

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS CAPITAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA HUMANA**

**NEYDIANA BELIZE DE PINA LOPES**

Estudo da via de transporte de água e/ou amônia através dos transportadores de ureia (UTs) quando expressos em oócitos da rã *Lithobates catesbeianus*

**São Paulo - SP**

**Setembro/2021**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS CAPITAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA HUMANA**

**NEYDIANA BELIZE DE PINA LOPES**

Studying the urea, water and/or ammonia transport pathway of the urea transporters (UTs) expressed in oocytes from *Lithobates catesbeianus* frog

Defesa de Mestrado no Programa de  
Fisiologia Humana do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Raif Musa Aziz,  
Professora Assistente Doutora.

**São Paulo- SP**  
**Setembro/2021**

## **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Maria Conceição de Pina e José Horácio Varela, por não medirem esforços para que eu pudesse ter a oportunidade de continuar meus estudos e correr atrás dos meus sonhos, pelo amor incondicional, zelo e apoio moral.

À minha irmã, Neima de Pina e outros familiares, pelo amor, força e por me incentivarem a correr atrás dos meus objetivos.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr. Raif Musa Aziz, por me receber no laboratório e pelo excelente trabalho como orientadora. Por ter compartilhado comigo as suas experiências e ensinamentos que hoje fazem parte de quem sou.

À Jessica Kabutomori, pelo companheirismo, paciência e pela boa vontade em me ajudar quando preciso.

Ao Ryan Geyer, por ter colaborado com os seus conhecimentos de biologia molecular, que foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

E, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram nesse processo de formação.

“Education is the most powerful weapon which you can  
use to change the world”

*Nelson Mandela*

“We must walk rapidly but not run. We must not be  
opportunists, nor allow our enthusiasms to make us lose  
the vision of concrete reality.”

*Amílcar Cabral*

## RESUMO

Nos rins, os transportadores de ureia (UTs) são responsáveis por facilitar o transporte de ureia, contribuindo para manter um interstício medular altamente concentrado, importante para os mecanismos de concentração urinária. Os mamíferos possuem dois genes, SLC14A1, que codifica UT-B, e SLC14A2, que gera variantes por splice, UT-A1, A2 e A3. Nos rins, UT-A1 é expresso na membrana apical e UT-A3 na membrana basolateral do ducto coletor medular interno; UT-A2 é expresso no segmento descendente fino da alça de Henle e UT-B nos vasos retos descendentes. A estrutura cristalina do UT-B de bovino (b) revela que o UT é uma proteína homotrimérica e cada monômero funciona como um canal para o transporte de ureia. No centro de cada monômero há um filtro de seletividade que coordena o transporte de ureia a favor do seu gradiente de concentração. Na região mais estreita desse filtro foram identificados dois resíduos de Treonina (Thr ou T) — T172 e T334 — que formam o sítio de ligação da proteína com a ureia e são conservados em todas as isoformas UT. Dois Trabalhos anteriores demonstraram que o UT-B, expresso em níveis elevados em oócitos de *Xenopus laevis*, não apenas transporta ureia, mas também funciona como um canal para água (YANG; VERKMAN, 1998; GEYER et. al., 2013) e NH<sub>3</sub> (GEYER et. al., 2013). Recentemente, nosso laboratório confirmou que UT-B funciona como um canal para água e, demonstrou pela primeira vez que UT-A2 e UT-A3 também são capazes de transportar água, além de ureia, quando expressos em oócitos da rã *Lithobates catesbeianus*, um sistema de expressão heteróloga de proteínas padronizado em nosso laboratório. Nesse estudo, nós investigamos o efeito do inibidor Floretina e da mutação dos dois resíduos conservados de T por V no transporte de ureia, água e NH<sub>3</sub> através das proteínas de camundongo (m) mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B. Oócitos de *Lithobates* foram injetados com cRNA para a expressão de UTs WT *versus* mutantes [(UT-A2<sup>WT</sup> vs UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), (UT-A3<sup>WT</sup> vs UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e (mUT-B<sup>WT</sup> vs UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>)] ou injetados com H<sub>2</sub>O como controle. A expressão heteróloga foi avaliada pela biotilação das proteínas de superfície, seguida de experimentos de “western blot” utilizando o anticorpo monoclonal anti-c-Myc. O transporte de ureia foi monitorado através de experimentos de captação de ureia marcada com Carbono<sup>14</sup>. O transporte de água foi explorado através de experimentos de permeabilidade osmótica à água (P<sub>f</sub>), computada através de microscopia de vídeo-imagem do aumento do volume de oócitos expostos à uma solução hipotônica. O transporte de NH<sub>3</sub> foi avaliado através da técnica de medidas do pH de superfície (pH<sub>S</sub>) que utiliza um microeletrodo de vidro com ponta romba, sensível a H<sup>+</sup>, para medir as variações de pH que ocorrem na superfície dos oócitos devido ao influxo resultante de NH<sub>3</sub> [(ΔpH<sub>S(NH3)</sub>]. Os resultados de “western blot” de amostras biotiniladas demonstraram que os oócitos de *Lithobates* são capazes de expressar as proteínas mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> e mUT-B<sup>WT</sup> e os seus respectivos mutantes devido à presença de bandas imunorreativas ao redor de 45-65 kDa, correspondente ao peso molecular de monômeros de UTs glicosilados. As bandas descritas para os UTs estavam ausentes nos “blots” de amostras biotiniladas de oócitos controle injetado com H<sub>2</sub>O. Os resultados funcionais demonstraram que os oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> exibiram valores médios de captação de <sup>14</sup>C-ureia, P<sub>f</sub> e ΔpH<sub>S(NH3)</sub> — sensíveis ao inibidor Floretina — significativamente maiores do que aquelas observados para os oócitos UT mutantes ou controle. Assim, este trabalho mostra pela primeira vez que mUT-A2 e mUT-A3 transportam NH<sub>3</sub> e utilizam um filtro de seletividade conservado como mecanismo de

transporte comum para ureia, água ou NH<sub>3</sub>. Acreditamos que alterações na expressão e/ou atividade dessas proteínas nos rins poderiam alterar as permeabilidades à ureia, água e/ou NH<sub>3</sub>, influenciando, desse modo, os mecanismos renais que integram a excreção de resíduos nitrogenados, água e ácido (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (nº 7971160519). O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo 156502/2019-4, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto: 2018/228551).

**Palavras-chave:** Transportadores de ureia; transporte de ureia; transporte de água; transporte de amônia; oócitos de *Lithobates*; medidas do pH de superfície.

## ABSTRACT

In the kidneys, the SLC14 family of proteins, known as urea transporters (UTs), is responsible for facilitating urea's transport, contributing to maintain the high osmolarity of the medullary interstitium, an essential process for the urinary concentrating mechanism. There are two UT genes: *SLC14A1*, which encodes UT-B, and *SLC14A2*, which generates splice variants UT-A1, A2 and A3. It has been shown that UT isoforms are expressed in specific renal regions, with UT-A1 and UT-A3 localized in the apical and basolateral membranes of the inner medullar collecting duct, respectively, UT-A2 in the thin descending limb of the Loop of Henle and UT-B in the descending vasa recta and red blood cells. The X-ray crystal structure of bovine UT-B (bUT-B) revealed a homotrimeric quaternary structure, with a urea pore in each monomer. In the pore's narrowest region, a selectivity filter with two highly conserved threonine (Thr or T) residues forms the urea binding site. In addition to urea, previous studies demonstrated that bUT-B could also transport water (YANG; VERKMAN, 1998; GEYER et. al., 2013) and NH<sub>3</sub> (GEYER et. al., 2013), and Thr to valine (Val or V) mutations in the selectivity filter reduce the transport of all these substances. Moreover, our laboratory recently showed that “wild type” (WT) mouse (m) UT-A2, mUT-A3 and mUT-B can be heterologously expressed on the surface of *Lithobates catesbeianus* oocytes, resulting in augmented and phloretin-sensitive urea and water transport. Herein, we investigated the heterologous expression of mouse (m) mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> and mUT-B<sup>WT</sup> and the following Thr to Val mutants mUT-A2<sup>T176V</sup>, mUT-A2<sup>T338V</sup>, mUT-A3<sup>T246V</sup>, mUT-A3<sup>T408V</sup>, mUT-B<sup>T172V</sup> and mUT-B<sup>T334V</sup>. The heterologous expression was evaluated by the biotinylation of the surface proteins, followed by western blot experiments using the monoclonal anti-c-Myc antibody. Urea uptake of the wild-type and mutant proteins was assessed with <sup>14</sup>C-Urea, osmotic water permeability (P<sub>f</sub>, cm/s) was calculated by monitoring cell swelling with video-image microscopy after exposing the oocytes to a hypotonic solution, and NH<sub>3</sub> permeability was measured using a microelectrode with a blunt tip to record the maximum transient NH<sub>3</sub>-induced change in oocyte surface pH [ $\Delta$ pH<sub>S(NH<sub>3</sub>)</sub>]. Samples of oocytes expressing mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> and mUT-B<sup>WT</sup> and their respective mutations revealed immunoreactive bands around 45 kDa, a value that is consistent with the molecular weight of glycosylated UT monomers. In contrast, immunoblots of biotinylated H<sub>2</sub>O-injected control oocyte samples had no detectable signals. We also observed that oocytes expressing mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> or mUT-B<sup>WT</sup> exhibited significantly higher and phloretin-sensitive <sup>14</sup>C-uptake, P<sub>f</sub> and  $\Delta$ pH<sub>S(NH<sub>3</sub>)</sub> average values than the mutants or H<sub>2</sub>O-injected control oocytes. Our results indicate that mutating the Thr in the selectivity filter does not affect the UT glycosylation or insertion into the oocyte plasma membrane. However, these mutant proteins display significantly lower urea, water and NH<sub>3</sub> transport activities than mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> and mUT-B<sup>WT</sup>. In conclusion, we have shown for the first time that mUT-A2 and mUT-A3 transport NH<sub>3</sub> and utilizes a conserved solute selectivity filter. We believe that changes in the expression and/or activity of these proteins in the kidney may modulate the permeability to urea, water and/or NH<sub>3</sub>, thus influencing the renal mechanisms that integrate the excretion of nitrogenous waste, water and acid (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). All experimental procedures were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (nr 7971160519). This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Process 156502/2019-4, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financing

Code 001 and PROEX fund (Academic Excellence Program) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto: 2018/228551).

**Keywords:** Urea transporters; urea transport; water transport; ammonia transport; *Lithobates* oocytes; surface pH.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Relação entre o metabolismo da amônia no fígado e o manejo renal de ureia e amônia nos rins.

**Figura 2.** Mecanismo de concentração urinária na presença de HAD.

**Figura 3.** Transporte de amônia ao longo dos túbulos renais e a função das glicoproteínas Rh nesse transporte.

**Figura 4.** Distribuição das isoformas de UT ao longo do néfron.

**Figura 5.** A) Estrutura cristalina do bUT e o monômero isolado de UT. B) Representação dos 10 TMs que formam o canal monomérico para ureia.

**Figura 6.** Representação do canal monomérico de bUT-B enfatizando as Thr (T172 e T334) na região  $S_m$ .

**Figura 7.** . Alinhamento das sequências de aminoácidos dos mUTs WT com dvUT, hUT-B e bUT-B, evidenciando os dois resíduos de treonina conservados em todas as isoformas.

**Figura 8.** Dissociação e isolamento dos oócitos de *Lithobates*.

**Figura 9.** Representação do plasmídeo pT7TS.

**Figura 10.** Representação da câmara e posicionamento dos eletrodos para a medida do  $pH_s$  do oócito.

**Figura 11.** Geometria da ponta do eletrodo de  $pH_s$ .

**Figura 12.** Rack com eletrodos para silanização.

**Figura 13.** Variações causadas no  $pH_s$  quando ocorre influxo de  $NH_3$  no oócito.

**Figura 14.** Alinhamento da sequência de aminoácidos padronizada para **A)** mUT-A2 de *Mus musculus* com a sequência de mUT-A2<sup>WT</sup>-Myc, **B)** UT-A3 de *Mus musculus* com a sequência de mUT-A3<sup>WT</sup>-Myc e **C)** UT-B de *Mus musculus* com a sequência de mUT-B<sup>WT</sup>-Myc.

**Figura 15.** Alinhamento de parte da sequência de aminoácidos de mUT WT *versus* respectivos mutantes. A substituição do resíduo de Thr pela Val está destacada em verde-água para **(A)** mUT-A2, em amarelo para **(B)** mUT-A3 e em verde para **(C)** mUT-B.

**Figura 16.** Imagens de “western blot” para detecção de proteínas extraídas da membrana dos oócitos injetados com cRNA para expressão de UTs WT e mutantes dos resíduos de Thr,

utilizando anticorpo monoclonal anti-Myc. As bandas representam as proteínas de membrana equivalente a 4 oócitos.

**Figura 17.** Média dos resultados da captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia de oócitos que expressam mUTs WT ou mutantes *versus* oócitos controle.

**Figura 18.** Média dos resultados das medidas de  $P_f$  de oócitos que expressam mUTs WT ou mutantes *versus* oócitos controle.

**Figura 19.** Traços representativos mostrando as variações do  $\text{pH}_s$  causadas pelo influxo de  $\text{NH}_3$  após exposição dos oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup> (laranja), mUT-A2<sup>T176V</sup> e mUT-A2<sup>T338V</sup> (verde) *versus* oócito controle (cinza), à uma solução de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ .

**Figura 20.** Média dos resultados das medidas da  $\Delta\text{pH}_s$  (em unidades de pH) de oócitos que expressam mUTs WT ou mutantes *versus* oócitos controle, expostos à uma solução de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ .

**Figura 21.** Média dos resultados da Captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia\*,  $P_f^*$  ou  $\Delta\text{pH}_{S(\text{NH}_3)}^*$  mediada pelas proteínas UTs WT.

**Figura 22.** Razão entre Captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia\* e  $P_f^*$  (A) e razão entre Captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia\* e  $P_{\text{NH}_3}^*$  (B) das proteínas UTs WT.

**Figura 23.** Comparação entre os diâmetros e estruturas das moléculas de ureia, água e  $\text{NH}_3$ . Relação entre o diâmetro das moléculas e o diâmetro da região  $S_m$  do canal monomérico do UT.

**Figura 24.** A) Representação do filtro de seletividade do bUT-B. B) Estrutura cristalina do bUT-B com a sequência consenso LPXXTXPF em destaque.

**Figura 25.** Estrutura química dos aminoácidos treonina e valina.

**Figura 26.** Estrutura cristalina do bUT-B com destaque aos (A) resíduos de Thr 172 e 334 (azul água) e (B) resíduos mutados de Val 172 e 334 (vermelho) na região  $S_m$  do canal monomérico.

**Figura 27.** Modelo publicado para propor a importância fisiológica do transporte de água pelos UTs.

**Figura 28.** Modelo publicado para propor a importância fisiológica do transporte de  $\text{NH}_3$  pelos UTs.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Etapas, ciclos e temperatura da reação de PCR para o experimento de mutação.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |   |
|----------|---|
| AC       | ANIDRASE CARBÔNICA  |
| AMPC     | 3'-5'- MONOFOSFATO CÍCLICO                                  |
| AQP      | AQUAPORINA  |
| DC       | DUCTO COLETOR   |
| DCMI     | DUCTO COLETOR MEDULAR INTERNO                               |
| FIC      | FLUIDO INTRACELULAR   |
| FEC      | FLUIDO EXTRACELULAR   |
| GLT      | GLUTAMINA   |
| HAD      | HORMÔNIO ANTIDIURÉTICO                                      |
| IQ       | INSTITUTO DE QUÍMICA  |
| NKCC     | COTRANSPORTADOR $Na^+/K^+/2Cl^-$                            |
| PBS      | PHOSPHATE BUFFER SALINE                                     |
| PCR      | REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE                              |
| Pf       | PERMEABILIDADE OSMÓTICA À ÁGUA                              |
| PKA      | PROTEÍNA CINASE A   |
| RH       | RHESUS  |
| SAE      | SEGMENTO ASCENDENTE ESPESSE                                 |
| SDF      | SEGMENTO DESCENDENTE FINO                                   |
| SAF      | SEGMENTO ASCENDENTE FINO                                    |
| SDS-PAGE | SODIUM DODECYL SULFATE - POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS |
| TBS      | TRIS BUFFER SALINE  |
| TBST     | TRIS BUFFER SALINE TWEEN                                    |
| TM       | TRANSMEMBRANAIS   |
| TP       | TÚBULO PROXIMAL   |
| TRH/T    | TREONINA  |
| USP      | UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO                                   |
| UT       | TRANSPORTADOR DE UREIA                                      |
| VAL/V    | VALINA  |
| WT       | WILD TYPE   |

## SUMÁRIO

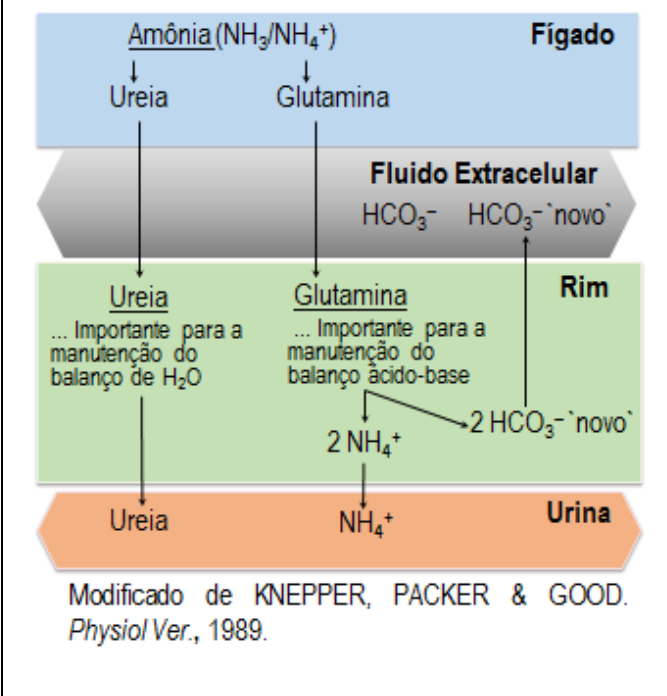
|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 1.1. BALANÇO DE ÁGUA .....   | 1  |
| 1.1.1. MECANISMO DE CONCENTRAÇÃO URINÁRIA .....  | 2  |
| 1.1.1.1 INTERSTÍCIO MEDULAR CONCENTRADO .....  | 3  |
| 1.1.1.2 AUMENTO DA PERMEABILIDADE DO DC .....  | 4  |
| 1.2. BALANÇO ÁCIDO-BASE .....  | 4  |
| 1.2.1. MANEJO RENAL DE AMÔNIA .....  | 5  |
| 1.1.1.2 TRANSPORTE DE NH <sub>3</sub> E H <sup>+</sup> PARA EXCREÇÃO DE NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....   | 6  |
| 1.3. A FAMÍLIA UT .....  | 7  |
| 1.4. ESTRUTURA CRISTALINA DOS UTS .....  | 8  |
| 1.4.1. FILTRO DE SELETIVIDADE .....  | 9  |
| 1.4.1.1 OS RESÍDUOS CONSERVADOS DE THR NAS PROTEÍNAS UTS .....   | 10 |
| 1.5. ESTUDOS COM ANIMAIS “KNOCKOUT” .....  | 11 |
| 1.6. OUTRAS FUNÇÕES PARA AS PROTEÍNAS UTS? .....   | 11 |
| 1.7. OÓCITOS .....   | 12 |
| 1.8. HIPÓTESE .....  | 12 |
| 2. OBJETIVOS GERAIS .....  | 13 |
| 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 13 |
| 2.1.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MUTS WT NA MEMBRANA DOS OÓCITOS E EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESSA EXPRESSÃO .....  | 13 |
| 2.1.2. EFEITO DA EXPRESSÃO DOS MUTS WT NO TRANSPORTE DE UREIA, ÁGUA E NH <sub>3</sub> ANTES E APÓS TRATAMENTO COM O INIBIDOR FLORETINA E O EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESES TRANSPORTES. .... | 13 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 14 |
| 3.1. OBTENÇÃO DE cRNA A PARTIR DE cDNA .....   | 14 |
| 3.2. MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA .....  | 15 |
| 3.3. SEQUENCIAMENTO .....  | 17 |
| 3.4. OBTENÇÃO DE cRNA .....  | 17 |
| 3.5. ANIMAIS .....   | 17 |
| 3.6. SOLUÇÕES E DROGAS .....   | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 3.7. CIRURGIA .....   | 18 |
| 3.8. ISOLAMENTO DOS OÓCITO .....  | 19 |
| 3.9. INJEÇÃO DE CRNA .....  | 20 |
| 3.10. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR BIOTINILAÇÃO E “WESTERN BLOT” .....   | 20 |
| 3.10.1. BIOTINILAÇÃO .....  | 20 |
| 3.10.2. “WESTERN BLOT” .....  | 21 |
| 3.11. MEDIDAS DE CAPTAÇÃO DE UREIA .....  | 22 |
| 3.12. MEDIDAS DE PERMEABILIDADE OSMÓTICA À ÁGUA .....   | 23 |
| 3.13. MONITORAMENTO DO PH DE SUPERFÍCIE COM MICROELETRODOS .....  | 24 |
| 3.13.1. FABRICAÇÃO DOS MICROELETRODOS PARA MEDIDAS DE $V_M$ E $pH_S$ .....  | 25 |
| 3.13.1.1. MICROELETRODO QUE MEDE O $V_M$ .....  | 25 |
| 3.13.1.1. MICROELETRODO QUE MEDE AS VARIAÇÕES DO $pH_S$ .....   | 25 |
| 3.13.2. MEDIDAS DAS VARIAÇÕES DO PH DE SUPERFÍCIE .....   | 27 |
| 3.14. ESTATÍSTICA .....   | 28 |
| 4. RESULTADOS .....   | 29 |
| 4.1. SEQUENCIAMENTO DOS cDNAs DOS UTs WT .....  | 29 |
| 4.2. SEQUENCIAMENTO DOS MUTANTES .....  | 31 |
| 4.3. EXPRESSÃO DOS MUTs WT NA MEMBRANA DOS OÓCITOS E EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESTA EXPRESSÃO. ....  | 33 |
| 4.4. EFEITO DA EXPRESSÃO DOS MUTs WT NO TRANSPORTE DE UREIA, ÁGUA E $NH_3$ ANTES E APÓS TRATAMENTO COM O INIBIDOR FLORETINA E O EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESSES TRANSPORTE ..... | 36 |
| 5. DISCUSSÃO .....  | 45 |
| 5.1. EXPRESSÃO DE MUTs WT <i>VERSUS</i> MUTANTES NA MEMBRANA DOS OÓCITOS .....  | 46 |
| 5.2. TRANSPORTE DE UREIA, ÁGUA E $NH_3$ PELOS MUTs WT <i>VERSUS</i> MUTANTES .....  | 46 |
| 6. CONCLUSÕES .....   | 56 |
| 7. REFERÊNCIAS .....  | 57 |

## 1. INTRODUÇÃO

Diariamente, como resultado do catabolismo de proteínas, células em todo o corpo geram amônia (par  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ )<sup>1</sup>. Esta amônia entra na circulação e é transportada até o fígado onde é metabolizada em compostos nitrogenados menos tóxicos, ureia e glutamina, que caem na circulação sistêmica e chegam aos rins. Nos rins, a ureia participa da formação e manutenção da hipertonicidade do interstício medular — importante para o **balanço da água** — e a glutamina, por sua vez, é usada pelas células do túbulo proximal (TP) em um processo

**FIG 1.** Relação entre o metabolismo da amônia no fígado e o manejo renal de ureia e amônia nos rins.



metabólico que gera quantidades equimolares de íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Os íons  $\text{HCO}_3^-$  compreendem o ‘ $\text{HCO}_3^-$  novo’ que é transportado para a circulação sistêmica e os íons  $\text{NH}_4^+$  devem ser excretados na urina (**Figura 1**) — importante para o **balanço ácido-base** (KNEPPER; PACKER; GOOD, 1989; GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017a,b).

