

ROSÉLIA DOS SANTOS DAMASCENO

**EFEITO DA GLICOSE SOBRE OS MECANISMOS DE
EXTRUSÃO DE PRÓTONS EM CÉLULAS MDCK**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Oliveira de Souza

São Paulo
2010

RESUMO

DAMASCENO, R. S. **Efeito da glicose sobre os mecanismos de extrusão de prótons em células MDCK.** 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este estudo investigou o efeito da glicose sobre a atividade e expressão da isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE1) e da H^+ -ATPase do tipo vacuolar, em células MDCK (Mardin Darby Canine Kidney), linhagem derivada de rim de cão, que apresenta características similares às células principais e intercalares das porções distais do néfron. Por microscopia de fluorescência, se avaliou a velocidade de recuperação do pH_i (dpH_i/dt) e a capacidade tamponante (β_i). A partir desses parâmetros, se calculou o efluxo de H^+ (J_{H^+}). Por Western blot, se avaliou a expressão de NHE1 e da subunidade E da H^+ -ATPase do tipo vacuolar. **Resultados:** Na condição controle o efluxo de H^+ foi de 6.27 ± 0.51 mM/min ($n = 9$). O tratamento agudo com glicose (25 mM) aumentou o efluxo de H^+ via NHE1, o qual foi modulado pela PI3 cinase. Na mesma condição, não se observou alterações na atividade da H^+ -ATPase. O tratamento crônico com glicose (25 mM) induziu significativo aumento do efluxo de H^+ , via NHE1 e H^+ -ATPase. O efeito estimulador da glicose sobre a atividade de NHE1 e H^+ -ATPase foi dependente da atividade da p38 MAP cinase. Além disso, o tratamento crônico com glicose (25 mM) induziu fosforilação do sistema ezrin/radixin/moesin (ERM) e Akt. **Conclusões:** Nossos resultados indicam que no tratamento agudo com glicose (25 mM), o NHE1 foi modulado pela PI3 cinase. Contudo, no tratamento crônico com glicose (25 mM), a atividade do NHE1 foi modulada pelo sistema ERM/Akt e a atividade da H^+ -ATPase foi modulada pela p38 MAP cinase.

Palavras-chave: Trocador Na^+/H^+ . H^+ -ATPase. Glicose. Sistema NHE1/ERM/PI3K/Akt.

ABSTRACT

DAMASCENO, R. S. **Effect of glucose on mechanisms of proton extrusion in MDCK cells.** 2010. 62 p. Master Thesis- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This study investigated the effect of glucose on the activity and expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) and vacuolar H⁺-ATPase, in Mardin Darby Canine Kidney (MDCK) cells from dog kidney, with similar characteristics to principal and intercalated cells of the distal nephron. The pH_i recovery rate (dpH_i/dt) and the buffering capacity (β_i) was evaluated through fluorescence microscopy. From these parameters the H⁺ efflux (J_{H⁺}) was calculated. By Western blot, the NHE1 and H⁺-ATPase (E subunit) expression was evaluated. **Results:** In the control situation the H⁺ efflux was 6.27 ± 0.51 mM/pH units (n = 9). Acute treatment with glucose (25 mM) increased the H⁺ efflux via NHE1, which was modulated by PI3 kinase. In the same condition, the H⁺-ATPase activity did not change. Chronic treatment with glucose (25 mM) induced significant increase of H⁺ efflux via NHE1 and H⁺-ATPase. The stimulatory effect of glucose on the NHE1 and H⁺-ATPase activity was dependent on p38 MAP kinase activity. Furthermore, chronic treatment with glucose (25 mM) induced Ezrin/radixin/moesin (ERM) and Akt phosphorylation. **Conclusions:** Our results indicate that during the acute treatment with glucose (25 mM), the NHE1 was modulated by PI3 kinase. However, during chronic treatment with glucose (25 mM), NHE1 activity was modulated by the ERM/Akt system and of H⁺-ATPase activity was modulated by p38 MAP Kinase.

Key words: Na⁺/H⁺ exchanger. Vacuolar H⁺-ATPase. Glucose. NHE1/ERM/Akt system.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A manutenção do pH intracelular (pH_i) é de fundamental importância para o adequado funcionamento dos processos bioquímicos celulares. Os mecanismos que contribuem para a regulação do pH_i são amplamente estudados e dependem tanto dos transportadores iônicos localizados na membrana plasmática (Na^+/H^+ , H^+ -ATPase, H^+/K^+ -ATPase, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$) como dos tampões intracelulares (OBERLEITHNER et al., 1990; SALEH e BATTLE, 1990; SCHUSTER et al., 1991).

