

ÉRIKA YUMI TANIGUCHI

**pH intracelular nos neurônios dos gânglios
das raízes dorsais**

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

Área de concentração: Fisiologia e Biofísica

Orientador: Antonio Carlos Cassola

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

TANIGUCHI, É. Y. **pH intracelular dos neurônios dos gânglios das raízes dorsais**. 2017. 65 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo do trabalho foi determinar o pH_i , a capacidade tamponante do citosol na ausência de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (β_i) de neurônios dos gânglios das raízes dorsais e investigar a expressão de trocadores Na^+/H^+ e sua função na regulação do pH_i . O pH_i foi estimado com o indicador fluorescente BCECF. A operação do trocador era quantificada na recuperação da acidose intracelular induzida experimentalmente. Na ausência do tampão $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ a taxa de alcalinização (k) deve-se, por hipótese, ao transporte de H^+ pelo trocador. A hipótese foi confirmada pela ação de agentes farmacológicos, *e.g.*, amiloride. Em soluções tamponadas por $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ as células tem pH_i de 7,24 e, em soluções tamponadas com HEPES, 7,04. A β_i foi de 8,17 mM/pH. As células se recuperam da acidose com k médio de $0,0138 \text{ s}^{-1}$. O efeito inibitório do amiloride em concentração de 1 mM deve-se ao fato dos fenótipos celulares expressarem diferentes isoformas do trocador. Segundo RT-PCR, todas as 5 isoformas do trocador são expressas e a quantidade de RNAm, avaliada por qPCR, é maior para a NHE1, seguida de NHE5.

Palavras-chaves: trocador Na^+/H^+ . pH intracelular. Neurônio sensorial. Microscopia de fluorescência. Rato wistar.

ABSTRACT

TANIGUCHI, É. Y. **Intracellular pH in neurons of dorsal root ganglia**. 2017. 65 p. Master thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The objective here was to determine intracellular pH (pH_i), cytosolic buffering power in $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ free medium (β_i) of neurons from dorsal root ganglia and to investigate the functional expression of the Na^+/H^+ exchangers in the regulation of pH_i . pH_i was estimated with fluorescence indicator BCECF. Exchanger operation was quantified during recovery from intracellular acidification induced experimentally. In $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ free medium the alkalization rate (k) is due, hypothetically, H^+ extrusion by the exchanger. This assumption was confirmed by action of pharmacologic agents, *e.g.*, amiloride. In medium buffered with $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ cells have pH_i of 7.24 and, in medium buffered with HEPES, 7.04. β_i calculated was 8.17 mM/pH. Cells recovery from acidosis with mean k of 0.0138 s^{-1} . Inhibitory effect of amiloride in 1 mM concentration is due to cellular phenotypes expressing different Na^+/H^+ exchanger isoforms. According to RT-PCR, all the five exchanger isoforms are expressed and mRNA quantity, evaluated by qPCR, is greater to NHE1, followed by NHE5.

Keywords: Na^+/H^+ exchanger. Intracellular pH. Sensory neuron. Fluorescence microscopy. Wistar rat.

INTRODUÇÃO

1.1 Neurônios e outros fenótipos nos gânglios da raiz dorsal

Neurônios são células especializadas em processamento de informações. Estas são codificadas em sinais elétricos, sejam respostas graduadas, nas sinapses e nos receptores, sejam potenciais de ação. Tais sinais elétricos dependem de canais para íons das membranas celulares, implantados na capacitância da bicamada lipídica (HILLE, 2001). Toda a percepção sensorial do corpo, menos a da cabeça, depende de neurônios cujos corpos celulares estão nos gânglios nas raízes dorsais (GRD) da medula espinhal. Os neurônios sensoriais efetuam a transdução, codificação das várias modalidades sensoriais em sinais elétricos, e a transmissão desses sinais ao sistema nervoso central. Por estarem fora da proteção da barreira hematoencefálica os neurônios são suscetíveis a substâncias transportadas pelo sangue. Nos gânglios há um grupo heterogêneo de neurônios, cujos corpos celulares diferem em tamanho e que servem a diferentes modalidades sensoriais (BASBAUM et al., 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001; LAWSON, 2002; PETRUSKA et al., 2000; REICHLING et al., 2013). Os neurônios são pseudounipolares, isto é, o axônio se divide em dois ramos, um para a periferia e outro para a medula espinhal. Não possuem dendritos. Os corpos celulares estão agrupados e não há sinapses entre os neurônios. Estes corpos celulares expressam variados tipos de canais para íons, dependentes de voltagem ou não, alguns em elevadas densidades. Cada corpo celular é envolto por uma camada de células gliais, chamadas de células satélites. A relação funcional entre neurônio e glia não está esclarecida. Sabe-se que os neurônios secretam adenosina 5 trifosfato (ATP) e as células gliais possuem receptores purinérgicos de vários tipos (GU et al., 2010; HANANI, 2005; HANANI, 2012), mas além dessa informação, o mais são especulações.