### 1.1. BALANÇO DA ÁGUA

O principal componente do corpo humano é a água. Um homem adulto saudável com 1,70 m de altura e peso de 70 kg, tem aproximadamente 42 litros de água distribuídos nos fluidos intracelular (FIC) e extracelular (FEC), dividido em plasma e interstício. A

<sup>1</sup> A amônia existe em duas formas moleculares,  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ . A molécula de  $\text{NH}_3$  não tem carga elétrica mas tem alta polaridade e, desse modo, permeabilidade lipídica limitada em alguns segmentos do néfron.  $\text{NH}_3$  pode reagir reversivelmente com o  $\text{H}^+$  de acordo com a reação:  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ . O íon  $\text{NH}_4^+$  depende de transportadores para atravessar a membrana (KNEPPER; PACKER; GOOD, 1989).

osmolaridade do FIC e FEC é de aproximadamente 290 mOsm/L H<sub>2</sub>O, sendo que no FEC há grandes quantidades dos íons sódio (Na<sup>+</sup>) e cloreto (Cl<sup>-</sup>), quantidades razoavelmente grandes de íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e quantidades pequenas de íons potássio (K<sup>+</sup>). Já no FIC, o K<sup>+</sup> e o Mg<sup>2+</sup> são os principais cátions (GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017a).

O FIC e o FEC são separados pela membrana plasmática, altamente permeável à água e semipermeável a íons. Essa membrana regula, a todo o momento, o movimento de água e solutos entre os dois compartimentos e, assim, a osmolaridade do FEC, fundamental para a manutenção do volume e da função celular para o bom funcionamento do organismo. Em condições normais, para evitar que haja variações na osmolaridade extracelular, são necessários alguns ajustes na quantidade total de água perdida ou ingerida diariamente pelo organismo. Esses ajustes são feitos pelos rins que ajustam a excreção de água na urina e pela sede que controla a ingestão de água. Assim, quando há uma restrição hídrica, para evitar um aumento significativo na osmolaridade plasmática, os rins diminuem a excreção de água, produzindo urina concentrada. Seguindo o mesmo raciocínio, quando há um consumo elevado de água, os rins aumentam a excreção renal de água produzindo urina diluída, mantendo a osmolaridade plasmática constante (KNEPPER, KWON, NIELSEN, 2015; GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017a).

### **1.1.1. MECANISMO DE CONCENTRAÇÃO URINÁRIA**

Os mecanismos renais utilizados para concentrar a urina para manter o balanço de água envolvem as estruturas tubulares renais e os capilares peritubulares da medula renal (os chamados vasos retos) que interagem entre si de modo a 1) produzir e conservar um gradiente de osmolaridade ao longo do eixo córtico-medular e 2) aumentar a permeabilidade do ducto coletor (DC) cortical à água — ambos regulados na presença de concentrações adequadas de hormônio antidiurético circulante (HAD). Com isso, acontece a reabsorção de água do DC para o interstício e, finalmente, para a circulação sistêmica (BERLINER; BENNETT, 1967; KNEPPER, 1997; KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015) e a osmolaridade do plasma é mantida constante (**Figura 2**).

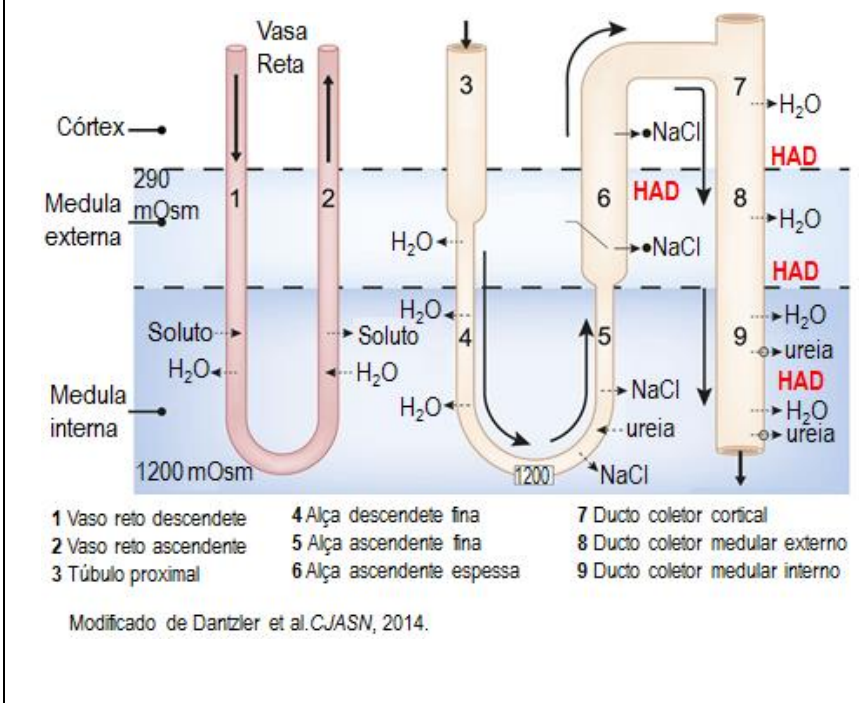


### 1.1.1.1. INTERSTÍCIO MEDULAR CONCENTRADO

A medula renal apresenta um aumento progressivo na osmolaridade do interstício medular em relação ao plasma, a partir da medula externa até a medula interna, atingindo cerca de 1200 mOsm/L H<sub>2</sub>O em humanos (GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017a; NAWATA; PANNABECKER, 2018). Essa alta osmolaridade do interstício medular é a força motente para a reabsorção de água do DC e é produzida pelo acúmulo de NaCl e ureia.

- **TRANSPORTE DE Na<sup>+</sup>**. O acúmulo de NaCl no interstício medular depende basicamente de um transporte ativo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> através do cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2), localizado na membrana apical das células do segmento ascendente espesso (SAE) da alça de Henle. Visto que o SAE da alça de Henle é continuamente impermeável à água, a reabsorção ativa de Na<sup>+</sup> não é acompanhada da reabsorção de água e, desse modo, além de

**FIG 2.** Mecanismo de concentração urinária na presença de HAD.



concentrar o interstício medular e gerar o gradiente que move a reabsorção de água no DC, o SAE da alça também dilui (em relação ao plasma) o fluído tubular que segue em direção ao DC (GAMBA et al., 1994; PAYNE; FORBUSH, 1994; ARES; CACERES; ORTIZ, 2011; KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015).

- **TRANSPORTE DE UREIA**. O acúmulo de ureia no interstício medular interno depende de um processo de recirculação de ureia em que a ureia é 1) reabsorvida no TP em consequência da reabsorção de água pela via paracelular, 2) reabsorvida no DC medular interno (DCMI) na presença de HAD, contribuindo com a geração e manutenção da hipertonicidade do interstício medular, antes de 3) ser secretada do interstício para luz dos

segmentos descendentes e ascendentes finos (SDF e SAF) da alça de Henle na região medular e, então, excretada na urina. Por muito tempo, acreditava-se que a ureia — molécula pequena, polar e sem carga — era transportada apenas pela bicamada lipídica. No entanto, a alta taxa de transporte de ureia em alguns tipos celulares sugeria a presença de um transporte facilitado. Atualmente, sabe-se que os chamados transportadores de ureia (UTs) são responsáveis pelo transporte de ureia através da membrana plasmática, a favor do seu gradiente de concentração (YOU et al., 1993; SHAYAKUL; STEEL; HEDIGER, 1996; KARAKASHIAN et al., 1999; TRINH-TRANG-TAN et al., 2002; LUCIEN et al., 2005; STEWART et al., 2009).

### **1.1.1.2. AUMENTO DA PERMEABILIDADE DO DC**

Elevações mínimas da osmolaridade do plasma (cerca de 2 mOsm) ativam osmorreceptores no hipotálamo com consequente aumento da produção e secreção de HAD para a circulação sistêmica. O HAD atinge o DC através dos capilares peritubulares e se liga a receptores  $V_2$  localizados na membrana basolateral das células principais, acionando uma cascata de sinalização — que resulta no aumento dos níveis da enzima Adenil cilase e da atividade da proteína quinase A (PKA) — com consequente inserção dos canais para água Aquaporinas 2 (AQP2) na membrana apical das células principais. e aumento da permeabilidade à água do epitélio do DC (BERLINER; BENNETT, 1967; KNEPPER, 1997; KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015). A inserção de aglomerados de AQP2 aumenta a permeabilidade à água do DC e, como o interstício medular (em contato com a luz do DC) é altamente concentrado (~1.200 mOsm/L  $H_2O$ ), ocorre, portanto, o movimento de água da luz do DC para o interstício medular hipertônico e, finalmente, para a circulação sistêmica.

## **1.2. BALANÇO ÁCIDO-BASE**

A atividade metabólica do organismo produz diariamente uma grande quantidade de ácido volátil ( $CO_2$ ), regulado pelos pulmões, e uma quantidade de ácidos fixos ( $H^+$ ), regulado pelos rins. Quando os ácidos fixos são lançados no FEC, a grande maioria é rapidamente neutralizada pelo  $HCO_3^-$  do FEC seguindo a reação  $H^+ + HCO_3^- \rightarrow H_2O + CO_2$ , catalisada pela enzima anidrase carbônica (AC). O resultado da neutralização da carga de ácido fixo corresponde ao desaparecimento equivalente de uma carga de  $HCO_3^-$  no FEC. Desse modo, para evitar que a concentração de  $HCO_3^-$  no fluido extracelular fique abaixo do valor

fisiológico (24 mmol/L), os rins reabsorvem todo o  $\text{HCO}_3^-$  filtrado, evitando perda de  $\text{HCO}_3^-$  na urina, e geram  $\text{HCO}_3^-$  “novo” para repor a carga de  $\text{HCO}_3^-$  consumida no processo de neutralização dos ácidos fixos do organismo. O processo para geração do  $\text{HCO}_3^-$  “novo” envolve o metabolismo da glutamina (Gln) — produzida a partir do metabolismo da amônia no fígado — nas células do TP (WEINER; VERLANDER, 2013; GEYER et al., 2013c; GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017b; ZATZ, 2012; MUSA-AZIZ, 2017).

### **1.2.1. MANEJO RENAL DE AMÔNIA**

Nas células do TP a Gln, captada a partir do fluido luminal e do sangue do capilar peritubular, é metabolizada para gerar energia e, neste processo, há produção de quantidades equimolares de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Essa carga de  $\text{HCO}_3^-$  produzida corresponde ao  $\text{HCO}_3^-$  “novo”, que vai para a corrente sanguínea para manter a concentração de  $\text{HCO}_3^-$  plasmática. Os íons  $\text{NH}_4^+$  gerados nas células do TP são secretados para o lúmen do segmento, reabsorvidos no SAE da alça de Henle e secretados para o DC. Se os íons  $\text{NH}_4^+$  não fossem excretados e entrassem na circulação sistêmica, no fígado seriam metabolizados, predominantemente através do ciclo da ureia, como mostra a reação  $2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ureia} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$ . Nesse processo haveria liberação de íons  $\text{H}^+$  que consumiriam íons  $\text{HCO}_3^-$ , alterando o saldo de  $\text{HCO}_3^-$  “novo” gerado pelas células do TP (KNEPPER et al. 1989; GEYER et al., 2013c; WEINER; VERLANDER, 2013; ZATZ, 2012; MUSA-AZIZ, 2017). Desse modo, a excreção dos íons  $\text{NH}_4^+$  é fundamental para que os rins possam manter o balanço ácido-base do organismo e, portanto, o pH do plasma ao redor de 7,4.

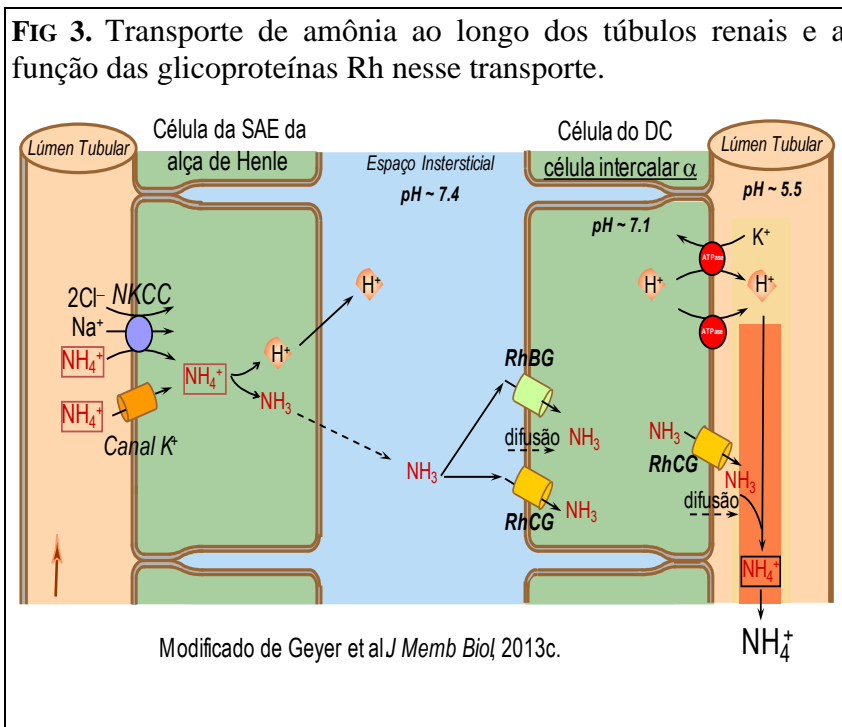
Alterações no metabolismo renal de Gln são determinantes da manutenção do balanço ácido-base. Durante uma resposta normal à acidose metabólica, a excreção de íons  $\text{NH}_4^+$  aumenta consideravelmente, indicando o aumento na geração de  $\text{HCO}_3^-$  “novo” para recuperar o  $\text{HCO}_3^-$  utilizado na neutralização do excesso de ácido (WEINER; VERLANDER, 2013).

#### **1.2.1.1. TRANSPORTE DE $\text{NH}_3$ E $\text{H}^+$ PARA EXCREÇÃO DE $\text{NH}_4^+$**

Quando passam do SAE da alça de Henle para o interstício medular, os íons  $\text{NH}_4^+$ , devido ao pH de 7,4, se dissociam em  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}^+$ . A secreção de íons  $\text{NH}_4^+$  para a luz do DC envolve a secreção em paralelo de  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}^+$ , através das membranas basolateral e apical da

célula intercalar . No baixo pH na luz do DC,  $\text{NH}_3$  reage rapidamente com o  $\text{H}^+$  formando novamente  $\text{NH}_4^+$  que é, então, excretado na urina (**Figura 3**) (KNEPPER et al. 1989; GEYER et al., 2013c; WEINER; VERLANDER, 2013; ZATZ, 2012; MUSA-AZIZ, 2017).

O íon  $\text{H}^+$  é secretado principalmente pela  $\text{H}^+$  ATPase (e, em menor escala, pela  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) presentes na membrana apical da célula intercalar  $\alpha$ . Quanto à molécula de  $\text{NH}_3$ , as membranas apical e basolateral do epitélio do DC tem uma permeabilidade limitada à molécula — devido à



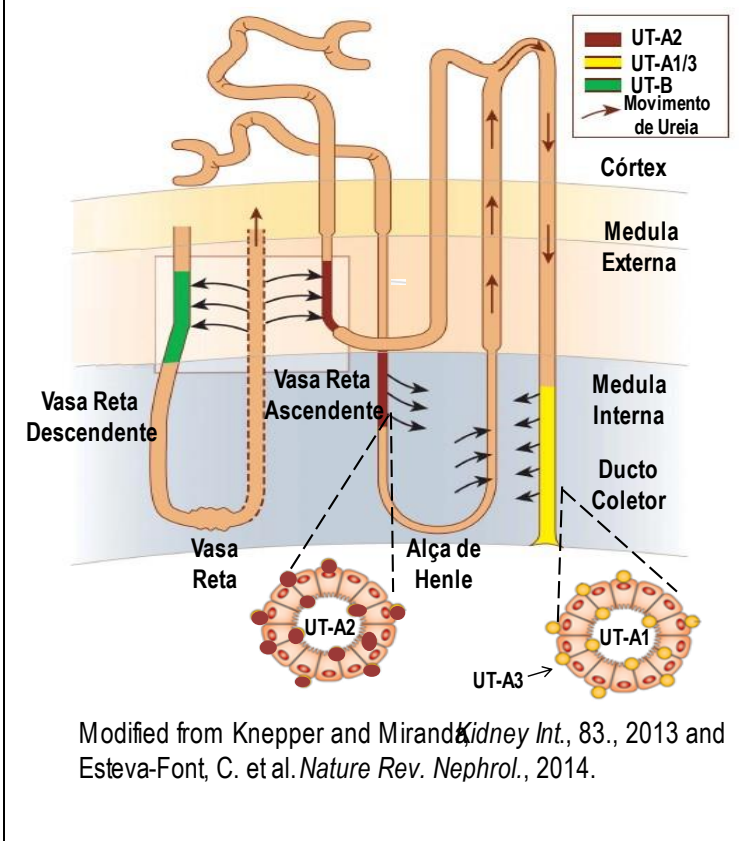
alta expressão de proteínas de membrana nestas membranas — o que sugere a participação de proteínas de membrana no transporte de  $\text{NH}_3$  para aumentar o fluxo de  $\text{NH}_3$  no epitélio do DC.

Estudos de alguns laboratórios, incluindo o nosso, demonstraram que as proteínas de membrana glicosiladas da família Rhesus (Rh) — RhCG e RhBG — são expressas nas células intercalares  $\alpha$  do DC e estão envolvidas com o transporte da molécula de  $\text{NH}_3$ . Assim,  $\text{NH}_3$  é transportada através da membrana basolateral via RhCG e RhBG e através da membrana apical via RhCG (BIVER et al., 2008; GEYER et al., 2013c; WEINER; VERLANDER, 2013; MUSA-AZIZ, 2017). A identificação dessas glicoproteínas Rh levou a mudanças na compreensão do metabolismo renal e extra-renal de amônia (BIVER et al, 2008; GEYER et al., 2013c; MUSA-AZIZ, 2017). Assim, devido à localização dos UTs no DC, acreditamos que esses canais também podem estar envolvidos com o transporte de  $\text{NH}_3$  no DC e, portanto, com a manutenção do balanço ácido-base do organismo.

### 1.3. FAMÍLIA UT

Os UTs são glicoproteínas de membrana expressas ao longo das estruturas tubulares e dos capilares renais. Na espécie humana foram identificados 2 genes que codificam, por splice, os UTs: o gene SLC14A2 que codifica as proteínas UT-As (A1-A6) e o gene SLC14A1 que codifica a isoforma UT-B (MACIVER et al., 2008). No rim (**Figura 4**), UT-A1 está localizado na membrana apical e o UT-A3 está localizado nas membranas apical e basolateral do DCMI. Neste segmento, ambas as isoformas são responsáveis pela reabsorção

**FIG 4.** Distribuição das isoformas de UT ao longo do néfron.



de ureia da luz do túbulo para o interstício medular (STEWART et al., 2004; HWANG et al., 2010; STEWART, 2011). UT-A2 é expresso no SDF da alça de Henle e é responsável pela secreção de ureia do interstício para a luz do túbulo (UCHIDA et al., 2005; MACIVER et al., 2008)<sup>2</sup>. UT-B é altamente expresso na membrana dos eritrócitos (14.000 UT-Bs/célula), mas também está presente nos vasos retos descendentes, onde é responsável pelo transporte de ureia do vaso reto descendente para o vaso reto ascendente (PALLONE, 1994; TRINH-TRANG-TAN et al., 2002; YANG et al., 2002; BAGNASCO, 2006; GEYER et al., 2013a). UT-B também é expresso no fígado, onde sua elevada expressão está relacionado ao efluxo de ureia para a circulação (TRINH-TRANG-TAN et al., 2002; SHAYAKUL; CLÉMENÇON;

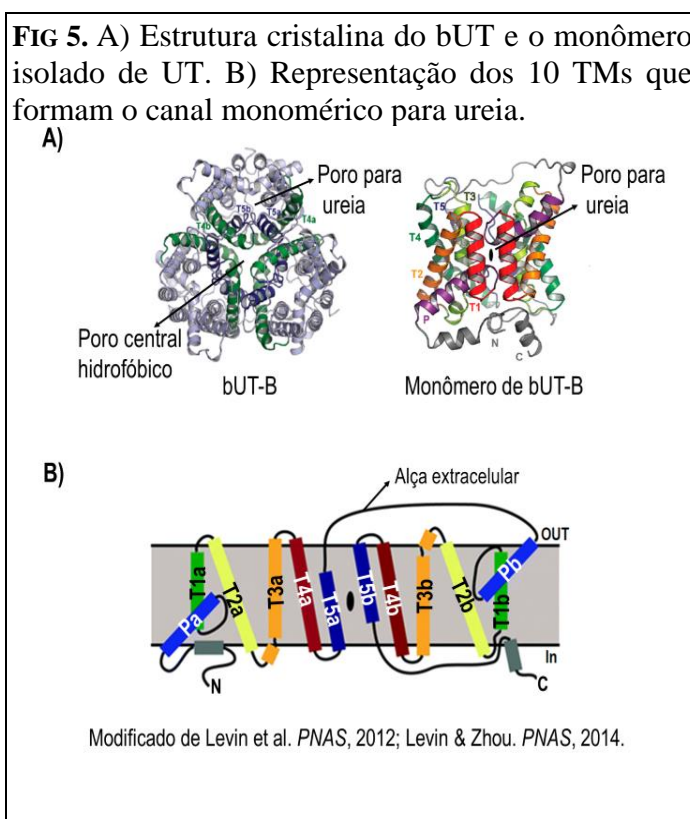
<sup>2</sup> Os transcritos de UT-As também são detectados no cérebro, coração e fígado (FENTON et al., 2002), mas a função e característica dos UT-As extra-renal ainda está sendo explorada.

HEDIGER, 2013), e na bexiga<sup>3</sup>, importante para proteger o as células de um acúmulo intracelular de ureia (YANG et al., 2002). Sabe-se que, nos eritrócitos, rim e fígado, o transporte de ureia pelos UTs pode ser inibido por um flavonoide vegetal chamado floretina (KLEIN et al. 1999; GEYER et al., 2013a). A floretina é uma molécula grande que possivelmente se liga às proteínas UTs, provocando uma mudança conformacional, o que altera o transporte de ureia (LEVIN; ZHOU, 2014; TOON; SOLOMOM, 1987).

#### 1.4. ESTRUTURA CRISTALINA DOS UTs

As estruturas cristalinas, adquiridas a partir de cristalografia de raio-X, dos UTs isolados da bactéria *Disulfovibrio vulgaris* (dvUT) e do UT-B bovino (bUT-B) (**Figura 5**) revelam que os UTs são proteínas homotriméricas (LEVIN; QUICK; ZHOU, 2009; LEVIN et al., 2012). Cada monômero contém duas metades homólogas, a e b, com orientações opostas na membrana. Cada metade possui

cinco  $\alpha$ -hélices transmembranares (TMs), sendo elas TM1a-5a e TM1b-5b, e duas  $\alpha$ -hélices, inclinadas a 45° em relação à membrana, Pa e Pb. Conectando o TM5a à hélice Pb existe uma longa e flexível alça extracelular que contém um resíduo de asparagina (Asn ou N) conhecido como sítio de N-glicosilação, ao redor de cada um dos três monômeros da proteína, importante para a função e estabilidade da proteína. Os terminais N e C estão localizados no citosol. Entre as duas metades encontra-se um poro



<sup>3</sup> A concentração de ureia na urina é cerca de 20 a 100 vezes maior do que ureia plasmática, portanto, o epitélio da bexiga inevitavelmente está em constante contato com elevada concentração de ureia (YANG; BANKIR, 2005; SPECTOR; YANG; WADE, 2007).

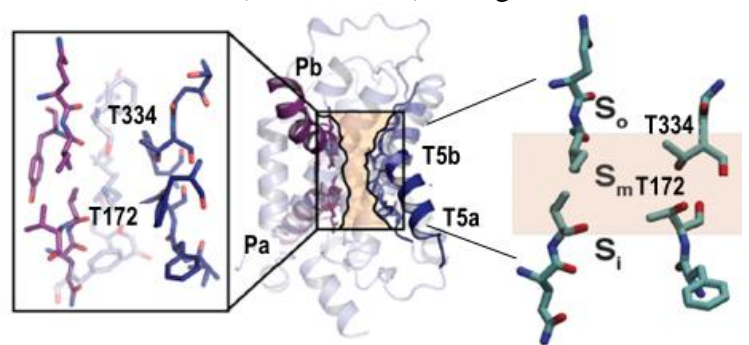
anfipático — que contém um filtro de seletividade formado por resíduos conservados — que medeia a passagem das moléculas de ureia (LEVIN; QUICK; ZHOU, 2009; LEVIN et al., 2012). Entre os três monômeros existe um poro central lipofílico, análogo aos poros centrais das proteínas Rhesus (Rh) e AQPs, formado por resíduos hidrofóbicos e obstruído por moléculas de lipídeos (LEVIN; ZHOU, 2014).