Como muitos produtos catabólicos são ácidos, os indivíduos necessitam de mecanismos que evitem a queda do pH_i . O rim, favorecendo a excreção de radicais ácidos, exerce papel relevante na manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo. O epitélio dos segmentos distais do néfron, incluindo o do ducto coletor, é heterogêneo, porque apresenta diferentes tipos celulares (células principais e intercalares α e β). No ducto coletor, as células principais são importantes para a reabsorção de Na^+ e água e as células intercalares secretam H^+ , reabsorvem K^+ e reabsorvem ou secretam HCO_3^- . Por isso, em condições normais, esse segmento do néfron é essencial para a regulação do pH do meio interno e conseqüentemente, para a acidificação urinária (MALNIC, 1987). Contudo, patologias como diabetes mellitus descompensado podem induzir acúmulo de ácidos provenientes do metabolismo. Desses ácidos fazem parte o ácido acetoacético e o ácido beta-hidroxibutírico, que normalmente são metabolizados a CO_2 e água pelo ciclo de Krebs, cujo funcionamento depende do metabolismo da glicose. Nestas condições, os ácidos em excesso devem ser neutralizados pelo tampão bicarbonato, que é transformado em água e CO_2 , sendo este último, eliminado pelos pulmões. A conseqüência pode ser uma queda da concentração de bicarbonato no plasma, o que leva a uma queda do pH neste compartimento e caracteriza um quadro de acidose metabólica. Esta por sua vez, pode ser em parte, corrigida pelas respostas adaptativas renais que incluem a estimulação do trocador Na^+/H^+ e da H^+ -ATPase (AMEMIYA et al., 1995; NAKAMURA, 2004).

Neste trabalho enfatizamos a participação do trocador Na^+/H^+ e da H^+ -ATPase na regulação do pH intracelular (pH_i).

1.2 Trocador Na^+/H^+

O trocador Na^+/H^+ é uma proteína de membrana com várias funções importantes, tais como: manutenção do pH_i , regulação do volume e divisão celular (NOEL & POUYSSÉGUR, 1995). Várias isoformas do trocador Na^+/H^+ já foram clonadas ($\text{NHE}_1 - \text{NHE}_{10}$) (SARDET et al., 1989; TSE et al., 1992; TSE et al., 1993; ORLOWSKI et al., 1992; WANG et al., 1993; KLANKE et al., 1995; NUMATA et al., 2001; GOYAL et al., 2003; LEE et al., 2008).

A regulação do pH_i é monitorada principalmente pela isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE_1) (**Figura 1**). Essa isoforma corresponde a uma glicoproteína de aproximadamente 110 kDa, com 10 a 12 segmentos transmembrânicos (SARDET et al., 1989, 1990), cujo domínio N-terminal (denominado unidade de transporte) é altamente sensível ao amiloride e o domínio C-terminal (ou citoplasmático regulatório) apresenta grande sensibilidade à vários sinais extracelulares, como: fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas (WAKABAYASHI et al., 1992, 1994; BIANCHINE et al., 1995). A isoforma NHE_1 é ubiquamente distribuída em todas as células de vertebrados, sendo nas células de epitélios transportadores, preferencialmente, localizada na membrana basolateral (TSE, et al., 1991; TSE, 1993). No rim, essa isoforma encontra-se na membrana basolateral de todas as células dos múltiplos segmentos do néfron (BIEMESDERFER et al., 1992). Contudo, nas células do túbulo proximal, além do NHE_1 na membrana basolateral, existe também na membrana luminal, a isoforma 3 (NHE_3) com particular relevância para o rim, uma vez que, ao secretar H^+ para a luz tubular, reabsorve Na^+ para a célula (AMEMIYA et al., 1995).

