20 – Efeito oposto da Ang II e da Forskolin nos níveis de fosforilação do NHE3 em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram tratadas por 30 min com 10^{-4} M Forskolin (FSK) ou veículo na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II por 5, 15 ou 30 min. **(A)** Lisado de células OKP foi preparado para *immunoblotting* e incubado com anticorpo contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (PS552-NHE3, 1:1000), NHE3 (1:1000) e actina (1:50000). **(B)** A abundância relativa foi quantificada por densitometria e os dados estão representados como a razão entre os níveis de fosforilação do NHE3 e os níveis do NHE3 total, normalizados pelo Controle. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando o teste Kruskal-Wallis não paramétrico seguido pelo pós-teste de Dunn. N indicado nas barras. ***P < 0,001 vs. CTRL.

4.1.4. Ang II contrapõe-se aos efeitos da FSK sobre a atividade e os níveis de fosforilação do NHE3 via AT1R em células OKP

Ensaio funcionais e moleculares similares aos das Figuras 19 e 20 foram realizados para verificar se os efeitos da Ang II observados eram mediados pelo AT1R. Para isso, células OKP foram tratadas com 10^{-6} M losartan (Los), um inibidor específico do AT1R, antes de serem pré-incubadas com 10^{-4} M FSK por min na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II por 5, 15 e 30 min. O tratamento com Los inibiu o efeito da Ang II em contrapor-se à inibição da atividade do NHE3 mediado pela FSK (Figura 21).

Figura 21 – Efeito do bloqueio do receptor AT1 na atividade do NHE3 em células OKP tratadas com Forskolin e/ou Ang II. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram tratadas por 30 min com veículo ou 10^{-4} M Forskolin (FSK) e/ou 10^{-10} M Ang II por 5, 15 ou 30 min na presença de 10^{-6} M Losatan (Los) e, em seguida, sujeitas à técnica do pré-pulso de NH_4Cl para se avaliar a taxa de recuperação do pH_i . Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. N indicado nas barras. *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. CTRL.

Além disso, a Ang II foi incapaz de reduzir os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 induzida pela FSK (Figura 22). Estes resultados indicam que a Ang II contrapõe-se aos efeitos da FSK sobre a atividade e os níveis de fosforilação do NHE3 via AT1R em células OKP.

A)

B)

Figura 22 – Efeito do bloqueio do receptor AT1 nos níveis de fosforilação do NHE3 em células OKP tratadas com Forskolin e/ou Ang II. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram tratadas por 30 min com veículo ou 10^{-4} M Forskolin (FSK) e/ou 10^{-10} M Ang II por 5, 15 ou 30 min na presença de 10^{-6} M Losatan (Los). **(A)** Lisado de células OKP foi preparado para *immunoblotting* e incubado com anticorpo contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (PS552-NHE3, 1:1000), NHE3 (1:1000) e actina (1:50000). **(B)** A abundância relativa foi quantificada por densitometria e os dados estão representados como a razão entre os níveis de fosforilação do NHE3 e os níveis do NHE3 total, normalizados pelo Controle. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando o teste Kruskal-Wallis não paramétrico seguido pelo pós-teste de Dunn. N indicado nas barras. *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. CTRL.

4.1.5. O bloqueio da via da proteína Gi previne o efeito estimulatório da Ang II sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar

Com o intuito de investigar se os efeitos da Ang II observados sobre os níveis de fosforilação e sobre a atividade transportadora do NHE3 em células OKP pré-tratadas com FSK poderiam ser explicados pela ativação da via de sinalização AT1R/proteína Gi, avaliamos os efeitos da toxina pertussis (PTX), um composto que inibe a proteína Gi e eleva os níveis de cAMP, sobre a atividade e os níveis de fosforilação do NHE3. Primeiramente, avaliamos o papel da proteína Gi *per se* sobre a atividade e sobre os níveis de fosforilação do NHE3 tratando células OKP com 10 ng/mL PTX por 5, 15 e 30 min. O tratamento com PTX reduziu a atividade do NHE3 em células OKP em condições basais [Figura 23A: $0,272 \pm 0,029$; $0,162 \pm 0,011$; $0,178 \pm 0,013$ e $0,124 \pm 0,010$ unidades de pH/min em 0 (CTRL), 5, 15 e 30 min, respectivamente] e esta redução na atividade foi acompanhada por um aumento nos níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 [Figuras 23B e 23C: 100 ± 2 ; 158 ± 16 ; 155 ± 11 e 155 ± 16 % em 0 (CTRL), 5, 15 e 30 min, respectivamente].

A)

B)

C)

Figura 23 – Efeito da toxina pertussis na atividade do NHE3 e nos seus níveis de fosforilação no sítio consenso para PKA em células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 24 poços foram incubadas com veículo ou 10 ng/mL de toxina pertussis (PTX) por 5, 15 ou 30 min e, em seguida, **(A)** sujeitas à técnica do pré-pulso de NH_4Cl para se avaliar a taxa de recuperação do pH_i. **(B)** Lisado de células OKP foi preparado para *immunoblotting* e incubado com anticorpo contra o NHE3 fosforilado na serina 552 (PS552-NHE3, 1:1000), NHE3 (1:1000) e actina (1:50000). **(C)** A abundância relativa foi quantificada por densitometria e os dados estão representados como a razão entre os níveis de fosforilação do NHE3 e os níveis do NHE3 total, normalizados pelo Controle. Dados expressos como média $\pm$ EP. Em A, o valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey enquanto que em C o valor P foi calculado usando o teste Kruskal-Wallis não paramétrico seguido pelo pós-teste de Dunn. N indicado nas barras. *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 vs. CTRL.

Em seguida, nós realizamos experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* para determinar o fluxo de bicarbonato ($\text{J}_{\text{HCO}_3^-}$) dependente do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de ratos Wistar exposto a 10^{-10} M Ang II e/ou 10 ng/mL PTX. Conforme indicado na Figura 24, a PTX *per se* inibe a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal nativo ($1,228 \pm 0,120$ vs. $2,896 \pm 0,111$ nmol/cm² x s, P < 0,001). Além disso, a perfusão simultânea de Ang II com PTX preveniu o efeito estimulatório da Ang II sobre a atividade do NHE3 ($1,650 \pm 0,225$ vs. $4,361 \pm 0,179$ nmol/cm² x s, P < 0,001), mostrando que o bloqueio da via da proteína Gi previne o efeito estimulatório da Ang II sobre a atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar.

Figura 24 – Efeito da toxina pertussis na atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de rato Wistar. O fluxo reabsortivo de bicarbonato ($J_{HCO_3^-}$) foi avaliado por meio de microperfusão estacionária e medição contínua do pH luminal na presença ou ausência de 10^{-10} M Ang II e/ou 10 ng/ml PTX. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. Número de túbulos perfundidos está indicado nas barras. ***P < 0,001 vs. CTRL; ###P < 0,001 vs. Ang II.

Verificamos, então, que a Ang II promove aumento na atividade do NHE3 pelo menos em parte por um mecanismo dependente de AT1R/proteína Gi.

4.2. Papel da proteína motora miosina IIA no aumento da atividade do NHE3 pela Ang II em túbulo proximal renal:

4.2.1. A miosina IIA está envolvida na regulação do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos Wistar

Sabendo da possibilidade de interação entre a miosina IIA e o NHE3 e que ela está envolvida no tráfego de transportadores e de vesículas citoplasmáticas para a membrana (35, 40, 115), fomos avaliar se a miosina IIA participa da redistribuição do NHE3 nas microvilosidades do túbulo proximal. Para isso testamos a hipótese de que a inibição da miosina IIA pode prevenir o aumento da atividade do NHE3 mediada pela Ang II por impedir a translocação do mesmo da base para o corpo das microvilosidades.

