

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Neydiana Belize de Pina Lopes

**EFEITO DA MUTAÇÃO PONTUAL DE DOIS RESÍDUOS DE
TREONINA NA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DO TRANSPORTADOR DE
UREIA mUT-A2 NO TRANSPORTE DE ÁGUA, QUANDO EXPRESSO
EM OÓCITOS DA RÃ *LITHOBATES CATESBEIANUS***

São Paulo

2019

Neydiana Belize de Pina Lopes – RA: 004402

**EFEITO DA MUTAÇÃO PONTUAL DE DOIS RESÍDUOS DE
TREONINA NA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DO TRANSPORTADOR DE
UREIA mUT-A2 NO TRANSPORTE DE ÁGUA QUANDO, EXPRESSO
EM OÓCITOS DA RÃ *LITHOBATES CATESBEIANUS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof^a. Dr^a. Maria Anete Lallo (Centro Universitário São Camilo) e co-orientado pela Prof^a. Dr^a. Raif Musa Aziz (Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, SP), como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani

Lopes, Neydiana Belize de Pina

Efeito da mutação pontual de dois resíduos de treonina na expressão e função do transportador de ureia mUT-A2 no transporte de água quando expresso em oócitos da rã *Lithobates Catesbeianus* / Neydiana Belize de Pina Lopes. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

52 p.

Orientação de Maria Anete Lallo.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

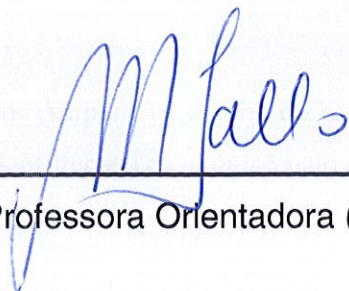
1. Transportadores de Ureia 2. Oócitos de rã 3. *Lithobates catesbeianus* 4. Transporte de água 5. Conservação de água pelos rins I. Lallo, Maria Anete II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 612.463

Neydiana Belize de Pina Lopes

**EFEITO DA MUTAÇÃO PONTUAL DE DOIS RESÍDUOS DE
TREONINA NA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DO TRANSPORTADOR DE
UREIA mUT-A2 NO TRANSPORTE DE ÁGUA, QUANDO EXPRESSO
EM OÓCITOS DA RÃ *LITHOBATES CATESBEIANUS***

São Paulo, 07 de Junho de 2019



Professora Orientadora (Maria Anete Lallo)



Professor Examinador (Adriano Pereira)

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho e a conclusão do curso, contou com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Aos meus pais, Maria Conceição de Pina e José Horácio Varela, pelo amor, carinho, paciência, ensinamentos e por depositarem toda a confiança em mim e não medirem esforços para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar fora do meu país.

À minha orientadora de iniciação científica e co-orientadora do TCC Prof.^a Dr. Raif Musa Aziz, por me receber no laboratório e pela ajuda e orientação neste trabalho. Por ter compartilhado comigo as suas experiências e ensinamentos que com certeza levarei para sempre comigo.

À minha orientadora Prof.^a Dr. Maria Anete Lallo, pela ajuda e orientação neste trabalho, e contribuição na minha formação.

Ao Ryan Geyer, por compartilhar comigo os seus conhecimentos de biologia molecular que foram essenciais para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

À Jessica Kabutomori e Rebecca Campos, pela boa vontade em me ensinar sobre os procedimentos e experimentos do laboratório. Sempre com muita paciência e extrema educação.

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

Às minhas colegas de apartamento, Anícia Moreno, Ana Eveline Semedo e Edma de Melo, pelo apoio nos dias difíceis e pelos momentos inesquecíveis que construímos juntas ao longo destes anos.

Aos meus colegas de classe, Andreza Alves, Débora Bissegato, Maria Lara Sureira e Viviane Nascimento pela amizade e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos professores do curso de Biomedicina que através dos seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje concluir este trabalho.

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

DE PINA, Neydiana. B. L. **Efeito da mutação pontual de dois resíduos de treonina na expressão e função do transportador de ureia mUt-A2 no transporte de água, quando expresso em oócitos da rã *Lithobates catesbeianus*.** 2019. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, 2019.