Dados da literatura mostram que a porção regulatória C-terminal do NHE_1 é um importante sítio de interação da proteína com várias outras proteínas regulatórias, que podem atuar alterando a configuração do NHE_1 ou converter mensagens celulares para modular sua atividade (MALO e FLIEGEL, 2006). O NHE_1 possui sítios para proteínas dependentes de cálcio, incluindo a calcineurina e a calmodulina (CaM) (BERTRAND et al., 1994; PANG et al., 2001). Além disso, o NHE_1 possui sítios de fosforilação para Fosfatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂, fator regulador de pH_i), proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA) (WAKABAYASHI et al., 1992; AHARONOVITZ et al., 2000; SALAMANCA et al., 2005). Adicionalmente, o NHE_1 possui outros sítios para fosforilação, os quais são modulados por diferentes proteínas sinalizadoras, incluindo Akt (membro da família de proteínas cinases B) e p38 MAP cinase (MALO e FLIEGEL, 2006; DARMELLAH, 2007). A organização do citoesqueleto é também um fator associado com a atividade do NHE_1 e sabe-se que o sistema Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) é um complexo protéico que contribui para a organização do

citoesqueleto, permitindo a interação dos filamentos de actina com várias proteínas de membrana (VAHERI et al., 1997). O NHE1 possui 2 sítios para o sistema ERM e quando este é ativado pela Rho cinase, liga-se ao NHE1 e o complexo ERM/NHE1 recruta a proteína phosphoinositide-3 cinase (PI3K), a qual estimula a Akt.

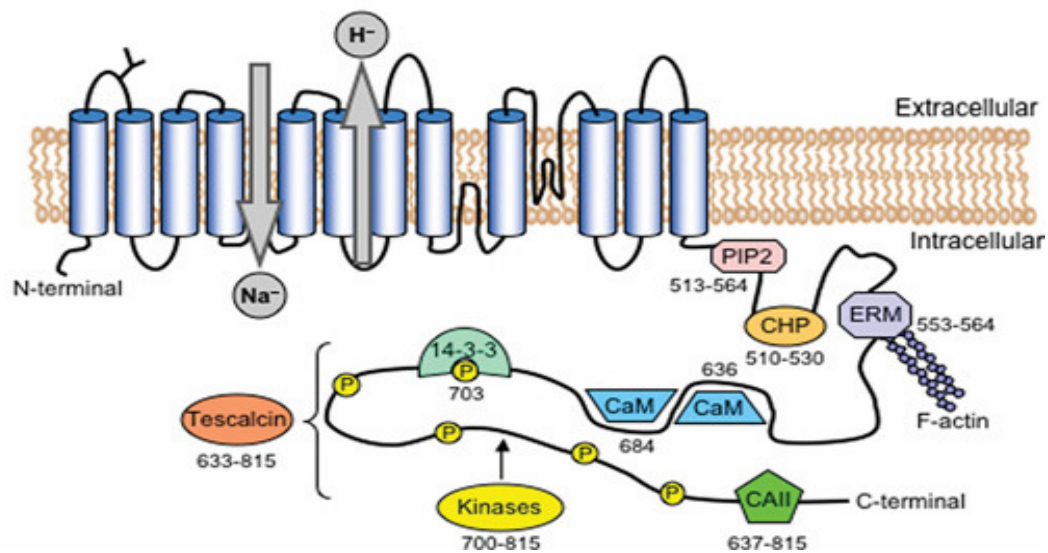


Figura 1. Esquema da estrutura da isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE1).

Fonte: Fliegel I. et al, 2007.

A glicose também pode exercer um papel modulatório relevante sobre o trocador Na^+/H^+ . Estudos em células mesangiais e endoteliais indicam que glicose (25 a 30 mM) induz aumento da atividade e/ou expressão da isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (GANZ et al., 2000, WANG et al., 2008).

Nascimento Gomes e Mello-Aires (1990 e 1997) encontraram que em túbulos proximais de rins de ratos, a administração aguda de glicose (20 mM) na luz do túbulo, inibiu o trocador Na^+/H^+ localizado na membrana luminal das células desse segmento do néfron. Enquanto que, no diabetes mellitus, a glicose estimulou a atividade desse trocador. Contudo, o efeito da glicose sobre a atividade de NHE1 ainda não foi elucidado.

1.3 H^+ -ATPase do tipo vacuolar

A H^+ -ATPase do tipo vacuolar (ou tipo V) é uma proteína ubiquamente distribuída em todas as células de eucariontes. Nos compartimentos intracelulares, a H^+ -ATPase vacuolar regula o pH de muitas organelas, incluindo lisossomas, endossomas e complexos de Golgi.

Na membrana plasmática, sua função é permitir a extrusão de H^+ da célula, participando, portanto, do controle do pH_i (SAUTIN et al., 2005).