Ensaio funcionais foram realizados por meio de experimentos de microperfusão estacionária *in vivo* para determinar o fluxo de bicarbonato ($J_{\text{HCO}_3^-}$) dependente do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de ratos Wistar exposto a 10^{-10} M Ang e/ou 10^{-5} M blebistatina (Figura 25). Conforme observado na Figura 25, a Ang II, como esperado, aumentou a atividade do NHE3 quando comparada à do CTRL ($4,361 \pm 0,179$ vs. $2,746 \pm 0,152$ nmol/cm² x s, $P < 0,001$) e a perfusão tubular simultânea de Ang II com blebistatina preveniu completamente o aumento de atividade do NHE3 mediado pela Ang II ($2,925 \pm 0,142$ vs. $2,746 \pm 0,152$ nmol/cm² x s, $P < 0,001$). A blebistatina *per se* não foi capaz de afetar a atividade basal do NHE3 ($2,912 \pm 0,151$ vs. $2,746 \pm 0,152$ nmol/cm² x s, $P < 0,001$). Nossos resultados sugerem, então, que a miosina IIA desempenha um papel na mediação da regulação da atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos em resposta à Ang II.

Figura 25 – Efeito da blebistatina na atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de rato Wistar. O fluxo reabsortivo de bicarbonato ($J_{HCO_3^-}$) foi avaliado por meio de microperfusão estacionária e a medição contínua do pH luminal na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II e/ou 10^{-5} M Blebistatina. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. Número de túbulos perfundidos está indicado nas barras. ***P < 0,001 vs. CTRL.

Dados estes resultados, passamos a investigar os mecanismos moleculares que estão envolvidos com esta resposta. Para isso, fizemos ensaios de biotilação em células OKP para avaliar a quantidade de NHE3 na superfície celular na presença ou na ausência de 10^{-10} M Ang II e 10^{-5} M blebistatina. O resultado preliminar da Figura 26 sugere que o aumento da atividade do NHE3 com tratamento com Ang II está associado ao aumento do mesmo na superfície celular e que o uso do inibidor da miosina IIA foi capaz de prevenir esse aumento do NHE3 na superfície. Nossos dados sugerem, então, haver uma interação funcional entre NHE3 e miosina IIA.

A)

B)

Figura 26 – Expressão do NHE3 na superfície de células OKP. Células OKP cultivadas até a confluência em placas de 6 poços foram tratadas por 30 min com veículo (CTRL), com 10^{-10} M Ang II e/ou 10^{-5} M Blebistatina. As proteínas da superfície celular foram isoladas por ensaio de biotinylation, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana PVDF. Estas membranas foram então incubadas com anticorpo contra o NHE3 total (1:1000). **(A)** expressão total do NHE3 no lisado total de células OKP após o tratamento; actina (1:50000) foi usada como controle interno. **(B)** expressão do NHE3 de superfície. N = 1.

BN-PAGE é um dos métodos úteis para isolar complexos proteicos sob condições nativas, incluindo proteínas de membrana, permitindo a análise de massa molecular, estado oligomérico e composição de complexos proteicos

(150). Resolvemos, então, avaliar por BN-PAGE se a infusão aguda de Ang II alteraria a abundância dos complexos multiméricos formados com o NHE3 e a miosina IIA. Para isso, ratos Wistar foram infundidos com solução Controle ou com Ang II. Em seguida, a região cortical dos rins foi sujeita ao fracionamento subcelular por gradiente de densidade para estabelecermos quais frações estariam mais enriquecidas em NHE3 e miosina IIA e pouco enriquecidas em miosina IIA glomerular. Inicialmente, avaliamos a distribuição da miosina IIA, do NHE3 e da podocina, utilizada como marcador glomerular, nas 12 frações obtidas (Figura 27).

Figura 27 – Distribuição da miosina IIA, do NHE3 e da podocina. 12 frações obtidas por meio de fracionamento celular por gradiente de densidade foram sujeitas ao SDS-PAGE e *immunoblotting*. As análises de expressão foram feitas utilizando-se anticorpos contra miosina IIA, NHE3 e podocina e a distribuição ao longo das frações plotada em um gráfico.

Uma vez avaliada a distribuição, determinamos, então, uma janela formada pelas frações de F5 até F9, a qual foi submetida à eletroforese BN-PAGE (Figura 28).

A)

B)

Figura 28 – Distribuição dos complexos proteicos contendo NHE3 e miosina IIA. (A) Um pool de frações (F5-F9) obtido por meio de fracionamento celular por gradiente de densidade de animais CTRL e Ang II foi sujeito ao BN-PAGE, à transferência para uma membrana PVDF e ao *immunoblotting*. As membranas foram incubadas com anticorpos contra miosina IIA e NHE3. (B) A abundância relativa dos complexos proteicos foi quantificada por densitometria e os dados estão normalizados pelo Controle. Dados expressos como média $\pm$ EP. O valor P foi calculado usando teste t. N = 3. *P < 0,05 vs. CTRL.

Conforme observado na Figura 28A, é possível identificar pelo menos dois complexos proteicos (setas), um com aproximadamente 1100 kDa e outro com aproximadamente 800 kDa, presentes tanto na membrana incubada com NHE3 quanto na com miosina IIA. O tratamento com Ang II foi capaz de promover um aumento da miosina IIA (130 ± 10 vs. 100 ± 3 %, $P < 0,05$ vs. CTRL) no complexo proteico mais pesado (1100 kDa) (Figuras 28A e 28B). Embora não tenha atingido significância estatística, o tratamento com Ang II mostra uma tendência no aumento do NHE3 (144 ± 17 vs. 100 ± 5 %, $P = 0,069$ vs. CTRL) no mesmo complexo proteico.

Dado este aumento na expressão de ambas as proteínas em um mesmo complexo com o tratamento com Ang II, decidimos avaliar a distribuição subcelular da miosina IIA e se ela migra com o NHE3 para o corpo das microvilosidades frente à infusão com Ang II (Figura 29) por meio de ensaio de imunofluorescência. Até o momento obtivemos apenas as imagens referentes à distribuição do NHE3 em animais Controle e em animais infundidos com Ang II. Observa-se que o tratamento com Ang II promoveu o aumento do NHE3 nas microvilosidades. Pretendemos avaliar a distribuição da miosina IIA em uma situação Controle e em uma com estímulo (Ang II).

Figura 29 – Efeitos da Ang II na localização do NHE3 em membrana apical de túbulo proximal de rato Wistar. Experimento de imunofluorescência mostrando a distribuição do NHE3 na situação Controle e a sua redistribuição para as microvilosidades após tratamento com Ang II. Diferentes experimentos foram realizados usando anti-NHE3 (1:100) detectado pelo uso de um secundário AlexaFluor 568 (verde) e anti-vilina (1:100) detectado pelo uso de um secundário AlexaFluor 488 (vermelho).

5. DISCUSSÃO

Nos túbulos proximais renais de mamíferos, muitos hormônios regulam o transporte de sódio por meio da alteração dos níveis intracelulares de cAMP. Hormônios natriuréticos como PTH (43), dopamina (86) e GLP-1 (58) aumentam os níveis intracelulares de cAMP, que levam à ativação da PKA e à redução na reabsorção de sódio em túbulo proximal renal devido ao aumento nos níveis de fosforilação do NHE3 com consequente inibição do transportador. Um dos objetivos desta tese foi investigar se a Ang II poderia reduzir os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 mediado pela cAMP/PKA, o que levaria ao aumento do transporte mediado pelo NHE3, por reduzir os níveis de cAMP em células tubulares proximais renais. Nossos resultados fornecem novas evidências de que a Ang II contrapõe-se aos efeitos da fosforilação e da inibição do NHE3 induzidos pela cAMP/PKA pela ativação da sinalização AT1R/proteína Gi em células tubulares proximais renais.