#### 1.4.1. FILTRO DE SELETIVIDADE

O filtro de seletividade de cada monômero, formado por quatro hélices (TM3a, TM3b, TM5a e TM5b) e com o diâmetro de  $\sim 3 \text{ \AA}$ , é subdividido em três regiões específicas:  $S_o$  (voltada para o extracelular),  $S_i$  (voltada para o intracelular) e  $S_m$  (região central, mais estreita) (**Figura 6**). A região  $S_m$  é revestida por resíduos hidrofóbicos, exceto pela presença de um par de Treoninas (Thr ou T) — T172 e T334 (em bUT-B) — que conferem uma certa característica hidrofílica à região  $S_m$ . Essas Thr estão altamente envolvidas com a passagem de ureia pelo poro, formando o sítio de ligação da proteína com o substrato ureia, através da ligação entre as hidroxilas de ambas as Thr e o oxigênio da molécula de ureia (LEVIN; QUICK; ZHOU, 2009; LEVIN et al., 2012; LEVIN; ZHOU, 2014).

O filtro de seletividade pode acomodar e coordenar a passagem de várias moléculas de ureia, a favor de um gradiente de concentração, em fila única ( $10^4$ – $10^6$  moléculas/seg). No entanto, como os resíduos que revestem a região  $S_m$  desse filtro não possuem carga, isso leva à exclusão de espécies carregadas, como  $H^+$ ,  $NH_4^+$  e guanidínio ( $[CH_6N_3]^+$ ) (LEVIN; ZHOU, 2014).

**FIG 6.** Representação do canal monomérico de bUT-B enfatizando as Thr (T172 e T334) na região  $S_m$ .



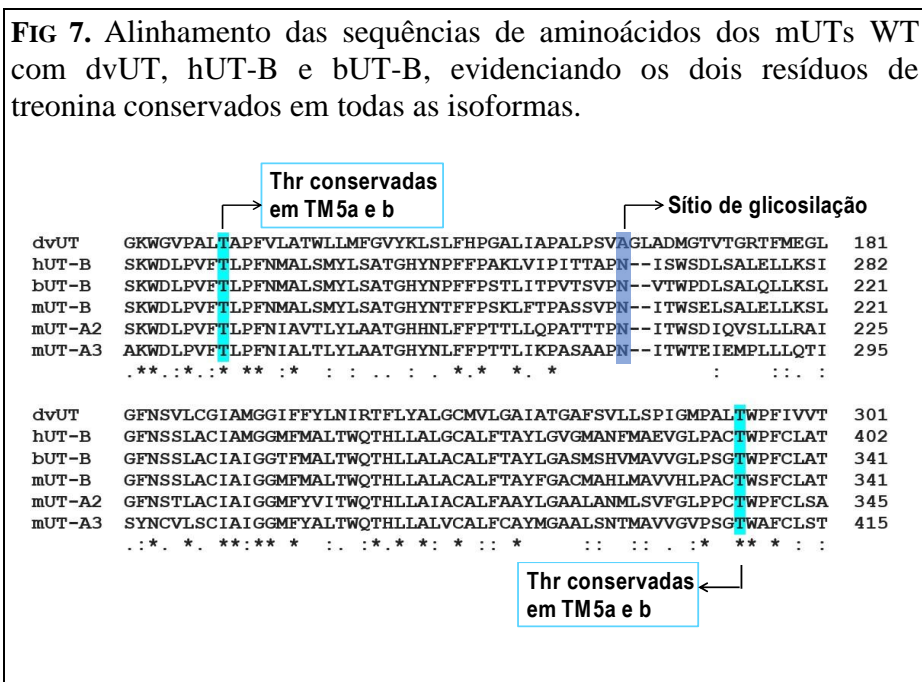
Modificado de Levin et al. *PNAS*, 2012.

Ainda que os UTs terem sido originalmente classificados como transportadores, as taxas de fluxo de moléculas de ureia medidas e a ausência de uma mudança conformacional da proteína durante o transporte são consistentes com o mecanismo observado em canais, mesmo não apresentando um sistema de “gating” conhecido (LEVIN; QUICK; ZHOU, 2009; LEVIN et al., 2012; LEVIN; ZHOU, 2014).

### 1.4.1.1. OS RESÍDUOS CONSERVADOS DE THR NAS PROTEÍNAS UT

Todas as isoformas de UT partilham uma homologia estrutural significativa ao nível dos nucleotídeos e, conseqüentemente, dos aminoácidos que compõem essas proteínas.

O alinhamento das sequências de aminoácidos dos UTs “wild type” (WT) que realizamos (Figura 7) mostra que os dois resíduos de Thr localizados na região S<sub>m</sub> do filtro de seletividade de cada monômero de dvUT (T130 e T294) e bUT (T172 e T334)



(LEVIN; QUICK; ZHOU, 2009; LEVIN et al., 2012) também são conservados em UT-B humano (h) (T177 e T339), assim como nas isoformas de UT de camundongo (m) de nosso interesse — mUT-A2 (T176 e T338), mUT-A3 (T246 e T408) e mUT-B (T172 e T334).

O uso de inibidores para o transporte de ureia e a mutação sítio-dirigida são ferramentas valiosas no estudo da relação entre estrutura e função de proteínas de interesse. Sabe-se que a mutação pontual que leva a substituição de cada Thr para uma Valina (Val, V) na proteína UT-B provoca um aumento na hidrofobicidade do poro o que reduz significativamente o transporte de ureia em bUT-B (LEVIN et al., 2012) e ureia, água e NH<sub>3</sub> em hUT-B (GEYER et al., 2013), presumivelmente devido à uma redução do diâmetro do



canal monomérico. Assim, nós acreditamos que os resíduos de Thr (com as hidroxilas na cadeia lateral) também estejam relacionados com o transporte de água e  $\text{NH}_3$  através do canal monomérico de UT-A2 e UT-A3.

### **1.5. ESTUDOS COM ANIMAIS “KNOCKOUT”**

Estudos com animais “knockout” fornecem informações importantes sobre o papel e a importância fisiológica de genes específicos. Em 2004, Fenton e colaboradores demonstraram que camundongos com duplo “knockout” para UT-A1 e A3 apresentam uma redução de aproximadamente 35% na concentração urinária e um aumento no fluxo urinário quando comparados com camundongos controle. Outros estudos demonstraram que camundongos “knockout” para UT-A2, quando submetidos a uma dieta com baixo teor de proteínas, apresentam uma deficiência na capacidade de concentrar a urina quando comparados aos camundongos WT (UCHIDA et al., 2005). Sands e colaboradores (1992) observaram que humanos com a perda genética de UT-B são incapazes de concentrar a urina mais do que 800 mOsm/L  $\text{H}_2\text{O}$ , mesmo quando submetidos a uma restrição hídrica e a administração exógena de HAD.

### **1.6. OUTRAS FUNÇÕES PARA AS PROTEÍNAS UTs?**

Em 2007, Zhai e colaboradores observaram que, sob condições fisiológicas, de hidratação e desidratação, o SDF da alça (curta) de Henle de néfrons corticais de camundongos, ratos (r) e humanos não expressam AQP1 e apresentam uma alta expressão de UT-A2 que se inicia logo após o túbulo proximal reto e continua até a transição com a SAE da alça de Henle. Esses resultados foram contrários às observações publicadas anteriormente por outros dois grupos (NEJUM, 2005; VERKMAN, 2006) — que atribuíam a alta permeabilidade à água do SDF da alça de Henle dos néfrons corticais à expressão de AQP1 —, no entanto, foram importantes para adicionar informações que levam a um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos com a concentração da urina. Adicionalmente, Yang e Verkman (1998) demonstraram que UT-B também funciona como um canal para água. Posteriormente e com mais detalhes, Geyer e colaboradores (2013a) ao estudarem o transporte de  $\text{CO}_2$  em eritrócitos, também demonstraram que UT-B funciona como um canal para água e, além disso, demonstraram pela primeira vez que UT-B pode transportar  $\text{NH}_3$ , sensível a floretina. Essa permeabilidade de UT-B à  $\text{NH}_3$  poderia reforçar a capacidade das

hemácias de captar  $\text{NH}_3$  em vários tecidos e depois descarregá-la no fígado para detoxificação. Do ponto de vista fisiológico, a observação desses estudos lapidaram nosso interesse em desenvolver este projeto.

### 1.7. OÓCITOS

Nosso laboratório demonstrou que os oócitos da rã *Lithobates catesbeianus* podem ser utilizados como modelo de expressão heteróloga para estudar — através de biologia molecular e eletrofisiologia — a função de uma nova proteína de membrana ou uma função nova de uma proteína já descrita (Figura 8) (KABUTOMORI et al., 2018).

**FIG 8.** Dissociação e isolamento dos oócitos de *Lithobates*.



Em oócitos, temos o controle da expressão de canais, transportadores ou enzimas (MUSA-AZIZ et al., 2010; KABUTOMORI et al., 2018) — que podem facilmente ser inibidos ou mutados. Dos experimentos obtidos com oócitos, podemos extrair, por exemplo, a permeabilidade, devido a expressão de uma determinada proteína, à ureia, água ou  $\text{NH}_3$  e, dessa forma, entender a função da proteína em outros sistemas, tal como o sistema renal.

### 1.8. HIPÓTESE

Embora esteja claro que os transportadores de ureia (UTs) medeiam o transporte de ureia, existe um debate para esclarecer se essas proteínas podem mediar o transporte de água e da molécula de  $\text{NH}_3$  (gás dissolvido) e quais seriam os mecanismos envolvidos nesse

transporte. Assim, considerando a localização estratégica dos UTs nos rins, em locais onde o transporte de ureia, água e amônia é extremamente importante, postulamos que as proteínas UT-A2, UT-A3 e UT-B podem mediar o transporte água e  $\text{NH}_3$  através do canal monomérico para ureia.

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a expressão e a função de transporte de ureia, água e/ou NH<sub>3</sub> das proteínas mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B WT expressas na membrana de oócitos da rã de *Lithobates catesbeianus* e investigar se a substituição pontual de dois resíduos conservados de Thr por Val no filtro de seletividade do canal monomérico para ureia desses UTs influencia a expressão e a função de transporte dessas proteínas na membrana plasmática.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **2.1.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MUTS WT NA MEMBRANA DOS OÓCITOS E EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESSA EXPRESSÃO**

Nesta etapa, foi investigado se, após a injeção de cRNA para expressão das proteínas UTs WT *versus* mutantes, os oócitos de *Lithobates* eram capazes de sintetizar e expressar as proteínas na membrana.

#### **2.1.2. EFEITO DA EXPRESSÃO DOS MUTS WT NO TRANSPORTE DE UREIA, ÁGUA E NH<sub>3</sub> (ANTES E APÓS TRATAMENTO COM O INIBIDOR FLORETINA) E O EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESSES TRANSPORTES**

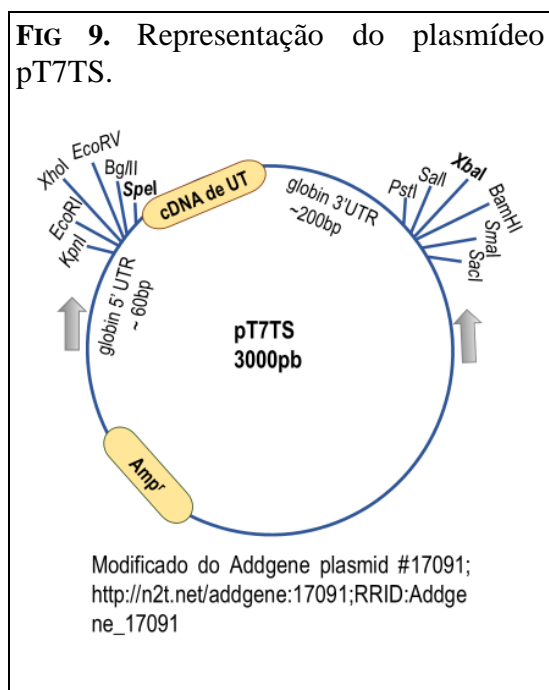
Nesta etapa, foi analisado a capacidade de transporte de ureia, água ou NH<sub>3</sub> de oócitos de *Lithobates* injetados com cRNA para expressão de UTs WT (antes e após tratamento com o inibidor Floretina), assim como o efeito da mutação Thr → Val na função de transporte dos UTs.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO DE cRNA A PARTIR DE cDNA

O cRNA que codifica as proteínas mUT-A2, mUT-A3 ou mUT-B foi obtido a partir de um cDNA (c para “capped”) inserido em um vector de expressão ou plasmídeo, o pT7TS (**Figura 9**) — gentilmente doados ao laboratório pelo Dr. Bryce MacIver, do Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard University, Boston, Massachusetts (MACIVER et al., 2008).

O plasmídeo pT7TS (**Figura 9**) possui um gene que confere resistência ao antibiótico penicilina, um sítio de restrição TCTAGA reconhecido pela enzima XbaI (Nº Cat. R0145S, New England BioLabs, Ipswich, MA), as sequências promotoras T7 forward (5'→3') e GI3B ou SP6 reverse (3'→5') (Addgene plasmid #17091), que atuam como sítios de reconhecimento para a ação da enzima RNA polimerase, e as regiões UTR 3' e 5' do gene da β-globulina de anfíbios, que modulam, principalmente, o transporte do cRNA para os ribossomos e a eficiência da tradução pelo oócito de *Lithobates* (MIGNONE et al., 2002, GOLDIN; SUMIKAWA, 1992).



Primeiramente, o plasmídeo recombinante, que contém a sequência que codifica a proteína UT de interesse, foi clonado a partir da transformação de bactérias competentes *E. Coli* (obtidas no laboratório) em meio de cultura com ampicilina para seleção das bactérias transformadas (HANAHAN, 1983). Após a clonagem, o cDNA foi linearizado pela enzima de restrição XbaI (Nº Cat. R0145, New England Bio Labs). O cDNA linearizado foi purificado com o kit de purificação QIAquick PCR (Nº Cat. 28104, Qiagen Inc., Valencia, CA). Em sequência, para obtenção do cRNA, o cDNA linearizado foi transcrito pela enzima RNA polimerase, usando o kit T7 específico mMessage mMachine kit (Nº Cat. AM1344, Ambion, Austin, TX) e, posteriormente, o cRNA foi purificado e concentrado de acordo com a

recomendação do kit RNeasy MinElute RNA Cleanup Kit (Nº Cat. 74204, Qiagen Inc.). Uma amostra de cRNA foi submetida à espectrofotometria no “Nanodrop 2000c spectrophotometer” (Thermo Fisher Scientific) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (comprimento de onda definido, respectivamente, para a leitura de RNA e proteínas), para quantificação e análise da pureza (MUSA-AZIZ; BORON, PARKER, 2010; KABUTOMORI et al. 2018).

### 3.2. MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

Para a síntese dos mutantes sítio-dirigidos foram utilizados os seguintes primers específicos para cada mutação (destacados em cinza):

#### **mUT-A2**

##### **mUT-A2<sup>T176V</sup>**

Foward: 5'- GTGGGACCTCCCAGTCTTCGTA**CTGCCCTTCAACATC**-3'

Reverse: 5'- GATGTTGAAGGGCAGT**ACGAAGACTGGGAGGTCCCAC**-3'

##### **mUT-A2<sup>T338V</sup>**

Foward: 5'- TTGGATTACCACCCTGCGTCTGGCCCTTTTGCCTC-3'

Reverse: 5'- GAGGCAAAGGGCCAGACGCAGGGTGGTAATCCAA-3'

#### **mUT-A3**

##### **mUT-A3<sup>T246V</sup>**

Foward: 5'-GGGACCTGCCCGTCTTCGTCCTGCCCTTCAACATTGC-3'

Reverse: 5'-GCAATGTTGAAGGGCAGG**ACGAAGACGGGCAGGTCCC**-3'

##### **mUT-A3<sup>T408V</sup>**

Foward: 5'-TTGGGGTGCCCTCAGGCGTTTGGGCCTTCTGTCTCTC-3'

Reverse: 5'-GAGAGACAGAAGGCCCA**AAACGCCTGAGGGCACCCCA**-3'

#### **mUT-B**

##### **mUT-B<sup>T172V</sup>**

Foward: 5'-GCCATGTTGAAAGGGAGAA**CAAAGACGGGCAGGTCCC**ACTT-3'

Reverse: 5'-AAGTGGGACCTGCCCGTCTTT**GTTCTCCCTTTCAACATGGC**-3'

##### **mUT-B<sup>T334V</sup>**

Foward: 5'-GCTGTGGTTCACCTGCCAGCTTGTGT**GTGGTCCTTTTGT**TTG-3'

Reverse: 5'-CAAACAAAAGGACC**CACACACAAGCTGGCAGGTGAACCACAGC**-3'

Estes primers utilizados para a substituição dos resíduos de Thr — T176 ou T338 no mUT-A2, T246 ou T408 no mUT-A3 e T172 ou T334 no mUT-B — por resíduos de Val foram desenhados utilizando a plataforma “QuikChange Primer Design Program” (<https://www.chem.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) e enviados para serem confeccionados pela Exxtend Solução em Oligos (São Paulo, SP).

Para cada mutação foi realizado uma reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”), utilizando reagentes do kit “QuikChange Site-Directed Mutagenesis II” (Nº Cat. 200523), de acordo com o protocolo disponibilizado pela Agilent Technologies (Santa Clara, CA).

Para a reação, foram utilizados 5 µL de 10x tampão de reação disponibilizado pelo kit, 50 ng de DNA parental (que foi submetido à mutação), 125 ng de cada primer sintetizado (forward e reverse), 1 µL da mistura de dNTPs e água pura, livre de nucleotidases, até a completar o volume da reação para 50 µL. Após isso, foi adicionado 1 µL da DNA-polimerase *PfuUltra* HF (2,5 U/µL). Após a preparação, as amostras foram submetidas à reação de PCR utilizando o termociclador “Veriti 96-well Thermal Cycler” (Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as etapas descritas na **Tabela 1** a seguir:

**Tabela 1.** Etapas, ciclos e temperatura da reação de PCR para o experimento de mutação.

| Etapas                 | Ciclos | Temperatura | Tempo                   |
|------------------------|--------|-------------|-------------------------|
| Desnaturação inicial   | 1      | 95°C        | 30 segundos             |
| Desnaturação           |        | 95°C        | 30 segundos             |
| Anelamento dos primers | 18     | 55°C        | 1 minuto                |
| Amplificação           |        | 68°C        | 4 minutos e 30 segundos |

Após reação de PCR, as amostras de cDNA foram digeridas com 1 µL da enzima de restrição DpnI (10 U/µL, do kit “QuikChange Site-Directed Mutagenesis II”) à 37°C por 12h. A DpnI é uma enzima isolada da bactéria *Diplococos pneumoniae* que tem especificidade por DNA metilado, como o cDNA parental, que foi clonado a partir da transformação de bactérias *E. coli*. Assim, a DpnI digere o DNA parental, selecionando o cDNA mutado que não é

metilado (produto da reação de PCR) (MIERZEJEWSKA et al., 2014). Esse DNA mutado que foi selecionado pode, então, ser sequenciado para confirmar a presença da mutação pontual.

### 3.3 SEQUENCIAMENTO

Para confirmar a integridade do cDNA de interesse, os cDNAs das proteínas WT e os DNAs mutados foram sequenciados pelo Serviço de Sequenciamento da Central Analítica do Instituto de Química na Universidade de São Paulo (Central Analítica IQ/USP) pelo método de Sanger utilizando primers específicos (TSIATIS et al., 2010).

### 3.4. OBTENÇÃO DO CRNA

Os cRNAs Cap'5 — estrutura gerada pela ligação 5'- 5' trifosfato da molécula de mRNA com uma guanosina metilada, que protege o mRNA da ação de fosfatases — das proteínas de interesse foram transcritos utilizando o kit de transcrição mMessage mMachine T7 (Nº Cat. AM 1224, Invitrogen, Carlsbad, CA) a partir de seus respectivos insertos de cDNA linearizados e, posteriormente, purificados e concentrados de acordo com a recomendação do kit RNeasy MinElute Spin column (Nº Cat. 74204, Qiagen). Uma amostra de cada cRNA foi submetida à espectrofotometria para quantificação e análise de pureza utilizando o NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrometer da Thermo Scientific (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010; KABUTOMORI et al., 2018; KABUTOMORI; PINA-LOPES; MUSA-AZIZ, 2020).

### 3.5. ANIMAIS

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº 7971160519). As rãs fêmeas adultas da espécie *Lithobates catesbeianus* com peso médio de 450g foram adquiridas da Rã World (São Paulo, SP) e mantidas no biotério de rãs, no Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, USP, em aquários de plástico, sob condições controladas de temperatura (22°C), ciclo claro/escuro de 12h e com uma dieta específica a base de proteínas (Aquos Biotruta Final 42 da empresa Total Alimentos, Três Corações, MG).



### 3.6. SOLUÇÕES E DROGAS

A solução controle (“ND96”) para os oócitos de *Lithobates catesbeianus* contém (em mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, e 5 HEPES. A solução 0 Ca<sup>2+</sup> é uma versão modificada da solução “ND96”, onde 1 mM de CaCl<sub>2</sub> foi substituído por 1 mM de NaCl.

Para os experimentos de inibição, o inibidor Floretina foi diluído em “ND96” e usado na concentração de 0,5 mM (durante 20 min).

O meio de cultura OR3, onde os oócitos foram mantidos, contém 6,85 g/L de meio Leibovitz L-15 com L-glutamina (Nº Cat. L4386-1L, Gibco/ Sigma-Aldrich, St Louis, MO) — suplementado com 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 U/mL de estreptomicina (Nº Cat. 15140-122, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) — e HEPES 5 mM.

Para os experimentos de medidas da captação de <sup>14</sup>C-Ureia. Foi adicionado 5 µCi de <sup>14</sup>C-ureia ou 1 mM de ureia não marcada na solução “ND96” (YANG;VERKMAN, 1998; GEYER et al., 2013a).

Para os experimentos de medidas da P<sub>f</sub>. A solução hipotônica é uma variante da solução de “ND96”, onde a osmolaridade foi reduzida de 195 mOsmois/L H<sub>2</sub>O para 70 mOsmois/L H<sub>2</sub>O (PRESTON et al., 1993; VIRKKI et al., 2002; MUSA-AZIZ et al., 2009a; KABUTOMORI et al. 2018).

Para os experimentos de medidas de pHs. A solução de NH<sub>4</sub>Cl é uma variante da solução “ND96”, onde 0,5 mM NaCl foi substituído por 0,5 mM de NH<sub>4</sub>Cl (MUSA-AZIZ et al., 2009a).

A osmolaridade de todas as soluções foi ajustada para 195 mOsmois/L H<sub>2</sub>O usando NaCl ou água e o pH foi ajustado para 7,50 utilizando NaOH ou HCl (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010; KABUTOMORI et al. 2018).

### 3.7. CIRURGIA

Para a cirurgia de laparotomia, rãs adultas foram anestesiadas por meio de imersão em solução de Tricafina a 0,2% (Nº Cat. A5040, “Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate”, Sigma-Aldrich) adicionado ao banho. Após completado o efeito do anestésico, a rã foi

posicionada em uma superfície fria e foi realizado uma incisão de 1 cm na parede abdominal para acesso ao ovário. Fragmentos ovarianos e todo o seu conteúdo de oócitos foram removidos do animal e colocados em um tubo de fundo cônico de 50 mL com solução “ND96”. A seguir, uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca e imediatamente centrifugada por 10 min para separar o plasma e medir a osmolaridade (“Vapro® Vapor Pressure Osmometer”, Wescor, Utah, USA) e o pH plasmático (“Gas Analyser, Radiometer ABL5”, Copenhagen, Dinamarca). Os valores de osmolaridade e pH plasmáticos medidos foram semelhantes ao encontrados anteriormente e publicados no artigo “*Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog) Oocytes: A Novel Heterologous Expression System for Aquaporins, Kabutomori J, Beloto-Silva O, Geyer RR, Musa-Aziz R., Journal of Experimental Biology-Biology Open, 2018”. Após este procedimento, foi realizada a eutanásia do animal (SIVE; GRAINER; HARLAND, 2010; KABUTOMORI et al., 2018).