Nas células eucariontes, a H^+ -ATPase do tipo vacuolar é eletrogênica e consiste em dois domínios: um catalítico e citoplasmático (V_1) com 640 kDa e outro integral (V_0) com 240 kDa. Juntos, esses domínios formam um complexo com aproximadamente 900 kDa (MALNIC, 2000; WAGNER et al., 2004) (**Figura 2**). O domínio V_1 é composto por oito subunidades (A – H), sendo o responsável pela hidrólise de ATP. O domínio V_0 é composto por seis subunidades (a, c, c', c'', d, e) e é responsável pela translocação do próton através da membrana (JEFFERIES et al., 2008). A H^+ -ATPase opera por um mecanismo rotatório, no qual a hidrólise de ATP no domínio V_1 libera a energia necessária para direcionar a rotação da haste central que liga os domínios V_1 e V_0 , o que permite a extrusão do próton pelo domínio V_0 (FORGAC M et al., 2007; HIRATA T. et al., 2003 ; INOUE et al., 2005).

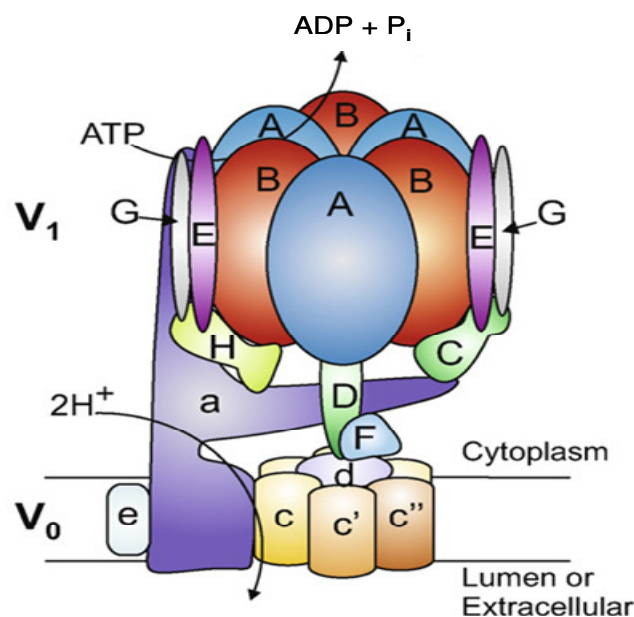


Figura 2. Estrutura proposta para a H^+ -ATPase vacuolar, composta por um domínio citoplasmático V_1 , responsável pela hidrólise de ATP, e um domínio integral de membrana V_0 , responsável pelo transporte de prótons.

Fonte: modificado de Jefferies et al., 2008.

No rim, a H^+ -ATPase vacuolar é um importante mecanismo de extrusão celular de H^+ e sua distribuição ocorre preferencialmente na membrana apical de células do túbulo proximal, células do segmento espesso da alça de Henle e células intercalares α do ducto coletor (WAGNER et al., 2004). No túbulo proximal e segmento espesso da alça de Henle, a atividade da ATPase está associada com a reabsorção de bicarbonato. No néfron distal, essa ATPase constitui o mais importante mecanismo de acidificação luminal, o que pode gerar

uma urina final com pH próximo ou inferior a 5,0 (MALNIC, 2000). Entretanto, em uma situação de alcalose metabólica, a H^+ -ATPase vacuolar pode ser inserida na membrana basolateral de células intercalares β do ducto coletor, para transferir H^+ da célula para o interstício (WAGNER et al., 2004).

A regulação do transporte renal de H^+ pela H^+ -ATPase do tipo vacuolar pode ocorrer na forma de respostas agudas (minutos) e reversíveis ou respostas crônicas (horas e dias), as quais dependem de maiores mudanças na arquitetura celular. A atividade da H^+ -ATPase vacuolar é modulada por vários fatores, incluindo acidose metabólica, hormônios como a angiotensina II, arginina vasopressina e o mineralocorticoide aldosterona (OLIVEIRA-SOUZA, M. et al., 2002, 2004, WAGNER et al., 2004, CARRARO -LACROIX-L. R. et al., 2006). A resposta da H^+ -ATPase frente a tais estímulos inclui o controle da expressão dos genes para as suas subunidades, translocação de vesículas contendo a H^+ -ATPase para a membrana plasmática e dissociação reversível dos domínios V_0 e V_1 , o que induz a inativação da ATPase (LEE et al., 1995, BROWN et al., 1992, KANE e PARRA, 2000). Recentemente, Brown et al. (2010) demonstraram que em células intercalares de ducto coletor, a inserção e atividade da H^+ -ATPase também podem ser moduladas por cAMP.