Como os corpos celulares podem ser mantidos isolados em culturas, e como os neurônios expressam significativamente vários tipos de canais para íons, historicamente os neurônios foram utilizados para a análise biofísica e farmacológica deles (MELLI; HÖKE, 2009). Notadamente concentrou-se nestes neurônios a investigação de fármacos com ação anti-álgica e, por isto, de interesse terapêutico (DAVIDSON et al., 2014; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; KISHI et al., 2002; REICHLING et al., 2013; VINCENT et al., 2009).

1.2 A questão do controle da concentração do íon H (H⁺) no compartimento intracelular em neurônios e em outros fenótipos celulares

O H⁺ é o núcleo do átomo de hidrogênio que, no caso do isótopo de massa 1, é um próton. Pelo seu tamanho diminuto, o intenso campo elétrico no espaço próximo torna o H⁺ extremamente reativo. Pela definição de Brønsted, um ácido é qualquer espécie química que possa doar H⁺; e uma base é qualquer espécie química que pode receber H⁺. As dissociações dos ácidos e as associações das bases aos prótons são reações reversíveis, cujos equilíbrios são determinados pelas concentrações dos ácidos ou bases não dissociados, pela [H⁺] e pela constante de dissociação (K_a) da base ou ácido não dissociados. Dadas as baixas concentrações do próton em solução aquosa, desde 1924 adotou-se, para indicar concentração do H⁺ nas soluções, a variável pH.

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

O conceito foi introduzido antes, em 1909, por Sørensen, como *p* [H⁺]. O conceito por sua conveniência ganhou uso universal: uma solução neutra tem pH 7; raramente se pensa na [H⁺], que é de 10⁻⁷ mol/l.

Na condição de equilíbrio para um único ácido dissolvido em água, HA, o pH da solução será dado pela equação de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

Em que pK_a = -log(K_a), isto é, negativo do logaritmo da constante de dissociação aparente; [A⁻] é a concentração da base conjugada, que se forma pela dissociação do ácido.

Em qualquer fenótipo celular o metabolismo, característico dos fenômenos biológicos, produz, preponderantemente, ácidos. Há produção de ácidos fixos e de ácidos voláteis, o gás carbônico (CO₂), que se dissolvem nas soluções aquosas das células e, ao fazê-lo, reagem com a água, formando o ácido carbônico (H₂CO₃). Este se dissocia em H⁺ e bicarbonato (HCO₃⁻). Os ácidos fixos não são gases nas temperaturas compatíveis com a vida.

A dissociação em próton e ânions contribuirá para o aumento na concentração do H^+ . O metabolismo, portanto, contribui para o aumento da concentração de H^+ intracelular.

O H^+ distribui-se, no citosol, entre dois compartimentos: um químico, constituído pelos tampões, e outro constituído pela solução aquosa – na qual existe na maior parte do tempo em associação com a água, formando o cátion hidrônio (H_3O^+).

Os tampões são compartimentos químico, constituídos por pares de ácido e base conjugada, que ligam ou dissociam o H^+ amortecendo, mas não anulando, as flutuações de pH quando quantidades de ácidos ou bases são adicionadas ao citosol.

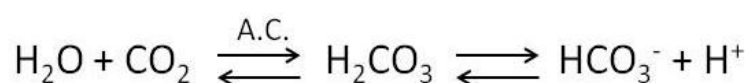
A relação entre a adição de um ácido a um sistema tampão e a variação do pH não é linear e é caracterizada pela constante de dissociação dos seus componentes, K:

$$K = \frac{[B^n][H^+]}{[HB^{(n+1)})}$$

Na equação acima, $HB^{(n+1)}$ é a concentração do ácido fraco e B^n é a concentração da base conjugada.

A capacidade tamponante depende da soma de efeitos de todos os tampões da célula, e é expressa na unidade $mM/\Delta pH_i$ (ácido adicionado/variação de pH). Os tampões, que pelo princípio isohídrico amortecem as variações do pH intracelular (pH_i) para uma dada sobrecarga de ácido, são separados em duas categorias: tampão CO_2/HCO_3^- (β_{CO_2}) e capacidade tamponante intrínseca (β_i), dada pelos demais tampões.

O sistema tamponante CO_2/HCO_3^- , a que se deve a fração da β_{CO_2} das células, é quantitativamente o tampão mais relevante do compartimento extracelular, apesar de o pK_a ser de 6,8 para um pH do plasma de 7,4. A predominância quantitativa do tampão deve-se à pCO_2 plasmática, que determina a concentração de CO_2 no plasma, ser regulada pela respiração. A reação de hidratação do CO_2 esta esquematizada abaixo:



A hidratação espontânea do CO_2 é lenta, mas é catalisada pela anidrase carbônica (A.C.), enzima de ampla ocorrência nos tecidos. O H_2CO_3 formado é um ácido fraco que rapidamente se dissocia em HCO_3^- e H^+ .

É possível estimar o pH plasmático através da concentração de CO_2 e HCO_3^- do plasma utilizando a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{s \cdot \text{pCO}_2}$$

Na equação, HCO_3^- é a base conjugada e CO_2 , o ácido. Segundo a lei de Henry, a concentração de CO_2 dissolvida no meio líquido é proporcional a pressão parcial do gás (pCO_2), e da sua solubilidade na fase líquida aquosa (s).