A capacidade dos rins de produzir urina mais concentrada que o plasma (osmolaridade de 290 mOsm/L H₂O) quando há a necessidade de conservar água no organismo, advém dos mecanismos de concentração urinária que dependem da alta osmolaridade do interstício medular e da presença do hormônio antidiurético, os quais promovem a reabsorção de água da luz do ducto coletor para o interstício e, finalmente, para a circulação sistêmica. A alta osmolaridade do interstício medular é gerada pelo acúmulo de NaCl e ureia nesta região. O transporte de ureia ocorre através dos transportadores de ureia, UTs, distribuídos ao longo das estruturas tubulares do néfron: UT-A1 expresso na membrana apical e UT-A3 na membrana basolateral do ducto coletor medular interno; UT-A2 expresso no segmento descendente fino da alça de Henle e UT-B expresso nos vasos retos descendentes. No entanto, há um debate sobre se os UTs também são importantes para facilitar, no rim, o transporte de água, que seria uma nova função atribuída aos UTs. A estrutura cristalina do UT-B de bovino revela que o UT é uma proteína homotrimérica. Cada monômero funciona como um canal para o transporte de ureia. Nesse poro monomérico foram identificados dois resíduos de treonina (Thr ou T) — T172 e T334 — importantes para o transporte de ureia e conservados em todas as isoformas de UTs. Nossa hipótese é que o UT-A2 é capaz de transportar água, além de ureia, através do poro monomérico para ureia. Assim, este estudo explora a permeabilidade à água do UT-A2 — expresso no segmento descendente fino da alça, onde não há expressão de canais para água — através de mutações pontuais para alterar resíduos conservados de Thr (T176 e T338, envolvidos com a ligação da proteína ao substrato) para Valina (V) no filtro de seletividade do poro para ureia de UT-A2. Para tal, oócitos da rã *Lithobates catesbeianus* foram injetados com cRNA para expressão de mUT-A2 *wild type* (mUT-A2^{WT}) ou mutantes (UT-A2^{T176V} e UT-A2^{T338V}) ou injetados com H₂O (controle). A expressão heteróloga foi avaliada por biotinação de proteínas de superfície e análise de *Western blot*. A permeabilidade osmótica à água (P_f) foi computada através de microscopia de vídeo-imagem do aumento do volume de grupo de oócitos injetados com cRNA *versus* oócitos injetados com H₂O, controle, quando expostos à uma solução hipotônica em relação ao plasma da rã. As medidas de P_f demonstraram que os oócitos que expressam mUT-A2^{WT} tem P_f significante maior do que aquelas dos oócitos mutantes ou controle. Portanto, nosso estudo indica, pela primeira vez, que mUT-A2 transporta água, além de ureia e, considerando que as mutações pontuais inibiram o transporte de água através de mUT-A2, provavelmente as moléculas de água atravessam a proteína através da mesma via que as moléculas de ureia. UT-A2, sendo permeável à ureia e água pode ser um importante elo para integrar a excreção renal de resíduos nitrogenados e água e possibilitar uma melhor compreensão da fisiologia e dos distúrbios do balanço da água do organismo.

Palavras-chave: *Lithobates catesbeianus*. Oócitos de Rã. Transporte de água. Conservação de água pelos rins. Transportadores de Ureia.

DE PINA; Neydiana. B. L. **Effect of the point mutation of two threonine residues on the expression and function of the urea transporter mUT-A2 in water transport, when expressed in *Lithobates catesbeianus* oocytes.** 2019. 52p. Undergraduate thesis (Bachelor of Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, 2019.

The capacity of the kidneys to produce urine more concentrated than plasma (osmolarity of 290 mOsm/L H₂O) when there is a need to conserve water in the body, comes from the urinary concentration mechanisms that depend on the high osmolarity of the medullary interstice and the presence of the antidiuretic hormone, which promote the reabsorption of water from the lumen of collecting duct to the interstitium and, finally, to the systemic circulation. The high osmolarity of the medullary interstice is generated by the accumulation of NaCl and urea in this region. Urea transport occurs through the urea transporters, UTs, distributed along the tubular structures of the nephron: UT-A1 expressed in the apical membrane and UT-A3 in the basolateral membrane of the inner medullary collecting duct; UT-A2 expressed in the thin descending segment of the loop of Henle and UT-B expressed in descending vasa recta. However, there is a debate about whether UTs are also important to facilitate, in the kidney, water transport, which would be a new role assigned to UTs. The crystalline structure of bovine UT-B reveals that UT is a homotrimeric protein. Each monomer functions as a channel for urea transport. In this monomeric pore two threonine residues (Thr or T) were identified — T172 and T334 — important for the urea transport and is conserved in all UT isoforms. Our hypothesis is that UT-A2 is capable of transporting water, besides urea, through the monomer pore for urea. Thus, this study explores the water permeability of the UT-A2 — expressed in the thin descending segment of the loop, where there is no water channel expression — through point mutations to alter conserved Thr residues (T176 and T338, involved with binding of the protein to the substrate) to Valine (V) in the urea pore selectivity filter of UT-A2. For this, oocytes from the *Lithobates catesbeianus* frog were injected with cRNA for expression of mUT-A2 *wild type* (mUT-A2^{WT}) or mutants (UT-A2^{T176V} and UT-A2^{T338V}) or injected with H₂O (control). Heterologous expression was evaluated by biotinylation of surface proteins and *Western blot* analysis. The osmotic permeability to water (P_f) was computed by video-image microscopy of the increased volume of oocyte group injected with cRNA *versus* oocytes injected with H₂O, control, when exposed to a hypotonic solution in relation to frog plasma. Measurements of P_f demonstrated that oocytes expressing mUT-A2^{WT} have significant P_f greater than those of mutant or control oocytes. Therefore, our study indicates for the first time that mUT-A2 transports water in addition to urea and, considering that point mutations inhibited the transport of water through mUT-A2, water molecules probably traverse the protein through the same pathway which urea molecules. UT-A2, being permeable to urea and water can be an important link to integrate the renal excretion of nitrogen residues and water and to allow a better understanding of the physiology and disturbances of the body's water balance.