Entre os agentes moduladores da H^+ -ATPase vacuolar, a glicose também parece ser importante, uma vez que estudos com leveduras e insetos sugerem tal substrato como agente regulador do acoplamento dos domínios V_0 e V_1 (JEFFERIES et al., 2008).

Estudos com células LLC-PK1 (derivadas de túbulo proximal do rim de porco), também sugerem que a glicose pode modular a atividade da H^+ -ATPase vacuolar, por estimular a Phosphoinositide 3-kinase (ou PI3 cinase) e conseqüentemente, o deslocamento do domínio V_1 no citoplasma, bem como seu acoplamento ao domínio V_0 na membrana (SAUTIN et. al., 2005). Contudo, no néfron distal, especialmente no ducto coletor, o efeito da glicose sobre a atividade da H^+ -ATPase é pouco conhecido.

1.4 Transportadores de Glicose no Rim

Estudos morfológicos indicam que o túbulo proximal renal é subdividido em três segmentos: 1, 2 e 3 (S1, S2 e S3) (SELDIN e GIEBISCH, 2000). A reabsorção de glicose no túbulo proximal é mediada por duas classes de proteínas transportadoras: os co-transportadores “Sodium Glucose Transporters” (SGLTs) localizados na membrana apical da

célula tubular e os uniportes “Glucose Transporters” (GLUTs), localizados na membrana basolateral da mesma célula. No segmento S1, a glicose interage com a isoforma 2 do co-transportador sódio-glicose ou SGLT2, que possui alta capacidade de transporte com estequiometria de 1:1 (1 Na⁺:1 Glicose). No segmento S3, a entrada de glicose na célula ocorre preferencialmente pelo SGLT1, com menor capacidade de transporte e estequiometria de 2:1 (2 Na⁺:1 Glicose). Na membrana basolateral, a saída de glicose é passiva e dependente de dois transportadores, o GLUT2 no segmento S1 e o GLUT1 no segmento S3 (BAINES et al., 2002; WOOD et al., 2003). Além disso, a Na⁺/K⁺-ATPase localizada na membrana basolateral da célula tubular é um elemento-chave no processo de reabsorção de glicose. Sua atividade estabelece gradiente eletroquímico do sódio, o qual favorece o transporte simultâneo do íon e glicose para a célula. Logo, o transporte de glicose é considerado ativo secundário e contra gradiente de concentração (CURI e PROCOPIO, 2009).

Em condições normais, não se conhece SGLTs endógenos no néfron distal. No entanto, sabe-se que as células Mardin Darby Canine Kidney (MDCK), linhagem derivada de rim de cão, com características similares ao epitélio do néfron distal (GAUSH et al., 1966), expressam a isoforma 1 do transportador de glicose (GLUT1) na membrana basolateral (PASCOE et al., 1996).