### 3.8. ISOLAMENTO DOS OÓCITOS

Os fragmentos ovarianos (com oócitos envolvidos pela camada de células foliculares) foram transferidos para uma placa de Petri de 100 cm contendo solução controle “ND96”. Com uso de tesoura e pinças tipo relojoeiro esterilizadas, os fragmentos foram reduzidos em fragmentos menores, aproximadamente 5 mm<sup>3</sup> e, então, lavados em solução Ø Ca<sup>2+</sup>-“ND96” sob agitação constante (15 min/lavagem, total de 3 lavagens). Sequencialmente, os fragmentos foram tratados com 0,25 mg/mL de Colagenase Tipo VII purificada (Nº Cat. C0773, Sigma-Aldrich) em solução Ø Ca<sup>2+</sup>-“ND96”, por 10 min, sob agitação constante (**Figura 8A**). Em sequência, os oócitos foram novamente lavados em solução Ø Ca<sup>2+</sup>-“ND96” sob agitação constante (15 min/lavagem, total de 3 lavagens) e uma vez em solução controle “ND96” (5 min/lavagem). Esse procedimento permite a dissociação dos oócitos, no entanto, a defoliculação (remoção da camada de células foliculares) não é completa. Sequencialmente, os vestígios de camada folicular dos oócitos foram removidos manualmente (seguindo seus estágios de desenvolvimento e viabilidade), utilizando pinças tipo relojoeiro (**Figura 8B**). Oócitos individualizados (**Figura 8C**), maduros (estágio V/VI), defoliculados foram mantidos em meio OR<sub>3</sub> de osmolaridade de 195 mOsmois, pH 7,50, à 20°C (KABUTOMORI et al., 2018).

### **3.9 INJEÇÃO DE CRNA**

Um dia após o isolamento, os oócitos foram injetados com 25 nL de cRNA que codifica as proteínas de interesse (numa concentração de 1000 ng/ $\mu$ L) ou injetados com 25 nL de H<sub>2</sub>O. Esses oócitos injetados com H<sub>2</sub>O foram os oócitos controle para análise da expressão funcional endógena (KABUTOMORI et al., 2018).

As injeções de cRNA foram realizadas utilizando uma micropipeta de vidro produzida no equipamento “Model P-97 Flaming Micropipette” (Sutter Instrument Company, Novato, CA, EUA). Antes da injeção, as pontas das micropipetas estiradas foram cortadas em um diâmetro de 2  $\mu$ m e preenchidas com óleo mineral (Nº Cat. M5904, Sigma-Aldrich) (MUSA-AZIZ; BORON, PARKER, 2010; KABUTOMORI et al., 2018). As micropipetas de injeção foram então posicionadas no microinjetador “Nanoliter 2000 volume microinjector” (World Precision Instruments, WPI, Sarasota, FL, USA). Após a injeção de cRNA ou H<sub>2</sub>O, os oócitos foram mantidos em meio OR3 a 20°C, por quatro dias até a realização dos experimentos para análise da expressão e função dos UTs.

### **3.10. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR BIOTINILAÇÃO E “WESTERN BLOT”**

#### **3.10.1 BIOTINILAÇÃO**

A análise dos níveis de expressão das proteínas de interesse na membrana dos oócitos foi avaliada utilizando o método de biotinilação com o kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation (Nº Cat. 21425, Thermo Fisher Scientific) de acordo com a recomendação do fabricante.

Para o experimento de biotinilação, grupos com 20 oócitos cada foram incubados em PBS (Nº Cat. 1890535, Thermo Fisher Scientific) com 0,24 mg/mL Biotina (Nº Cat. 21425, Thermo Fisher Scientific) — vitamina hidrossolúvel, que se liga a resíduos de lisina presentes nas proteínas de membrana (voltada para o extracelular) — por 1 hora à 4°C, sob agitação. A reação de biotinilação das proteínas de membrana foi interrompida pela adição de 250  $\mu$ L da solução “quenching” do kit de biotinilação. Após a incubação com biotina, os oócitos foram colocados em uma solução de lise (10  $\mu$ L/oócito) contendo TBS (Nº Cat. 28376, Thermo Fisher Scientific), 1% Triton X-100 (Nº Cat. T8787-100ML, Sigma-Aldrich) e inibidor de protease livre de EDTA (Nº Cat. 04693124001, Roche, Indianápolis, IN) e lisados por uma seringa acoplada a uma agulha de 25G. O lisado obtido foi centrifugado a 3000 x g a 4°C por

10 min e apenas o sobrenadante foi transferido para um novo tubo 1,5 mL. Desse sobrenadante, foi reservada uma pequena alíquota que constituiu a fração de amostras de proteínas total, enquanto o restante foi incubado em uma coluna de separação (“Spin X column”, do kit de biotinylation) com a proteína Avidina (10 µL/oócito) (NeutrAvidin gel, Nº Cat. 1859388, Thermo Fisher Scientific) em constante agitação à temperatura ambiente por 1 h. A avidina, que está aderida à coluna de separação, interage com a biotina em uma forte ligação não-covalente (SANO et al., 1998). Essa interação permite que as proteínas biotiniladas ligadas à avidina fiquem “presas” na coluna de separação (DAINIAK et al., 2007)

Após a incubação com a avidina, as amostras foram lavadas três vezes por centrifugação (3,000 x g em temperatura ambiente por 1 min) com a solução de lise para eliminar as proteínas que não se ligaram à avidina e, com isso, na coluna de separação permaneceram apenas as proteínas de superfície biotiniladas ligadas à avidina. Na sequência, as amostras foram eluídas por centrifugação (3,000 x g em temperatura ambiente por 1 min) com uma solução contendo 1x “sample buffer” de Tris-Glicina SDS (Novex, Nº Cat. LC2676, Thermo Fisher Scientific) e 0,5 M de DTT (Dithiothreitol, Nº Cat. 20291, Thermo Fisher Scientific). O DTT quebra a ligação entre a avidina e a biotina, permitindo a eluição das proteínas biotiniladas (DESARNAUD et al., 1992).

Depois desse processo de biotinylation, as amostras de proteínas de superfície biotiniladas dos oócitos de cada grupo foram analisadas por experimentos de “western blot” (KABUTOMORI et al. 2018; KABUTOMORI; PINA-LOPES; MUSA-AZIZ, 2020).

### **3.10.2. “WESTERN BLOT”**

Amostras das proteínas biotiniladas dos oócitos injetados com cRNA para expressão da proteína WT ou mutante ou injetados com H<sub>2</sub>O controle foram separadas por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel Electrophoresis), em gel de poliácridamida 12% de acordo com o seu peso molecular por 2h30 min a 150 V. Posteriormente, as amostras foram transferidas para uma membrana de filtração PVDF (difluoreto de polivinilideno) por 1h30 min à 0,17 A. Após a transferência, a membrana foi bloqueada utilizando uma solução tampão TBST (25 mM Tris, 0,15M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7,4) com 5% de leite Mólico 0% de gordura (Mólico, Nestle, Vevey, Suíça) (TBST-B) em temperatura ambiente por 2 h. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário monoclonal específico

anti-c-Myc<sup>4</sup> (Nº Cat. R95025, Thermo Fisher Scientific) em TBST-B, em uma proporção de 1:1000, por 14h à 4°C. Na sequência, a membrana foi lavada com TBST 10 vezes, 2 min cada, e posteriormente incubada com anticorpo monoclonal secundário de cabra anti-camundongo (Nº Cat. 041806, KPL, Gaithersburg, MD) em uma proporção de 1:2000 em temperatura ambiente por 1h. Após, a membrana foi novamente lavada com TBST e preparada para a revelação das bandas. As bandas de proteínas transferidas para a membrana de PVDF foram visualizadas utilizando o kit Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Nº Cat. 32132, Thermo Fisher Scientific) por 5 min e revelada no equipamento de quimioluminescência Amersham Imager 600 (Nº Cat. 29013461, GE Healthcare, Chicago, IL) (KABUTOMORI et al., 2018).

### **3.11. MEDIDAS DA CAPTAÇÃO DE UREIA**

O transporte de ureia através dos oócitos foi medido a partir do monitoramento de captação de <sup>14</sup>C-ureia como descrito por Yang e Verkman (1998) e Geyer e colaboradores (2013a). Brevemente, grupos de 5 oócitos injetados com cRNA para expressão de mUT-A2, mUT-A3 ou mUT-B ou, injetados com H<sub>2</sub>O controle, foram incubados por 10 min em 200 µL de “ND96” contendo 5 µCi de <sup>14</sup>C-ureia e 1 mM de ureia não marcada. Para os experimentos de inibição, os oócitos WT ou controle foram pré-incubados com 0,5 mM de Floretina por 20 min e lavados 3 vezes em “ND96” antes de serem expostos ao radioisótopo. Depois da exposição ao radioisótopo, os oócitos foram lavados em “ND96” contendo 1 mM de ureia não marcada. Cada oócito de cada grupo (UTs-WT, H<sub>2</sub>O controle ou UTs mutante) foi lisado em 100 µL de uma solução com 5% SDS utilizando uma pipeta com ponteira P200. Sequencialmente, o lisado foi transferido para um frasco contendo 5 mL de fluido de cintilação para quantificar a radioatividade do radioisótopo <sup>14</sup>C por um contador de cintilação (Microbeta Trilux 1450 LSCS Luminescence Counter, DerkinElmer Presisely) que mede a quantidade de energia emitida pelos raios beta do isótopo (YANG;VERKMAN, 1998;

---

<sup>4</sup> O laboratório fez a adição de um epítipo pequeno — EQKLISEEDL (c-Myc tag) na terminação C das proteínas — contra o qual existe um anticorpo monoclonal de camundongo (anti-c-Myc) que é altamente específico, uma vez que os anticorpos policlonais disponíveis para UTs se mostraram inespecíficos.

GEYER et al., 2013a, KABUTOMORI; PINA-LOPES; MUSA-AZIZ, 2020).

### 3.12. MEDIDAS DE PERMEABILIDADE OSMÓTICA À ÁGUA

O cálculo da  $P_f$  é particularmente útil para caracterizar e/ou demonstrar a função de proteínas de membrana que conferem aos oócitos uma elevada permeabilidade à água (PRESTON et al., 1993; VIRKKI et al., 2002; MUSA-AZIZ et al., 2009a; KABUTOMORI et al., 2018). Brevemente, grupos contendo 5-6 oócitos injetados com cRNA para a expressão de UTs WT ou mutantes ou oócitos controle injetados com H<sub>2</sub>O foram colocados em uma placa de petri contendo solução “ND96” hipotônica (70 mOsm/L H<sub>2</sub>O), e imagens de vídeo foram coletadas a cada 1s durante 100 segundos para a obtenção da variação da área de projeção de cada oócito ao longo do tempo.

Para o cálculo da  $P_f$  assume-se o oócito como sendo uma esfera com uma área total (S) 8-vezes maior do que a área da esfera projetada (PRESTON et al., 1993, ROMERO et al., 1997), utilizando a seguinte equação:

$$P_f = \frac{V_0 \times d(V/V_0)}{dt \times S \times \Delta Osm \times V_w} = \text{cm/s.}$$

Onde  $V_0$  é o volume inicial do oócito,  $d(V/V_0)/dt$  é a taxa máxima do aumento fracional de volume ao longo do tempo [influxo máximo de H<sub>2</sub>O ( $J_{V,max}$ , in cm<sup>3</sup>/s),  $\Delta Osm$  é o gradiente osmótico através da membrana (195 - 70 = 125 mOsm, expresso como mol/cm<sup>3</sup>) e  $V_w$  é o volume molar da água (18,1 cm<sup>3</sup>/mol).

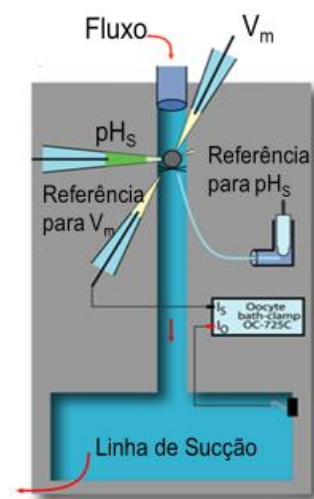
Para a inibição das medidas de  $P_f$  por floretina, oócitos de cada grupo (UTs WT ou H<sub>2</sub>O controle) foram colocados isoladamente em placa de 24 poços contendo “ND96” e numerados para as primeiras medidas de  $P_f$ , antes do inibidor. Após essas medidas, os oócitos de cada grupo foram pré- temperatura ambiente por 20 min (YANG; VERKMAN, 1998; GEYER et al., 2013a). Após o tempo de incubação, cada oócito foi lavado 3 vezes em “ND96” e colocado em uma nova placa com “ND96” igualmente numerada e foram realizadas as segundas medidas de  $P_f$ , depois do inibidor.

### 3.13 MONITORAMENTO DO pH DE SUPERFÍCIE COM MICROELETRODOS

Um oócito, visualizado através de um estereomicroscópio (com aumento de 32 x), foi mantido por um fio de nylon em uma câmara de plástico (com um canal de 3 mm de largura × 30 mm de comprimento), através da qual a solução flui continuamente a 4 mL/min por meio de tubos Tygon® 11 conectados em seringas de plástico de 120 mL acopladas a bombas de infusão (Nº Cat. 2222, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) (**Figura 10**). As soluções eram trocadas manualmente através de uma sequência de válvulas de 4 vias operadas pneumaticamente<sup>5</sup>, acopladas a um cilindro de nitrogênio.

Inicialmente, o oócito foi empalado com um microeletrodo preenchido com 3M KCl para monitorar o  $V_m$  do oócito em relação ao banho, o qual foi clampeado a 0 mV usando um 725I Oocyte Bath Clamp (Warner Instruments, Hamden, CT) (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010).

**FIG 10.** Representação da câmara e posicionamento dos eletrodos para a medida do pH<sub>S</sub> do oócito.



Modificado de Musa-Aziz et al  
*Methods*, 2010.

Em seguida, um eletrodo de pH<sub>S</sub> com ponta romba de ~20 μm, preenchido com uma resina de troca iônica sensível a H<sup>+</sup> (Hydrogen Ionophore I-Cocktail B, Sigma-Aldrich) foi posicionado distante da superfície do oócito. As voltagens foram medidas através de um eletrômetro de alta impedância (FD223, World Precision Instruments WPI). A referência externa para o eletrodo de pH<sub>S</sub> era um eletrodo de calomelano<sup>6</sup> (Nº Cat. Ohaus Stref2, Pipette, San Diego, CA, EUA) que oferece um potencial constante, próximo de zero, conectado a entrada de um eletrômetro de baixa impedância (modelo 750, WPI). O pH<sub>S</sub> (voltagem) foi obtido a partir da subtração do sinal do eletrodo calomelano (voltagem) do sinal do eletrodo de pH<sub>S</sub> (voltagem). Os dados adquiridos foram convertidos em valor de pH<sub>S</sub> pelo conversor de

<sup>5</sup> Da colaboração com o laboratório do professor Walter F. Boron, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA.

<sup>6</sup> O eletrodo de calomelano consiste em mercúrio, coberto por uma pasta de Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, imerso em um eletrólito saturado com KCl (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – KCl saturado).

sinal Labjack U6 (Lakewood, CO, EUA) e enviados para um computador PC onde foram analisados e calculados pelo software “Frog whisperer”.<sup>7</sup> Para a calibração do eletrodo de pHs, realizada antes de cada experimento, eram utilizadas três soluções de pH conhecido (6,0, 7,5 e 8,0) e mantidas a temperatura ambiente. O eletrodo era então calibrado, observando-se a variação de voltagem em relação a variação de pH (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010).

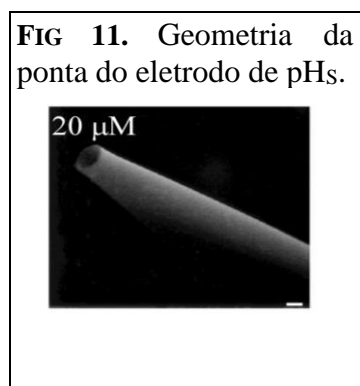
### 3.13.1 FABRICAÇÃO DOS MICROELETRODOS PARA MEDIDAS DO $V_M$ E PHs

#### 3.13.1.1 MICROELETRODO QUE MEDE O $V_M$

Foi confeccionado a partir de capilares de borosilicato com parede fina (No. Cat. G200TF-4, 2,0 mm OD  $\times$  1,56 mm ID, Warner Instruments, Hamden, CT), estirados horizontalmente (estirador Modelo P-97, Sutter Instrument Co) e preenchido com 3M KCl (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010).

#### 3.13.1.2 MICROELETRODO QUE MEDE AS VARIAÇÕES DO PHs (Figura 11)

Foi confeccionado a partir de capilares de borosilicato com parede “standard” (Nº Cat. G200F-4, 2,0 mm OD  $\times$  1.16 mm ID, Warner Instruments), estirado horizontalmente (estirador P-97, Sutter). Para romper e polir as pontas (de  $\sim 20 \mu\text{m}$ ) dos microeletrodos foi usada uma microforja, do mesmo modo como é feito uma pipeta de "giant-patch". Os eletrodos foram, então, colocados em um forno com a ponta para cima em um rack de metal aberto (com orifícios cilíndricos que permitem o acesso, por baixo, ao interior do capilar de vidro) sobre uma placa de petri “Pyrex” à 200 °C por 12 h para remoção de umidade (**Figura 12**). Depois dessa secagem, os eletrodos sofrem previamente um processo de silanização (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010) antes de ser colocado a resina de  $\text{H}^+$ , devido a sua natureza apolar.

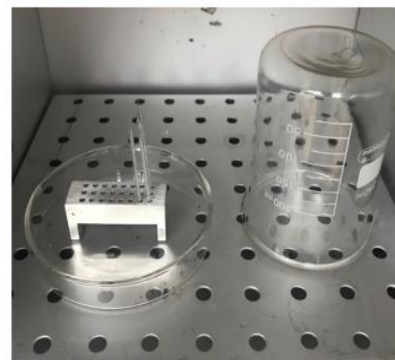


<sup>7</sup> O software foi desenvolvido pelo engenheiro de softwares Dale Huffman do laboratório do Professor Walter F. Boron.



- **SILANIZAÇÃO DO ELETRODO.** Para esse processo, um frasco de vidro invertido foi, então, colocado sobre a placa de Petri para criar um ambiente fechado em torno dos eletrodos no “rack”. Esse frasco de vidro foi rapidamente levantado para permitir a injeção de 80  $\mu\text{L}$  de silano (N<sup>o</sup> Cat 14755, Sigma-Aldrich) na placa de Petri, abaixo do rack. O frasco de vidro foi reposicionado para que toda a superfície interna dos capilares de vidro sejam expostos ao vapor do silano, por um período médio de 40 min e, após esse

**FIG 12.** Rack com eletrodos para silanização.



período, o frasco de vidro foi retirado. O revestimento de silano forneceu uma superfície hidrofóbica — dada pela reação dos grupos hidroxila do vidro com o átomo de silício do composto orgânico silano [N<sup>o</sup> Cat. 14755, bis (dimethylamino) dimetilsilano, Sigma-Aldrich] — que permite que a resina de troca-iônica, sensível ao íon  $\text{H}^+$ , fique aderida na ponta do microeletrodo. Os microeletrodos assim preparados ficaram armazenados no forno até serem preenchidos com a resina de  $\text{H}^+$  num dissecador, evitando o contato com a umidade do ar (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010).

- **COLOCAÇÃO DA RESINA DE  $\text{H}^+$ .** A colocação da resina de troca iônica na ponta do microeletrodo de pHs era feita através de um capilar de vidro, estirado manualmente em um maçarico, e introduzido no microeletrodo de pHs silanizado, pela sua extremidade. Pelo mesmo processo, uma solução tampão contendo (em mM) 40  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 15  $\text{NaCl}$  titulada a um pH 7,0 com  $\text{NaOH}$  foi colocada no microeletrodo após o preenchimento da ponta com a resina (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010).

Essa micropipeta foi conectada, via hemi-célula de calomelano, a um eletrômetro modelo 750 (World Precision Instruments) (MUSA-AZIZ et al, 2009b; MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010; GEYER et al., 2013a).

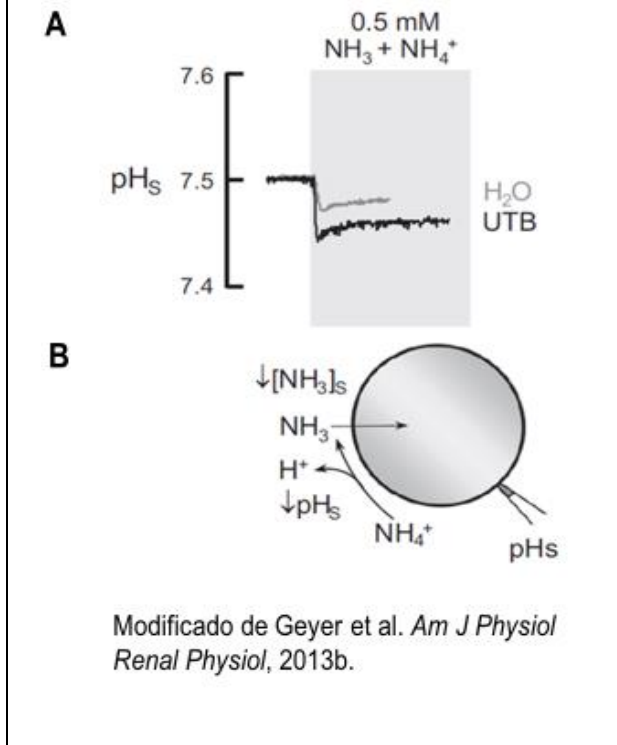
### 3.13.2. MEDIDAS DAS VARIAÇÕES DO pH DE SUPERFÍCIE

Na câmara, um oócito foi exposto à solução “ND96” para a medida do  $V_m$  e do  $pH_s$  na situação estacionária. O eletrodo de  $pH_s$  foi, então, posicionado sobre a superfície do oócito (na região equatorial da célula) por meio de um micromanipulador controlado por um microprocessador (modelo MPC-200 system, Sutter Instrument Company), de tal forma, que causou uma depressão de  $\sim 40 \mu m$  nessa superfície. Com o eletrodo nessa posição, a solução contínua de “ND96” foi trocada pela solução de  $0,5 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$  para as medidas das variações do  $pH_s$  devido ao influxo de  $\text{NH}_3$  [ $\Delta p\text{H}_{s(\text{NH}_3)}$ ] (MUSA-AZIZ et al. 2009b, a; GEYER et al. 2013 a, b, c).

Durante os experimentos, o eletrodo de superfície foi levado para uma distância de  $\sim 300\text{--}400 \mu m$  da superfície do oócito para ser recalibrado no pH da solução extracelular (7,50).

O influxo de  $\text{NH}_3$  na célula causa uma queda transiente no  $pH_s$  com posterior recuperação para um valor que segue em direção ao valor basal inicial. A queda do  $pH_s$  ocorre porque a entrada de  $\text{NH}_3$  para a célula leva à queda da concentração de  $\text{NH}_3$  no lado extracelular da membrana (**Figuras 13A e B**). Por sua vez, o déficit de  $\text{NH}_3$  na superfície externa da membrana é repostado pela  $\text{NH}_3$  que vem diretamente da solução que banha a célula (solução do ‘seio’ extracelular), e da  $\text{NH}_3$  que se forma devido à ocorrência da seguinte reação na superfície celular:  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+$ . O novo  $\text{H}^+$  que se origina desta reação causa uma mudança de  $pH_s$  que é detectada pelo microeletrodo de pH presente na superfície celular (como mostrado na figura 11). Dessa forma, a magnitude da queda  $\Delta p\text{H}_{s(\text{NH}_3)}$  calculada representa um índice da permeabilidade da membrana a  $\text{NH}_3$ .

