



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE DOUTORADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ALANA NOGUEIRA GODINHO

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO NHE3 EM TÚBULOS PROXIMAIS RENAIIS DE
RATAS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E IMPACTO DIRETO DO
ESTRADIOL E DA PROGESTERONA**

FORTALEZA - CEARÁ

2019

ALANA NOGUEIRA GODINHO

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO NHE3 EM TÚBULOS PROXIMAIS RENAIIS DE
RATAS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E IMPACTO DIRETO DO
ESTRADIOL E DA PROGESTERONA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do centro de ciências da saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Fisiologia Renal.

Orientador: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucília Maria Abreu Lessa.

FORTALEZA - CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Godinho, Alana Nogueira .
Modulação da atividade do NHE3 em túbulos
proximais renais de ratas durante as fases do ciclo
estral e impacto direto do estradiol e da
progesterona [recurso eletrônico] / Alana Nogueira
Godinho. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do
trabalho acadêmico com 139 folhas, acondicionado em
caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do
Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2019.
Área de concentração: Fisiologia Renal.

Orientação: Prof. Ph.D. Manassés Claudino Fonteles.
Coorientação: Prof.^a Ph.D. Lucília Maria Abreu
Lessa.

1. Rim. 2. Hormônios sexuais. 3. Ciclo estral. 4.
NHE3. I. Título.

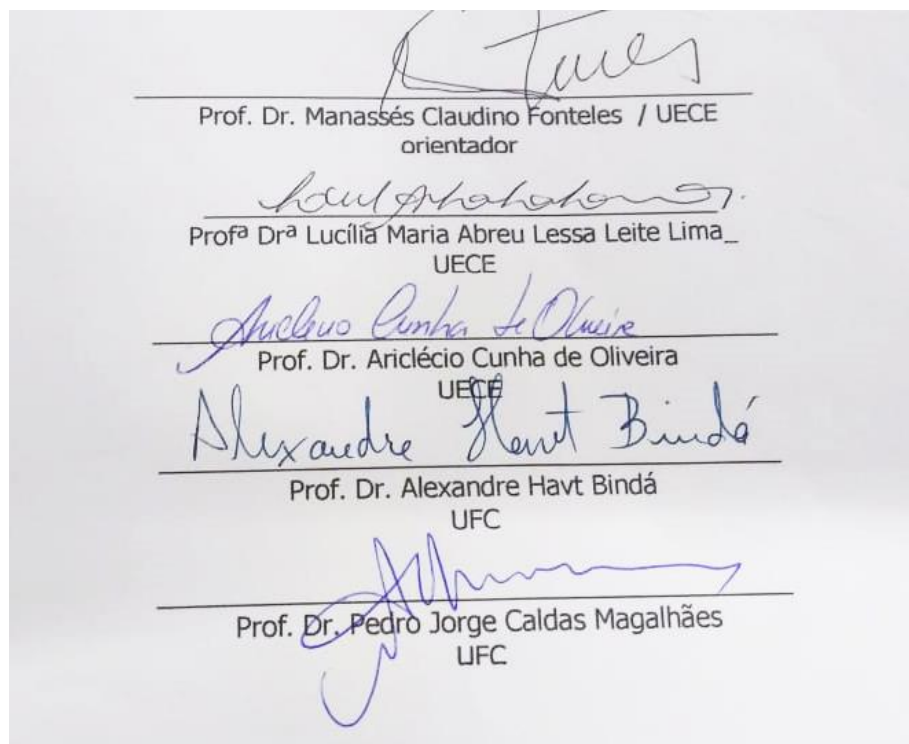
ALANA NOGUEIRA GODINHO

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DO NHE3 EM TÚBULOS PROXIMAIS RENAIIS DE
RATAS DURANTE AS FASES DO CICLO ESTRAL E IMPACTO DIRETO DO
ESTRADIOL E DA PROGESTERONA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do centro de ciências da saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Fisiologia Renal.

Aprovado em: 11 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Ao meu misericordioso Senhor, por sempre ter me guiado.

Aos meus pais amados Wellington e Herbenia, ao meu querido esposo Anderson, e ao Ângelo que ainda cresce em meu ventre, mas que já transformou tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sobretudo pelo dom da vida e por ter me guiado sempre pelos melhores caminhos. Ao Espírito Santo, por me conceder resiliência e à Mãe Maria por sua interseção.