2. Conclusão

Em conclusão, nossos resultados indicam que o tratamento agudo com glicose (25 mM) aumentou o efluxo de H^+ via NHE1, o qual foi modulado pela PI3 cinase. Na mesma condição, não se observou alterações na atividade da H^+ -ATPase. O tratamento crônico com glicose (25 mM) induziu um significativo aumento do efluxo de H^+ , via NHE1 e H^+ -ATPase. O efeito crônico e estimulador da glicose sobre a atividade de NHE1 e H^+ -ATPase foi dependente da atividade da p38 MAP cinase. Além disso, o tratamento crônico com glicose (25 mM) induziu fosforilação do sistema ezrin/radixin/moesin (ERM) e Akt, indicando que a atividade do NHE1 foi também modulada pelo sistema ERM/Akt.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.1232 p.
- AHARONOVITZ, O.; ZAUN, H. C.; BALIA, T.; YORK, J. D.; ORLOSKI, J.; GRISTEIN, S. Intracellular pH regulation by Na⁺/H⁺ exchanger requires phosphatidylinositol 4,5 biphosphate. **J. Cell Biol.**, v. 150, p. 213-224, 2000.
- AMBUHL, P.; AMEMIYA, M.; PREISIG, P. A.; MOE, O. W.; ALPERN, R. J. Chronic Hyperosmolality increase NHE3 activity in OKP cells. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 170-177, 1998.
- AMEMIYA, M.; LOFFING, J.; LOTSCHER, M.; KAISLING B.; ALPERN, R. J.; MOE, O. W. Expression of NHE-3 in the apical membrane of rat renal proximal tubule and thick ascending limb. **Kidney Int.**, v. 48, n. 4, p. 1206-1215, 1995.
- BAINES, A.; HO, P. Glucose stimulates O₂ consumption, NOS and Na⁺/H⁺ exchange in diabetic rat proximal tubules. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 283, p. 286-293, 2002.
- BERTRAND, B.; WAKABAYASHI, S.; IKEDA, T.; POUYSSÉGUR J.; SHIGEKAWA, M. The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. **J. Bioch. Chem.**, v. 269, p. 13703-13709, 1994.
- BIANCHINE, L.; KAPUS, A.; LUKAES, G.; WASAN, S.; WAKABAYASHI, S.; POUYSSÉGUR, J.; YU, F. H.; ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Responsives of mutants of NHE1 isoform of Na⁺/H⁺ antiporter to osmotic stress. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 269, p. 998-1007, 1995.
- BIEMESDERFER, D.; REILLY, R. F.; EXNER, M.; IGARASHI, P.; ARONSON, P.S. Immunocytochemical characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE1 in rabbit kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 263, p. 833-840, 1992.
- BOYARSKY, G.; GANZ, M. B.; STERNZEL, R. B.; BORON, W. F. pH regulation in single glomerular mesangial cells I. Acid extrusion in absence and presence of HCO₃⁻. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 255, p. 844-856, 1988.
- BROWN, D; SABOLIC, I; GLUCK, S. Polarized targeting of V-ATPase in kidney epithelial cells. **J. Exp. Biol.**, v. 172, p. 231-243, 1992.
- BROWN, D.; BRETON, S.; WAGNER, A. C.; MCLAUGHLIN, M. M.; WINTER, C.; RUSSO, M. L.; LJUBOJEVIC, M.; PAUNESCU, G. T. Cyclic AMP stimulates apical V-ATPase accumulation, microvillar elongation and proton extrusion in Kidney collecting duct A- intercalated cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 6, p. 643-654, 2010.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUVINIC, S.; BRAVO-ZEHNDER, M.; BOYER, J. L.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; GONZÁLEZ, A. Nucleotide P2Y1 receptor regulates EGF receptor mitogenic signaling and expression in epithelial cells. **J. Cell Sci.**, v. 120, p. 4289-4301, 2007.

CARRARO-LACROIX, L. R.; MALNIC, G. Signaling pathways involved with the stimulatory effect of angiotensin II on vacuolar H⁺-ATPase in proximal tubule cells. **Eur. J. Physiol.**, v. 452, n. 6, p. 728-736, 2006.

CARRARO-LACROIX, L. R.; GIRARD, A. C. C.; MALNIC, G. Long-term regulation of vacuolar H⁺-ATPase by angiotensin II in proximal tubule cells. **Eur. J. Physiol.**, v. 458, p. 969-979, 2009.

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

CURI, R.; PROCÓPIO, J.(eds) **Fisiología Básica**. Guanabara Koogan, 2009. p. 61.

DARMELLAH, A; PRUNIER, F.; TAMARILLE, S.; RUCKER-MARTIN, C.; FEUVRAY, D. Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger contributes to left ventricular hypertrophy in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes: critical role of Akt. **Diabetologia**, v. 50, p. 1335-1344, 2007.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na⁺-independent proton secretion in MDCK-C11 cells. **Pflugers Arch.**, v. 441, p. 287-293, 2000

FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 917-929, 2007.

FORGAC, M.; CANTLEY, L.; WIEDENMANN, B.; ALTSTIEL, L.; BRANTON, D. Clatrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 1300-1303, 1983.

GANZ, M. B.; HAWKINS, K.; REILLY, R. F. High glucose induces the activity and expression of Na⁺/H⁺ exchange in glomerular mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 278, p. 91-96, 2000.

GAUSH, C. R.; HARD, W. L.; SMITH, T. F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 122, p. 931-935, 1966.

Good, D. W.; George, T.; Watts III, B. A. Nerve Growth Factor Inhibits Na⁺/H⁺ Exchange and HCO³⁻ Absorption through Parallel Phosphatidylinositol 3-Kinase-mTOR and ERK Pathways in Thick Ascending Limb. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 39, p. 26602 - 26611, 2008.

GOYAL, S.; VANDER, H. G; ARONSON, P. S; Renal expression of novel exchanger isoform NHE8. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 284, n. 3, p. 467-473, 2003.

HARRIS, R. C.; BRENNER, B. M. ; SEIFTER, J. L. Sodium-hydrogen exchange and glucose transport in renal microvillus membrane vesicles from rats with diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 77, n. 3, p. 724-733, 1986.