**FIG 13.** Variações causadas no  $pH_s$  quando ocorre influxo de  $\text{NH}_3$  no oócito.



Para a inibição das medidas de  $\Delta\text{pH}_{\text{S(NH}_3\text{)}}$  por floretina, os oócitos de cada grupo (UTs WT ou H<sub>2</sub>O controle) foram colocados isoladamente em placa de 24 poços contendo “ND96” e numerados para as primeiras medidas de  $\Delta\text{pH}_{\text{S(NH}_3\text{)}}$ , antes do inibidor. Após essas medidas, os oócitos de cada grupo foram pré-incubados isoladamente com Floretina 0,5 mM em temperatura ambiente por 20 min (YANG; VERKMAN, 1998; GEYER et al., 2013a). Após o tempo de incubação, cada oócito foi lavado 3 vezes em “ND96” e colocado em uma nova placa com “ND96” igualmente numerada e foram realizadas as segundas medidas de  $\Delta\text{pH}_{\text{S(NH}_3\text{)}}$ , depois do inibidor.

### **3.14 ESTATÍSTICA**

Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão. O (n) se refere ao número de medidas. A diferença entre 2 valores médios foram comparadas utilizando o teste t com correção de Bonferroni com um nível de significância ajustado para  $p < 0,0125$ . Quando comparado mais de 2 grupos, foi feito One-Way ANOVA seguido do teste Student-Newman-Keuls (SNK), utilizando o software KaildaGraph (versão 4; Synergy Software, Reading, EUA). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. SEQUENCIAMENTO DOS cDNAs DOS MUTs WT**

Antes de iniciar os experimentos foi necessário confirmar a integridade e a identidade dos cDNAs que codificam as proteínas mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B WT (todos com o epítipo c-Myc). Para isso, foi realizado o sequenciamento dos cDNAs. As sequências obtidas foram traduzidas em sequências de aminoácidos utilizando a plataforma ExPASy Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>) e comparadas com as sequências padrão para UT-A2, UT-A3 e UT-B da espécie *Mus musculus*, encontrada na plataforma “The National Center for Biotechnology Information” no endereço online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>. Os alinhamentos dos mUTs WT estão evidenciados nas **Figuras 14**.

**Figura 14.** Alinhamento da sequência de aminoácidos padronizada para **A)** mUT-A2 de *Mus musculus* com a sequência de mUT-A2<sup>WT</sup>-Myc, **B)** mUT-A3 de *Mus musculus* com a sequência de mUT-A3<sup>WT</sup>-Myc e **C)** mUT-B de *Mus musculus* com a sequência de mUT-B<sup>WT</sup>-Myc.

**UT-A2**

**A)**

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| UT-A2       | MEESTEIKVEANTARTSWIQSSMVAGGKRVSALSITGEMKECGEGLKDKSPVFQFLDW   | 60  |
| mUT-A2_cMyc | MEESTEIKVEANTARTSWIQSSMVAGGKRVSALSITGEMKECGEGLKDKSPVFQFLDW   | 60  |
| UT-A2       | VLRGMSQVMFVNNPLSGILIVLGLFVQNPWWAISGCLGTVMSTLTALILSQDKSAIAAGL | 120 |
| mUT-A2_cMyc | VLRGMSQVMFVNNPLSGILIVLGLFVQNPWWAISGCLGTVMSTLTALILSQDKSAIAAGL | 120 |
| UT-A2       | HGYNGVLVGLLMAVFSKGNYYWLLLPVIVMSMTCPIISSALSTVFSKWDLPVFTLPFN   | 180 |
| mUT-A2_cMyc | HGYNGVLVGLLMAVFSKGNYYWLLLPVIVMSMTCPIISSALSTVFSKWDLPVFTLPFN   | 180 |
| UT-A2       | IAVTLYLAATGHHNLFPPFTLLQPATTPNITWSDIQVSLLRRAIPVGIQGVYCDNPWT   | 240 |
| mUT-A2_cMyc | IAVTLYLAATGHHNLFPPFTLLQPATTPNITWSDIQVSLLRRAIPVGIQGVYCDNPWT   | 240 |
| UT-A2       | GGIFLVALFISSPLICLHAAIGSTIGMLAALSIAFPFDSIYFGLCGFNSTLACIAIGGMF | 300 |
| mUT-A2_cMyc | GGIFLVALFISSPLICLHAAIGSTIGMLAALSIAFPFDSIYFGLCGFNSTLACIAIGGMF | 300 |
| UT-A2       | YVITWQTHLLAIACALFAAYLGAALANMLSVFGLPPTWPFCLSALTFLLLTSNNPAIYK  | 360 |
| mUT-A2_cMyc | YVITWQTHLLAIACALFAAYLGAALANMLSVFGLPPTWPFCLSALTFLLLTSNNPAIYK  | 360 |
| UT-A2       | LPLSRVTYPEANRIYFLSQEKNRRASTITRYQAYDVS-----                   | 397 |
| mUT-A2_cMyc | LPLSKVTYPEANRIYFLSQEKNRRASTITRYQAYDVEQKLISEEDL               | 407 |

**UT-A3**

**B)**

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| UT-A3       | MSDHHPLKEMSDSNSSPLLPEPLSSRYKLYESELSSPTWSSSQDTHPALPLEMPEEKD    | 60  |
| mUT-A3_cmyc | MSDHHPLKEMSDSNSSPLLPEPLSSRYKLYESELSSPTWSSSQDTHPALPLEMPEEKD    | 60  |
| UT-A3       | LRSSDEDSHIVKIEKPNERNKRRESEVSRASAGRGGFSLFQAVSYLTGDMKECKNWLKD   | 120 |
| mUT-A3_cmyc | LRSSDEDSHIVKIEKPNERNKRRESEVSRASAGRGGFSLFQAVSYLTGDMKECKNWLKD   | 120 |
| UT-A3       | KPLVLQFLDQVLRGAAQVMFVNNPISGLIIFIGLLIQNPWWTIAGTLGTVASTLAALALS  | 180 |
| mUT-A3_cmyc | KPLVLQFLDQVLRGAAQVMFVNNPISGLIIFIGLLIQNPWWTIAGTLGTVASTLAALALS  | 180 |
| UT-A3       | QDRSALASGLHGYNGMLVGLLMAVFEKLDYWWLLFPVFTSMACPIISSALSTIFAKW     | 240 |
| mUT-A3_cmyc | QDRSALASGLHGYNGMLVGLLMAVFEKLDYWWLLFPVFTSMACPIISSALSTIFAKW     | 240 |
| UT-A3       | DLPVETLPFNIALTLYLAATGHYNLFPPFTLLIKPASAAPNITWTEIEMPLLQTIPIVGVG | 300 |
| mUT-A3_cmyc | DLPVETLPFNIALTLYLAATGHYNLFPPFTLLIKPASAAPNITWTEIEMPLLQTIPIVGVG | 300 |
| UT-A3       | QVYCDNPWTGGMILVALFISSPLICLHAAIGSIVGLLAALTVATPFETIYGLWSYNCV    | 360 |
| mUT-A3_cmyc | QVYCDNPWTGGMILVALFISSPLICLHAAIGSIVGLLAALTVATPFETIYGLWSYNCV    | 360 |
| UT-A3       | LSCIAIGGMFYALTWQTHLLALVCAFCAYMGAALSNTMAVVGVPSTWAFCLSTLTFLL    | 420 |
| mUT-A3_cmyc | LSCIAIGGMFYALTWQTHLLALVCAFCAYMGAALSNTMAVVGVPSTWAFCLSTLTFLL    | 420 |
| UT-A3       | LTSNNTGIYKLPKLVTYPEANRIYFLTVRSEEEKSPNGD-----                  | 461 |
| mUT-A3_cmyc | LTSNNTGIYKLPKLVTYPEANRIYFLTVRSEEEKSPKGDQKLISEEDL              | 471 |

**UT-B**

**C)**

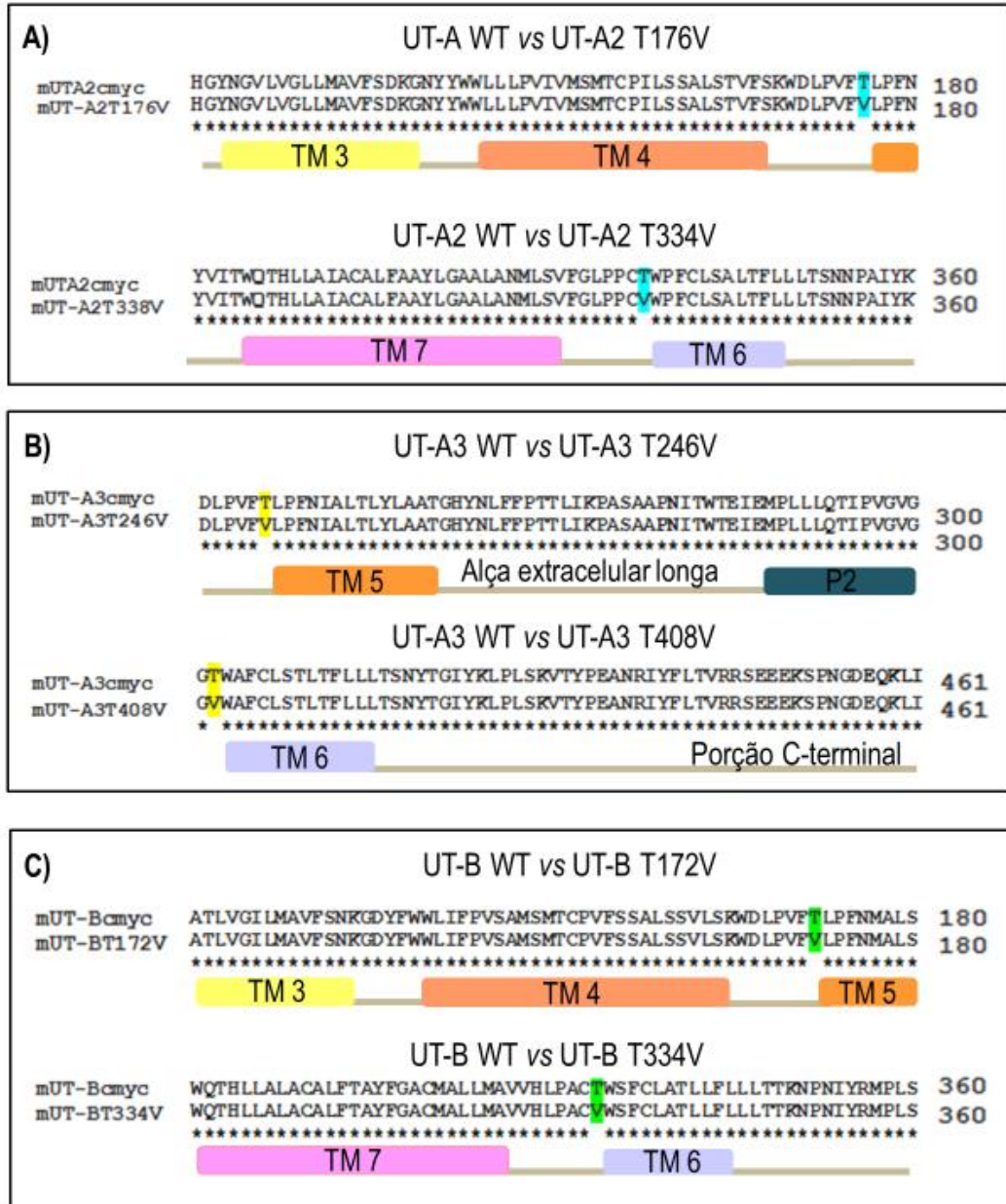
|            |   |     |
|------------|---|-----|
| UT-B       | MEDSPTMAKVDNRGENQILSCRGRRCGFKVLGYVTGDMKEFANWLKDKPVVLQFMDWILRG | 60  |
| mUT-B_cmyc | MEDSPTMAKVDNRGENQILSCRGRRCGFKVLGYVTGDMKEFANWLKDKPVVLQFMDWILRG | 60  |
| UT-B       | ISQVVFVSNPISGILIVLGLLVQNPWWALCGCVGTVVSTLTALLSQDRSAIAAGLQGYN   | 120 |
| mUT-B_cmyc | ISQVVFVSNPISGILIVLGLLVQNPWWALCGCVGTVVSTLTALLSQDRSAIAAGLQGYN   | 120 |
| UT-B       | ATLVGILMAVFSNKGDFWLLIFPVSAVMSMTCPVFSSALSSVLSKWDLPVFTLPFNMAIS  | 180 |
| mUT-B_cmyc | ATLVGILMAVFSNKGDFWLLIFPVSAVMSMTCPVFSSALSSVLSKWDLPVFTLPFNMAIS  | 180 |
| UT-B       | MYLSATGHYNTFFPSKLFVSSVPNITWSELSALELLKSLFVGVGQIYCDNPWTGGIF     | 240 |
| mUT-B_cmyc | MYLSATGHYNTFFPSKLFVSSVPNITWSELSALELLKSLFVGVGQIYCDNPWTGGIF     | 240 |
| UT-B       | LCAILLSSPMLCLHAAIGSLLGVIAGLSLAAPPEDIYFGLWGFNSLACIAIGGMFMAIT   | 300 |
| mUT-B_cmyc | LCAILLSSPMLCLHAAIGSLLGVIAGLSLAAPPEDIYFGLWGFNSLACIAIGGMFMAIT   | 300 |
| UT-B       | WQTHLLALCALFTAYFGACMAHLMVHLPACTWVFCLATLFLLLTTKPNPIYRMPIS      | 360 |
| mUT-B_cmyc | WQTHLLALCALFTAYFGACMAHLMVHLPACTWVFCLATLFLLLTTKPNPIYRMPIS      | 360 |
| UT-B       | KVITYSEENRIFYLQNKRMVESPL-----                                 | 384 |
| mUT-B_cmyc | KVITYSEENRIFYLQNKRMVESPLEQKLISEEDL                            | 394 |

A **Figura 14** demonstrou que as sequências dos nossos cDNAs mUT-A2 (**A**), UT-A3 (**B**) e UT-B (**C**) não apresentam diferenças significantes quando comparados com as sequências padrão de UT-A2, UT-A3 e UT-B encontradas na plataforma NCBI, o que confirma a integridade e a identidade dos cDNAs. Além disso, foi também possível confirmar a presença da sequência EQKLISEEDL, que corresponde ao epítipo c-Myc adicionado à região C-terminal (destacado em amarelo) do mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> e mUT-B<sup>WT</sup>, e os resíduos conservados de Thr presentes no filtro de seletividade de cada monômero de mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B.

#### 4.2. SEQUENCIAMENTO DOS MUTANTES

Para confirmar a substituição dos resíduos de Thr por Val na região S<sub>m</sub> do filtro de seletividade dos mUTs foi realizado o sequenciamento dos cDNAs obtidos no final dos experimentos de mutagênese. Desse sequenciamento de cDNA, foi obtido a sequência de aminoácidos dos mutantes T→V em mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B, que foi comparada à sequência de aminoácidos do respectivo mUT<sup>WT</sup> obtidas anteriormente. Foi feito o alinhamento comparando a sequência de aminoácido dos mUTs mutantes com a sequência de aminoácidos do cDNA template utilizadas no experimento de mutação.

**Figura 15.** Alinhamento de parte da sequência de aminoácidos de mUT WT *versus* respectivos mutantes. A substituição do resíduo de Thr pela Val está destacada em verde-água para (A) mUT-A2, em amarelo para (B) mUT-A3 e em verde para (C) mUT-B.



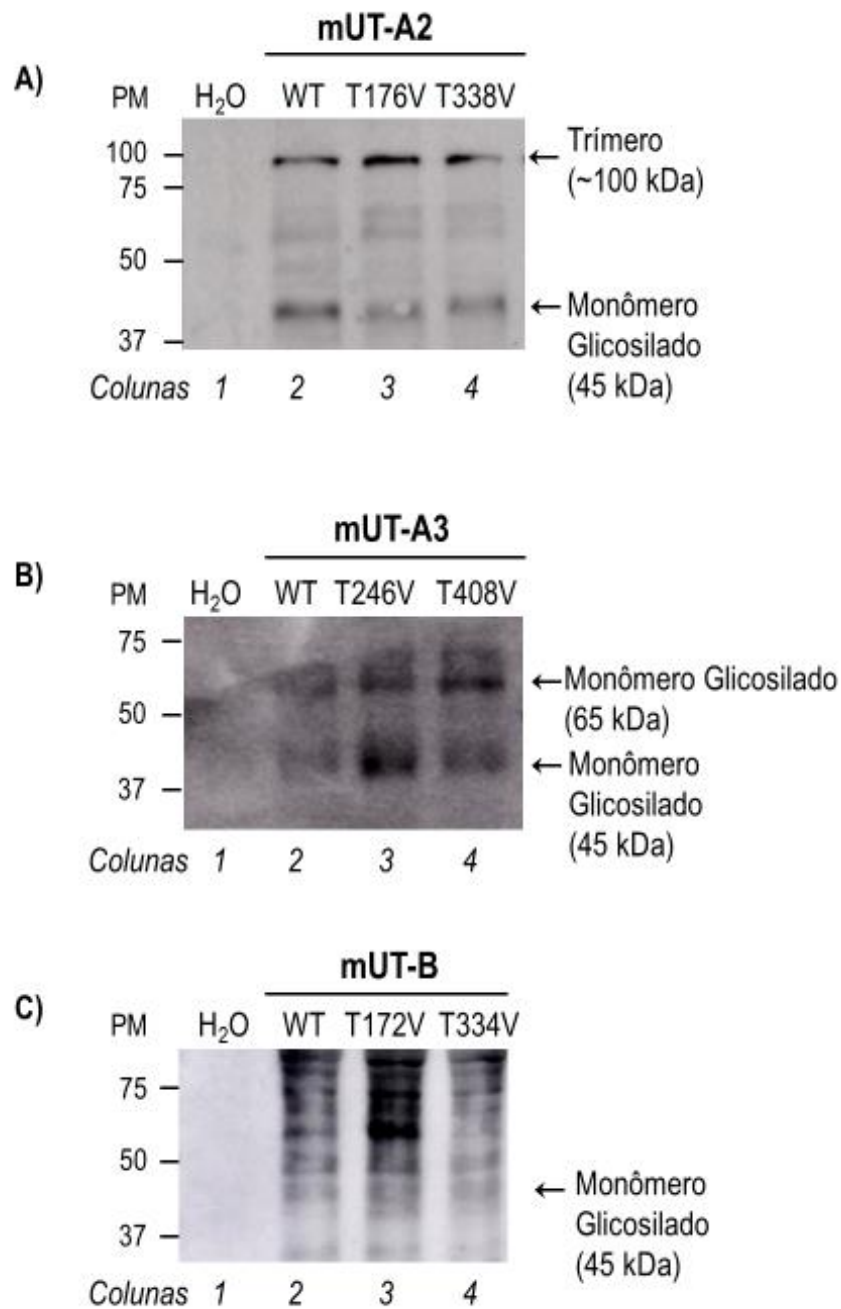
A **Figura 15** mostra que a mutação foi efetiva pela presença de resíduos de Val nas posições (A) 176 ou 338 do mUT-A2 (UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), (B) 246 ou 408 do mUT-A3 (UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e (C) 172 ou 334 do mUT-B (UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>).

*Após confirmar o sucesso das mutações pontuais nos resíduos de Thr, foram realizados experimentos para avaliar se, após a injeção de cRNA para expressão das proteínas UTs WT e mutantes, os oócitos de Lithobates são capazes de sintetizar e expressar as proteínas UTs na membrana e o efeito das mutações nessa expressão.*

#### **4. 3. EXPRESSÃO DOS MUTS WT NA MEMBRANA DOS OÓCITOS E EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESSA EXPRESSÃO**

**Figura 16.** Imagens de “western blot” para detecção de proteínas extraídas da membrana dos oócitos injetados com cRNA para expressão de UTs WT e mutantes dos resíduos de Thr, utilizando anticorpo monoclonal anti-Myc. As bandas representam as proteínas de membrana equivalente a 4 oócitos. Nos blots, a coluna à esquerda mostra o peso molecular (PM) e as colunas de 1 a 4 mostram bandas representativas de amostras de proteínas biotiniladas e isoladas, dos lisados de oócitos injetados com H<sub>2</sub>O controle (coluna 1), com cRNA para expressão de mUT WT (coluna 2) *ou* mutantes (colunas 3 e 4).





Na **Figura 16A** vemos os “blots” da coluna 2 mostrando bandas ao redor de 45 kDa e de 100 kDa, que correspondem, respectivamente, ao peso molecular das formas monomérica e trimérica da proteína UT-A2 para as amostras de mUTs<sup>WT</sup>. Essas bandas também estão presentes nos “blots” das colunas 3 e 4 correspondentes aos mutantes mUT-A2<sup>T176V</sup> e mUT-A2<sup>T338V</sup>, respectivamente. A **Figura 16 B**, na coluna 2, mostra a expressão de bandas ao redor de 45 e 65 kDa compatíveis com os monômeros de UT-A3 nas amostras de mUT-A3<sup>WT</sup>, sendo que estas bandas também aparecem nas colunas 3 para mUT-A3<sup>T246V</sup> e 4 para mUT-

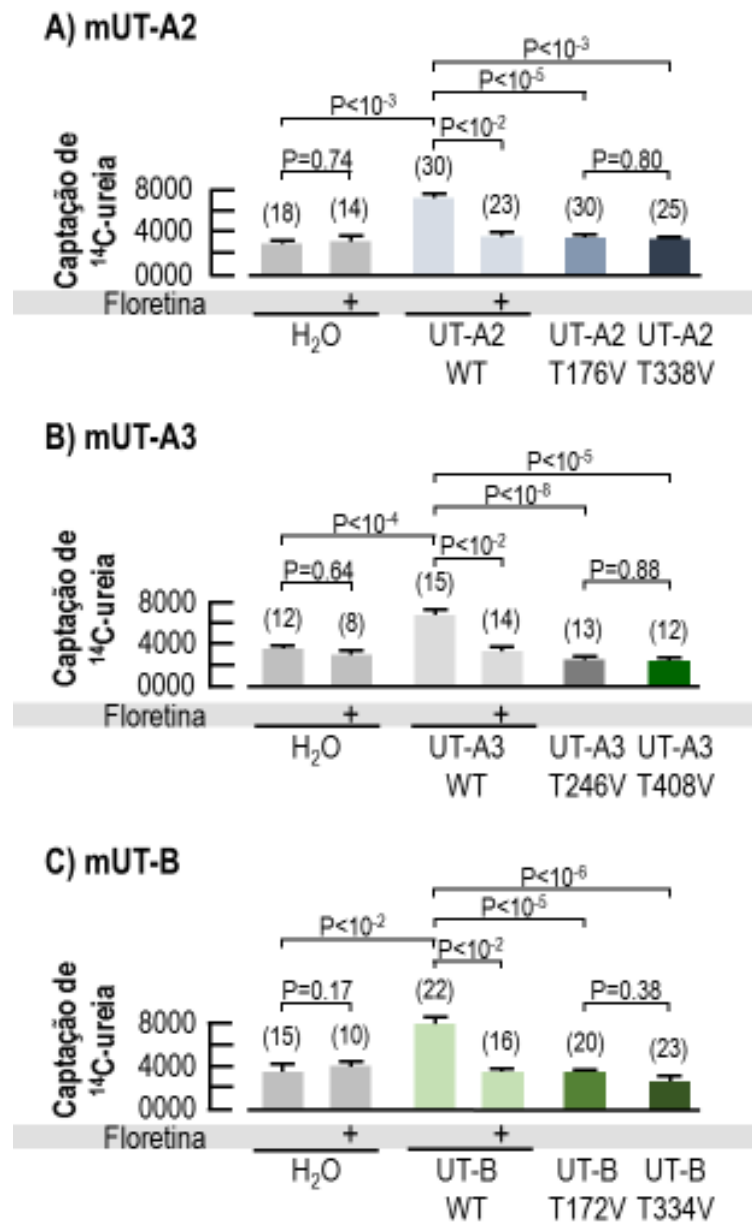
A3<sup>T408V</sup>. Da mesma forma, a **Figura 16C** exibe a detecção de uma banda de 45 kDa equivalente ao peso molecular do monômero de UT-B, nas amostras da coluna 2 para mUT-B<sup>WT</sup>, assim como nas amostras das colunas 3 para mUT-B<sup>T172V</sup> e 4 para mUT-B<sup>T334V</sup>. Em adição, as bandas descritas na coluna 2 das **Figuras 16 A** para mUT-A2<sup>WT</sup>, **B** para mUT-A3<sup>WT</sup> e **C** para mUT-B<sup>WT</sup> estão ausentes nos “blots” da coluna 1 para as amostras biotinilada de oócitos controle, injetados com H<sub>2</sub>O.