Keywords: *Lithobates catesbeianus*. Frog oocytes. Water transport. Preservation of water by the kidneys. Urea Transporters.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC	Adenilato ciclase
AMPc	3' - 5' - monofosfato cíclico
AQP	Aquaporina
DC	Duto coletor
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
HAD	Hormônio antidiurético
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IQ	Instituto de Química
NKCC	Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pf	Permeabilidade osmótica à água
PKA	Proteína cinase A
SAE	Segmento ascendente espesso
SDF	Segmento descendente fino
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel Electrophoresis
TBS	Tris buffer saline
TBST	Tris buffer saline tween
TM	Transmembranais
Trh/T	Treonina
USP	Universidade de São Paulo
UT	Transportador de ureia
Val/V	Valina
WT	Wild type

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Homeostase da água.....	1
1.2 Organização estrutural e funcional do rim.....	2
1.3 Mecanismos de concentração urinária	5
1.4 Transporte de Ureia	8
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAS E MÉTODOS	16
3.1 Animais	16
3.2 Soluções	17
3.3 Isolamento dos oócitos	18
3.4 Plasmídeo	19
3.5 Sequenciamento.....	21
3.6. Mutação.....	23
3.7 Obtenção do cRNA.....	25
3.8 Análise da expressão proteica por Biotinilação e <i>Western blot</i>	26
3.8.1 Biotinilação	26
3.8.2 <i>Western blot</i>	27
3.9 Medidas de permeabilidade osmótica à água.....	28
3.10 Estatística	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Resultado do sequenciamento do cDNA mUT-A2 ^{WT} c-Myc	30
4.2 Resultado do sequenciamento dos cDNAs mutantes.....	31
4.3 Análise da expressão da proteína mUT-A2 ^{WT} e mutantes mUT-A2 ^{T176V} e mUT-A2 ^{T338V} na superfície de oócitos de <i>Lithobates</i>	32
4.4 Análise da P _r dos oócitos de <i>Lithobates</i> injetados com cRNA para a expressão de mUT-A2 ^{WT} e mutantes mUT-A2 ^{T176V} ou mUT-A2 ^{T338V}	35
5 CONCLUSÃO	37
APOIO FINANCEIRO	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXOS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Homeostase da água

O principal componente do nosso organismo é a água. Se considerarmos um homem adulto saudável pesando 70kg, 60% do seu peso é dado pela água, ou seja, aproximadamente 42 L. Cerca de 2/3 dessa água total está dentro das células, formando o fluido intracelular, enquanto 1/3 está fora das células, no interstício e plasma, formando o fluido extracelular — conhecido como meio interno. Esses fluidos, intracelular e extracelular, são separados pela membrana plasmática que regula o movimento de água (e íons) entre os mesmos. Esse movimento de água é fundamental para manter constante a concentração de solutos ou osmolaridade do meio interno — o equilíbrio hidroeletrólítico (ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012).

O principal determinante da osmolaridade do fluido extracelular (quantidade de solutos osmoticamente ativos dissolvidos em 1 L de plasma) é o íon sódio (Na^+) acompanhado dos seus pares iônicos bicarbonato (HCO_3^-) e cloreto (Cl^-). Apesar da composição de solutos do fluido intracelular ser diferente daquela do fluido extracelular, esses dois fluidos apresentam uma osmolaridade de aproximadamente 290 mOsm/L H_2O . A manutenção da osmolaridade do fluido extracelular é fundamental para a função de todas as células do organismo. Por exemplo, um aumento ou diminuição na osmolaridade do fluido extracelular gera um gradiente osmótico que leva ao movimento de água do compartimento menos concentrado para o mais concentrado até atingir um novo equilíbrio osmótico, o que altera, desta forma, o volume e, conseqüentemente, a função da célula (JAMISON; GEHRIG, 2011; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012; GIEBISCH; WINDHAGER, 2017)

No entanto, em condições normais ocorrem ajustes na quantidade total de água, ou seja, no balanço entre a quantidade de água livre de solutos ingerida e perdida pelo organismo. Esses ajustes — para preservar a quantidade total de água no organismo e, conseqüentemente, a osmolaridade do fluido extracelular — são controlados pelos rins, que ajustam a excreção de água na urina, e, pela sede, que controla a ingestão oral de água. Os rins ajustam a excreção de água na urina, de modo a compensar a ingestão anormalmente alta ou anormalmente baixa de água, sem variações significativas na excreção de solutos, eliminando, desse modo, uma

urina mais concentrada (conservando água) ou mais diluída (eliminando água) que o plasma. Portanto, o conhecimento dos mecanismos envolvidos com a excreção renal de água (e eletrólitos) pelos rins é importante para melhor compreensão da fisiologia e dos distúrbios hidroeletrolíticos do organismo (GIEBISCH; WINDHAGER, 2017).