Considerando-se o compartimento intracelular, a concentração do CO_2 varia pouco com a adição de ácidos, pois está determinada pela concentração extracelular, regulada pela ventilação pulmonar. Por esta razão o tampão é quantitativamente importante na regulação do pH_i , apesar da disparidade entre o pK_a do sistema tampão e o pH do plasma, arterial ou venoso.

A β_i , capacidade tamponante conferida por outros tampões que não o $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, pode ser definida como a quantidade de base forte (B), ou ácido forte (A), a ser adicionada à solução necessária para aumentar, ou diminuir, o pH em uma unidade.

$$\beta_i = \frac{\Delta B}{\Delta \text{pH}_i} = - \frac{\Delta A}{\Delta \text{pH}_i}$$

A β_i pode ser determinada pela variação de pH_i dada pela exposição da célula a uma base ou a um ácido fraco (ROOS; BORON, 1981). Estimativas da β_i de neurônios e células gliais ficam entre 5 e 30 mM (AMOS; RICHARDS, 1996; CHESLER, 2003), o que significa considerável capacidade de tamponar ácidos nos neurônios.

A produção de ácidos pelo metabolismo tende, apesar da capacidade tamponante do citosol, a reduzir o pH da solução citoplasmática a níveis intoleráveis para os eventos bioquímicos da célula, se o íon não for transportado, na membrana celular, para fora da célula. Modificações na estrutura 3D das proteínas são fortemente determinadas pelo pH. Há resíduos de aminoácidos com caráter ácido (carboxilas) ou básico (grupamentos amina),

cujo nível de protonação terá impacto nestas estruturas 3D das moléculas, alterando-lhes a função e, em níveis hierárquicos mais altos, a fisiologia da célula. Interessa-nos, em particular, as modificações com alterações funcionais nos canais iônicos.

Se a distribuição do H^+ na membrana celular plasmática fosse passiva, de equilíbrio termodinâmico, por um transporte passivo – difusão pela bicamada ou canal – o pH_i seria ácido (CHESLER, 1990; ROSS; BORON, 1981; THOMAS, 1984). Para um pH extracelular de 7,4 e uma diferença de potencial elétrico de -60 mV na membrana celular, calcula-se, pela equação de Nernst, que o pH_i de equilíbrio seria da ordem de 6,4, significativamente abaixo dos valores medidos para o pH_i , em torno de 7,0, encontrado na maioria das células (ROSS; BORON, 1981; TAKAHASHI; COPENHAGEN, 1996). Portanto, em condições estacionárias a força movente – potencial eletroquímico para o íon H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$) – para o próton o arrastaria para dentro da célula, caso a membrana o permitisse. Com a produção contínua de ácido pelo metabolismo celular, transportadores de próton para fora da célula ou de base para dentro são necessários para que o pH_i seja mantido nos níveis estacionários.

Cada fenótipo celular apresenta, além dos tampões, um repertório de mecanismos de transporte de H^+ e de bases na membrana celular. A operação destes transportadores é essencial para a regulação do pH_i na produção continuada de ácidos pelo metabolismo.

1.3 Transportadores de H^+ e de bases na membrana celular plasmática

1.3.1 Trocador Na^+/H^+

Ubíquo nos neurônios e em outros fenótipos celulares é o trocador Na^+/H^+ (DONOWITZ et al., 2013; MAHNENSMITH; ARONSON, 1985; ROOS; BORON, 1981). Nas células do padrão eucariótico o trocador é uma proteína integral de membrana. Em condições fisiológicas, nas diferenças de potencial químico para o Na^+ e para o H^+ , o trocador transporta Na^+ para dentro e H^+ para fora. Com estequiometria 1:1, o transportador não é reogênico e evita o campo elétrico na membrana como força determinante do fluxo acoplado dos íons (ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2004). Considerado a principal via de transporte de H^+ para fora de neurônios e astrócitos, há diferentes isoformas do trocador Na^+/H^+ ,

codificadas pela família de gene Slc9. Esta família compreende 3 subfamílias: Slc9a, Slc9b e Slc9c (DONOWITZ et al., 2013; FUSTER; ALEXANDER, 2014).

As nove isoformas da subfamília Slc9a nos mamíferos compartilham 25 a 70% da sequência dos aminoácidos. Provavelmente as topologias das isoformas na membrana são semelhantes, com segmento N-terminal e C-terminal no citoplasma e 12 segmentos transmembrânicos (KHADILKAR et al., 2001; ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2004; SLEPKOV et al., 2007). No subgrupo há cinco isoformas na membrana plasmática, NHE1 a NHE5, e outras quatro nas membranas de organelas intracelulares, NHE6 a NHE9. A estrutura tridimensional do trocador Na^+/H^+ de mamíferos ainda não foi completamente determinada. Deduziu-se por cristalografia e difração de Raio X a estrutura com resolução 3D do trocador Na^+/H^+ de *E. coli*. (HUNTE et al., 2005; PADAN et al., 2009). A semelhança das estruturas primárias do trocador nos padrões procarióticos e eucarióticos suporta inferências de semelhanças nas estruturas 3D.