Diversos estudos usando diferentes modelos experimentais já demonstraram que a Ang II aumenta a atividade do NHE3 (84, 91, 116, 156, 183) e vários outros verificaram que os mecanismos subjacentes a este aumento de atividade em túbulo proximal pode ser dependente de PKC (91), Ca^{+2} (12) e IP_3 (78), indicando a participação da via de sinalização AT1R/Gq. No entanto, não foi demonstrado se a ativação da via AT1R/proteína Gi pela Ang II, com consequente diminuição nos níveis de cAMP, poderia regular a atividade do NHE3 por diminuir seus níveis de fosforilação na serina 552. Para investigar esta questão, os experimentos *in vitro* foram desenvolvidos de tal

forma a avaliar as variações nos níveis de cAMP, com consequente variação na PKA e nos níveis de fosforilação do NHE3, enquanto que nas análises *in vivo*, os experimentos foram conduzidos para se avaliar diretamente o papel da proteína Gi no transporte mediado pelo NHE3 em ratos saudáveis.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com FSK diminui a atividade do NHE3 em células OKP por aumentar a atividade da PKA, que, consequentemente, aumenta os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552, enquanto que o tratamento com Ang II reverteu completamente o aumento de cAMP e o aumento dos níveis de fosforilação do NHE3 mediados pela FSK por meio de um mecanismo dependente de AT1R. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores que demonstraram que a sinalização Ang II/AT1R medeia a diminuição de cAMP em células tubulares proximais (110, 116, 143, 174). Entretanto, nosso trabalho diferiu dos resultados observados por Cano e colaboradores (28) que demonstraram que a Ang II estimula a atividade do transportador Na^+/H^+ em células OKP por um mecanismo independente de cAMP. Considerando que um número alto de passagem celular é capaz de alterar a morfologia, a resposta aos estímulos e a expressão de proteínas quando comparado a um número baixo (25, 199), esta diferença encontrada pode ser atribuída ao fato de que este estudo prévio se valeu de células OKP entre as passagens 32-45 enquanto que nós usamos células entre as passagens 6-12.

De acordo com esta hipótese, há também outros trabalhos que reportaram diminuição nos níveis de cAMP induzido pela Ang II que utilizaram células tubulares proximais com baixa passagem (110, 174) ou mesmo cultura primária (116, 143). Com relação aos níveis de cAMP em células OKP em

condições basais, nós não observamos um efeito inibitório induzido pela Ang II, mas deve ser levado em conta que os níveis basais de cAMP são muito baixos em cultura e que a diminuição dos níveis de cAMP induzido por um hormônio é geralmente mais pronunciada na presença de um agente estimulador (89). Valendo-se de experimentos *in vitro* e de microperfusão estacionária *in vivo*, nós demonstramos que células tubulares proximais tratadas com PTX apresentam inibição na atividade do NHE3 e aumento em seus níveis de fosforilação, sugerindo o envolvimento da proteína Gi na manutenção da atividade do NHE3 em condições basais tanto *in vitro* quanto sob condições fisiológicas. Além do mais, a perfusão simultânea de Ang II e PTX em túbulo proximal nativo preveniu o efeito estimulatório da Ang II sobre a atividade do NHE3. Estes resultados sugerem que a Ang II pode estimular a atividade do NHE3 pelo menos em parte por ativação da via AT1R/Gi.

Experimentos prévios de micrperfusão *in vivo* em túbulo proximal de rato demonstraram que a infusão intravenosa de Ang II aumenta a reabsorção de bicarbonato devido à diminuição tubular dos níveis de cAMP e que o tratamento com PTX atenua este aumento (116). É importante ressaltar que nossos experimentos de microperfusão foram feitos se valendo de um tratamento agudo luminal tanto de Ang II quanto de PTX, enquanto que os resultados obtidos no trabalho anterior foram baseados em uma infusão intravenosa de Ang II e tratamento crônico de PTX. Estas diferenças experimentais podem explicar o porquê nós fomos capazes de observar a perda completa de estimulação do NHE3 promovida pela Ang II. Mais ainda, os resultados do nosso tratamento agudo luminal sustentam a ideia de que as respostas fisiológicas observadas não são mediadas por processos indiretos de

um tratamento crônico e/ou intravenoso. Baum e colaboradores (15) avaliaram os efeitos da Ang II luminal na reabsorção de fluido e no transporte de bicarbonato por microperfusão *in vitro* em túbulo proximal de coelho. Neste estudo foi observado que após o tratamento com inibidores da ECA, a Ang II aumentou a reabsorção de fluido e de bicarbonato, reforçando o papel da Ang II intrarrenal neste processo além de mostrar que a Ang II endógena afeta o transporte de bicarbonato em túbulo proximal *in vitro* via AT1R.

Nós e outros grupos já observamos que a função transportadora do NHE3 se correlaciona negativamente aos seus níveis de fosforilação, isto é, quando a atividade está aumentada, seus níveis de fosforilação na serina 552 estão diminuídos e vice versa (44-46, 131, 206). Além disso, a fosforilação do NHE3 pela PKA já foi demonstrada ser necessária para a sua inibição (95). Todos estes trabalhos sugerem que a regulação fina desde mecanismo pós-traducional pode ser importante na modulação da função transportadora do NHE3.

O túbulo proximal renal é innervado por nervos simpáticos, os quais, quando estimulados, parecem aumentar a reabsorção de fluido tubular. Em 2015, Pontes e colaboradores (144) sugeriram que aumentos na reabsorção de sódio pelo NHE3 induzidos por um estímulo elétrico agudo de baixa frequência no nervo renal ocorrem por meio da ativação do sistema renina angiotensina intrarrenal e da via de sinalização AT1R/Gi. Este estudo demonstrou que os aumentos na reabsorção de sódio via NHE3 são devidos ao aumento da Ang II intrarrenal que, por sua vez, causa diminuição nos níveis de cAMP urinários e, consequentemente, reduz os níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 pela PKA. Juntamente a isso, nossos resultados fornecem evidências de que a Ang

II está envolvida na sinalização cAMP/PKA e na fosforilação do NHE3 em túbulo proximal.

O cAMP desempenha papel crucial na regulação de diversas funções fisiológicas tais como permeabilidade vascular e o transporte de sal e água (60, 144, 179), sendo que todas elas participam do controle da pressão arterial. Então, não é surpresa que alterações na sinalização dependente da proteína Gi e de cAMP estejam associadas com várias condições patológicas, inclusive hipertensão. Várias anormalidades na expressão da proteína Gi já foram encontradas em modelos genético (123) e experimental (3, 122) de hipertensão. A expressão aumentada da proteína Gi precede o desenvolvimento da hipertensão tanto em rato espontaneamente hipertenso (SHR) (123) quanto em rato hipertenso DOCA-sal (122), indicando que aumentos na expressão da proteína Gi e na desregulação dos níveis intracelulares de cAMP poderiam contribuir para a patogênese da hipertensão.

Na insuficiência cardíaca, doença associada com retenção de água e sal, expansão do volume extracelular e edema, ratos insuficientes exibem um aumento na abundância do NHE3 cortical dependente de AT1R (37) e nosso grupo já demonstrou que este aumento na atividade do NHE3 está associado com a diminuição nos níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 (88). De forma semelhante, ratos SHR jovens exibem aumento na retenção de sódio dependente do SRA antes do desenvolvimento da hipertensão devido ao aumento na expressão do AT1R no túbulo proximal (37). Nosso grupo também já observou uma atividade aumentada do NHE3 em rato SHR jovem, quando comparado ao rato jovem normotenso Wistar Kyoto (WKY), que está associada com a diminuição nos níveis de fosforilação do NHE3 na serina 552 pela PKA

nas microvilosidades do túbulo proximal renal (44). Estes achados são consistentes com os nossos mostrando uma regulação da fosforilação do NHE3 na serina 552 pela Ang II.