1.2 Organização estrutural e funcional do rim

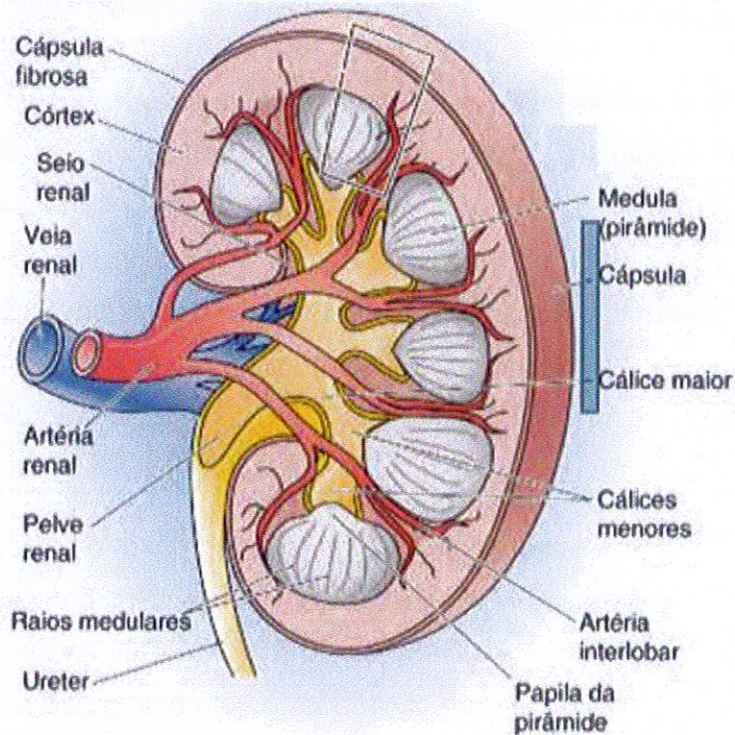
O rim é um dos órgãos que tem uma das mais evidentes relações entre função e estrutura. Assim, vale a pena a descrição de alguns detalhes da anatomia do rim para facilitar o entendimento da função deste órgão no Mecanismo de Concentração da Urina:

Cada rim é coberto por uma cápsula de tecido não distensível. Possui uma borda convexa e outra côncava, sendo que nesta última encontra-se o hilo renal. A região do hilo serve como porta de entrada para a artéria renal e plexos nervosos e porta de saída para a veia renal, vasos linfáticos e uréter (GIEBISCH; WINDHAGER 2017; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012).

Um corte sagital dos rins mostra duas regiões: uma mais externa — córtex renal — e outra mais interna — medula renal (Fig. 1). Na região do hilo renal, a artéria renal se divide dando origem às artérias interlobares. Quando as artérias interlobares atingem o limite entre as regiões medular e a cortical elas subdividem-se em artérias arqueadas. Partindo em ângulo reto de cada uma das artérias arqueadas distribuem-se as artérias corticais (ou interlobulares) que caminham por entre o córtex renal em direção à superfície do rim. De cada artéria cortical saem várias arteríolas que recebem o nome de arteríolas aferentes. Cada arteríola aferente sofre então um processo de capilarização dando origem aos capilares glomerulares (glomérulo), que reúnem-se formando a arteríola eferente. Essa localização dos capilares glomerulares entre as arteríolas aferente e eferente, vasos de alta resistência, é essencial para a alta taxa de filtração que ocorre no glomérulo. Sequencialmente, cada arteríola eferente sofre um novo processo de capilarização, constituindo os capilares peritubulares (GIEBISCH; WINDHAGER 2017; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012).

A unidade morfofuncional dos rins é denominada néfron e, em humanos, cada rim possui cerca de 1 milhão e 200 mil néfrons. Cada néfron é constituído por um glomérulo (envolvido por uma cápsula, a Cápsula de Bowman) e por uma estrutura tubular subdividida em quatro segmentos: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (DC). Os capilares peritubulares caminham ao longo das estruturas tubulares. Existem dois tipos de néfrons: os corticais — aqueles que têm o glomérulo localizado na região superficial do córtex e com alça de Henle curta — e os justamedulares — aqueles que têm o glomérulo localizado na região córtex-medula e com alça de Henle longa, característica importante para o papel dos rins na conservação de água (Fig. 2) (GIEBISCH; WINDHAGER 2017; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012).

Figura 1 – Estruturas visíveis no corte longitudinal do rim.



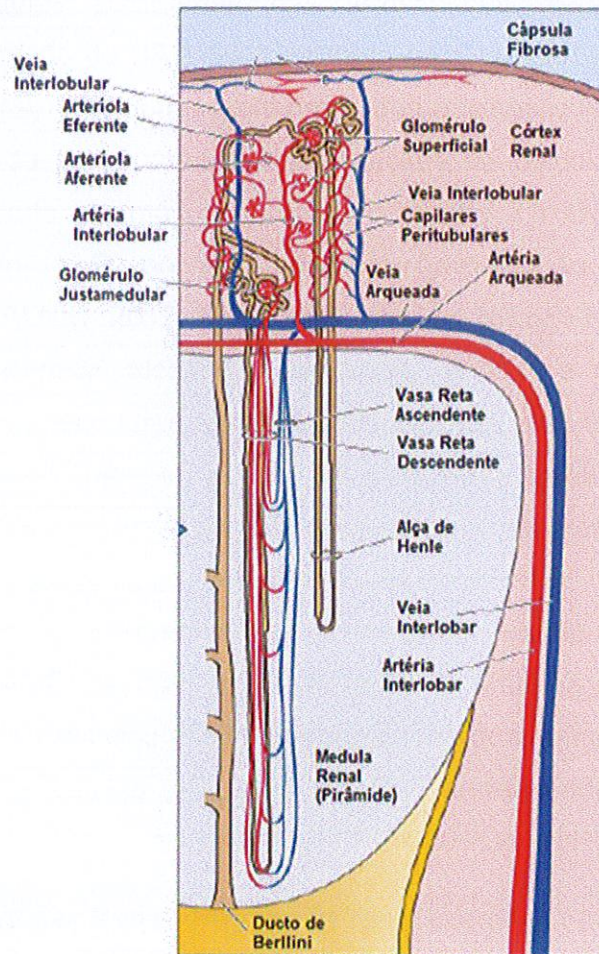
Fonte: (GIEBISCH; WINDHAGER, 2017)

Embora os rins compreendam menos de 0.5% do peso corpóreo, a cada minuto eles recebem cerca de 1200 mL de sangue [corresponde ao Fluxo Sanguíneo Renal (FSR)]. Considerando um débito cardíaco de 6.000 mL/min, temos que o FSR corresponde a 20% do débito cardíaco. Essa elevada taxa de FSR fornece o volume de plasma sanguíneo necessário para que os rins realizem suas funções (GIEBISCH; WINDHAGER 2017; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012).