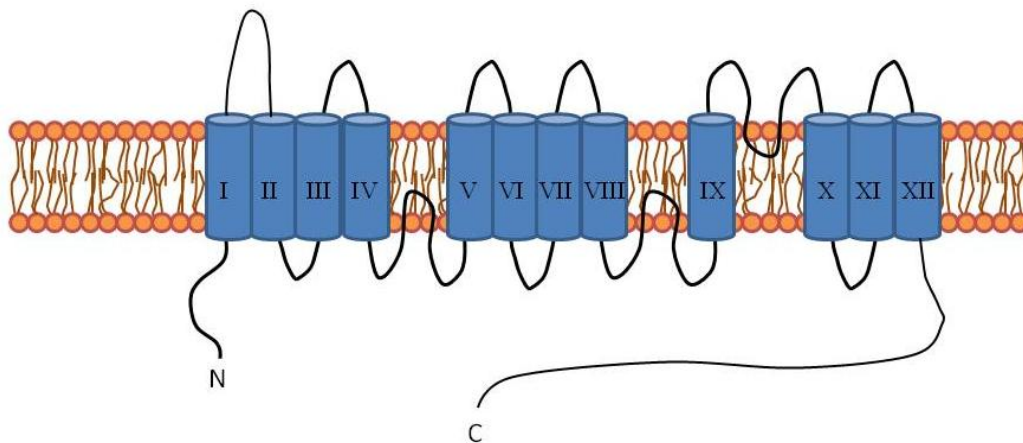


Figura 1 - Topologia comum dos NHEs. Os terminais N e C são citoplasmáticos. Os 12 segmentos na membrana têm estrutura secundária de α -hélices (domínios funcionais).

1.3.1.1 NHE1

Das nove isoformas o NHE1 é expresso em praticamente todos os tipos de tecidos de mamíferos. O NHE1 tem funções essenciais nas células (“housekeeping”), como na regulação do pH_i e do volume celular (MALO; FLIEGEL, 2006). Por regular o pH e o volume celular o NHE1 está envolvido com outros processos fisiológicos, tais como crescimento, migração e proliferação celular e apoptose (DENKER; BARBER, 2002; PUTNEY et al., 2002), e em muitas

doenças, como insuficiência cardíaca, câncer e hipertrofia de órgãos (MAHNENSMITH; ARONSON, 1985; FUSTER; ALEXANDER, 2014). A hiperatividade deste transportador torna o meio citosólico mais alcalino, e se constitui em estímulo para a neoplasia (HARGUINDEY et al., 2005). A inibição de NHE1 em células cancerígenas vem sendo cogitada como tratamento para o câncer (RESHKIN et al., 2014). Camundongos nos quais se fez nocaute (KO) do gene NHE1 têm taxa de crescimento pós-natal reduzida e mortalidade elevada (BELL et al., 1999).

1.3.1.2 NHE2

A isoforma NHE2 é intensamente expressa em tecidos como o de rins e de estômago (FUSTER; ALEXANDER, 2014; HANNER et al., 2008). Camundongos KO apresentam hipocloridria decorrente da redução de células parietais gástricas viáveis e comprometimento da barreira intestinal (FUSTER; ALEXANDER, 2014). No sistema nervoso central a expressão de NHE2 é encontrada no córtex cerebral de ratos recém-nascidos (MA; HADDAD, 1997).

1.3.1.3 NHE3

NHE3 é estratégico para o transporte epitelial de Na^+ , HCO_3^- e água; por ele se dá a maior parte da reabsorção de Na^+ em rins e absorção de Na^+ nos intestinos (DONOWITZ et al., 2013). Localizado na membrana celular plasmática, essa isoforma também foi encontrada em vesículas endossômicas subapicais de microvilosidades. Como um reservatório de transportadores funcionais, as vesículas acrescentam ou diminuem a densidade do trocador da borda em escova, em resposta a sinais hormonais (CHOW et al., 1999; ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2004).

1.3.1.4 NHE4

NHE4 é expresso predominantemente no estômago e no intestino e em menor quantidade no rim, hipocampo, útero e músculo esquelético (DONOWITZ et al., 2013; FUSTER; ALEXANDER, 2014). Gawenis et al. (2005) demonstraram, utilizando camundongos

KO, que esta isoforma em células parietais gástricas está envolvida na regulação do volume celular e das concentrações iônicas intracelulares para a secreção ácida. Esta isoforma é relativamente insensível aos inibidores amiloride e 5-(N-etil-N-isopropil)-amiloride (EIPA) (CHAMBREY et al., 1997; DONOWITZ et al., 2013; FUSTER; ALEXANDER, 2014).