Ao meu querido e amado pai Wellington, *in memoriam*, por sempre ter acreditado na capacidade de seus filhos e pelos muitos sacrifícios para que tivéssemos educação de qualidade; à minha amada mãe Maria Herbenia que nunca mediu esforços para suprir nossas necessidades, cuidando de seus filhos com todo amor e devoção e aos meus queridos irmãos por sempre terem incentivado e contribuído em meus estudos.

Ao meu amado esposo, Anderson Douglas, pelo apoio contínuo em vários sentidos a fim de que essa etapa da minha vida pudesse ser concluída. Ao bebê que estamos gerando, com muito amor e carinho, pois ele já me trouxe paz.

Ao maior e melhor incentivador que o laboratório poderia ter, meu orientador Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles, pois sem seu esforço, contribuição e determinação nada teria sido possível. Ao senhor, minha eterna admiração.

À minha querida co-orientadora, Prof. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa, por ter permitido meu retorno, por sempre confiar e acreditar em minha capacidade e principalmente por sua humildade em ajudar em cada momento quase que maternalmente.

Ao prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e, em especial, à profa. Dra. Cláudia Ferreira dos Santos por nos contagiarem com seu amor à pesquisa além de não medirem esforços para que a mesma ocorra da forma mais correta e também pela constante colaboração recebida.

A todos os colegas do LAFIR e do LAFCAR, pela grande família que formamos, em especial aos amigos da microperfusão que fizeram parte da construção deste trabalho: Nádia, Renan, Suellen, Marília e, em especial, a Mirna Bernardo pois sem ela a construção desta pesquisa não teria sido possível. Às alunas Camila e Adriele, pela importante contribuição nos experimentos de biologia molecular. Às amigas e futuras pesquisadoras Isabel, Renata, Angélica Luna e Ariana que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa e que proporcionaram alegres momentos mais difíceis.

Aos amigos de Sobral, Anderson Weiny e Jordânia Freire pelo auxílio frente às minhas atribuições na Universidade Federal do Ceará quando estava submersa nos experimentos e,

sobretudo, pelo companheirismo e parceria em nossas futuras pesquisas. Às administradoras Aline Araújo e Anne Araújo, pois sem o incentivo frente à gestão para que conseguisse o afastamento, esse trabalho não teria sido possível.

Sou profundamente grata a todos vocês!

"Tudo posso Naquele que me fortalece".

(Fp 4:13).

RESUMO

Estradiol (E2) e progesterona (P4) são os principais hormônios esteroides envolvidos no controle das funções reprodutivas em fêmeas. Receptores para estes hormônios têm sido encontrados no cérebro, sistema cardiovascular e túbulos renais. Entre outros efeitos, E2 e P4 podem modular a reabsorção de sódio ao longo do nefro, alterando o balanço hidroeletrólítico. O permutador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3) consiste na via principal para a reabsorção de Na^+ e de bicarbonato nos túbulos proximais (TP), dependendo do gradiente de Na^+ gerado pela bomba de Na^+/K^+ -ATPase (NKA). Nosso trabalho objetivou avaliar a modulação do permutador NHE3 durante as diferentes fases do ciclo estral (CE) e os efeitos diretos de E2 e P4 em rins de ratas ovariectomizadas (OVX), analisando a função renal, a expressão da NKA e o possível envolvimento da via de sinalização NKA-Src-Ras-Raf-Erk 1/2. Para tanto, ratas Wistar (180 a 250g) tiveram seu CE avaliado durante 15 dias para serem submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) ou grupo falso operado, onde o animal mantinha-se cíclico, e uma das diferentes fases do ciclo, proestro (PRO), estro (EST), metaestro (MET) ou diestro (DIE), era estudada. Inicialmente, os animais foram submetidos às gaiolas metabólicas (GM) durante as fases do CE de interesse e, em seguida, utilizamos a técnica de Microperfusão Estacionária (ME), a qual permite a medida da secreção de H^+ em TP, representando uma medida indireta da função do permutador NHE3. Através desta técnica, TP foram puncionados e perfundidos com solução controle para comparar as diferentes fases do ciclo estral com o grupo OVX. Posteriormente, os rins foram armazenados para avaliação da expressão proteica pela técnica de Western Blot (WB). Os resultados mostraram diferenças na atividade secretória de H^+ , sugerindo uma modulação diferencial do permutador de acordo com a fase. Os resultados de expressão proteica revelaram menor expressão do permutador NHE3 no grupo DIE, comparativamente aos demais grupos. Na segunda etapa da pesquisa, foi investigado o efeito intratubular de E2 e P4, em diferentes concentrações, sobre a atividade secretória de H^+ de fêmeas OVX, cujos resultados sugeriram que E2 ou P4 promovem aumento da atividade secretória de H^+ comparativamente ao grupo OVX. Posteriormente, fêmeas OVX foram tratadas com E2 ou P4 durante 10 dias e foram submetidas aos experimentos de GM, ME e tiveram seus rins armazenados para WB. Os experimentos de ME revelaram aumento da atividade secretória de H^+ apenas no grupo tratado com E2. Os resultados de WB, por sua vez, mostram uma regulação cortical da bomba NKA, a qual se encontra diminuída no grupo OVX. Nossos achados indicam que o permutador NHE3 é modulado durante as diferentes fases do CE e que tanto E2 quanto P4 regulam positivamente o trocador NHE3 em TP de ratas quando