Portanto, os resultados da **Figura 16** demonstram que a mutação dos resíduos conservados de Thr para Val na proteína mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> não prejudicou a expressão da proteína na membrana plasmática dos oócitos, uma vez que as colunas correspondentes às proteínas mutantes no resultado de “western blot” apresentaram bandas semelhantes às bandas da proteína WT descritas na literatura (YOU et al., 1993; WADE et al., 2000; TRINH-TRANG-TAN et al., 2002; BAGNASCO et al., 2006; MACIVER et al., 2008; SU et al., 2012; QIAN et al., 2016).

*Dando continuidade, o próximo passo foi verificar se as proteínas UTs expressas em oócitos de Lithobates transportam ureia — função primária dessas proteínas — antes e após tratamento com o inibidor Floretina e a importância dos resíduos conservados de Thr na função de transporte de ureia dessas proteínas UTs.*

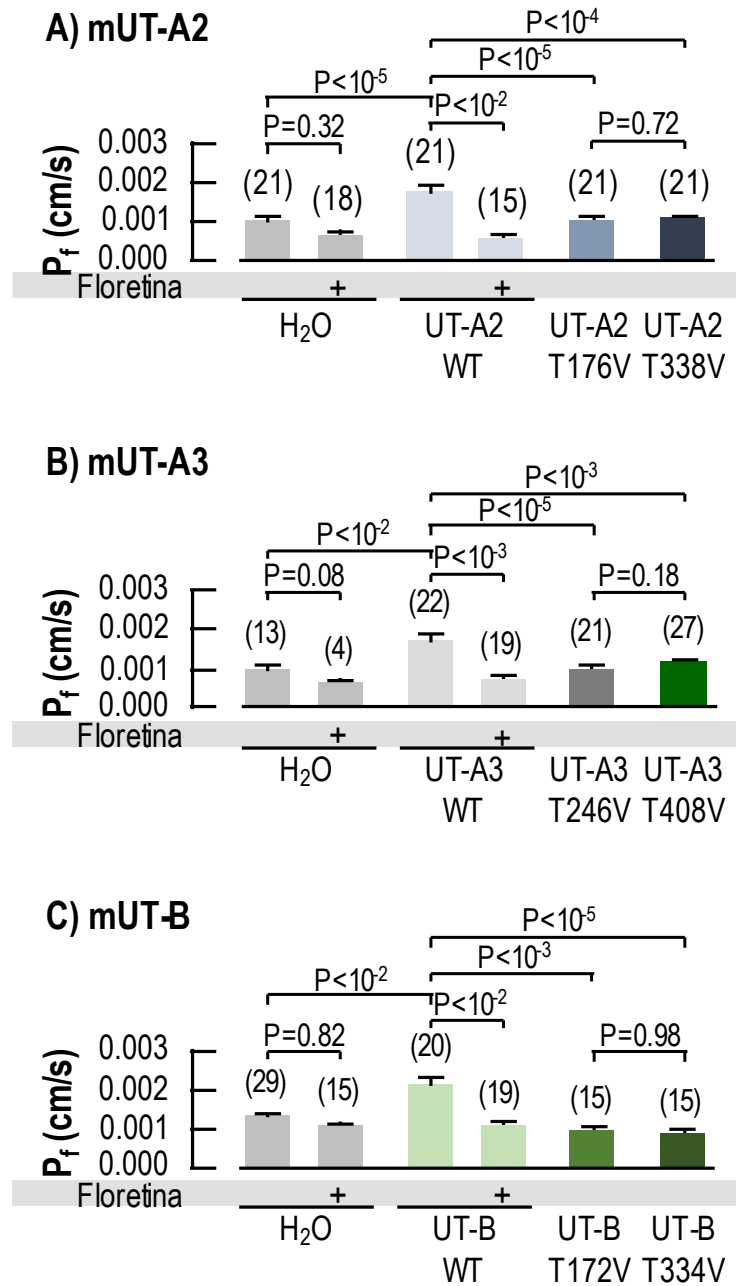
**4.4. EFEITO DA EXPRESSÃO DOS MUTS WT NO TRANSPORTE DE UREIA, ÁGUA E NH<sub>3</sub> ANTES E APÓS TRATAMENTO COM O INIBIDOR FLORETINA E O EFEITO DA MUTAÇÃO DOS RESÍDUOS DE THR NESSES TRANSPORTES**

**Figura 17.** Média dos resultados da captação de <sup>14</sup>C-ureia de oócitos que expressam mUTs WT ou mutantes *versus* oócitos controle.



Os resultados da **Figura 17** (lado esquerdo) mostram que a captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia dos oócitos injetados com cRNA para expressão de mUT-A2<sup>WT</sup> (**A**), mUT-A3<sup>WT</sup> (**B**) ou mUT-B<sup>WT</sup> (**C**) é significativamente maior que àquela dos seus respectivos oócitos controle (cinza), injetados com H<sub>2</sub>O, sendo que a incubação com Floretina (0.5 M por 20 min) reduziu significativamente esse transporte através dos oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup>, mas não alterou aquele dos oócitos controle. Os resultados da **Figura 17** também mostram que a comparação da captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia dos oócitos UT WT foi maior do que àquelas dos UTs mutantes [ (UT-A2<sup>WT</sup> vs UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), UT-A3<sup>WT</sup> vs UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e (UT-B<sup>WT</sup> vs UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>)] ou controle. Por sua vez, os resultados obtidos com os UTs após tratamento com Floretina são comparáveis aos resultados obtidos com os UTs mutantes.

**Figura 18.** Média dos resultados das medidas de  $P_f$  de oócitos que expressam mUTs WT ou mutantes *versus* oócitos controle.

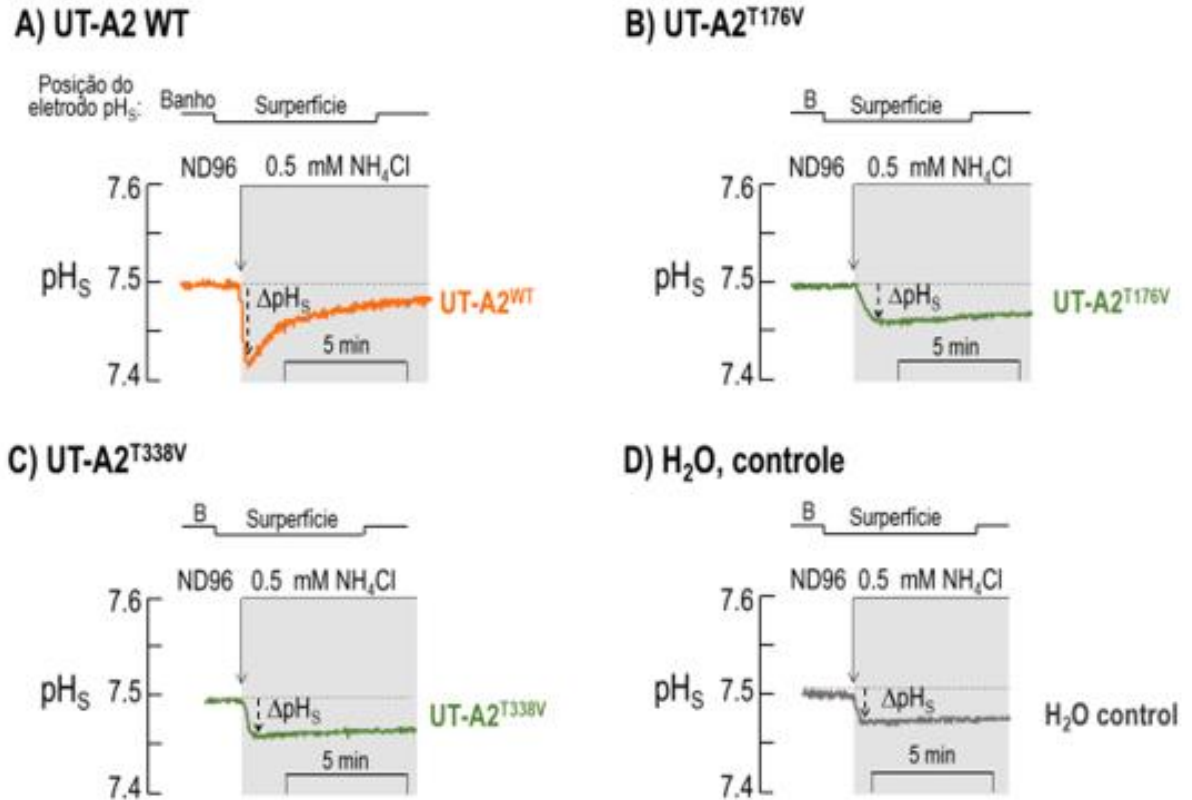


Os resultados da **Figura 18** (lado esquerdo) mostram que a média da  $P_f$  dos oócitos injetados com cRNA para expressão mUT-A2<sup>WT</sup> (**A**), mUT-A3<sup>WT</sup> (**B**) ou mUT-B<sup>WT</sup> (**C**) é significativamente maior que àquela dos oócitos controle e a incubação com Floretina (0.5 M

por 20 min) reduziu significativamente o transporte através dos oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup>, mas não alterou aquele dos oócitos controle. Essa **Figura 18** também mostra que a comparação da  $P_f$  dos oócitos UT WT *versus* mutantes em mUT-A2 (UT-A2<sup>WT</sup> *vs* UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), mUT-A3 (UT-A3<sup>WT</sup> *vs* UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e mUT-B (UT-B<sup>WT</sup> *vs* UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>) foi significativamente maior para os UTs WT do que àquelas dos UTs mutantes ou controle.

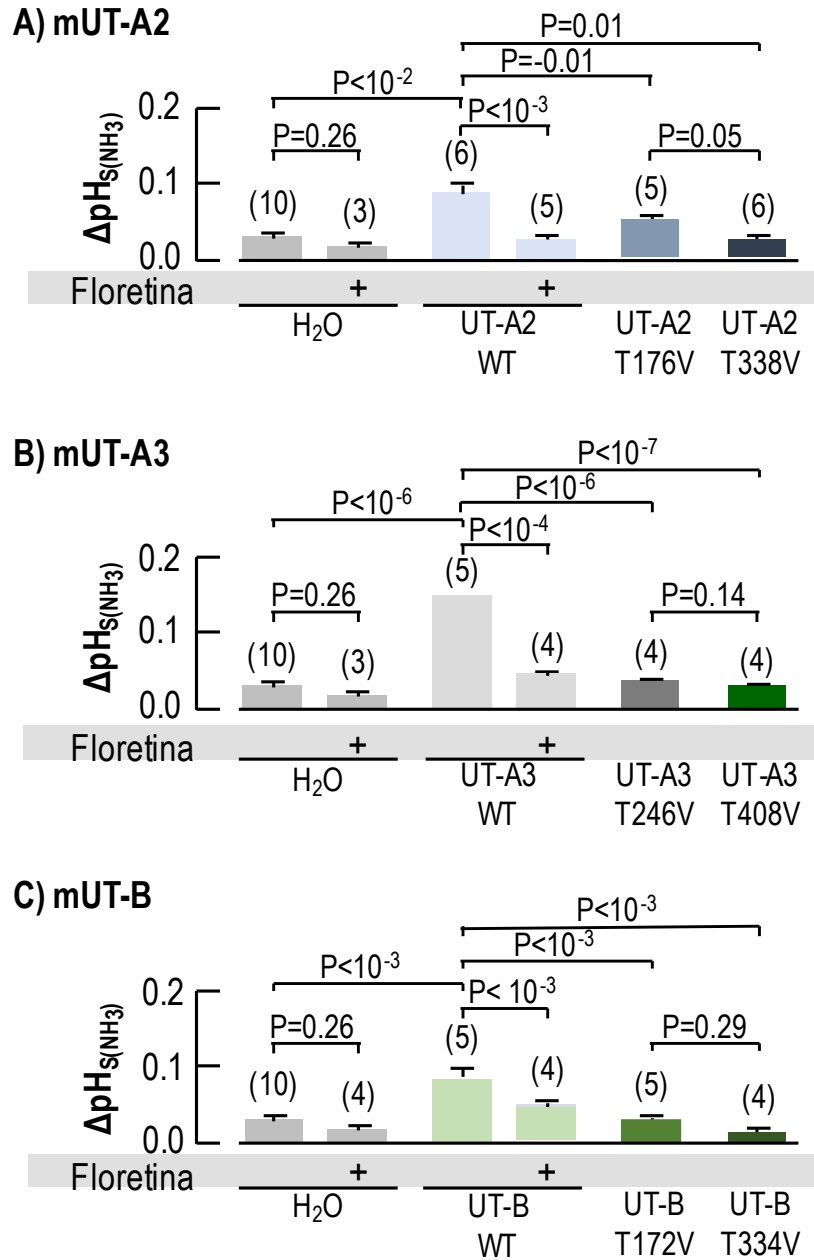
O experimento para a medida das variações do  $pH_s$  foi iniciado com a ponta do eletrodo  $pH_s$  na solução de “ND96” extracelular (“banho”) — ~ 300  $\mu$ m longe da superfície do oócito — para calibrar o eletrodo no pH 7,50 da solução controle. Depois disso, a ponta plana romba do eletrodo foi empurrada contra a superfície do oócito até que uma leve depressão (~ 40  $\mu$ m) fosse observada na membrana (“superfície”, área cinza). A criação dessa pequena depressão é importante porque cria um microambiente entre a ponta do eletrodo e a membrana do oócito que maximiza a  $\Delta pH_s$  e garante um posicionamento do eletrodo na membrana que é consistente e reproduzível em cada experimento, minimizando variabilidades. Com o eletrodo na superfície, a solução contínua de “ND96” (4 mL/min) foi trocada pela solução de 0,5 mM  $NH_4Cl$  (4mL/min) e ocorreu uma rápida e transiente acidificação do  $pH_s$ , seguida de uma recuperação lenta em direção ao valor inicial. Depois de certo tempo, quando ainda estava ocorrendo a recuperação do  $pH_s$ , o eletrodo foi colocado no “banho” para nova calibração no pH 7,50 da solução  $NH_4Cl$ . A magnitude da  $\Delta pH_s$  representa o índice da permeabilidade da membrana à  $NH_3$ .

**Figura 19.** Traços representativos mostrando as variações do pH<sub>s</sub> causadas pelo influxo de NH<sub>3</sub> após exposição dos oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup> (laranja), mUT-A2<sup>T176V</sup> e mUT-A2<sup>T338V</sup> (verde) *versus* oócito controle (cinza), à uma solução de NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.



Assim, a **Figura 19** mostra que a troca da solução de ND96 para a solução 0.5 mM NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> causou uma rápida e transiente queda no pH<sub>s</sub>, seguida de uma recuperação lenta que foi maior nos oócitos que expressam **(A)** mUT-A2<sup>WT</sup> do que nos oócito que expressam os mutantes **(B)** mUT-A2<sup>T176V</sup> e **(C)** mUT-A2<sup>T338V</sup> ou **(D)** oócito controle, injetado com H<sub>2</sub>O.

**Figura 20.** Média dos resultados das medidas da  $\Delta pH_S$  (em unidades de pH) de oócitos que expressam mUTs WT ou mutantes *versus* oócitos controle, expostos à uma solução de  $NH_3/NH_4^+$ .



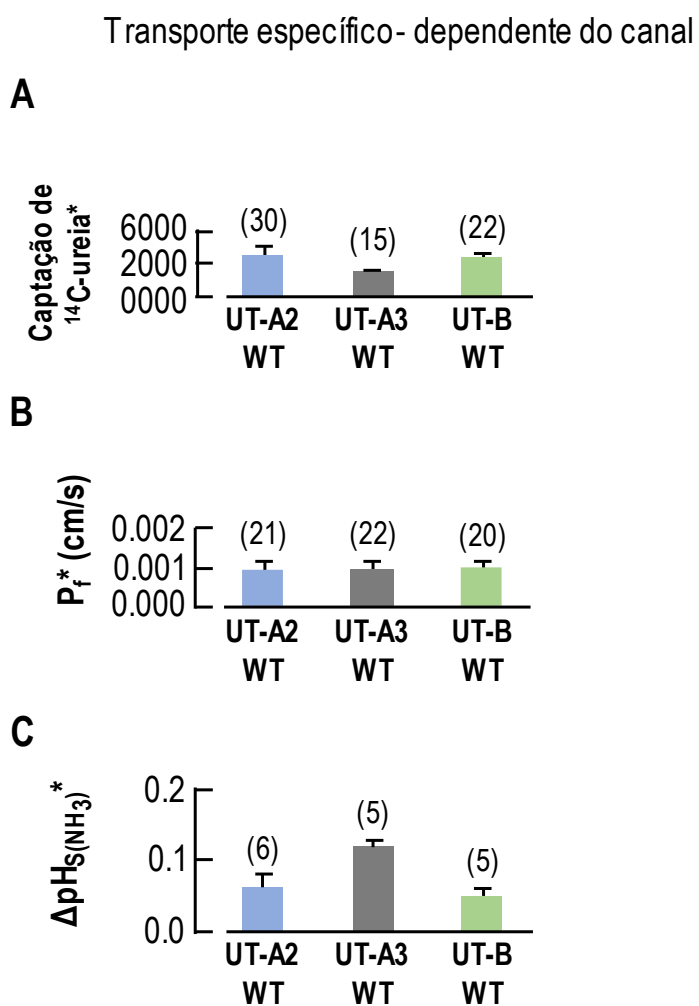
Os resultados da **Figura 20** (lado esquerdo) mostram que a média da  $\Delta pH_{S(NH_3)}$  dos oócitos injetados com cRNA para expressão de mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> é



significativamente maior que àquela dos seus respectivos oócitos controle, injetados com H<sub>2</sub>O. A incubação com Floretina (0.5 M por 20 min) não teve efeito nos oócitos controle, mas reduziu significativamente a transporte através dos oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup>. Os resultados da **Figura 20** também mostram que a  $\Delta pH_s$  dos oócitos UT WT foi significativamente maior do que àquelas dos respectivos UTs mutantes [ (UT-A2<sup>WT</sup> vs UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), (UT-A3<sup>WT</sup> vs UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e (UT-B<sup>WT</sup> vs UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>)] ou controle.

A partir dos dados das figuras 17, 18 e 20 calculamos a permeabilidade específica (\*) mediada pelos UTs<sup>WT</sup> à ureia, água ou NH<sub>3</sub>. A P\* foi calculadas a partir da subtração do valor de captação de <sup>14</sup>C-ureia (figura 18), P<sub>f</sub> (figura 19) ou  $\Delta pH_{S(NH_3)}$  (figura 21) de cada oócito que expressa mUTA2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> do valor médio de captação de <sup>14</sup>C-ureia, P<sub>f</sub> ou  $\Delta pH_{S(NH_3)}$  dos respectivos ócitos controle, injetados com H<sub>2</sub>O. A **Figura 21** resume essas diferenças.

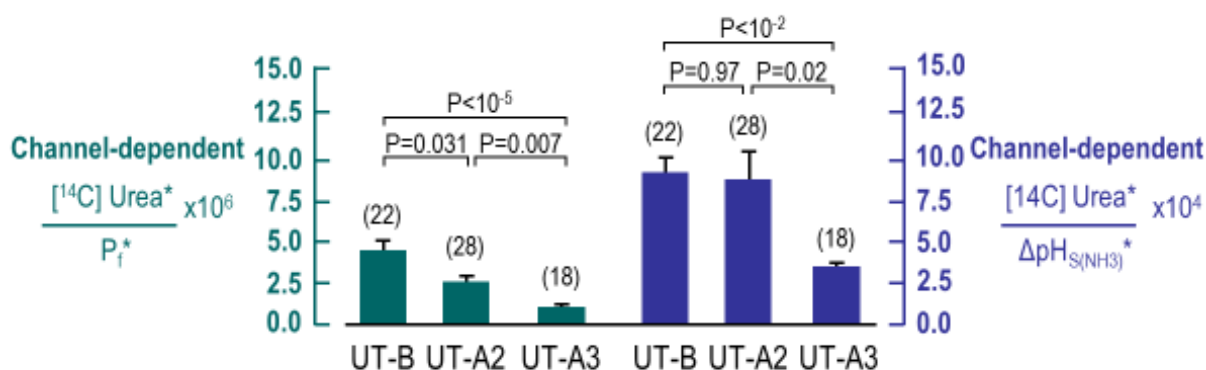
**Figura 21.** Média dos resultados da Captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia\*,  $P_f^*$  ou  $\Delta\text{pH}_{\text{S}(\text{NH}_3)^*}$  mediada pelas proteínas UTs WT.



Os valores médios representam, respectivamente, a captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia\* (**A**),  $P_f^*$  (**B**) ou  $\Delta\text{pH}_{\text{S}(\text{NH}_3)^*}$  (**C**) mediado pela proteína UT-A2<sup>WT</sup>, UT-A3<sup>WT</sup> ou UT-B<sup>WT</sup>. Esses valores são significativamente maiores que zero, indicando um índice da expressão funcional de cada um dos UTs<sup>WT</sup> à ureia, água e  $\text{NH}_3$ .

A partir dos dados da figura 21, calculamos a seletividade relativa de cada UT<sup>WT</sup> para ureia *versus* água *versus* NH<sub>3</sub> (**Figura 22**). Para tal, oócito por oócito, dividimos <sup>14</sup>C-ureia\* pelos valores correspondentes de P<sub>f</sub>\*, sendo o resultado um índice semiquantitativo da razão de permeabilidade ureia/água para mUTA2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> (**Figura 22**, barras verdes-azuladas, lado esquerdo da figura). Da mesma forma, a divisão dos valores individuais de <sup>14</sup>C-ureia\* pelos valores correspondentes de ΔpH<sub>S(NH3)</sub>\* produz um índice semiquantitativo da razão de permeabilidade ureia/NH<sub>3</sub> para mUTA2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> (**Figura 22**, barras azuis, lado direito da figura).

**Figura 22.** Razão entre Captação de <sup>14</sup>C-ureia\* e P<sub>f</sub>\* (A) e razão entre Captação de <sup>14</sup>C-ureia\* e P<sub>NH3</sub>\* (B) das proteínas UTs WT.



A análise dos dados da **Figura 22** indica que cada UT<sup>WT</sup> tem uma seletividade característica para ureia *versus* água (**Figura 22** barras verde-azuladas) — que cai na sequência mUT-B > mUT-A2<sup>WT</sup> > mUT-A3 — e *versus* NH<sub>3</sub> (**Figura 22**, barras azuis) — que cai na sequência mUT-B = mUT-A2 > mUT-A3.

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho discute os resultados sobre as propriedades de transporte para os substratos ureia, água e/ou  $\text{NH}_3$  das proteínas UTs — mUTA2 e mUT-A3 — expressas em oócitos da rã *Lithobates*. Os resultados obtidos 1) confirmam estudos anteriores relatando que o UT-B transporta ureia, água e  $\text{NH}_3$ , 2) descrevem pela primeira vez que UT-A2 e UT-A3 transportam  $\text{NH}_3$ , além de água (como demonstrado no primeiro manuscrito publicado “Urea Transporter mediated water transport through murine UTs: Implications in Urine Concentration. Kabutomori J, **Pina-Lopes N**, Musa-Aziz R., Journal of Experimental Biology-Biology Open, 2020”<sup>8</sup>) e indicam que as moléculas de água e  $\text{NH}_3$  atravessam a membrana através do canal monomérico para ureia em mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B.

No primeiro manuscrito publicado, os achados confirmaram que, quando expressa em oócitos de *Lithobates*, um sistema de expressão heteróloga de proteínas padronizado em nosso laboratório, a proteína mUT-B transporta água, além de ureia, assim como visto por outros pesquisadores (YANG; VERKMAN, 1998; GEYER et al., 2013) e, demonstraram, pela primeira vez, que mUT-A2 e mUT-A3 transportam água, além de ureia.