A formação da urina inicia-se com a filtração do plasma nos capilares glomerulares levando a formação de um ultrafiltrado com concentrações de sais e moléculas orgânicas que são similares às do plasma (daí o termo ultrafiltrado), mas essencialmente livre de proteínas de alto peso molecular e elementos celulares do sangue. Para esse processo de filtração glomerular são necessários dois elementos básicos: 1) uma barreira filtrante capaz de selecionar o que é filtrado nos glomérulos e 2) uma força (pressão) capaz de movimentar o fluido dos capilares glomerulares, através da barreira de filtração, para o espaço de Bowman (espaço entre o glomérulo e a cápsula de Bowman). Essa pressão que movimenta a filtração representa um balanço delicado de forças, as chamadas Forças de Starling. A pressão hidrostática que existe no capilar glomerular (resultante do trabalho da bomba cardíaca gerando a pressão arterial) favorece a filtração, sendo que a pressão coloidosmótica do plasma no capilar glomerular (resultante da presença de proteínas de alto peso molecular que não são filtradas) e a pressão hidrostática no espaço de Bowman se opõem à filtração (GIEBISCH; WINDHAGER 2017; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012)

Após o processo de filtração, o filtrado glomerular atinge as estruturas tubulares do néfron. Ao longo dos túbulos a composição e o volume do filtrado são progressivamente modificados pelos processos de reabsorção e secreção tubular até se transformar na urina. Em condições normais, a maior parte de toda a quantidade filtrada nos glomérulos é reabsorvida ao longo das paredes dos túbulos renais e a urina final constitui apenas cerca de 1 a 2% do volume de plasma filtrado. Assim, o plasma é limpo de produtos do metabolismo endógeno (carboidratos, proteínas e lipídeos), produtos do metabolismo de drogas exógenas e de substâncias que estejam em excesso, tal como a água. Com isso, os rins controlam precisamente a composição e o volume do líquido extracelular do organismo (GIEBISCH; WINDHAGER 2017; ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012).

Figura 2 – Estrutura dos néfrons cortical e justamedular e os vasos sanguíneos do rim



Fonte: (GIEBISCH; WINDHAGER, 2017)

1.3 Mecanismos de concentração urinária

Os mecanismos renais utilizados para concentrar a urina envolvem todas as estruturas tubulares e os capilares peritubulares da medula renal (nesta região são descritos como vasos retos) que interagem entre si de modo a produzir e conservar um interstício medular altamente concentrado que, na presença de concentrações adequadas de hormônio antidiurético circulante, move a reabsorção de água do DC para o interstício e, finalmente, para a circulação sistêmica (GIEBISCH; WINDHAGER, 2017; KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015).

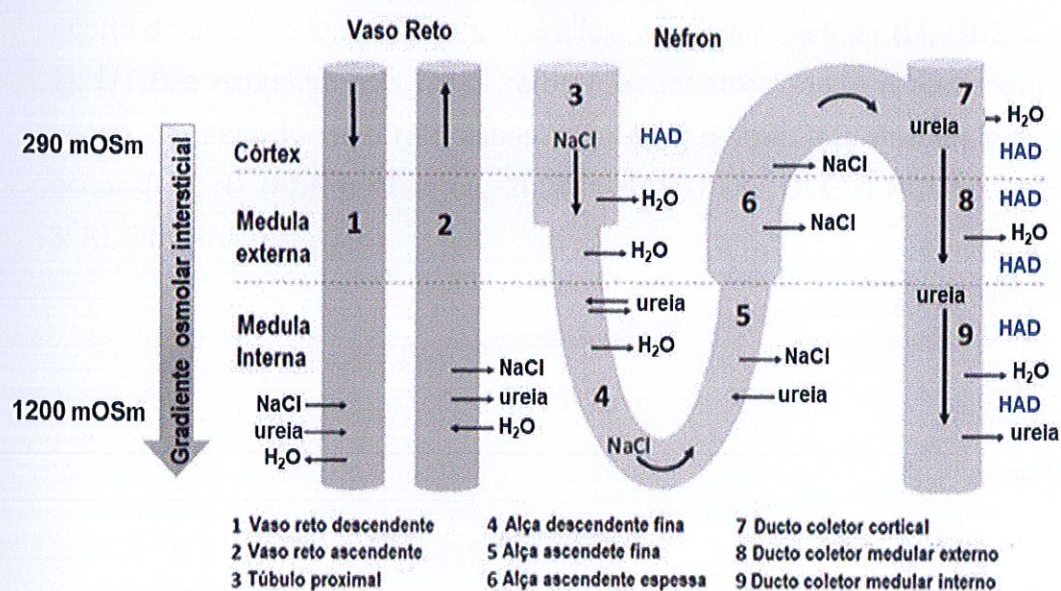
Hormônio Antidiurético. O HAD é produzido no corpo celular de grandes neurônios localizados nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo e estocado em vesículas secretórias nas terminações desses neurônios, na neurohipófise. A secreção do HAD é influenciada pela osmolaridade do plasma. No hipotálamo existem osmorreceptores próximos dos núcleos que produzem HAD (e próximos do centro da sede) sensíveis a variações da osmolaridade do plasma. Quando a osmolaridade plasmática aumenta cerca de 2 mOsm acima do limiar fisiológico (290 mOsm/L H₂O), ocorre um aumento na produção e secreção de HAD (ZATZ, SEGURO; MALNIC, 2012; KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015). Esse HAD cai na circulação sistêmica, alcança a circulação renal e, a partir dos capilares peritubulares, atinge as estruturas tubulares onde exerce suas ações reguladoras a partir da interação com o receptor do tipo V2 para HAD, localizado na membrana basolateral das células principais do DC, acoplado a uma proteína homotrimérica Gs. Por sua vez, a ativação da proteína Gs resulta na ativação da enzima adenilato ciclase (AC) que leva a um aumento nos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e, com isso, a ativação da proteína cinase A (PKA) que leva à translocação de vesículas citosólicas contendo aquaporinas 2 (AQP 2) para a membrana apical das células principais do DC, aumentando, dessa forma, a permeabilidade à água deste segmento (KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015).