administrados agudamente por via intraluminal. O tratamento com E2 é capaz de estimular o permutador NHE3, bem como a NKA cortical, com possível envolvimento da via NKA-Src-Ras-Raf-Erk 1/2. Contudo, novas etapas da investigação necessitam ser realizadas a fim de melhor caracterizar os mecanismos pelos quais E2 e P4 regulam a atividade do NHE3.

Palavras-chave: Rim. Hormônios sexuais. Ciclo estral. NHE3.

ABSTRACT

Estradiol (E2) and progesterone (P4) are the major steroid hormones involved in the control of reproductive functions in females. Receptors for these hormones are in the brain, cardiovascular system and renal tubules. Among other effects, E2 and P4 can modulate sodium reabsorption throughout the nephron, altering the hydro electrolytic balance. The Na⁺/H⁺ isoform 3 (NHE3) exchanger consists of the main pathway for Na⁺ and bicarbonate reabsorption in the proximal tubules (PT), depending on the Na⁺ gradient generated by the Na⁺/K⁺-ATPase pump (NKA). Our objective was to evaluate the modulation of the NHE3 exchanger during the different phases of the estrous cycle (EC) and the direct effects of E2 and P4 on the ovariectomized rats (OVX), analyzing NKA expression and the possible involvement of the NKA Src-Ras-Raf-Erk 1/2 signaling pathway. For this, Wistar rats (180-250g) had their EC evaluated for 15 days to undergo ovariectomy surgery (OVX) or false operated group, where the animal remained cyclic for studied of one the different phases of the cycle, proestrus (PRO), estrus (EST), metaestrus (MET) or diestrus (DIE). Initially, the animals stayed to metabolic cages (MC) during the phases of EC of interest and then we used the technique of Stationary Microperfusion (SM), which allows the measurement of H⁺ secretion in PT, representing an indirect measure of the NHE3 exchanger function. Through this technique, PT were punctured and perfused with control solution to compare the different phases of the estrous cycle with the OVX group. Subsequently, the kidneys were stored for evaluation of protein expression by Western blot (WB) analyses. The results showed differences in the secretory activity of H⁺, suggesting a differential modulation of the exchanger according to the phase. The results of protein expression revealed lower NHE3 exchanger expression in the DIE group, compared to the other groups. In the second phase of the research, we investigated the intratubular effect of E2 and P4, in different concentrations, whose results suggested that E2 or P4 promoted increased secretory activity of H⁺ compared to the OVX group. Afterwards, we treated OVX females with E2 and P4 for 10 days and submitted to MC, SM and had their kidneys stored for WB. The SM experiments revealed increased secretory H⁺ activity only in the E2-treated group. The WB results showed a cortical regulation of the NKA pump, which was decreased in the OVX group. Our findings indicated that the NHE3 exchanger undergoes modulation during the different phases of the EC. Both E2 and P4 positively regulate the NHE3 exchanger in rat PT when acutely administered intraluminally. Treatment with E2 seems able to stimulate NHE3 exchanger as well as cortical NKA, with possible involvement of the NKA-Src-Ras-Raf-Erk

1/2 pathway. However, we need to be performed new research steps in order to better characterize the mechanisms by which E2 and P4 regulate NHE3 activity.

Key words: Kidney. Sex hormones. Estrous cycle. NHE3.