1.3.1.5 NHE5

RNAm de NHE5 é expresso principalmente no cérebro, tanto de rato, quanto de humanos (ATTAPHITAYA et al., 1999); É encontrado na membrana plasmática, e em vesículas endossômicas (ORLOWSKI; GRINSTEIN, 2007; SZÁSZI et al., 2002). Este trocador também já foi observado, em menor quantidade, em outros tecidos como testículo, baço e músculo esquelético (ATTAPHITAYA et al., 1999). Foi sugerido que NHE5 controle o crescimento de espinho dendrítico em sinapses de neurônios do hipocampo através de um mecanismo de retroalimentação negativa autócrino dependente de pH (DIERING et al., 2011).

1.3.1.6 Inibidores de trocadores de Na^+/H^+

Diversos inibidores dos trocadores de Na^+/H^+ foram descritos na literatura. A primeira droga descrita como inibidora de NHE foi o amiloride (BENOS, 1982). As isoformas são inibidas pelo amiloride com afinidades diferentes (KHADILKAR et al., 2001; MASEREEL et al., 2003). Existem inibidores mais potentes, que distinguem as várias isoformas, como os derivados do amiloride, EIPA e cariporide (MASEREEL et al., 2003).

Todas as cinco isoformas de NHE encontradas na membrana plasmática são sensíveis ao inibidor EIPA em concentrações de μM . A seletividade do EIPA, segundo Masereel et al. (2003) e Orłowski e Grinstein (2004), pelas isoformas do trocador está da seguinte ordem: $\text{NHE1} > \text{NHE2} > \text{NHE5} > \text{NHE3} > \text{NHE4}$. A concentração inibitória resultando em 50% do efeito máximo (IC_{50}) do EIPA para NHE1 é de 25 nM, enquanto que para NHE4 o valor é superior a 10 μM (CHAMBREY et al., 1997).

1.3.2 Transportadores de base

Outros transportadores comuns na membrana plasmática que podem regular o pH_i são os transportadores de base da família Slc4. Todos os membros desta família são proteínas de membrana integrais que podem transportar HCO_3^- ou CO_3^{2-} , juntamente com pelo menos um íon monoatômico, normalmente Na^+ ou Cl^- . Há três grupos distintos na família, separados de acordo com os íons que são transportados juntamente com o HCO_3^- (ROMERO et al., 2013).

1.3.2.1 Cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$

O cotransportador $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ carrega a base utilizando energia proveniente de potencial eletroquímico para Na^+ ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$). O sentido do cotransporte é determinado pela estequiometria dos íons envolvidos. Assim o cotransporte $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ com estequiometria de 1:3, que leva 2 cargas negativas para fora da célula, tem a direção do transporte dos íons para fora, determinada pelo campo elétrico de membrana. Há também transportadores com estequiometria de 1:2 e de 1:1. Nestes o balanço de energia livre determina que ambos os íons sejam transportados do compartimento extra para o intracelular; portanto, transportam base para o citoplasma ou o que é equivalente, em termos de ácidos e bases, ácido para fora. A droga mais utilizada para inibir estes transportadores é o ácido estilbeno disulfônico (DIDS) (PARKER; BORON, 2013).

1.3.2.2 Trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

Conhecidos também como trocadores aniônicos, AE, possui apenas três membros, AE1-AE3; o AE1 foi o primeiro da família a ser identificado e clonado. O AE1 é conhecido também como proteína da “banda 3”, devido a sua posição em corrida de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida de proteínas de membrana de eritrócitos (ROMERO et al., 2013). O movimento resultante dos íons transportados depende das diferenças de potencial químico para um e para outro, que é variável nos fenótipos e em diferentes circunstâncias fisiológicas para um mesmo fenótipo.

1.3.2.3 Trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ movido por Na^+

Trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ movido por Na^+ , NDCBE, pode ser encontrado em células neuronais e não neuronais de vertebrados, incluindo cérebro, espermatozoides, células do endotélio vascular, rim e células β -pancreáticas (WANG et al., 2000). Com estequiometria de 1:1:2 ($\text{Na}^+ : \text{Cl}^- : \text{HCO}_3^-$) este transportador, pelo balanço das energias livres dos íons envolvidos, transporta a base para dentro da célula (ROOS; BORON, 1981).

1.3.3 Outros transportadores

Transportadores de H^+ são, ainda, a bomba de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ da membrana celular plasmática. Trata-se, de fato, de um transporte ativo primário, acoplado ao ATP, que faz transporte do Ca^{2+} para o extracelular. O acoplamento com o transporte de H^+ para dentro reduz o efeito do campo elétrico de membrana no balanço de energias livres do transportador, mas resulta no transporte de ácido para o intracelular. Nos surtos de atividade da bomba, o transporte de H^+ para o citoplasma deve ser compensado por outros transportadores de ácido para que se mantenha o pH_i .