Interstício Medular Renal. Na medula renal ocorre um aumento progressivo na osmolaridade do interstício a partir da medula externa até a medula interna, em relação ao plasma, atingindo cerca de 1200 mOsm/L H₂O em humanos (FENTON et al., 2004; NAWATA; PANNABECKER, 2018). Essa osmolaridade do interstício medular interno é gerada pelo transporte ativo de NaCl da luz do segmento ascendente espesso (SAE) da alça de Henle para o interstício medular — através do cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC) localizado na membrana apical — e por acúmulo de ureia — produto do catabolismo proteico — no interstício medular. O SAE da alça de Henle é impermeável à água. Com isso, o transporte ativo de NaCl ao longo do SAE gera um fluido tubular hipotônico em relação ao plasma, ou seja, há formação de água livre de solutos, enquanto o interstício medular fica hipertônico em relação ao plasma (KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015; GIEBISCH; WINDHAGER, 2017).

Quanto maior for a concentração do interstício medular, maior o gradiente osmótico que move a reabsorção de água pelas células principais do DC. O HAD, além de aumentar a permeabilidade do DC à água, também regula positivamente o cotransportador NKCC, ao aumentar a expressão dessa proteína na membrana apical do SAE da alça de Henle, e aumenta a permeabilidade à ureia no DC medular, aumentando, desse modo, a capacidade de formação do interstício medular concentrado (NIELSEN et al., 1996; KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015; GIEBISCH; WINDHAGER, 2017).

Assim, a presença de aglomerados de AQP 2 na membrana apical (na presença de HAD) e a expressão constitutiva de AQP 3 e 4 na membrana basolateral das células principais do DC, somado à hipertonicidade do interstício medular, possibilita a reabsorção de água da luz do DC para o interstício e, posteriormente, para a corrente sanguínea (Fig. 3) (KNEPPER; KWON; NIELSEN, 2015).

Figura 3 – Representação do mecanismo de concentração urinária na presença de HAD



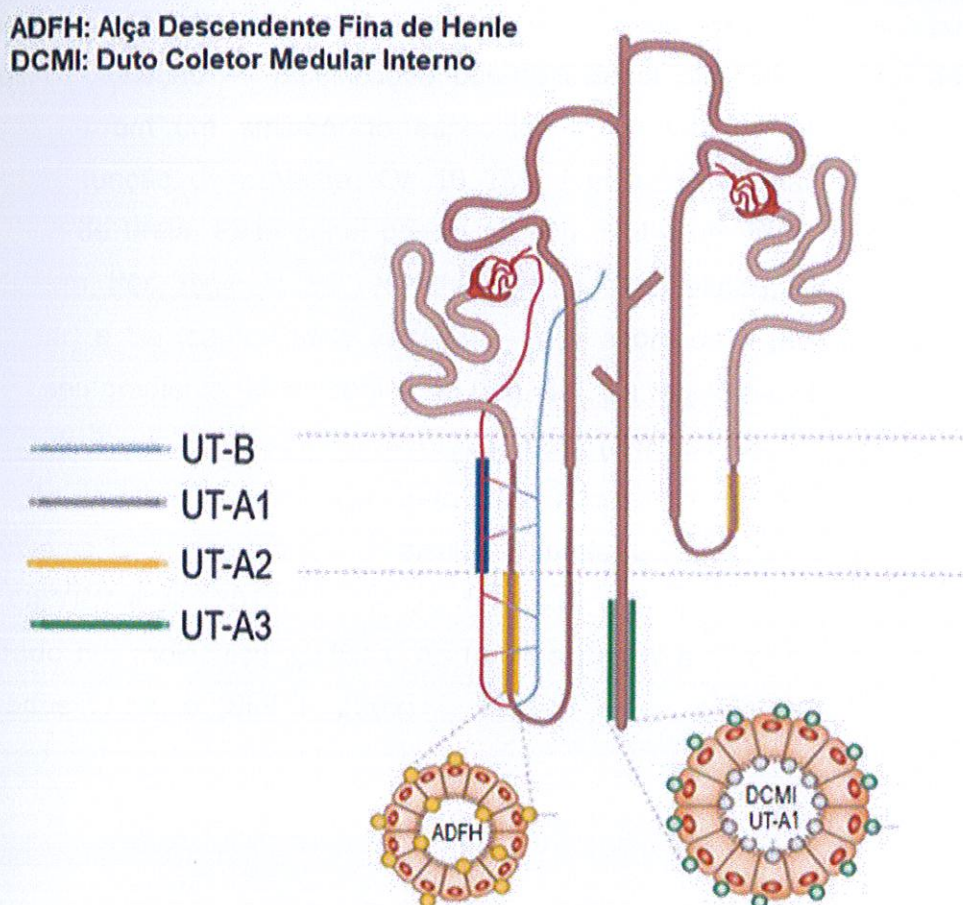
Fonte: Adaptado de Nawata e Pannabecker (2018)

