

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - ISCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Alterações funcionais e moleculares no permutador NHE3 de túbulos proximais renais no curso da diabetes experimental

Doutorando: Renan Góis Mateus

Orientadora: Profa. Dra. Lucília Maria Abreu Lessa

Fortaleza, Ceará 2019

RENAN GÓIS MATEUS

Alterações funcionais e moleculares no permutador NHE3 de túbulos proximais renais no curso da diabetes experimental

Tese de doutorado apresentado à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia Renal

Orientador:
Prof(a). Dra. Lucília Maria Abreu Lessa

Fortaleza, Ceará 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Mateus, Renan Gois.

Alterações funcionais e moleculares no permutador NHE3 de túbulos proximais renais no curso da diabetes experimental [recurso eletrônico] / Renan Gois Mateus. - 2019.
87 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Doutorado, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof.^a Pós-Dra. Lucilia Maria Abreu Lessa.

1. Diabetes Mellitus. 2. Nefropatia Diabética. 3. NHE3. I. Título.

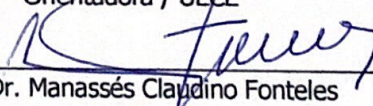


**14ª ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE RENAN GÓIS MATEUS,
REALIZADA NO DIA 27 DE NOVEMBRO DE 2019.**

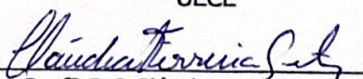
Aos vinte e sete dias do mês de novembro do ano de dois mil e dezenove, realizou-se a sessão de Defesa de Tese de Doutorado, do aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, **RENAN GÓIS MATEUS**. Compunham a banca os professores Drs. Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima (orientadora), Manassés Claudino Fonteles, Cláudia Ferreira Santos, Ivelise Regina Canito Brasil e Alexandre Havt Bindá. A tese tinha como título **"Alterações funcionais e moleculares no permutador NHE3 de túbulos proximais renais no curso da diabetes experimental"**. A defesa ocorreu das 15:00 às 18:15 horas. Inicialmente, o aluno apresentou o conteúdo de sua tese e posteriormente foi arguido pelos professores membros da banca examinadora. Em seguida, a banca reuniu-se em separado, a fim de avaliar a tese e o desempenho do candidato. A avaliação da tese foi considerada SATISFATORIA tendo sido atribuídas as seguintes notas: Profª Drª Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima 10,0 (DEZ), Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles 10,0 (DEZ), Profª Drª Cláudia Ferreira Santos 10,0 (DEZ), Profª Drª Ivelise Regina Canito Brasil 10,0 (DEZ) e Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá 10,0 (DEZ). A Banca Examinadora considerou o aluno APROVADO. Eu, Profª Drª Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima, que presidi esta sessão pública de defesa de tese de doutorado, assino a presente ata, juntamente com os demais membros da banca, e dou fé. Fortaleza, 27 de novembro de 2019.



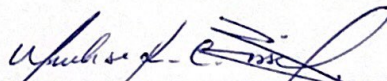
Profª Drª Lucília Maria Abreu Lessa Leite Lima
Orientadora / UECE



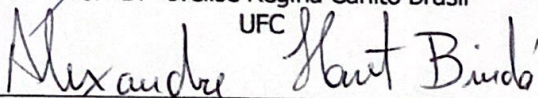
Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles
UECE