HIRATA, T.; NAKAMURA, N.; OMOTE, H.; WADA, Y.; FUTAI, M. Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 1, p. 386-389, 2000.

INOUE, H.; NOUMI, T.; NAGATA, M.; MURAKAMI, H.; KANAZAWA, H. Targeted disruption of the gene encoding the proteolipid subunit of mouse vacuolar H⁺-ATPase leads to early embryonic lethality. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1413, n. 3, p. 130-138, 1999.

JEFFERIES, K. C.; CIPRIANO, D. J.; FORGAC, M. Function, structure and regulation of the vacuolar H⁺-ATPases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 476, n.1, p. 33-42, 2008

KANE, P. M.; PARRA, K. J. Assembly and regulation of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 81-87, 2000.

PARRA, K. J.; KANE, P. M. Reversible association between the V1 and V0 domains of yeast vacuolar H⁺ATPase is an unconventional glucose-induced effect. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, n. 12, p. 7064-7074, 1998.

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

LEE, B. S.; UNDERHILL, D. M; CRANE, M. K.; GLUCK, S. L. Transcriptional regulation of the vacuolar H⁺-ATPase B2 subunit gene differentiating THP-1 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7320-7329, 1995.

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

MALNIC, G. H⁺ secretion in renal cortical tubules: Kinetic aspects. **Kidney Int.**, v. 32, p. 136-150, 1987.

MALNIC, G. Cell biology of H⁺ transport in epithelia. **ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.**, p. 25-37, 2000.

MALO, M. E.; FLIEGEL, L. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 84, p. 1081-1094, 2006.

NASCIMENTO-GOMES, G.; MELLO-AIRES, M. Effect of glucose on the kinetics of bicarbonate reabsorption in the early and middle proximal tubule. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 23, n. 1, p. 79-85, 1990.

NASCIMENTO-GOMES, G.; ZALADEK, G. F.; MELLO-AIRES, M. Alterations of the renal handling of H⁺ in diabetic rats. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 20, n. 4, p. 251-257, 1997.

NAKAMURA, S. Glucose activates H⁺-ATPase in kidney epithelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, p. 97-105, 2004.

- NOËL, J.; POUYSSÉGUR, J. Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 283-296, 1995.
- NUMATA, M.; ORLOWSKI, J. Molecular cloning characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 20, p. 17387-17394, 2001.
- OBERLEITHNER, H.; STEIGNER, W.; SILBERNAGL, S.; VOGEL, GASTRAUNTHALER, G.; PFLALLER, W. MDCK cells III: Aldosterone activates an Na⁺/K⁺ pump. **Pflügers Arch.**, v. 416, p. 540-47, 1990.
- OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Interaction of angiotensin II and atrial natriuretic peptide on pH(i) regulation in MDCK cells. **Am. J. Physiol Renal Physiol.**, v. 279, n. 5, p.944-953, 2000.
- OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G., MELLO-AIRES, M. Atrial natriuretic peptide impairs the stimulatory effect of angiotensin II on H⁺-ATPase. **Kidney Int.**, v. 62, n. 5, p. 1693-1699, 2002.
- OLIVEIRA-SOUZA, M.; MUSA-AZIZ, R.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Arginine vasopressin stimulates H⁺-ATPase in MDCK cells via V1 (cell Ca²⁺) and V2 (cAMP) receptors. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 286, n.2, p. 402-408, 2004.
- ORLOWSKI, J.; KANDASAMY, R. A.; SHULL, G. E. Molecular cloning of putative members of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family. CDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 9331-9, 1992.
- PANG, T.; SU, X.; WAKABAYASHI, S.; SHIGEKAWA, M. Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 17367-17372, 2001.
- PASCOE, S. W.; INUKAI, K.; OKA, Y.; Slot, W. J.; JAMES, E. D. Differential targeting of facilitative glucose transporters in polarized epithelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 271, p. 547-554, 1996.
- POUYSSÉGUR, J.; SARDET, C.; FRANCHI, A.; L'ALLEMAIN, G. L.; PARIS, S. Aspecific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 4833-4837, 1984.
- RANE, M. J.; SONG, Y; JIN, S; BARATI, M. T; WU, R.; KAUSAR, H.; TAN, Y.; WANG, Y.; ZHOU, G; KLEI, J. B.; LI, X.; CAI, L. Interplay between Akt and p38 MAPK Pathways in the Regulation of Renal Tubular Cell Apoptosis Associated with Diabetic Nephropathy. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 298, p. 49-61, 2010.
- RINK, T. J.; TREIN, R. Y. ; POZZAN, T. Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 95, p. 189-196, 1982.
- SALAMANCA, D. A.; KHALIL, R. A. Protein kinase C isoforms as specific targets form modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, n. 11, p. 1537-1545, 2005.