Em anos mais recentes a descrição de canais para H^+ (Hv) tem ganhado espaço na literatura (DECOURSEY, 2008); a consideração deles na fisiologia das células se torna obrigatória. A estrutura molecular básica dos canais Hv é o módulo sensor de voltagem dos canais dependentes de voltagem para cátions: 4 alfa hélices, que topologicamente se localizam na membrana celular. A quarta hélice contém cargas positivas, por resíduos de lisina e arginina protonados, e cargas negativas, estabilizadoras da estrutura, distribuídas pelas 3 outras hélices. Estes canais, portanto, são sensíveis a voltagem. Tratando-se de canais, o fluxo por eles é passivo, a favor da diferença de potencial eletroquímico. O sentido do fluxo de H^+ dependerá dos valores do pH_i e da diferença de potencial elétrico na membrana.

1.4 Transportadores em neurônios

Neurônios do sistema nervoso central – do hipocampo, do córtex cerebral, do cerebelo, da medula espinhal e da retina – expressam o trocador Na^+/H^+ , como um dos principais mecanismos para o transporte de ácido (RITUCCI et al., 1998; RUFFIN et al., 2014). Os neurônios podem ainda apresentar transportadores de bicarbonato na membrana. Camundongos KO de transportadores de ácido da família Slc4 tendem a exibir redução na excitabilidade (RUFFIN et al., 2014). A expressão ou importância fisiológica destes mecanismos variam entre os diferentes tipos de neurônios (CHESLER, 2003; KERSH et al., 2009; RITUCCI et al., 1998; RUFFIN et al., 2014). Abaixo, alguns exemplos de neurônios e seus diversos transportadores.

1.4.1 Neurônios do Hipocampo

A regulação do pH_i em neurônios do hipocampo de ratos ocorre principalmente por um NHE insensível ao amiloride e seus derivados (CHESLER, 2003). A predominância de um trocador Na^+/H^+ com baixa sensibilidade ao amiloride distingue os neurônios do hipocampo da grande maioria das células. Atualmente, não se tem conhecimento de qual seria essa isoforma. Diering et al. (2011) estudaram a atividade de NHE5 na região sináptica em camundongos e sugerem que o trocador atua como um regulador negativo de crescimento de espinhos dendríticos. Quanto aos transportadores de base, há evidências pelo menos de expressão de NDCBE em ratos (BEVENSEE et al., 1996).

1.4.2 Neurônios do Córtex Cerebral

A recuperação da acidificação intracelular em neurônios do córtex cerebral de ratos e camundongos ocorre, segundo a literatura, principalmente por NHE sensível ao amiloride (CHESLER, 2003). Ma e Haddad (1997) detectaram em ratos recém-nascidos a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de NHE1, NHE2 e NHE4 nesta região que aumentava com o desenvolvimento dos ratos. Um estudo com córtex de camundongo sugeriu a expressão de um trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependente de Na^+ , além do trocador Na^+/H^+ , atuando na recuperação do pH do neurônio após a acidificação intracelular induzida (PEDERSEN et al., 1998). Segundo Chen et al. (2008), a proteína NDCBE é altamente expressa no córtex de

camundongo. O trocador aniônico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ é intensamente expresso nos neurônios, segundo uma análise de western blotting (RUFFIN et al., 2014).

1.4.3 *Neurônios do Cerebelo*

Segundo Ma e Haddad (1997), ratos recém-nascidos expressam RNAm para os genes NHE1, NHE2, NHE3 e NHE4 no cerebelo, porém apenas a expressão de RNAm de NHE3 se eleva com a idade, enquanto a expressão das outras três isoformas diminuem. Até há pouco tempo acreditava-se que a expressão de NHE3 era restrita apenas às células de Purkinje. O pH_i das células em meio sem HCO_3^- apresenta um valor de repouso maior que as células em meio contendo HCO_3^- (CHESLER, 2003), indicando que há pelo menos um transportador de ácido via trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$.

1.4.4 *Neurônios da Medula oblonga*

Os neurônios da medula oblonga possuem formas e funções heterogêneas. Parte destes neurônios são quimiossensíveis, sensíveis às concentrações de CO_2 ou de H^+ (CHESLER, 2003). Nas várias regiões da estrutura a recuperação de uma acidificação é mediada por diversas isoformas dos trocadores de Na^+/H^+ sensíveis a amiloride. Dentre as isoformas, a isoforma NHE3 possui maior papel nas células quimiossensíveis (WIEMANN; BINGMANN, 2001).

CONCLUSÃO

O pH intracelular em neurônios do gânglio da raiz dorsal foi medido nas células em cultura, em duas condições, em soluções extracelulares tamponadas por $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ e em soluções tamponadas por HEPES e equilibradas com ar atmosférico. Na ausência de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ os transportadores de base na membrana celular não operam e a capacidade tamponante do citoplasma, decresce. O pH intracelular estacionário é mais próximo da neutralidade nestas condições. Na solução extracelular tamponada com HEPES o principal transportador de ácido na membrana celular plasmática é o trocador Na^+/H^+ , cuja operação – taxa de transporte – foi quantificada. A sua sensibilidade a amiloride e derivado foi demonstrada e aspectos termodinâmicos do transportador, como a sua dependência da diferença de potencial químico para o Na^+ foi evidenciada. Por técnicas de Biologia Molecular, verificou-se que todos os genes que codificam as isoformas do trocador na membrana celular plasmática foram expressos, com predominância daqueles cujos produtos são as isoformas NHE1 e a NHE5.