É importante ressaltar que nossos achados não excluem o envolvimento dos mecanismos dependentes da proteína Gq e de outras vias de sinalização no aumento de atividade do NHE3 em túbulo proximal mediado pela Ang II. De fato, há vários trabalhos mostrando que essas vias alternativas são recrutadas em diferentes contextos. No entanto, nosso trabalho demonstra que a ativação da proteína Gi pela Ang II/AT1R contrapõe-se aos efeitos nos níveis de fosforilação e de inibição do NHE3 induzidos pela cAMP/PKA em células tubulares proximais. Além disso, demonstramos que esta ativação é essencial para o efeito estimulatório da Ang II em condições associadas com aumento nos níveis de cAMP e de fosforilação do NHE3 na serina 552. Mais ainda, os resultados apresentados sugerem que a Ang II modula a rede de fosforilação do NHE3 tubular proximal e, ao fazê-lo, neutraliza a via desencadeada por importantes fatores natriuréticos.

Os rins respondem a uma série de compostos vasoativos que fazem parte de sistemas complexos como o SRA. Muito se sabe sobre a capacidade dos rins em controlar a excreção de sal e água, baseada no fato de que a pressão de perfusão renal exerce influência na excreção de sódio e água. Este fenômeno conhecido como natriurese pressórica faz do rim um importante agente efetor na regulação da pressão arterial. As ações da Ang II sobre os transportadores ao longo do néfron já foram bem documentadas (14, 41, 147, 161), sendo que a ativação dos receptores AT1 promove a reabsorção de fluido em túbulo proximal (41, 161) por estimular tanto o NHE3 quanto a $\text{Na}^+\text{-K}^+$

ATPase (41). Vale ressaltar que os níveis e a localização dos principais transportadores de Na^+ em túbulo proximal são modificados durante a inibição da ECA, sugerindo que a Ang II possa controlar sua síntese e seu tráfego celular (196).

A redistribuição do NHE3 entre os microdomínios da membrana apical do túbulo proximal desempenha papel chave na resposta à natriurese-pressórica. Diversos estudos já tentaram identificar o mecanismo intrarrenal que poderia explicar essa interação entre hipertensão, redistribuição do NHE3 e natriurese-pressórica. Um outro objetivo desta tese foi avaliar o papel da miosina IIA na redistribuição do NHE3 em resposta à Ang II. Além da interação física entre NHE3 e miosina IIA (dados não publicados), nossos achados mostram haver uma interação funcional entre eles, sendo que essa interação parece ser necessária para a regulação do NHE3 pela Ang II. Então, a melhor compreensão do papel da miosina IIA na redistribuição do NHE3 pode evidenciar uma outra forma de modificar a resposta da natriurese pressórica via NHE3 e, conseqüentemente, um outra forma de proporcionar proteção contra o aumento de pressão.

Em nossos experimentos, a blebistatina foi utilizada visando avaliar o papel da miosina IIA como mediadora da regulação hormonal da atividade do NHE3. Entretanto, há relato do uso da blebistatina como terapia. Em 2010, Si e colaboradores avaliaram o efeito da inibição direta da miosina II por blebistatina na inflamação (164). Eles administraram a blebistatina em um modelo de rato com inflamação renal aguda induzida por fator de necrose tumoral (TNF) e observaram que ela promoveu a diminuição no sequestro renal de macrófagos marcados circulantes de maneira dose-dependente. Além disso, observaram

que em ratos com nefropatia obstrutiva progressiva, o tratamento com blebistatina promoveu efeitos renoprotetores evidenciados pela normalização do peso renal, melhora na morfologia e diminuição na injúria túbulo-intersticial.

Pouco se sabe sobre a relação Ang II e miosina IIA. Como já dito, nossos achados sugerem haver uma interação funcional entre NHE3 e miosina IIA em resposta à Ang II em túbulo proximal. Contudo, há um trabalho na literatura correlacionando também Ang II e miosina IIA, mas em fibroblastos de quelóide (23). Bond e colaboradores sugerem que a Ang II tem papel na patogênese do quelóide devido à existência de AT1R em fibroblastos normais e em fibroblastos de quelóides. Eles avaliaram o papel da Ang II na patogenicidade do quelóide e demonstraram que a Ang II aumenta a migração do fibroblasto no quelóide de forma dependente de AT1R pelo aumento na expressão de miosina II. Por meio de experimentos de BN-PAGE, observamos que a infusão de Ang II foi capaz de promover o aumento da miosina IIA em um complexo proteico de, aproximadamente, 1100 kDa, corroborando o dado de Bond e colaboradores que também demonstraram que a Ang II é capaz de promover aumento na expressão de miosina IIA. Estes dados sugerem um mecanismo de regulação pelo qual a sinalização da Ang II aumenta os níveis de expressão e a ativação da miosina II.

Não somente uma relação entre Ang II e miosina IIA já foi avaliada. Dos demais componentes do SRA, a ECA é outro que tem relação com a miosina IIA (96). A fosforilação da cauda C-terminal da ECA está envolvida com o *shedding* desta enzima (97) e já foi demonstrado em cultura primária de célula endotelial humana que a interação da ECA com a miosina IIA determina o seu *shedding* e que a fosforilação é responsável por conectar funcionalmente a

ECA à miosina IIA podendo regular a força dessa interação além de poder regular a estabilidade da ECA à membrana plasmática.

Mutações e deleções em cada uma das isoformas de miosina II estão associadas com diversas doenças e, em alguns casos, camundongos com estas alterações são gerados para mimetizar a doença humana para estudo. Alterações na atividade da miosina II contribuem para diversas patologias incluindo doenças neurais, câncer, doenças cardiovasculares e doenças renais (120). Vasodilatadores que têm como alvo a miosina II para regular a pressão arterial estão sendo usados no tratamento de doenças que resultam da atividade alterada desta classe de miosina. Como exemplo, há o vasodilatador Fasudil que é usado para aumentar o fluxo sanguíneo após o acidente vascular cerebral, mas que também já foi usado com sucesso para melhorar a aprendizagem e a memória funcional em modelo de roedor com Alzheimer (87, 168), assim como para a sobrevivência neural e a função motora em modelo de roedor com esclerose lateral amiotrófica e com Parkinson (178, 207).

A maioria dos estudos da miosina IIA no rim foca nas mutações que ocorrem no gene para a miosina IIA (*Myh9*) (101, 166, 204). É interessante destacar que a identificação do *Myh9* como principal contribuinte genético para a doença renal crônica entre as populações de origem africana abriu uma porta para entender os mecanismos da doença que estão subjacentes a várias síndromes de doenças renais. Estes estudos levaram à hipótese de que *Myh9* poderia ser um determinante importante do excesso de risco da doença renal crônica associada à ascendência africana.

Nossos achados juntamente aos demais aqui discutidos mostram a importância fisiológica e farmacológica do tráfego membranar, mecanismo

reconhecidamente importante na regulação da reabsorção de sal em túbulo proximal. Todas essas novas descobertas representam um avanço significativo em nossa compreensão dos complexos proteicos associados ao NHE3 e poderão ser uma estratégia terapêutica útil em doenças como a hipertensão.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a Ang II contrapõe-se aos efeitos do cAMP/PKA sobre a fosforilação e a atividade do NHE3 pela ativação da via AT1R/Gi e que a miosina IIA desempenha um papel na mediação da regulação da atividade do NHE3 em túbulo proximal renal de ratos em resposta à Ang II. Sugerem ainda que a desfosforilação do NHE3 na serina 552 pode representar um evento chave na regulação do manuseio de sal tubular proximal pela Ang II na presença de hormônios natriuréticos que promovem o aumento dos níveis de cAMP e da fosforilação do transportador e que a miosina IIA está envolvida na regulação do tráfego do NHE3 em túbulo proximal renal.