1.4 Transporte de Ureia

O acúmulo de ureia no interstício medular interno depende de um processo de recirculação, onde a ureia é livremente filtrada no glomérulo, reabsorvida no túbulo proximal e ducto coletor medular interno (DCMI) e secretada nas alças finas descendente e ascendente de Henle na região medular (GIEBISCH; WINDHAGER, 2017).

Por muito tempo, pensava-se que a ureia era transportada apenas pela bicamada lipídica, mas atualmente sabe-se que existem transportadores de membrana capazes de facilitar o transporte de ureia, a favor do seu gradiente de concentração, através da bicamada lipídica. Esses transportadores são os chamados transportadores de ureia, os UTs (TRINH-TRANG-TAN et al., 2002). Nos mamíferos existem 2 genes já identificados que codificam os UTs: o gene SLC14A2 que codifica as proteínas UT-A1, UT-A2 e UT-A3 e o gene SLC14A1 que codifica a proteína UT-B. Nos rins de humanos UT-A1 e UT-A3 são expressos no DCMI, respectivamente nas membranas apical e basolateral, são responsáveis pela reabsorção de ureia do lúmen do DCMI para os vasos retos (YANG, 2005). UT-A2 é expresso no segmento descendente fino (SDF) da alça de Henle e medeia o transporte da ureia do lúmen para o interstício da região medular (LI; CHEN; YANG, 2012). UT-B é expresso nos vasos retos descendentes, onde é responsável pelo transporte de ureia do vaso reto ascendente para o vaso reto descendente, e nos eritrócitos (Fig. 4) (FENTON et al., 2004; SHAYAKUL; CLÉMENÇON; HEDIGER, 2013; KLEIN; SANDS, 2016).

Figura 4 – Distribuição dos UTs ao longo das estruturas tubulares do néfron e nos vasos retos adjacentes



Fonte: Adaptado de Estevafont et al. (2014)

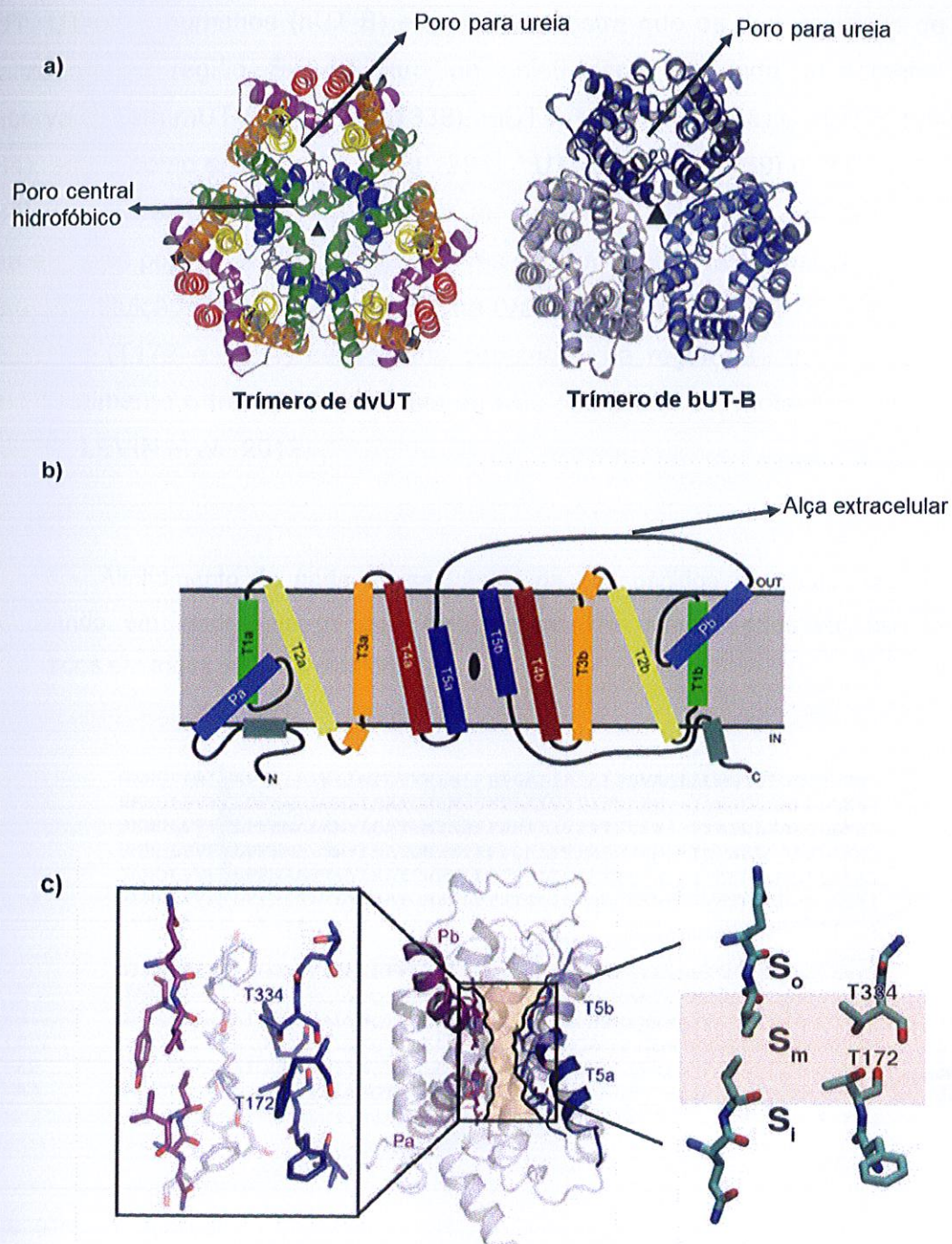
Ao longo do néfron, UT-A1, UT-A2, UT-A3 e UT-B estão envolvidos com a reabsorção e recirculação de ureia e, assim, participam da produção do interstício medular hiperosmótico, fundamental para a conservação da água do organismo na presença do HAD (MACIVER et al., 2008; GEYER et al., 2013).