Profª Drª Cláudia Ferreira Santos
UECE



Profª Drª Ivelise Regina Canito Brasil
UFC



Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
UFC

RESUMO

Diabetes Mellitus é uma doença metabólica caracterizada por produção insuficiente de insulina e / ou ineficiência de insulina na produção de seus efeitos fisiológicos. A longo prazo, leva a distúrbios graves em vários tecidos. A nefropatia diabética é a causa mais comum de insuficiência renal crônica e doença renal terminal no mundo. Algumas alterações importantes no túbulo renal proximal têm sido descritas. Vários estudos sugerem que o trocador NHE3, a principal via para reabsorção proximal do bicarbonato de sódio, é estimulado no diabetes o que pode contribuir para a expansão do volume nos estágios iniciais desta patologia. No entanto, ainda não é bem compreendido o funcionamento do permutador em estágios posteriores da nefropatia diabética, caracterizada por alterações na taxa de filtração glomerular e alta proteinúria. Nossos dados anteriores demonstraram que o permutador NHE3 do túbulo proximal renal está estimulado no período de duas semanas de diabetes experimental, no entanto, o transportador mostrou-se inibido em 8 semanas de diabetes experimental. O presente estudo teve como objetivo investigar mais profundamente essas alterações funcionais e moleculares no NHE3 que ocorrem a curto (2 semanas) e longos (4, 8 e 12 semanas) estágios de diabetes experimental. Para este fim, foram utilizados animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. Para medir a atividade do NHE3, foi utilizado o método de microperfusão renal estacionária *in vivo*. Além disso, os animais experimentais foram acomodados em gaiolas metabólicas por 24 horas no final dos períodos estudados de diabetes experimental (2, 4, 8 ou 12 semanas) para avaliação dos parâmetros de função renal. Nas análises moleculares, medimos a abundância de proteínas e transcrição de mRNA para várias moléculas-chave no desenvolvimento da nefropatia diabética, usando técnicas de western blot e RT qPCR. Nossos dados demonstraram que os animais diabéticos experimentais apresentaram hiperglicemia, glicosúria e dificuldade no ganho de peso e alterações em vários parâmetros renais, como aumento da RFG, fluxo urinário, proteinúria, depuração osmolar e água livre, quando comparados aos animais euglicêmicos. Além disso, observamos estímulos de natriurese e caliurese, bem como aumento do índice renal. Em animais com 2 semanas de diabetes, a atividade do NHE3 aumentou quando comparada ao grupo controle, corroborando com nossos dados iniciais. Entretanto, após 4, 8 ou 12 semanas de diabetes, a atividade NHE3 foi extremamente reduzida quando comparada ao controle euglicêmico. O tratamento com insulina foi capaz de prevenir várias alterações nos parâmetros da função renal, mas a atividade do NHE3 permaneceu reduzida em ratos diabéticos tratados com insulina. De fato, nossos dados mostraram que, quando aplicada diretamente no túbulo proximal, a insulina tem ação inibitória sobre o NHE3. Nossos resultados também mostraram que a expressão proteica de NHE3 foi reduzida na diabetes experimental tardia. No entanto, foi observado um aumento no mRNA para NHE3 em todos os períodos de estudo. Este estudo fornece descobertas ainda inéditas sobre alterações funcionais e moleculares em uma das principais proteínas transportadoras para homeostase de volume e ácido-base, processos tão ameaçados no curso da diabetes.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, Nefropatia Diabética, NHE3, Túbulo proximal, Microperfusão renal

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a metabolic disease characterized by insufficient insulin production and / or insulin inefficiency in producing its physiological effects. In long term, it leads to severe disorders in various tissues. Diabetic nephropathy is the most common cause for chronic renal failure and end-stage renal disease in the world. Some important changes in the renal proximal tubule have been described. Several studies suggest that the NHE3 exchanger, the main route for sodium bicarbonate proximal reabsorption, is stimulated in diabetes, or may contribute to volume expansion in the early stages of diabetes. However, it remains unclear the functioning of NHE3 in later stages of diabetic nephropathy, characterized by changes in glomerular filtration rate and intense proteinuria. Our previous data have demonstrated that the proximal tubule NHE3 is stimulated in two weeks of experimental diabetes. However the transporter showed to be inhibited in 8 weeks of experimental diabetes. The present study aimed to investigate more profoundly these functional and molecular changes in NHE3 that occur in short (2 weeks) and long (4, 8 and 12 weeks) terms of experimental diabetes. For this purpose we used streptozotocin-induced diabetic animals. In order to measure NHE3 activity, the *in vivo* stationary renal microperfusion method was used. Through this technique, hydrogen secretion can be measured *in vivo* by using hydrogen sensitive microelectrodes. By this method were able to measure intratubular pH continuously, thus we can calculate bicarbonate reabsorption net. In addition, the experimental animals were housed in metabolic cages for 24 hours in the end of the studied periods of experimental diabetes (2, 4, 8 or 12 weeks) for evaluation of renal function parameters. In the molecular biology analysis we measured the protein abundance and mRNA transcription level for several key molecules in the development of diabetic nephropathy, by using western blot and RT qPCR techniques. Our data have demonstrated that the experimental diabetic animals presented hyperglycemia, glycosuria and difficulty in weight gain and alterations in several renal parameters, such as increase in RFG, urinary flow, protein excretion, osmolar and free water clearances, when compared to euglycemic animal. Besides, we observed both natriuresis and kaliuresis stimuli, as well as increased renal Index. In animals with 2 weeks of diabetes, NHE3 activity was increased, when compared to the control group, corroborating with our initial data. However, after 4, 8 or 12 weeks of diabetes, NHE3 activity was extremely reduced, when compared to the euglycemic control. Insulin treatment was able to prevent several changes in renal function parameters, but NHE3 activity remained reduced in diabetic insulin treated rats. In fact our data have shown that when applied directly into the proximal tubule, insulin has inhibitory action on NHE3. Our findings have also shown that NHE3 protein abundance is reduced in long term experimental diabetes. However, it was observed an increase in mRNA for NHE3 in all periods of the study. This work provides still unpublished findings on functional and molecular changes in one of the major carrier proteins for both volume and acid-base homeostasis so endangered in the course of diabetes.

Keywords: Diabetes Mellitus, Diabetic Nephropathy, NHE3, Proximal Tubule, Renal Microperfusion