7. REFERÊNCIAS

1. **Aggen JB, Nairn AC, and Chamberlin R.** Regulation of protein phosphatase-1. *Chemistry & biology* 7: R13-23, 2000.
2. **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.
3. **Anand-Srivastava MB.** Modulation of Gi Proteins in Hypertension: Role of Angiotensin II and Oxidative Stress. *Curr Cardiol Rev* 6: 298-308, 2010.
4. **Ando H, Kawaai K, and Mikoshiba K.** IRBIT: a regulator of ion channels and ion transporters. *Biochim Biophys Acta* 1843: 2195-2204, 2014.
5. **Aronson PS.** Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Annual review of physiology* 47: 545-560, 1985.
6. **Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, Grünfeld JP, Gubler MC, Antignac C, and Heidet L.** Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephrol* 13: 65-74, 2002.
7. **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.
8. **Bader M, and Ganten D.** Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)* 86: 615-621, 2008.
9. **Baker JP, and Titus MA.** Myosins: matching functions with motors. *Curr Opin Cell Biol* 10: 80-86, 1998.
10. **Balakumar P, and Jagadeesh G.** A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cell Signal* 26: 2147-2160, 2014.
11. **Balakumar P, and Jagadeesh G.** Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. *J Mol Endocrinol* 53: R71-92, 2014.
12. **Banday AA, and Lokhandwala MF.** Oxidative stress causes renal angiotensin II type 1 receptor upregulation, Na⁺/H⁺ exchanger 3 overstimulation, and hypertension. *Hypertension* 57: 452-459, 2011.
13. **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.
14. **Barreto-Chaves ML, and Mello-Aires M.** Effect of luminal angiotensin II and ANP on early and late cortical distal tubule HCO₃⁻ reabsorption. *Am J Physiol* 271: F977-984, 1996.
15. **Baum M, Quigley R, and Quan A.** Effect of luminal angiotensin II on rabbit proximal convoluted tubule bicarbonate absorption. *Am J Physiol* 273: F595-600, 1997.
16. **Berne RM, and Koeppe BM.** *Berne & Levy physiology*. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2008, p. xii, 834 p.
17. **Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, and Johns DG.** Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2337-2365, 2001.

18. **Bezerra CN, Girardi AC, Carraro-Lacroix LR, and Rebouças NA.** Mechanisms underlying the long-term regulation of NHE3 by parathyroid hormone. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1232-1237, 2008.
19. **Biemesderfer D, Nagy T, DeGray B, and Aronson PS.** Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J Biol Chem* 274: 17518-17524, 1999.
20. **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. *The American journal of physiology* 265: F736-742, 1993.
21. **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.
22. **Bobulescu IA, Dwarakanath V, Zou L, Zhang J, Baum M, and Moe OW.** Glucocorticoids acutely increase cell surface Na⁺/H⁺ exchanger-3 (NHE3) by activation of NHE3 exocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F685-691, 2005.
23. **Bond JE, Bergeron A, Thurlow P, Selim MA, Bowers EV, Kuang A, and Levinson H.** Angiotensin-II mediates nonmuscle myosin II activation and expression and contributes to human keloid disease progression. *Mol Med* 17: 1196-1203, 2011.
24. **Boron WF, and Boulpaep EL.** *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2012, p. xiii, 1337 pages.
25. **Briske-Anderson MJ, Finley JW, and Newman SM.** The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 248-257, 1997.
26. **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. *The Journal of physiology* 530: 359-366, 2001.
27. **Cano A.** Characterization of the rat NHE3 promoter. *The American journal of physiology* 271: F629-636, 1996.
28. **Cano A, Miller RT, Alpern RJ, and Preisig PA.** Angiotensin II stimulation of Na-H antiporter activity is cAMP independent in OKP cells. *Am J Physiol* 266: C1603-1608, 1994.
29. **Capponi AM.** Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Blood Press Suppl* 2: 41-46, 1996.
30. **Carey RM.** The intrarenal renin-angiotensin system in hypertension. *Adv Chronic Kidney Dis* 22: 204-210, 2015.
31. **Carey RM, and Siragy HM.** Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24: 261-271, 2003.
32. **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. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1647-1655, 2009.
33. **Ceulemans H, and Bollen M.** Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84: 1-39, 2004.
34. **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.
35. **Chan W, Calderon G, Swift AL, Moseley J, Li S, Hosoya H, Arias IM, and Ortiz DF.** Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 280: 23741-23747, 2005.
36. **Chen SR, Chen M, Deng SL, Hao XX, Wang XX, and Liu YX.** Sodium-hydrogen exchanger NHA1 and NHA2 control sperm motility and male fertility. *Cell Death Dis* 7: e2152, 2016.
37. **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.

38. **Chintapalli VR, Kato A, Henderson L, Hirata T, Woods DJ, Overend G, Davies SA, Romero MF, and Dow JA.** Transport proteins NHA1 and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 11720-11725, 2015.
39. **Chou CL, Yu MJ, Kassai EM, Morris RG, Hoffert JD, Wall SM, and Knepper MA.** Roles of basolateral solute uptake via NKCC1 and of myosin II in vasopressin-induced cell swelling in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F192-201, 2008.
40. **Chung IT, Hosaka T, Harada N, Jambaldorj B, Fukunaga K, Nishiwaki Y, Teshigawara K, Sakai T, Nakaya Y, and Funaki M.** Myosin IIA participates in docking of Glut4 storage vesicles with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 995-999, 2010.
41. **Cogan MG.** Angiotensin II: a powerful controller of sodium transport in the early proximal tubule. *Hypertension* 15: 451-458, 1990.
42. **Cole JA, Forte LR, Krause WJ, and Thorne PK.** Clonal sublines that are morphologically and functionally distinct from parental OK cells. *Am J Physiol* 256: F672-679, 1989.
43. **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. *J Biol Chem* 275: 31601-31608, 2000.
44. **Crajoinas RO, Lessa LM, Carraro-Lacroix LR, Davel AP, Pacheco BP, Rossoni LV, Malnic G, and Girardi AC.** Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F872-881, 2010.
45. **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. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F355-363, 2011.
46. **Crajoinas RO, Pessoa TD, Rodrigues MV, Malnic G, and Girardi AC.** Changes in the activity and expression of protein phosphatase-1 accompany the differential regulation of NHE3 before and after the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol (Oxf)* 211: 395-408, 2014.
47. **Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ, Spurney RF, Kim HS, Smithies O, Le TH, and Coffman TM.** Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 115: 1092-1099, 2005.
48. **D'Souza S, Garcia-Cabado A, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, Moore HP, Orlowski J, and Grinstein S.** The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na⁺/H⁺ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J Biol Chem* 273: 2035-2043, 1998.
49. **Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, and Fabiani ME.** Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100: 481-492, 2001.
50. **Dixit MP, Xu L, Xu H, Bai L, Collins JF, and Ghishan FK.** Effect of angiotensin-II on renal Na⁺/H⁺ exchanger-NHE3 and NHE2. *Biochim Biophys Acta* 1664: 38-44, 2004.
51. **Donowitz M, and Li X.** Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiological reviews* 87: 825-872, 2007.
52. **Donowitz M, Ming Tse C, and Fuster D.** SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Mol Aspects Med* 34: 236-251, 2013.
53. **dos Santos L, Salles TA, Arruda-Junior DF, Campos LC, Pereira AC, Barreto AL, Antonio EL, Mansur AJ, Tucci PJ, Krieger JE, and Girardi AC.** Circulating dipeptidyl peptidase IV activity correlates with cardiac dysfunction in human and experimental heart failure. *Circ Heart Fail* 6: 1029-1038, 2013.
54. **du Cheyron D, Chalumeau C, Defontaine N, Klein C, Kellermann O, Paillard M, and Poggioli J.** Angiotensin II stimulates NHE3 activity by exocytic insertion of the transporter: role of PI 3-kinase. *Kidney Int* 64: 939-949, 2003.
55. **East DA, and Mulvihill DP.** Regulation and function of the fission yeast myosins. *J Cell Sci* 124: 1383-1390, 2011.