Cada monômero de UT contém 10 hélices transmembranais que se reúnem para formar o canal para ureia. No centro de cada monômero está o filtro de seletividade, com três regiões:  $S_o$ ,  $S_m$  e  $S_i$ . Os dados da literatura descrevem que, na proteína UT-B, o filtro de seletividade exclui espécies carregadas, mas permite a passagem de ureia e água, como demonstrado por vários autores (YANG; VERKMAN, 2002; LEVIN; QUICK; ZHOU, 2009; LEVIN et al., 2012; GEYER et al., 2013a). Desse modo, neste trabalho medimos o transporte de ureia, água e  $\text{NH}_3$  de oócitos injetados com cRNA para expressão da proteína mUT-A2, mUT-A3 ou mUT-B *versus* oócitos controle, injetados com  $\text{H}_2\text{O}$  e, para caracterizar a via de permeação das moléculas, 1) utilizamos o inibidor conhecido do transporte de ureia pelos UTs, a Floretina — para indicar se as moléculas de água e  $\text{NH}_3$  permeiam a membrana celular pela mesma via — e 2) mutamos os dois resíduos conservados de Thr localizados no canal monomérico para ureia da proteína mUT-A2 (UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), mUT-A3

---

<sup>8</sup> <https://bio.biologists.org/content/biopen/9/8/bio051805.full.pdf>

(UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e mUT-B (UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>) — para investigar se esses resíduos também estavam envolvidos com o transporte água e/ou NH<sub>3</sub>.

No entanto, antes de iniciar os experimentos funcionais, foi avaliada a expressão dos UTs WT e mutantes na membrana dos oócitos de *Lithobates*, a partir experimentos de “western blot”, utilizando o anticorpo monoclonal anti- Myc.

### 5.1. EXPRESSÃO DE MUTS WT *VERSUS* MUTANTES NA MEMBRANA DOS OÓCITOS

Os ensaios de “western blot” de amostras biotinizadas de oócitos injetados com cRNA para expressão de mUTs WT e mutantes na **Figura 16** demonstraram que a mutação dos resíduos de Thr para Val na região S<sub>m</sub> do filtro de seletividade não prejudicou a expressão das proteínas na membrana plasmática dos oócitos, uma vez que as colunas correspondentes às proteínas mutantes de mUT-A2 (UT-A2<sup>T176V</sup> e UT-A2<sup>T338V</sup>), mUT-A3 (UT-A3<sup>T246V</sup> e UT-A3<sup>T408V</sup>) e mUT-B (UT-B<sup>T172V</sup> e UT-B<sup>T334V</sup>) apresentaram bandas semelhante àquelas da proteína WT correspondente e expressas com um peso molecular compatível ao peso molecular das formas glicosiladas de UT-A2 (45-55 kDa), UT-A3 (45-65 kDa) e UT-B (45-65 kDa) expressas em células de mamíferos ou oócitos de *Xenopus* (WADE et al, 2000; TRINH-TRANG-TAN et al., 2002; YOU et al, 2003; BAGNASCO et al., 2006; MACIVER et al., 2008; SU et al., 2012; QIAN et al., 2017). Assim, esses resultados indicaram que a maquinaria intracelular dos oócitos de *Lithobates* foi capaz de sintetizar e expressar as proteínas UTs WT e mutantes na membrana plasmática.

### 5.2. TRANSPORTE DE UREIA, ÁGUA E NH<sub>3</sub> PELOS MUTS WT *VERSUS* MUTANTES

Dando continuidade, as análises nas **Figura 17, 18 e 20** mostraram, respectivamente, que os oócitos que expressam mUT-A2<sup>WT</sup>, mUT-A3<sup>WT</sup> ou mUT-B<sup>WT</sup> exibiram medidas de captação de <sup>14</sup>C-ureia, P<sub>f</sub> e ΔpH<sub>S(NH<sub>3</sub>)</sub> — inibidas após tratamento com Floretina — significativamente maiores do que àquela dos oócitos controle injetados com H<sub>2</sub>O, ou, ainda, do que àquela dos oócitos que expressam as proteínas mutantes mUT-A2<sup>T176V</sup> ou mUT-A2<sup>T338V</sup> (para mUT-A2<sup>WT</sup>), mUT-A3<sup>T246V</sup> ou mUT-A3<sup>T408V</sup> (para mUT-A3<sup>WT</sup>) e mUT-B<sup>T172V</sup> ou UT-B<sup>T334V</sup> (para mUT-B). Assim, esses resultados demonstraram, pela primeira vez, um transporte de NH<sub>3</sub>, além de ureia e água, através de UT-A2 e UT-A3, assim como indicaram que, provavelmente, a passagem de água e NH<sub>3</sub> através dos UT-As dependem de mecanismos

moleculares de transporte semelhantes àqueles demonstrados para o transporte de ureia através do UT-B (LEVIN et al., 2012).

Por muito tempo, a teoria definia que  $\text{NH}_3$  difundia-se passivamente e rapidamente através da fase lipídica de todas as membranas. Contudo, a primeira evidência desafiando essa teoria veio de uma observação de que membrana apical de células glandulares gástricas são impermeáveis a  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$  (WAISBREN et al, 1994) e membrana apical de criptas colônicas são impermeáveis a  $\text{NH}_3$  (Singh et al., 1995). A baixa permeabilidade dessas membranas a  $\text{CO}_2$  ou  $\text{NH}_3$  (e também a  $\text{H}_2\text{O}$ ) pode ser uma propriedade geral das membranas que estão em contato com um ambiente hostil (COOPER et al, 2002), que podem ter evoluído membranas robustas (pouco permeáveis), especializadas, com uma constituição lipídica única e/ou com alta expressão de proteínas cobrindo a superfície externa da membrana.

No néfron, o DC tem uma resistência transepitelial relativamente alta (com baixa permeabilidade iônica), e tem um importante papel no controle fino da absorção de  $\text{NaCl}$  e água, bem como na secreção  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$  (como  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}^+$ ). A baixa permeabilidade do epitélio do DC é consistente com a ideia de que o lúmen, em contato com a membrana apical, e o interstício medular, em contato com a membrana basolateral do DC — ambos com altos níveis de solutos, tais como, ureia e  $\text{NH}_4^+$  — sejam ‘ambientes hostis’ e, assim, a célula durante a evolução desenvolveu membranas especialmente “robustas”. Assim, a expressão e função das proteínas RhCG e RhBG no epitélio do DC aumenta seletivamente a permeabilidade das membranas desse epitélio à  $\text{NH}_3$ . Portanto, nós podemos pensar que UT-A3 expressa no DC, em conjunto com as proteínas Rh, agindo como canal para  $\text{NH}_3$ , serviria para acelerar o transporte de  $\text{NH}_3$  neste segmento, onde a difusão de  $\text{NH}_3$  através da fase lipídica da membrana é baixa para as necessidades fisiológicas. Uma intrigante possibilidade é que o ADH que estimula a reabsorção de ureia através do UT-A3, pode também aumentar a permeabilidade total a  $\text{NH}_3$  do DC. Em outras palavras, as proteínas UTs seriam um alvo molecular para a regulação da passagem de  $\text{NH}_3$  no DC.

Em 2013a, Geyer e colaboradores foram os primeiros a mostrarem — utilizando a técnica de medidas da  $\Delta\text{pH}_{\text{S}(\text{NH}_3)}$  — que o hUT-B expresso em oócitos de *Xenopus laevis* também funciona como um canal para  $\text{NH}_3$ , como demonstrando anteriormente e assim os UTs, junto com proteínas das famílias de AQPs (MUSA-AZIZ et al., 2009b; GEYER et al., 2013b) e Rh (COOPER et al., 2002; MUSA-AZIZ et al., 2009b; GEYER et al., 2013c) se

tornaram a terceira família de proteínas transportadoras de  $\text{NH}_3$ . Essa permeabilidade de hUT-B à  $\text{NH}_3$  poderia reforçar a capacidade das hemácias de captar  $\text{NH}_3$  em vários tecidos e depois descarregá-la no fígado para detoxificação. Por outro lado, MacIver e colaboradores (2008) não detectaram transporte de  $\text{NH}_3$  através das proteínas mUT-A2 e mUT-A3. Esses autores utilizaram vesículas preparadas com membrana plasmática de oócitos de *Xenopus* que expressavam mUT-A2, mUT-A3 ou controle, ao invés de células inteiras. A  $P_{\text{NH}_3}$  foi monitorada através da utilização do probe fluorescente sensível a pH, 5,6-carboxifluoresceína em experimentos de “stopped flow”, misturando as vesículas que expressavam mUT-A2, mUT-A3 ou controle com 40 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 6.8)<sup>9</sup>, para medir as mudanças no pH com base nas mudanças da fluorescência do probe. Essa técnica de medição de pH é menos acurada e quantitativa que a nossa técnica de medidas da  $\Delta\text{pHs}$ , que utiliza um eletrodo de vidro altamente sensível às variações de  $\text{H}^+$  colocado diretamente na superfície externa da membrana do oócito, onde ocorrem as mudanças de pH devido ao influxo de  $\text{NH}_3$ . As divergências entre os resultados do grupo de MacIver e o nosso talvez seja uma consequência das diferenças entre as metodologias utilizadas.

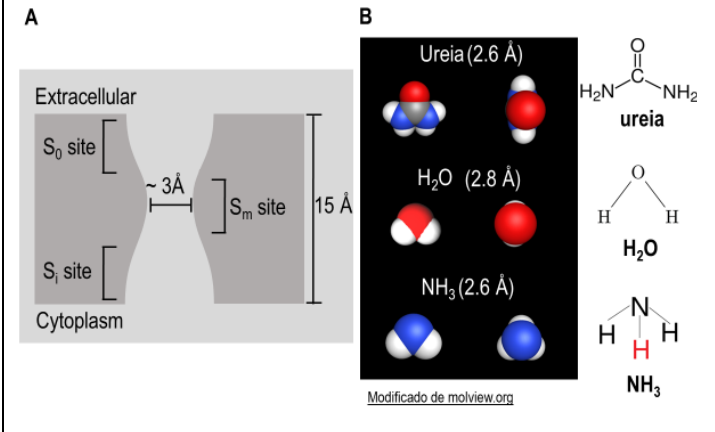
Considerando que a Floretina e ambas mutações da Thr (por Val) inibiram o transporte de ureia, água e  $\text{NH}_3$  dos oócitos que expressavam as proteínas mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B para um valor médio próximo daquele dos oócitos controle, então, nosso estudo, demonstra a importância dos dois resíduos altamente conservados de Thr para as funções de transporte das proteínas UTs e fornece evidências de que o filtro de seletividade descrito por Levin e colaboradores (2012) para bUT-B é conservado em mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B (LEVIN; ZHOU, 2014). Desse modo, podemos facilmente especular que as três moléculas atravessam as membranas biológicas através do canal monomérico para ureia dos UTs.

---

<sup>9</sup> Em nossos experimentos, a solução tinha 0,5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 7.5).

A região  $S_m$  no filtro de seletividade de cada monômero é uma região estreita, com diâmetro de  $\sim 3 \text{ \AA}$  (**Figura 23**). No entanto, o diâmetro da molécula de ureia ( $\sim 2.6 \text{ \AA}$  de diâmetro) é ligeiramente menor que o diâmetro da região  $S_m$  e, portanto, ureia passa livremente através do canal. Porém, o diâmetro da ureia não dá, ao canal, liberdade para distinguir entre uma molécula e

**FIG 23.** Comparação entre os diâmetros e estruturas das moléculas de ureia, água e  $\text{NH}_3$ . Relação entre o diâmetro das moléculas e o diâmetro da região  $S_m$  do canal monomérico do UT.

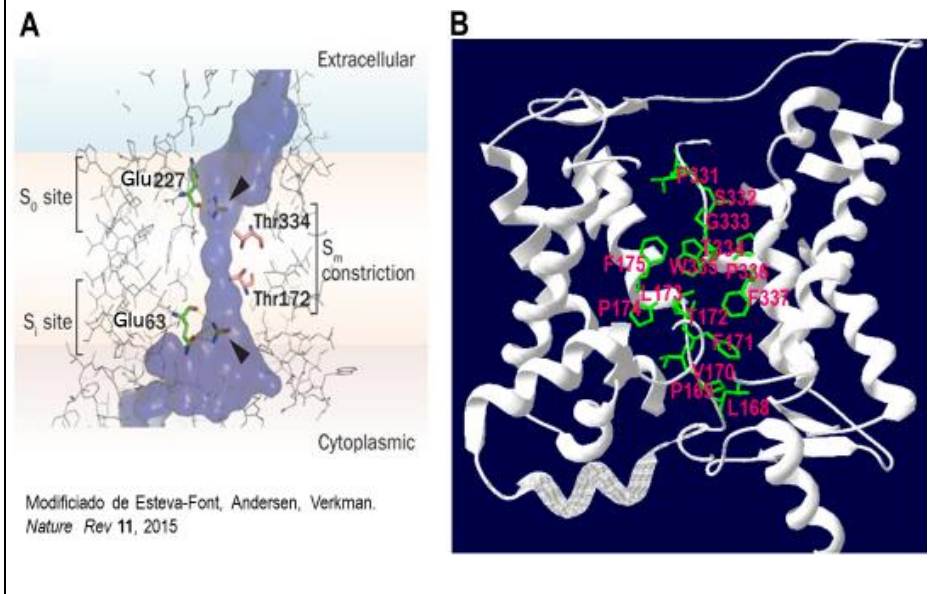


outra para permitir a passagem. Para tal, o filtro de seletividade da proteína UT precisa selecionar as propriedades químicas da molécula. Vale a pena mencionar que o diâmetro e a estrutura química das moléculas de água e  $\text{NH}_3$  se assemelham com àquela da molécula de ureia.

A região  $S_m$  no filtro de seletividade de cada monômero é revestida por resíduos hidrofóbicos, exceto pelas duas Treoninas (Thr ou T) — T172 e T334 (em bUT-B) —

presentes na sequência consenso LPXXTXPF na extremidade N-terminal das hélices TM5a e TM5b (LEVIN; ZHOU, 2014; ESTEVA-FONT; ANDERSON.; VERKMAN, 2015 (**Figura 24**).

**FIG 24.** A) Representação do filtro de seletividade do bUT-B. B) Estrutura cristalina do bUT-B com a sequência consenso LPXXTXPF em destaque.



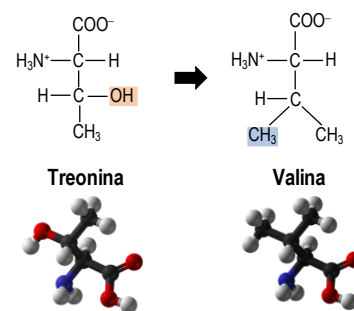
A passagem de ureia ocorre por pontes de hidrogênio, entre as moléculas de ureia e as hidroxilas da cadeia



lateral dos resíduos de Thr na região  $S_m$  do filtro de seletividade do canal monomérico. A interação das Thr remove a camada de solvatação ao redor da molécula de ureia, fornecendo interações similares àquelas da ureia com a água (LEVIN et al., 2012; ESTEVA-FONT; ANDERSON.; VERKMAN, 2015).

A substituição de uma ou outra Thr para Val reduz significativamente o transporte de ureia através das proteínas UTs mutantes. A Thr é um aminoácido polar, sem carga, com uma hidroxila na cadeia lateral e, portanto, hidrofílico, enquanto a Val é um aminoácido apolar, que não possui uma hidroxila na cadeia lateral e, portanto, hidrofóbico, com um volume maior (SMITH et al., 2002; DOKMAISRILAN; LEE; NIMMANPIPUG, 2010) (**Figura 25**).

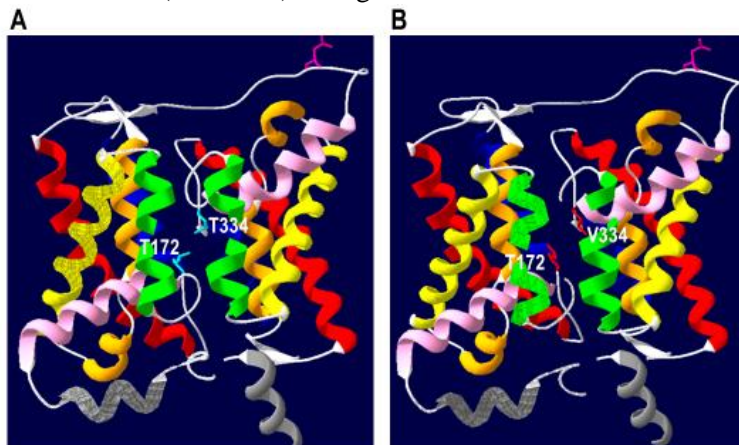
**FIG 25.** Estrutura química dos aminoácidos treonina e valina



Modificado de Lehninger, Nelson, & Cox. In Princípios de Bioquímica de Lehninger 6ª Edição.

Então, especulamos que as mutações Thr→Val aumentam a hidrofobicidade da região  $S_m$ , interrompendo as ligações por pontes de hidrogênio do substrato com os resíduos mutados do canal monomérico (**Figura 26**). Além disso, a perda das pontes de hidrogênio nos mutantes pode provavelmente causar uma rotação da Val em direção ao poro (LEVIN et al., 2012; ESTEVA-FONT; ANDERSON.; VERKMAN, 2015), de modo que a cadeia lateral da Val, agora hidrofóbica e mais flexível, pode reduzir o diâmetro da região  $S_m$ <sup>10</sup> e, com isso, as moléculas de ureia não conseguem atravessar o filtro

**FIG 26.** Estrutura cristalina do bUT-B com destaque aos (A) resíduos de Thr 172 e 334 (azul água) e (B) resíduos mutados de Val 172 e 334 (vermelho) na região  $S_m$  do canal monomérico.



de seletividade água, ou seja, o canal monomérico para ureia. Como o transporte de ureia,

<sup>10</sup> Na estrutura cristalina, não é possível ver os movimentos da cadeia lateral da proteína. Vê-se apenas uma foto da estrutura proteica.

água e  $\text{NH}_3$  foi inibido por Floretina e ambas as mutações da Thr, então, nossos dados indicam que água e  $\text{NH}_3$  também se movem através do canal monomérico para ureia nas proteínas UT-A2, UT-A3 e UT-B.

Levin e colaboradores (2012) foram os primeiros a estudar o efeito da mutação dos dois resíduos de Thr para Val em bUT-B (T334V e T172V) no transporte de  $^{14}\text{C}$ -ureia. Esses pesquisadores mostraram que apenas a mutação T334V reduziu substancialmente o transporte de  $^{14}\text{C}$ -ureia através de bUT-B expresso em oócitos de *Xenopus*. Da mesma forma, Geyer e colaboradores (2013) mutaram os resíduos de Thr em hUT-B (T339V e T177V) e também observaram que apenas a mutação análoga T339V em hUT-B reduziu o transporte de  $^{14}\text{C}$ -ureia em oócitos de *Xenopus*. No entanto, Geyer e colaboradores, assim como nós, encontraram que ambas as mutações em hUT-B, T177V e T339V reduziram substancialmente o transporte de água e  $\text{NH}_3$ . Portanto, os experimentos de Geyer e colaboradores indicaram que os dois resíduos de Thr são cruciais para o movimento de ureia, água e  $\text{NH}_3$  através de UT-B, enquanto o resíduo T177 parece não ser crítico para a ureia. A discrepância entre os estudos de captação de  $^{14}\text{C}$ -ureia dos grupos de Levin et al. (2012) e Geyer et al. (2013a) e o nosso provavelmente se deve às variações de espécies causando mudanças leves na estrutura quaternária ou, mais especificamente, no filtro de seletividade do canal monomérico.

A região  $S_m$  conservada do canal monomérico para ureia da proteína UT é sensível a mudanças na hidrofobicidade e volume dos resíduos de aminoácidos (LEVIN; ZHOU, 2014). Assim, nós especulamos que mudanças relativamente pequenas na conformação da região  $S_m$  do canal monomérico — causadas pela mutação dos resíduos de Thr para Val — pode ter efeitos substanciais na taxa de transporte da proteína e, portanto, a região  $S_m$  poderia potencialmente servir como um local para regular a taxa de permeação de ureia e/o água ou  $\text{NH}_3$ .

No entanto, o mecanismo molecular para o transporte de  $\text{NH}_3$  através do filtro de seletividade do canal monomérico das proteínas UTs provavelmente envolve o recrutamento, desprotonação e reprotonação do íon  $\text{NH}_4^+$ . O modelo baseado na estrutura cristalina propõe que  $\text{NH}_4^+$  do seio da solução extracelular se aproxima da abertura do poro, libera o  $\text{H}^+$  que eventualmente se difunde de volta ao seio da solução, deixando livre o  $\text{NH}_3$  que passa através do poro de um monômero. Portanto, no computo geral, tudo se passa como se o bUT-B

estivesse transportando  $\text{NH}_4^+$ , embora seja  $\text{NH}_3$  que na verdade passe através do poro (GEYER et al., 2013a). No entanto, ainda são necessários estudos adicionais sobre o mecanismo de transporte de  $\text{NH}_3$  pelos UTs, mais precisamente, para a identificação de outros aminoácidos que, em conjunto com as Thr conservadas, estão envolvidas na permeação de  $\text{NH}_3$ , mais precisamente no processo de desprotonação e reprotonação da molécula.<sup>11</sup>

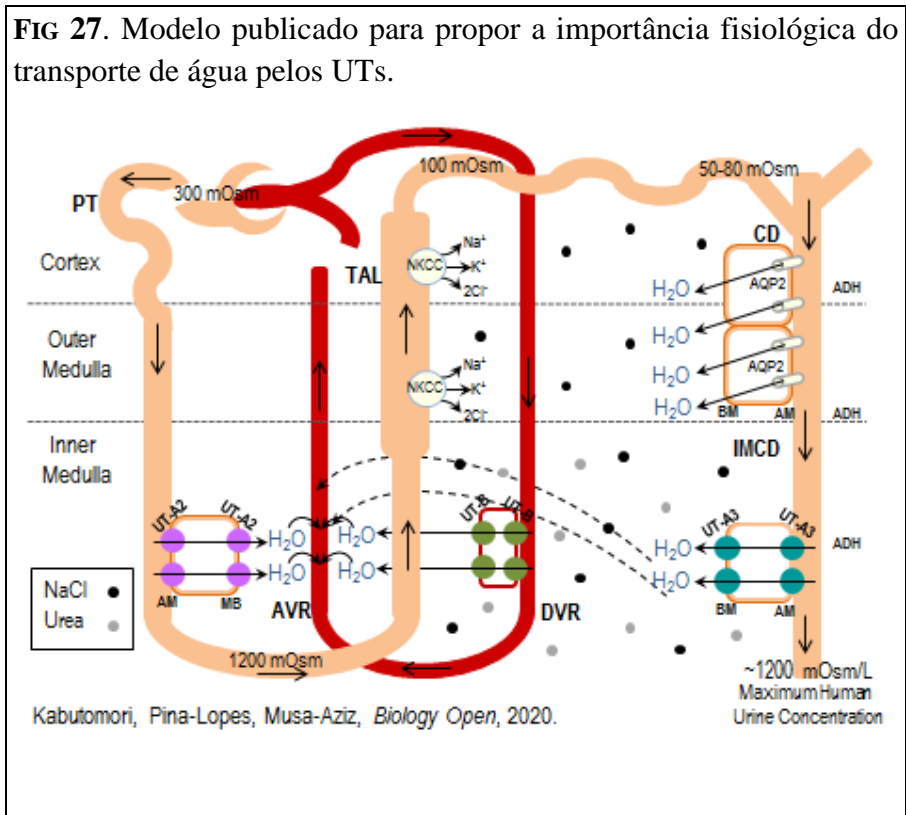
Simulações de dinâmica molecular (SDM) realizadas com bUT-B (LEVIN et al., 2012; GEYER et al., 2013a) revelaram que as barreiras de energia do filtro de seletividade do canal monomérico para ureia são relativamente baixas na região de  $S_o$ , no entanto, aumentam rapidamente ao se aproximar do resíduo T334 (de bUT- B) na região  $S_m$  e permanecem elevadas até atingir o resíduo T172 (de bUT-B), após o qual inicia-se a região  $S_i$ , onde a barreira energética cai rapidamente para níveis semelhantes àquele da região  $S_o$ . Em outras palavras, os resíduos de Thr conservados delineiam a região  $S_m$  e, desse modo, alterações estruturais sutis neste (ou mesmo distantes deste) microambiente provavelmente afetam a atividade da proteína.