SALEH, A. M.; BATLLE, D. C. Kinetic properties of the Na^+/H^+ antiporter in lymphocytes from the spontaneously hypertensive rat: Role of intracellular pH. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 17349, 1990.

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

SARDET, C.; COUNILLON, L.; FRANCHI, A.; POUYSSÉGUR, J. Growth factor induce phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter a glycoprotein of 110 kD. **Science wash.**, v. 247, p. 723-26, 1990.

SAUTIN, Y. Y., LU, M., GLAUGLER, A.; ZHANG, L.; GLUCK, S. L. Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Effects of Glucose on Vacuolar H^+ -ATPase Assembly, Translocation, and Acidification of Intracellular Compartments in Renal Epithelial Cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, n. 2, p. 575-589, 2005.

SAUVAGE, M.; MAZIÈRE, P.; FATHALLAH, H.; GIRAUD, F. Insulin stimulates NHE1 activity by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in human erythrocytes. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 4, p. 955-62, 2000.

SCHUSTER, V. L.; FEJER-TOTH, G.; NARAY-FEJER-TOTH, A.; GLUCK, S. Colocalization of H^+ -ATPase and band 3 anion exchanger in rabbit collecting duct intercalated cells. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. 506-517, 1991.

SELDIN, D. W.; GIEBISCH, G. **The Kidney**, Physiology and Pathophysiology, 3^a edição. Philadelphia, Lippincott Williams; Wilkins, 2000.

THOMAS, J. A.; BUCHSBAUM, R. N.; ZIMNIAK, A.; RACKER, E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. **Biochemistry**, v. 18, n. 11, p. 2210-2218, 1979.

TSE, C. M.; YANG, V. W.; WATSON, A. J.; LEVINE, S.; MONTROSE, M. H.; POTTER, J.; SARDET, C.; POUYSSÉGUR, J.; DONOWITZ, M. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the rabbit ileal villus cell basolateral membrane Na^+/H^+ exchanger. **Embo. J.**, v. 10, n. 8, p. 1957-67, 1991.

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

VAHERI, A.; CARPENO; EISKAL; HELANDER, T. S.; JAASKELAINEN, J.; MAJANDER-NOORDENSWAN, P. The ezrin protein family: membrane cytoskeleton interactions and disease associations. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 659-666, 1997.

WAGNER, C. A.; FINBERG, K. E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.; GEIBEL, J. P. Renal vacuolar H^+ -ATPase. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 4, p. 1263-1314, 2004.

- WAKABAYASHI, S.; FAFOURNOUX, C.; SARDET, C.; POUYSSÉGUR, J. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁽⁺⁾-sensing". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 2424 - 2428, 1992.
- WAKABAYASHI, S.; BERTRAND, B.; IKEDA, T.; POUSSÉGUR, J.; SHIGEKAWA, M. Mutation of Calmodulin-binding Site Renders the Na⁺/H⁺ Exchanger (NHE₁) Highly H⁺-sensitive and Ca⁺⁺ Regulation-defective. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13710-13715, 1994.
- WANG, Z.; ORLOWSKI, J.; SHULL, G. E. Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na⁺/H⁺ Exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11925-11928, 1993.
- WANG, S.; PENG, Q.; ZHANG, J.; LIU, L. Na⁺/H⁺ exchanger is required for hyperglycaemia-induced endothelial dysfunction via calcium-dependent calpain. **Card. Research.**, v. 80, p. 255- 262, 2008.
- WOOD, I. S.; TRAYHURA, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT) expanded families of sugar transport proteins. **Br. J. Nutr.**, v. 89, p. 3-9, 2003.
- WU, K. L.; KHAN, S.; LAKHE-REDDY, S.; JARAD, G.; MUKHERJEE, A.; OBEJERO-PAZ, C. A.; KONIECZKOWSKI, M.; SEDOR, J. R.; SCHELLING, J. R. The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 26280-26286, 2004 .
- WU, D.; PENG, F.; ZHANG, B.; INGRAM, A. J.; KELLY, D. J.; GILBERT, R. E.; GAO, B.; KUMAR, S.; KRESPINSKY, J. C. EGFR-PLCY1 signaling mediates high glucose-induced PKCβ1-Akt activation and collagen I upregulation in mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 297, p. 822-834, 2009.