REFERÊNCIAS*

AMOS, B. J.; RICHARD, C. D. Intrinsic hydrogen ion buffering in rat CNS neurones maintained in culture. **Exp. Physiol.**, Great Britain, v. 81, p. 261–271, 1996.

ATTAPHITAYA, S.; PARK, K.; MELVIN, J.E. Molecular cloning and functional expression of a rat Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5) highly expressed in brain. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 4383–4388, 1999.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BELL, S. M.; SCHREINER, C. M.; SCHULTHEIS, P. J.; MILLER, M. L.; EVANS, R. L.; VORHEES, C. V.; SHULL, G.E.; SCOTT, W.J. Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. C788-C795, 1999.

BENOS, D. J. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. C131-C145, 1982.

BEVENSEE, M. O.; CUMMINS, T. R.; HADDAD, G.G., BORON, W. F., BOYARSKY G. pH regulation in single CA1 neurons acutely isolated from the hippocampi of immature and mature rats. **J. Physiol.**, v. 494.2, p. 315-328, 1996.

CHAMBREY, R.; ACHARD, J.; WARNOCK, D. G. Heterologous expression of rat NHE4: a highly amiloride-resistant Na⁺/H⁺ exchanger isoform. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. C90-C98, 1997.

CHEN, L.; KELLY, M. L.; PARKER, M. D.; BOUYER, P.; GILL, H. S.; FELIE, J. M.; DAVIS, B. A.; BORON, W. F. Expression and localization of Na-driven Cl-HCO₃ exchanger (SLC4A8) in rodent central nervous system. **Neuroscience**, v. 153, p. 162-174, 2008.

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

CHESLER, M. The regulation and modulation of pH in the nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v. 34, p. 401-427, 1990.

CHESLER, M. Regulation and modulation of pH in the brain. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 1183-1221, 2003.

CHOW, C.; KHURANA, S.; WOODSIDE, M.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. The epithelial Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, is internalized through a clathrin-mediated pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 53, p. 37551-37558, 1999.

DAVIDSON, S.; COPITS, B. A.; ZHANG, J.; PAGE, G.; GHETTI, A.; GEREAU IV, R. W. Human sensory neurons: Membrane properties and sensitization by inflammatory mediators. **Pain**, v. 155 n. 9 p. 1861-1870, 2014.

DECOURSEY, T. E. Voltage-gated proton channels. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 2554-2573, 2008.

DENKER, S. P.; BARBER, D. L. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. **J. Cell Biol.**, v. 159, n. 6, p. 1087-1096, 2002.

DIERING, G. H.; MILLS, F., BAMJI, S. X.; NUMATA, M. Regulation of dendritic spine growth through activity-dependent recruitment of the brain-enriched Na⁺/H⁺ exchanger NHE5. **Mol. Biol. Cell.**, v. 22, p. 2246-2257, 2011.

DONOWITZ, M.; TSE, C. M.; FUSTER, D. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. **Mol. Asp. Med.**, v. 34, p. 236-251, 2013.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J. Clin. Invest.**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.

FUSTER, D. G.; ALEXANDER, R. T. Traditional and emerging roles for the SLC9 Na⁺/H⁺ exchangers. **Pflugers. Arch.**, v. 466, n. 1, p. 61-76, 2014.

GAWENIS, L. R.; GREEB, J. M.; PRASAD, V.; GRISHAM, C.; SANFORD, L. P.; DOETSCHMAN, T.; ANDRIGA, A.; MILLER, M. L.; SHULL, G. E. Impaired Gastric Acid Secretion in Mice with a Targeted Disruption of the NHE4 Na⁺/H⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 13, p. 12781-12789, 2005.

GU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; LI, G. W.; WANG, C.; MAE-HUANG, L. Y. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. **Neuron Glia Biol.**, v. 6, p. 53-62, 2010.

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Res. Ver.**, v. 48, n. 3, p. 457-476, 2005.

HANANI, M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: Implications for chronic pain. **Brain Res.**, v. 1487, p. 183-191, 2012.

HANNER, F.; CHAMBREY, R.; BOURGEOIS, S.; MEER, E.; MUCSI, I.; ROSIVALL, L.; SHULL, G. E.; LORENZ, J. N.; ELADARI, D.; PETI-PETERDI, J. Increased renal renin content in mice lacking the Na⁺/H⁺ exchanger NHE2. **Am. J. Physiol.**, v. 294, p. F937-944, 2008.

HARGUINDEY, S.; ORIVE, G.; PEDRAZ, J. L.; PARADISO, A.; RESHKIN, S. J. The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin - one single nature. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1756, p. 1-24, 2005.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 2001.