56. **Ellis B, Li XC, Miguel-Qin E, Gu V, and Zhuo JL.** Evidence for a functional intracellular angiotensin system in the proximal tubule of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R494-509, 2012.
57. **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. *J Biol Chem* 274: 11289-11295, 1999.
58. **Farah LX, Valentini V, Pessoa TD, Malnic G, McDonough AA, and Girardi AC.** The physiological role of glucagon-like peptide-1 in the regulation of renal function. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F123-127, 2016.
59. **Fuster DG, and Alexander RT.** Traditional and emerging roles for the SLC9 Na⁺/H⁺ exchangers. *Pflugers Arch* 466: 61-76, 2014.
60. **Giasson E, Servant MJ, and Meloche S.** Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272: 26879-26886, 1997.
61. **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. *J Biol Chem* 276: 46671-46677, 2001.
62. **Girardi AC, Fukuda LE, Rossoni LV, Malnic G, and Rebouças NA.** Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na⁺ - H⁺ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F414-422, 2008.
63. **Girardi AC, Knauf F, Demuth HU, and Aronson PS.** Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1238-1245, 2004.
64. **Girardi AC, Titan SM, Malnic G, and Rebouças NA.** Chronic effect of parathyroid hormone on NHE3 expression in rat renal proximal tubules. *Kidney Int* 58: 1623-1631, 2000.
65. **Gold MG, Barford D, and Komander D.** Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr Opin Struct Biol* 16: 693-701, 2006.
66. **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.
67. **Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, Giani JF, Nguyen MT, Riquier-Brisson AD, Seth DM, Fuchs S, Eladari D, Picard N, Bachmann S, Delpire E, Peti-Peterdi J, Navar LG, Bernstein KE, and McDonough AA.** The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. *J Clin Invest* 123: 2011-2023, 2013.
68. **Goode BL, Drubin DG, and Barnes G.** Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* 12: 63-71, 2000.
69. **Griendling KK, Lassègue B, and Alexander RW.** Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 281-306, 1996.
70. **Grønborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, Jensen ON, and Pandey A.** A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* 1: 517-527, 2002.
71. **Hansson V, Skålhegg BS, and Taskén K.** Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73: 81-92, 2000.
72. **Harold FM, and Papineau D.** Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis*. II. Proton and sodium extrusion. *J Membr Biol* 8: 45-62, 1972.
73. **Harris PJ, Thomas D, Zhuo J, and Skinner SL.** Regulation of proximal tubule sodium reabsorption by angiotensin II (All) and atrial natriuretic factor (ANF). *Acta Physiol Scand Suppl* 591: 63-65, 1990.

74. **Harris PJ, and Young JA.** Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflugers Arch* 367: 295-297, 1977.
75. **Hartman MA, Finan D, Sivaramakrishnan S, and Spudich JA.** Principles of unconventional myosin function and targeting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 133-155, 2011.
76. **Harvey BJ, Alzamora R, Healy V, Renard C, and Doolan CM.** Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing. *Biochim Biophys Acta* 1566: 116-128, 2002.
77. **Haulica I, Bild W, and Serban DN.** Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6: 121-131, 2005.
78. **He P, Klein J, and Yun CC.** Activation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by angiotensin II is mediated by inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding protein released with IP3 (IRBIT) and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 285: 27869-27878, 2010.
79. **He P, and Yun CC.** Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010: 238080, 2010.
80. **He P, Zhang H, and Yun CC.** IRBIT, inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding protein released with IP3, binds Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and activates NHE3 activity in response to calcium. *J Biol Chem* 283: 33544-33553, 2008.
81. **He P, Zhao L, No YR, Karvar S, and Yun CC.** The NHERF1 PDZ1 domain and IRBIT interact and mediate the activation of Na⁺/H⁺ exchanger 3 by ANG II. *Am J Physiol Renal Physiol* 311: F343-351, 2016.
82. **Horita S, Zheng Y, Hara C, Yamada H, Kunimi M, Taniguchi S, Uwatoko S, Sugaya T, Goto A, Fujita T, and Seki G.** Biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter by angiotensin II type 1A receptor. *Hypertension* 40: 707-712, 2002.
83. **Hosaka K, Takeda T, Iino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F, and Saito A.** Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int* 75: 1308-1315, 2009.
84. **Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, and Paillard M.** Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport activity in proximal tubule. *Kidney Int* 50: 1496-1505, 1996.
85. **Hu MC, Di Sole F, Zhang J, McLeroy P, and Moe OW.** Chronic regulation of the renal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3 by dopamine: translational and posttranslational mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1169-1180, 2013.
86. **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. *J Biol Chem* 276: 26906-26915, 2001.
87. **Huentelman MJ, Stephan DA, Talboom J, Corneveaux JJ, Reiman DM, Gerber JD, Barnes CA, Alexander GE, Reiman EM, and Bimonte-Nelson HA.** Peripheral delivery of a ROCK inhibitor improves learning and working memory. *Behav Neurosci* 123: 218-223, 2009.
88. **Inoue BH, dos Santos L, Pessoa TD, Antonio EL, Pacheco BP, Savignano FA, Carraro-Lacroix LR, Tucci PJ, Malnic G, and Girardi AC.** Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R166-174, 2012.
89. **Jakobs KH, Aktories K, and Schultz G.** Inhibition of adenylate cyclase by hormones and neurotransmitters. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14: 173-187, 1981.
90. **Kandasamy RA, and Orlowski J.** Genomic organization and glucocorticoid transcriptional activation of the rat Na⁺/H⁺ exchanger Nhe3 gene. *J Biol Chem* 271: 10551-10559, 1996.

91. **Karim ZG, Chambrey R, Chalumeau C, Defontaine N, Warnock DG, Paillard M, and Poggioli J.** Regulation by PKC isoforms of Na(+)/H(+) exchanger in luminal membrane vesicles isolated from cortical tubules. *Am J Physiol* 277: F773-778, 1999.
92. **Kaunisto KM, and Rajaniemi HJ.** Expression and localization of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the rat efferent ducts. *J Androl* 23: 237-241, 2002.
93. **Kobori H, Nangaku M, Navar LG, and Nishiyama A.** The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59: 251-287, 2007.
94. **Kocinsky HS, Dynia DW, Wang T, and Aronson PS.** NHE3 phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F212-218, 2007.
95. **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. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F249-258, 2005.
96. **Kohlstedt K, Kellner R, Busse R, and Fleming I.** Signaling via the angiotensin-converting enzyme results in the phosphorylation of the nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Mol Pharmacol* 69: 19-26, 2006.
97. **Kohlstedt K, Shoghi F, Müller-Esterl W, Busse R, and Fleming I.** CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane. *Circ Res* 91: 749-756, 2002.
98. **Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, and Sellers JR.** Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* 279: 35557-35563, 2004.
99. **Krendel M, and Mooseker MS.** Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 20: 239-251, 2005.
100. **Krug AW, Papavassiliou F, Hopfer U, Ullrich KJ, and Gekle M.** Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Arch* 446: 492-496, 2003.
101. **Kunishima S, and Saito H.** Advances in the understanding of MYH9 disorders. *Curr Opin Hematol* 17: 405-410, 2010.
102. **Kurashima K, D'Souza S, Szászi K, Ramjeesingh R, Orlowski J, and Grinstein S.** The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 274: 29843-29849, 1999.
103. **Kurashima K, Yu FH, Cabado AG, Szabó 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. *J Biol Chem* 272: 28672-28679, 1997.
104. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
105. **Lamprecht G, Weinman EJ, and Yun CH.** The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3. *J Biol Chem* 273: 29972-29978, 1998.
106. **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 Renal physiology* 281: F718-727, 2001.
107. **Leong PK, Devillez A, Sandberg MB, Yang LE, Yip DK, Klein JB, and McDonough AA.** Effects of ACE inhibition on proximal tubule sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F854-863, 2006.
108. **Leong PK, Yang LE, Holstein-Rathlou NH, and McDonough AA.** Angiotensin II clamp prevents the second step in renal apical NHE3 internalization during acute hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1142-1150, 2002.