Sabe-se que os polimorfismos de nucleotídeo único (“SNPs”) na região codificadora de genes pode perturbar a estrutura e, possivelmente, a função de proteínas e, conseqüentemente, contribuir para o início e/ou a progressão de uma determinada doença humana. Curiosamente, está começando a crescer o número de artigos na literatura correlacionando SNPs de isoformas da família SLC14 com processos fisiopatológicos. Ranade e colaboradores (2001) demonstraram dois SNPs no gene SCLC14A2 (para hUT-A2) relacionados à hipertensão e Hong e colaboradores (2007) demonstraram que esses SNPs estão associados às variabilidades interindividuais das respostas da pressão arterial ao tratamento com nifedipina — bloqueador de canais para cálcio que funciona como uma droga natriurética, vasodilatadora e, portanto, anti-hipertensiva. Nesse sentido, acreditamos que nosso estudo fornece informações sobre a importância da identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (“SNPs”) na região traduzida dos genes UT no organismo.

---

<sup>11</sup> Esses estudos envolvem a produção de uma série de mutações e experimentos de expressão funcional que farão parte do meu futuro projeto de doutorado.

Talvez o achado mais empolgante do nosso estudo tenha sido a demonstração do transporte de  $\text{NH}_3$ , além do transporte de água e ureia, mediado por UT-A2 e UT-A3. Na figura 22, os índices relativos das razões de permeabilidades ureia/água (barras verde-azulado) caiu na sequência  $m\text{UT-B} > m\text{UT-A2}^{\text{WT}} > m\text{UT-A3}$  e ureia/ $\text{NH}_3$  (barras azuis) caiu na sequência  $m\text{UT-B} = m\text{UT-A2} > m\text{UT-A3}$ .

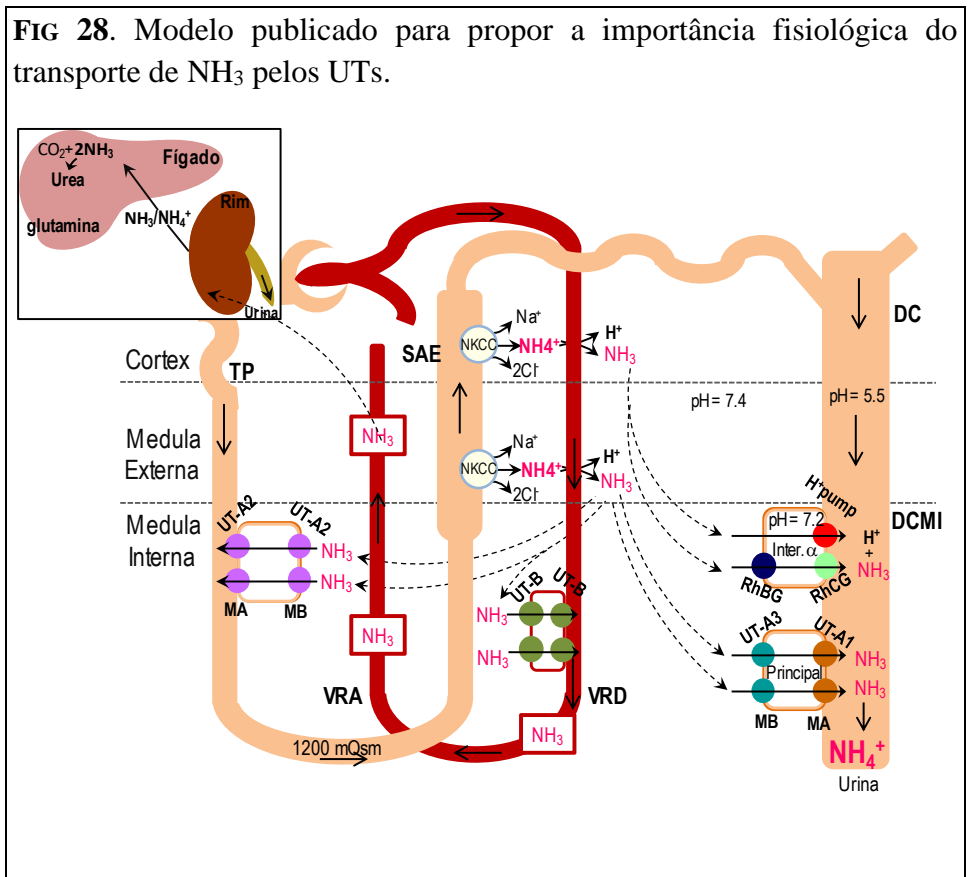


Esta observação nos direcionou a propor que regiões específicas no néfron, com alta expressão de UTs, podem exibir seletividade para ureia *versus* água e/ou ureia *versus*  $\text{NH}_3$ , influenciando, desse modo, o mecanismo de concentração da urina — importante para a manutenção do balanço de água — ou a excreção de  $\text{NH}_3$  — importante para a manutenção do balanço ácido-base.

Com isso, então, propomos inicialmente um modelo, inserindo o transporte de água, além do transporte de ureia, na função dos UTs nas estruturas tubulares e vasos retos renais. Esse modelo, já publicado no nosso primeiro artigo (KABUTOMORI: PINA-LOPES; MUSA-AZIZ, 2020), mostra que a alta osmolaridade do interstício medular produzida pelo acúmulo de  $\text{NaCl}$  na região medular (devido a reabsorção ativa de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  via cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  localizado na membrana apical do SAE da alça de Henle) e de ureia na região medular interna é importante para a reabsorção de água do DC na presença de HAD. Essa reabsorção de  $\text{NaCl}$ , que aumenta a osmolaridade do interstício medular em relação ao plasma, dilui, ao mesmo tempo, o fluido tubular no SAE da Alça de Henle em

relação ao plasma. Quando esse fluido tubular diluído chega ao sistema de DCs, em contato com o interstício medular hiperosmótico, a água é reabsorvida do DC cortical via AQP2, na presença de HAD, mas também pode ser reabsorvida do DCMI através de UT-A3 e, provavelmente, UT-A1. Além disso, a alta osmolaridade do interstício medular interno é também a força motriz para a reabsorção de água tanto do SDF da alça de Henle via UT-A2, quanto da vasa reta descendente (VRD) via UT-B. Desse modo, a água é eficientemente removida do interstício pelos vasos retos e retorna à corrente sanguínea, mantendo o gradiente do interstício medular hiperosmótico e contribuindo para a conservação da água no organismo, especialmente em casos de desidratação, quando aumenta a necessidade de retenção de água no organismo.

Com o final desse trabalho, propomos um novo modelo (Figura 28), descrevendo a importância fisiológica do transporte de  $\text{NH}_3$  pelos UTs ao longo das estruturas tubulares e vasos retos renais. O íon  $\text{NH}_4^+$



produzido e secretado pelas células do túbulo proximal é reabsorvido no SAE da alça de Henle pelo cotransportador  $\text{NKCC2}$  apical (WEINER; LEE HAMM, 2007). O pH menos ácido do interstício medular favorece a dissociação do íon  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}^+$  (GEYER et al., 2013a; WEINER; VERLANDER, 2013). Parte desse  $\text{NH}_3$  que se acumula no interstício medular, entra novamente no SDF via  $\text{UT-A2}$ , sendo reciclada para o SAE da alça de Henle,

uma outra parte (maior) entra na luz do DC e a pequena quantidade restante cai na corrente sanguínea através dos vasos retos via UT-B, sendo, então, transportada para o fígado, o qual detoxifica o organismo de  $\text{NH}_4^+$  por convertê-lo em ureia e glutamina (GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017b).

A excreção de  $\text{NH}_4^+$  na urina envolve, então, 1) a entrada de  $\text{NH}_3$  e de  $\text{H}^+$  do interstício para a célula intercalar  $\alpha$  através da membrana basolateral e 2) saída de  $\text{NH}_3$  e de  $\text{H}^+$  da célula intercalar  $\alpha$  para o lúmen através da membrana apical. No lúmen do DC, devido ao baixo pH,  $\text{NH}_3$  reage rapidamente com  $\text{H}^+$  formando novamente  $\text{NH}_4^+$  que é excretado (GIEBISCH; WINDHAGER; ARONSON, 2017b). Os íons  $\text{H}^+$  são secretados na luz do DC principalmente pela  $\text{H}^+$ -ATPase (VALLES et al., 2006). Quanto à secreção de  $\text{NH}_3$ , recentes trabalhos demonstraram que duas proteínas relacionadas estão envolvidas no transporte de  $\text{NH}_3$  através do epitélio do DC. Estas são as glicoproteínas de membrana, RhCG e RhBG<sup>12</sup>, expressa nas células intercalares  $\alpha$  (BIVER et al, 2008; GEYER et al. 2013c; WEINER; VERLANDER, 2013; MUSA-AZIZ, 2017). No entanto, postulamos que, em condições de acidose,  $\text{NH}_3$  pode também ser secretado via UT-A3 expresso nas células principais do DC.

Considerando a presença de UTs em regiões específicas do néfron, acreditamos que alterações na expressão e/ou atividade dessas proteínas poderiam alterar as permeabilidades à ureia, água e/ou  $\text{NH}_3$  nessas regiões, influenciando, desse modo, os mecanismos renais que integram a excreção de resíduos nitrogenados, água e ácido ( $\text{NH}_4^+$ ). Nosso estudo gera, então, informações importantes para uma melhor compreensão da fisiologia renal e dos distúrbios que envolvem os balanços de água e ácido-base do organismo. Além disso, colocamos que a atividade de transporte de água mediada pelos UTs gera informações que, potencialmente, poderão colaborar para outros estudos para o desenvolvimento de novos diuréticos direcionados aos UTs.

---

<sup>12</sup> RhBG e RhCG são homólogas da proteína RhAG, um componente do sistema sanguíneo Rh.

## **6. CONCLUSÕES**

No presente trabalho expressamos mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B em oócitos de *Lithobates catesbeianus* e os resultados obtidos 1) confirmam que UT-B funciona como um canal para ureia, água e  $\text{NH}_3$ , 2) descrevem pela primeira vez que UT-A2 e UT-A3 transportam  $\text{NH}_3$ , além de água, 3) indicam que as moléculas de água e  $\text{NH}_3$  atravessam a membrana através do canal monomérico para ureia em mUT-A2, mUT-A3 e mUT-B e 4) indicam que as proteínas UTs, expressas em regiões específicas do néfron, exibem seletividade para ureia *versus* água e/ou ureia *versus*  $\text{NH}_3$ .

Se as permeabilidades à água e  $\text{NH}_3$  observadas para as proteínas UT-A2 e UT-A3 e UT-B forem compatíveis com a função dessas proteínas ao longo dos túbulos e vasos retos renais, os UTs têm, então, um importante papel em reabsorver água ao longo do DC medular — importante para modular o mecanismo de concentração urinária para conservar água no organismo — e em transportar  $\text{NH}_3$  através das membranas basolateral e apical do DC — importante para a excreção renal de  $\text{NH}_4^+$  e, portanto, para a manutenção do balanço ácido-base do organismo.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ARES, G.R., CACERES, P.S., ORTIZ, P. A. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.301, p.1143–1159, 2011.
- BAGNASCO, S.M. The erythrocyte urea transporter UT-B. **Journal of Membrane Biology**, v.212, p.133–138, 2006.
- BERLINER, R.W., BENNETT, C.M. Concentration of urine in the mammalian kidney. **Am. J. Med.**, v. 42, p. 777–789, 1967.
- BIVER, Sophie et al. A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 339-343, nov. 2008.
- DAINIAK, M. B. et al. Methods in Cell Separation. In: KUMAR, A., GALAEV, I., MATTISSON, B. **Cell Separation. Fundamentals, Analytical and Preparative Methods**, New York, USA: Springer, 2007. Cap. 1, p. 8.
- DANTZLER, William H. et al. Urine-Concentrating Mechanism in the Inner Medulla: Function of the Thin Limbs of the Loops of Henle. **Clinical Journal of American Society of Nephrology**, v. 9, p. 1781–1789, 2014.
- DESARNAUD, F. et al. Protein purification using combined streptavidin (or avidin)-Sepharose and thiopropyl-Sepharose affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 603, n. 1-2, p. 95-104, jun. 1992.
- DOKMAISRILAN, Supaporn; LEE, Vannajan Sanghiran; NIMMANPIPUG, Piyarat. The gas phase conformers and vibrational spectra of valine, leucine and isoleucine: An ab initio study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 953, n. 1-3, p. 28-38, ago. 2010.
- ESTEVA-FONT, C.; ANDERSON, M. O.; VERKMAN, A. S. Urea transporter proteins as targets for small-molecule diuretics. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p.113-123, 9 dez. 2015.
- FENTON, R. A. et al. Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p.7469-7474, mai. 2004.
- GAMBA, G. et al. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.17713–17722, 1994.
- GEYER, R. R. et al. Movement of NH<sub>3</sub> through the human urea transporter B: a new gas channel. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 304, n. 12, p.1447-1457, abr. 2013a.
- GEYER, R. Ryan et al. Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of mammalian aquaporins 0–9. **American Journal of Physiology-cell Physiology**, v. 304, n. 10, p.985-994, mai. 2013b.
- GEYER, R. Ryan et al. Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> Permeabilities of Human RhAG, RhBG and RhCG. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 12, p.915-926, set. 2013c.
- GIEBISCH, G.; WINDHAGER, E. ARONSON P. Urine concentration and dilution. In: BORON, Walter F.; BOULPAEP, Emile L. **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017a, cap 33, p. 835–850.
- GIEBISCH, G.; WINDHAGER, E. ARONSON P. Transport of acids and bases. In: BORON, Walter F.; BOULPAEP, Emile L. **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2017b, cap 33, p. 851–865.
- GOLDIN, A. L.; SUMIKAWA, K. Preparation of RNA for injection into *Xenopus oocytes*. **Methods in Enzymology**, v. 207, p. 279-297, 1992.



- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, jun. 1983.
- HONG, X. et al. Genetic polymorphisms of the urea transporter gene are associated with antihypertensive response to nifedipine GITS. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 29, n.1, p. 3-10. 2007.
- HWANG, Shelly et al. Vasopressin increases phosphorylation of Ser84 and Ser486 in Slc14a2 collecting duct urea transporters. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 299, n. 3, p. 559-567, set. 2010.
- KABUTOMORI, J et al. *Lithobates catesbeianus* (American Bulfrog) oocytes: a novel heterologous expression system for aquaporins. **Biology Open**, v. 7, n.4, p. 809-822, mar. 2018.
- KABUTOMORI, J.; PINA-LOPES, N.; MUSA-AZIZ, R. Water transport mediated by murine Urea Transporters: implications for urine concentration mechanisms. **Biology Open**, v. 9, n.8, jul. 2020.
- KARAKASHIAN, A. et al. Cloning and characterization of two new isoforms of the rat kidney urea transporter: UT-A3 and UT-A4. **J. Am. Soc. Nephrol.** 10, 230–237, 1999.
- KLEIN, J. D. et al. UT-A urea transporter protein expressed in liver: upregulation by uremia. **J Am Soc Nephrol JASN**, v. 10, n. 10, p. 2076–2083, Out 1999.
- KNEPPER, M. A.; PACKER, R.; GOOD, D. W. Ammonium transport in the kidney. **Physiology Rev**, v.69, n. 1, p. 179-249, jan. 1989.
- KNEPPER, M. A. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 272, n. 1, p. 3–12, 1997.
- KNEPPER, M. A., & MIRANDA, C. A. Urea channel inhibitors: a new functional class of aquaretics. **Kidney International**, v. 83, n. 6, p.991–993, 2013.
- KNEPPER, M. A.; KWON, T. H.; NIELSEN, S. Molecular Physiology of Water Balance. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 14, p.1349-1358, abr. 2015.
- LEVIN, E. J.; QUICK, M.; ZHOU, M. Crystal structure of a bacterial homologue of the kidney urea transporter. **Nature**, v. 462, n. 7274, p.757-761, out. 2009.
- LEVIN, E. J et al. Structure and Permeation mechanism of mammalian urea transporter. **Proceeding of National Academy of Science of United States of America** , v. 109, n. 28, p. 11194-11199, jun. 2012.
- LEVIN, E. J.; ZHOU, M. Structure of Urea Transporters. **Subcellular Biochemistry**, Springer Netherlands, p.65-78, 2014.
- LI X, CHEN G and YANG B. Urea transporter physiology studied in knockout mice. **Front. Physio**, v.217, n.3, p.327-345. 2012.
- MACIVER, B. et al. Functional characterization of mouse urea transporters UT-A2 and UT-A3 expressed in purified *Xenopus laevis* oocyte plasma membranes. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** 294, F956-964, 2008.
- MIERZEJEWSKA, K et al. Structural basis of the methylation specificity of R. DpnI. **Cold Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 13, p. 8745–8754, 2014.
- MIGNONE, F. et al. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biol**, v 3, n. 3, fev 2002.
- MUSA-AZIZ, R. et al. Concentration-Dependent Effects on Intracellular and Surface pH of Exposing *Xenopus oocytes* to Solutions Containing  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . **Journal of Membrane Biology**, v. 228, n. 1, p.15-31, 26 fev. 2009a.

- MUSA-AZIZ, R. et al. Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 13, p. 5406–5411, mar. 2009b.
- MUSA-AZIZ, R.; BORON, W. F.; PARKER, M. D. Using fluorometry and ion-sensitive microelectrodes to study the functional expression of heterologously-expressed ion channels and transporters in *Xenopus* oocytes. **Elsevier**, v. 51, n. 1, p.134-145, mai. 2010.
- MUSA-AZIZ, R. Regulação Renal do Hidrogênio e do pH. In: **Tratado de Nefrologia**. São Paulo, Brasil: Atheneu, 2017. Cap 8, p. 85.
- NAWATA, C. M.; PANNABECKER, T. L. Mammalian urine concentration: a review of renal medullary architecture and membrane transporters. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 6, p.899-918, mai. 2018.
- NIELSEN, S. et al. Cellular and subcellular localization of the vasopressin-regulated urea transporter in rat kidney. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p.5495-5500, 28 mai. 1996.
- NEJSUM, L. N. The renal plumbing system: aquaporin water channels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 15, p.1692-1706, 28 mai. 2005.
- PAYNE, J.A.; FORBUSH, B. Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, p.4544, 1994.
- POLLER, Jonh P.; EATON, Douglas C. **Fisiologia Renal de Vander**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- POTTER, E. A.; STEWART, G.; SMITH, C. P. Urea flux across MDCK-mUT-A2 monolayers is acutely sensitive to AVP, cAMP, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 291, n. 1, p.122-128, jul. 2006.
- PRESTON, G. M. et al. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. **J Bio Chem**, v. 268, n. 1, p. 17-20, jan. 1993.
- QIAN, X. et al. Modulation of kidney urea transporter UT-A3 activity by alpha2,6-sialylation. **Pflugers Arch**, v. 468, n. 7, p.1161–1170, Jul 2016.
- RANADE, K. et al., Genetic variation in the human urea transporter-2 is associated with variation in blood pressure. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 19, p.2157–2164. 2001.
- ROMERO, M. F.; HEDIGER, M. A.; BOULPAEP, E. L. & BORON, W. F. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na<sup>+</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. **Nature** v. 387, p. 409–413. 1997.
- SANDS, J. M. et al. Urinary concentrating ability in patients with Jk (a-b-) blood type who lack carrier-mediated urea transport. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, n. 12, p.1689-1696, feb. 1992.
- SANO, T.; VAJDA, S.; CANTO, C. R. Genetic engineering of streptavidin, a vesatilie affinity tag. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**. v. 715, p. 85-91, Set 1998.
- SHAYAKUL, C.; STEEL, A.; HEDIGER, M.A. Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts. **J. Clin. Invest**, v. 98, p.2580–2587, 1996.
- SHAYAKUL, C.; CLÉMENÇON, B.; HEDIGER, M. A. The urea transporter family (SLC14): Physiological, pathological and structural aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2-3, p.313-322, abr. 2013.
- SINGH, S. K.; BINDER, H. J.; GEIBEL, J. P.; BORON, W. F. An apical permeability barrier to NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in isolated, perfused colonic crypts. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 92, n. 25, p. 11573-11577, dez. 1995.

- SIVE, H. L. GRAINER; R. M. HARLAND, M. R. Isolation of *Xenopus* oocytes. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 12, , p. 13734–1376, 2010.
- SMITH, Steven O et al. Implications of Threonine Hydrogen Bonding in the Glycophorin a Transmembrane Helix Dimer. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 5, p. 2476-2486, maio 2002.
- SMITH, C. P. Mammalian urea transporters. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 2, p.180-185, jan. 2009.
- SPECTOR, David A.; YANG, Qing; WADE, James B. High urea and creatinine concentrations and urea transporter B in mammalian urinary tract tissues. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 1, p. 467-474, jan. 2007.
- STEWART, G. S. et al. The basolateral expression of mUT-A3 in the mouse kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 5, p. 979-987, mai. 2004.
- STEWART, G.S. et al. Vasopressin regulation of the renal UT-A3 urea transporter. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. v. 296, p. 642-648, 2009.
- STEWART, Gavin. The emerging physiological roles of the SLC14A family of urea transporters. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 7, p. 1780-1792, nov 2011.
- SU, H. et al. Glycoforms of UT-A3 Urea Transporter with Poly-N-Acetyllactosamine Glycosylation Have Enhanced Transport Activity. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 303, n. 2, p. 201-208. 2012.
- SUN, A., et al. Vasopressin alters the mechanism of apical Cl<sup>-</sup> entry from Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> to Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup> cotransport in mouse medullary thick ascending limb. **J. Membr. Biol.** v. 120, p. 83–94, 1991.
- TOON, Michael R.; SOLOMON, A. K. Modulation of water and urea transport in human red cells: effects of pH and phloretin. **The Journal of Membrane Biology**. v. 99, n. 3, p. 157-164, nov. 1987.
- TRINH-TRANG-TAN, M-M. et al. UT-B1 proteins in rat: tissue distribution and regulation by antidiuretic hormone in kidney. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 283, n. 5, p.912-922, nov. 2002.
- TSIATIS, A. C. et al. Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 4, p. 425–432. 2010.
- UCHIDA, S. et al. Impaired urea accumulation in the inner medulla of mice lacking the urea transporter UT-A2. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, n.16, p.7357–7363, ago. 2005.
- VALLES, P. et al. Kidney Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: Physiology and Regulation. **Seminars in Nephrology**, v. 26, n. 5, p.361–374. 2006.
- VERKMAN, A.S. Roles of Aquaporins in Kidney Revealed by Transgenic Mice. **Seminars in Nephrology**, v. 26, n. 3, p.200-208, mai. 2006.
- VIRKKI L. V. et al. Cloning and functional characterization of a novel aquaporin from *Xenopus laevis* oocytes. **J Biol Chem**, v 277, n 25, p. 40610-40616, nov. 2002.
- WADE, J. B. et al. UT-A2: a 55-kDa urea transporter in thin descending limb whose abundance is regulated by vasopressin. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 278, n. 1, p. 52-62, jan. 2000.
- WEINER, I. D.; HAMM, L. L. Molecular Mechanisms of Renal Ammonia Transport. **Annual Review of Physiology**, v. 69, n. 1, p.317–340. 2007
- WEINER, I. D.; VERLANDER, J. W. Renal Ammonia Metabolism and Transport. **Comprehensive Physiology**, p.201-220, jan. 2013.
- YANG, B.; VERKMAN, A.S. Urea transporter UT3 functions as an efficient water channel. Direct evidence for a common water/urea pathway. **J. Biol. Chem.** v.273, p.9369–9372, 1998.

- YANG, B. et al. Urea-selective Concentrating Defect in Transgenic Mice Lacking Urea Transporter UT-B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p.10633-10637, jan. 2002.
- YANG, Baoxue; BANKIR, Lise. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 288, n. 5, p. 881-896, maio 2005.
- YOU, G. et al. Cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter. **Nature**, v. 365, p. 844–847. 1993.
- WADE, J. B. et al. UT-A2: a 55-kDa urea transporter in thin descending limb whose abundance is regulated by vasopressin. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 278, n. 1, p. 52-62, jan. 2000.
- WAISBREN, Steven J.; GEIBEL, John P.; MODLIN, Irvin M.; BORON, Walter F. Unusual permeability properties of gastric gland cells. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 332-335, mar. 1994.
- ZATZ, R. (Ed.); SEGURO, A. C. (Ed); MALNIC G. (Ed). **Bases fisiológicas da nefrologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2012.
- ZHAI, X. et al. Aquaporin-1 Is not Expressed in Descending Thin Limbs of Short-Loop Nephrons. **Journal of The American Society of Nephrology**, v. 18, n. 11, p. 2937-2944, out. 2007.

*Neydiana Belize de Pina Lopes*

---

Neydiana Belize de Pina Lopes