HUNTE, C.; SCREPANTI, E.; VENTURI, M.; RIMON, A.; PADAN, E.; MICHEL, H. Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. **Nature**, v. 435, p. 1197-1202, 2005.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KERSH, A. E.; HARTZLER, L. K.; HAVLIN, K.; HUBBELL, B. B.; NANAGAS, V.; KALRA, A.; CHUA, J.; WHITESELL, R.; RITUCCI, N. A.; DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. pH regulation transporters in

neurons from various chemosensitive brainstem regions in neonatal rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 297, n. 5, p. R1409–R1420, 2009.

KHADILKAR, A.; IANNUZZI, P.; ORLOWSKI J. Identification of sites in the second exomembrane loop and ninth transmembrane helix of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger important for drug recognition and cation translocation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 47, p. 43792-43800, 2001.

KISHI, M.; TANABE, J.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 51, n. 3, p. 819-824, 2002.

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A δ -or A α / β -fibres. **Exp. Physiol.**, v. 87, n. 2, p. 239-244, 2002.

MAHNENSMITH, R. L.; ARONSON, P. S. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. **Circ. Res.**, v. 56, n. 6, p. 773-788, 1985.

MALO, M. E.; FLIEGEL, L. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 84, p. 1081-1095, 2006.

MASEREEL, B.; POCHET, L.; LAECKMANN, D. An overview of inhibitors of Na⁺/H⁺ exchanger. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 38, n. 6, p. 547-554, 2003.

MELLI, G.; HÖKE, A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. **Expert Opin. Drug Discov.**, v. 4, n. 10, p. 1035-1045, 2009.

ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 36, p. 22373-22376, 1997.

ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. **Pflugers. Arch.**, v. 447, n. 5, p. 549-565, 2004.

ORLOWSKI, J.; GRINSTEIN, S. Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 19, p. 483-492, 2007.

PADAN, E.; KOZACHKOV, L.; HERZ, K.; RIMON, A. NhaA crystal structure: functional-structural insights. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 1593-1603, 2009.

PARKER, M. D.; BORON, W. F. The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters. **Physiol. Rev.**, v. 93, n. 2, p. 803-959, 2013.

PEDERSEN, S. F.; JØRGENSEN, N. K.; DAMGAARD, I.; SCHOUSBOE, A.; HOFFMANN, E. K. Mechanisms of pHi regulation studied in individual neurons cultured from mouse cerebral cortex. **J. Neurosci. Res.**, v. 51, n. 4, p. 431-441, 1998.

PETRUSKA, J. C.; NAPAPORN, J.; JOHNSON, R. D.; GU, J. G.; COOPER, B. Y. Subclassified Acutely Dissociated Cells of Rat DRG: Histochemistry and Patterns of Capsaicin-, Proton-, and ATP-Activated Currents. **J. Neurophysiol.**, v. 84, n. 5, p. 2365-2379, 2000.

PUTNEY, L. K.; DENKER, S. P.; BARBER, D. L. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 527-552, 2002.

REICHLING, D. B.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. The fundamental unit of pain is the cell. **Pain**, v. 154, p. S2-S9, 2013.

RESHKIN, S. J.; GRECO, M. R.; CARDONE, R. A. Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 369, p. 1-9, 2014.

RITUCCI, N. A.; CHAMBERS-KERSH, L.; DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. Intracellular pH regulation in neurons from chemosensitive and nonchemosensitive areas of the medulla. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 4, p. R1152-R1163, 1998.

ROMERO, M. F.; CHEN, A.; PARKER, M. D.; BORON, W. F. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. **Mol. Aspects. Med.**, v. 34, p. 159-182, 2013.

ROOS, A.; BORON, W.F. Intracellular pH. **Physiol. Rev.**, v. 61, n. 2, p. 296-434, 1981.

RUFFIN, V.A.; SALAMEH, A. I.; BORON, W. F.; PARKER M. D. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. **Front. Physiol.**, v. 5, p.1-11, 2014.

SLEPKOV, E. R.; RAINEY, J. K.; SYKES, B. D.; FLIEGEL, L. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. **Biochem. J.**, v. 401, p. 623-633, 2007.

SZÁSZI, K.; PAULSEN, A.; SZABÓ, E. Z.; NUMATA, M.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 isoform. **J. Biol Chem**, v. 277, n. 45, p. 42623-42632, 2002.

TAKAHASHI, K. I.; COPENHAGEN, D. R. Modulation of neuronal function by intracellular pH. **Neurosci Res**, v. 24, n. 2, p. 109-116, 1996.

THOMAS, R. C. Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. **J Physiol**, v. 354, p. 3P-22P, 1984.

VINCENT, A. M.; HINDER, L. M.; POP-BUSUI, R.; FELDMAN, E. L. Hyperlipidemia: a new therapeutic target for diabetic neuropathy. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 14, n. 4, p. 257–267, 2009.

WANG, C.; YANO, H.; NAGASHIMA, K.; SEINO, S. The Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger – cloning, tissue distribution, and functional characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 45, p. 35486-35490, 2000.

WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **FASEB J.**, v. 11, p. 835-841, 1997.

WIEMANN, M.; BINGMANN, D. Ventrolateral neurons of medullary organotypic cultures: intracellular pH regulation and bioelectric activity. **Resp. Physiol.**, v. 129, p. 57-70, 2001.