109. **Li H, Weatherford ET, Davis DR, Keen HL, Grobe JL, Daugherty A, Cassis LA, Allen AM, and Sigmund CD.** Renal proximal tubule angiotensin AT1A receptors regulate blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R1067-1077, 2011.
110. **Li XC, Carretero OA, Navar LG, and Zhuo JL.** AT1 receptor-mediated accumulation of extracellular angiotensin II in proximal tubule cells: role of cytoskeleton microtubules and tyrosine phosphatases. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F375-383, 2006.
111. **Li XC, Hopfer U, and Zhuo JL.** AT1 receptor-mediated uptake of angiotensin II and NHE-3 expression in proximal tubule cells through a microtubule-dependent endocytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1342-1352, 2009.
112. **Li XC, Hopfer U, and Zhuo JL.** Novel signaling mechanisms of intracellular angiotensin II-induced NHE3 expression and activation in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 303: F1617-1628, 2012.
113. **Li XC, Shull GE, Miguel-Qin E, and Zhuo JL.** Role of the Na⁺/H⁺ exchanger 3 in angiotensin II-induced hypertension. *Physiol Genomics* 47: 479-487, 2015.
114. **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.
115. **Lin P, Zhu H, Cai C, Wang X, Cao C, Xiao R, Pan Z, Weisleder N, Takeshima H, and Ma J.** Nonmuscle myosin IIA facilitates vesicle trafficking for MG53-mediated cell membrane repair. *FASEB J* 26: 1875-1883, 2012.
116. **Liu FY, and Cogan MG.** Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 84: 83-91, 1989.
117. **Liu FY, and Cogan MG.** Effects of intracellular calcium on proximal bicarbonate absorption. *Am J Physiol* 259: F451-457, 1990.
118. **Liu FY, and Cogan MG.** Role of protein kinase C in proximal bicarbonate absorption and angiotensin signaling. *Am J Physiol* 258: F927-933, 1990.
119. **Lorenz JN, Schultheis PJ, Traynor T, Shull GE, and Schnermann J.** Micropuncture analysis of single-nephron function in NHE3-deficient mice. *The American journal of physiology* 277: F447-453, 1999.
120. **Ma X, and Adelstein RS.** The role of vertebrate nonmuscle Myosin II in development and human disease. *Bioarchitecture* 4: 88-102, 2014.
121. **Malnic G, and de Mello-Aires M.** Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am J Physiol* 220: 1759-1767, 1971.
122. **Marcil J, de Champlain J, and Anand-Srivastava MB.** Overexpression of Gi-proteins precedes the development of DOCA-salt-induced hypertension: relationship with adenylyl cyclase. *Cardiovasc Res* 39: 492-505, 1998.
123. **Marcil J, Thibault C, and Anand-Srivastava MB.** Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1009-1022, 1997.
124. **McDonough AA.** Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R851-861, 2010.
125. **McDonough AA, and Biemesderfer D.** Does membrane trafficking play a role in regulating the sodium/hydrogen exchanger isoform 3 in the proximal tubule? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 533-541, 2003.
126. **Mehta PK, and Griendling KK.** Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-97, 2007.
127. **Mermall V, Post PL, and Mooseker MS.** Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279: 527-533, 1998.

128. **Minkoff C, Shenolikar S, and Weinman EJ.** Assembly of signaling complexes by the sodium-hydrogen exchanger regulatory factor family of PDZ-containing proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8: 603-608, 1999.
129. **Miyata N, Park F, Li XF, and Cowley AW.** Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 277: F437-446, 1999.
130. **Moe OW.** Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol* 10: 2412-2425, 1999.
131. **Moe OW, Amemiya M, and Yamaji Y.** Activation of protein kinase A acutely inhibits and phosphorylates Na/H exchanger NHE-3. *J Clin Invest* 96: 2187-2194, 1995.
132. **Murer H, Hopfer U, and Kinne R.** Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochem J* 154: 597-604, 1976.
133. **Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, and Bernstein KE.** Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236, 1991.
134. **Murray AJ.** Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 1: re4, 2008.
135. **Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, and Dzau VJ.** Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 393-399, 1993.
136. **Navar LG, Imig JD, Zou L, and Wang CT.** Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 17: 412-422, 1997.
137. **Navar LG, Kobori H, Prieto MC, and Gonzalez-Villalobos RA.** Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension* 57: 355-362, 2011.
138. **Navar LG, and Nishiyama A.** Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 107-115, 2004.
139. **Nguyen MT, Han J, Ralph DL, Veiras LC, and McDonough AA.** Short-term nonpressor angiotensin II infusion stimulates sodium transporters in proximal tubule and distal nephron. *Physiol Rep* 3: 2015.
140. **Nguyen MT, Lee DH, Delpire E, and McDonough AA.** Differential regulation of Na⁺ transporters along nephron during ANG II-dependent hypertension: distal stimulation counteracted by proximal inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F510-519, 2013.
141. **Noel J, Roux D, and Pouyssegur J.** Differential localization of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. *J Cell Sci* 109 (Pt 5): 929-939, 1996.
142. **Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel AP, Lessa LM, Rossoni LV, and Girardi AC.** Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 29: 520-528, 2011.
143. **Poggioli J, Lazar G, Houillier P, Gardin JP, Achard JM, and Paillard M.** Effects of angiotensin II and nonpeptide receptor antagonists on transduction pathways in rat proximal tubule. *Am J Physiol* 263: C750-758, 1992.
144. **Pontes RB, Crajoinas RO, Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Girardi AC, Campos RR, and Bergamaschi CT.** Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F848-856, 2015.
145. **Pouyssegur J.** Molecular biology and hormonal regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Renal physiology and biochemistry* 17: 190-193, 1994.
146. **Pushkin A, Clark I, Kwon TH, Nielsen S, and Kurtz I.** Immunolocalization of NBC3 and NHE3 in the rat epididymis: colocalization of NBC3 and the vacuolar H⁺-ATPase. *J Androl* 21: 708-720, 2000.
147. **Quan A, and Baum M.** Endogenous angiotensin II modulates rat proximal tubule transport with acute changes in extracellular volume. *Am J Physiol* 275: F74-78, 1998.

148. **Queiroz-Leite GD, Peruzzetto MC, Neri EA, and Rebouças NA.** Transcriptional regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by chronic exposure to angiotensin II in renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 470-476, 2011.
149. **Reczek D, Berryman M, and Bretscher A.** Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 139: 169-179, 1997.
150. **Reisinger V, and Eichacker LA.** Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics* 6 Suppl 2: 6-15, 2006.
151. **Riquier-Brison AD, Leong PK, Pihakaski-Maunsbach K, and McDonough AA.** Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F177-186, 2010.
152. **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.
153. **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.
154. **Ross JL, Ali MY, and Warshaw DM.** Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 20: 41-47, 2008.
155. **Rossier MF, and Capponi AM.** Cytosolic calcium oscillations in signal transduction pathways. *Mini Rev Med Chem* 2: 353-360, 2002.
156. **Saccomani G, Mitchell KD, and Navar LG.** Angiotensin II stimulation of Na(+)-H+ exchange in proximal tubule cells. *Am J Physiol* 258: F1188-1195, 1990.
157. **Sardet C, Franchi A, and Pouyssegur J.** Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* 56: 271-280, 1989.
158. **Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, and Dzau VJ.** Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 253-259, 1992.
159. **Schelling JR, and Abu Jawdeh BG.** Regulation of cell survival by Na⁺/H⁺ exchanger-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F625-632, 2008.
160. **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.
161. **Schuster VL, Kokko JP, and Jacobson HR.** Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J Clin Invest* 73: 507-515, 1984.
162. **Sellers JR.** Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1496: 3-22, 2000.
163. **Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, d'Apolito M, Iolascon A, Zelante LL, Savoia A, Balduini CL, Noris P, Magrini U, Belletti S, Heath KE, Babcock M, Glucksman MJ, Aliprandis E, Bizzaro N, Desnick RJ, and Martignetti JA.** Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 26: 103-105, 2000.
164. **Si J, Ge Y, Zhuang S, and Gong R.** Inhibiting nonmuscle myosin II impedes inflammatory infiltration and ameliorates progressive renal disease. *Lab Invest* 90: 448-458, 2010.
165. **Sim AT, and Scott JD.** Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26: 209-217, 1999.
166. **Singh N, Nainani N, Arora P, and Venuto RC.** CKD in MYH9-related disorders. *Am J Kidney Dis* 54: 732-740, 2009.

167. **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.
168. **Song Y, Chen X, Wang LY, Gao W, and Zhu MJ.** Rho kinase inhibitor fasudil protects against β -amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats. *CNS Neurosci Ther* 19: 603-610, 2013.
169. **Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, and Mitchison TJ.** Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* 299: 1743-1747, 2003.
170. **Sweeney HL, and Houdusse A.** Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* 39: 539-557, 2010.
171. **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.
172. **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.
173. **Teranishi K, Mekuchi M, and Kaneko T.** Expression of sodium/hydrogen exchanger 3 and cation-chloride cotransporters in the kidney of Japanese eel acclimated to a wide range of salinities. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 164: 333-343, 2013.
174. **Thekkumkara T, and Linas SL.** Role of internalization in AT(1A) receptor function in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F623-629, 2002.
175. **Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, and Smith RD.** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45: 205-251, 1993.
176. **Tsuganezawa H, Preisig PA, and Alpern RJ.** Dominant negative c-Src inhibits angiotensin II induced activation of NHE3 in OKP cells. *Kidney Int* 54: 394-398, 1998.
177. **Turban S, Beutler KT, Morris RG, Masilamani S, Fenton RA, Knepper MA, and Packer RK.** Long-term regulation of proximal tubule acid-base transporter abundance by angiotensin II. *Kidney Int* 70: 660-668, 2006.
178. **Tönges L, Günther R, Suhr M, Jansen J, Balck A, Saal KA, Barski E, Nientied T, Götz AA, Koch JC, Mueller BK, Weishaupt JH, Sereda MW, Hanisch UK, Bähr M, and Lingor P.** Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 62: 217-232, 2014.
179. **Uh M, White BH, and Sidhu A.** Alteration of association of agonist-activated renal D1(A) dopamine receptors with G proteins in proximal tubules of the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 16: 1307-1313, 1998.
180. **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 Renal physiology* 278: F375-379, 2000.
181. **Wade JB, Liu J, Coleman RA, Cunningham R, Steplock DA, Lee-Kwon W, Pallone TL, Shenolikar S, and Weinman EJ.** Localization and interaction of NHERF isoforms in the renal proximal tubule of the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1494-1503, 2003.
182. **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.
183. **Wang T, and Chan YL.** Mechanism of angiotensin II action on proximal tubular transport. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 689-695, 1990.
184. **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. *The American journal of physiology* 277: F298-302, 1999.
185. **Wang X, Chong M, Wang H, Zhang J, Xu H, and Liu D.** Block the function of nonmuscle myosin II by blebbistatin induces zebrafish embryo cardia bifida. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51: 211-217, 2015.

186. **Wei Q, and Adelstein RS.** Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. *Mol Biol Cell* 11: 3617-3627, 2000.
187. **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.
188. **Weinman EJ, Minkoff C, and Shenolikar S.** Signal complex regulation of renal transport proteins: NHERF and regulation of NHE3 by PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F393-399, 2000.
189. **Weinman EJ, Steplock D, and Shenolikar S.** CAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na⁺-H⁺ exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. *J Clin Invest* 92: 1781-1786, 1993.
190. **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.
191. **Wolf G, and Wenzel UO.** Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension* 43: 693-698, 2004.
192. **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 Renal physiology* 284: F1190-1198, 2003.
193. **Woodcock EA, and Johnston CI.** Inhibition of adenylate cyclase by angiotensin II in rat renal cortex. *Endocrinology* 111: 1687-1691, 1982.
194. **Xu L, Dixit MP, Nullmeyer KD, Xu H, Kiela PR, Lynch RM, and Ghishan FK.** Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger-NHE3 by angiotensin-II in OKP cells. *Biochim Biophys Acta* 1758: 519-526, 2006.
195. **Yang L, Leong PK, Chen JO, Patel N, Hamm-Alvarez SF, and McDonough AA.** Acute hypertension provokes internalization of proximal tubule NHE3 without inhibition of transport activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F730-740, 2002.
196. **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. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1197-1208, 2007.
197. **Yang LE, Sandberg MB, Can AD, Pihakaski-Maunsbach K, and McDonough AA.** Effects of dietary salt on renal Na⁺ transporter subcellular distribution, abundance, and phosphorylation status. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1003-1016, 2008.
198. **Yim HE, and Yoo KH.** Renin-Angiotensin system - considerations for hypertension and kidney. *Electrolyte Blood Press* 6: 42-50, 2008.
199. **Yu H, Cook TJ, and Sinko PJ.** Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* 14: 757-762, 1997.
200. **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. *J Biol Chem* 273: 25856-25863, 1998.
201. **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.
202. **Zachos NC, Tse M, and Donowitz M.** Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu Rev Physiol* 67: 411-443, 2005.
203. **Zatz R.** *Bases Fisiológicas da Nefrologia*. Atheneu, 2012, p. 416.
204. **Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, Liu C, Zervas P, Daniels MP, Chan CC, Kozin E, Kachar B, Kelley MJ, Kopp JB, and Adelstein RS.** Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 119: 238-250, 2012.

205. **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.
206. **Zhao H, Wiederkehr MR, Fan L, Collazo RL, Crowder LA, and Moe OW.** Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP. Role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605. *J Biol Chem* 274: 3978-3987, 1999.
207. **Zhao YF, Zhang Q, Xi JY, Li YH, Ma CG, and Xiao BG.** Multitarget intervention of Fasudil in the neuroprotection of dopaminergic neurons in MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 353: 28-37, 2015.
208. **Zheng Y, Horita S, Hara C, Kunimi M, Yamada H, Sugaya T, Goto A, Fujita T, and Seki G.** Biphasic regulation of renal proximal bicarbonate absorption by luminal AT(1A) receptor. *J Am Soc Nephrol* 14: 1116-1122, 2003.
209. **Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, and Li XC.** New frontiers in the intrarenal Renin-Angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 166, 2013.
210. **Zhuo JL, and Li XC.** New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides* 32: 1551-1565, 2011.