Estrutura do Transportador de Ureia. As estruturas cristalinas de um homólogo de UT isolado da bactéria *Desulfovibrio vulgaris* (dvUT) e do UT-B bovino (bUT-B) foram adquiridas a partir de cristalografia de raios-X. Essas estruturas mostram que ambas as proteínas são homotriméricas, sendo cada monômero uma

unidade de transporte de ureia independente (Fig. 5a) (LEVIN et al., 2009; LEVIN et al., 2012).

Cada monômero é formado por dez segmentos transmembranais (TMs) (Fig. 5b). No centro desses TMs, entre TM 5 e 6, há uma alça extracelular que possui um sítio de glicosilação — modificação pós-traducional que consiste na adição de carboidratos em um aminoácido específico — importante para a estabilidade terciária e função da proteína. Os 10 TMs formam um canal hidrofílico para a passagem de ureia. Esse canal possui no seu centro um filtro de seletividade — dividido em três regiões: S_o (voltada para o extracelular), S_i (voltada para o intracelular) e S_m (central mais estreita) — que acomoda a passagem de ureia a favor do seu gradiente de concentração (Fig. 5c). Na região S_m do filtro existem dois resíduos de Treonina (Thr ou T) — T172 e T334 (em bUT-B) — que formam 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 da ureia (LEVIN et al., 2009; LEVIN et al., 2012; GEYER et al., 2013). No centro dos três monômeros há um poro hidrofóbico bloqueado por moléculas lipídicas. As terminações N e C-terminal dos UTs estão localizadas no citosol (SMITH, 2009)

Figura 5 – a) Representação da estrutura cristalina dos trímeros de dvUT e de bUT-B. b) Representação dos segmentos transmembranais do bUT-B. c) Representação do poro monomérico do bUT-B enfatizando as regiões S_0 , S_m e S_i e os dois resíduos de Thr T172 e T334 localizados na região S_m no poro monomérico.



Fonte: (a) LEVIN et al., 2009; b) LEVIN et al., 2012; c) LEVIN; ZHOU, 2014; GEYER et al., 2013)

Todas as isoformas de UT-A e UT-B partilham uma homologia estrutural significativa ao nível dos nucleotídeos e, conseqüentemente, dos aminoácidos. A análise (que realizamos no laboratório) do alinhamento das seqüências de aminoácidos dos UTs (Fig. 6) de camundongos (mUT, que iremos estudar) com dvUT, UT-B de humanos (hUT-B) e o bUT-B mostra que os dois resíduos de Thr localizados na região S_m do filtro de seletividade de cada monômero são conservados em mUT-A2 (T176 e T338), mUT-A3 (T246 e T408) e mUT-B (T172 e T334), assim como em dvUT (T130 e T294), hUT-B (T177 e T339) e bUT-B (T172 e T334), e sugere que essas Thr podem ter um papel importante no transporte de ureia e outras possíveis substâncias através do poro monomérico dos UTs. Sabe-se que a substituição da Thr para uma Valina (Val ou V) em hUT-B (T177V e T339V) e em bUT-B (T172 e T334) causa uma constrição na região S_m do poro e reduz substancialmente o transporte de ureia através das proteínas mutantes (GEYER et al., 2013; LEVIN et al., 2012).

Figura 6 – Alinhamento de parte da seqüência de aminoácidos das isoformas de UTs evidenciando em verde que os dois resíduos de Thr demonstrados em bUT-B são conservados em todas as isoformas de UT.

dvUT	GKVGVPAL ^T APFVLATWLLMFGVYKLSLFHPGALIAPALPSVAGLADMGTVTGRTFMEGL	181
hUT-B	SKWDLPVFTLPPFNMA ^L SMYLSATGHYNPFFPAK ^L VIPI ^T TAPN--ISWSDLSALELLKSI	282
bUT-B	SKWDLPVFTLPPFNMA ^L SMYLSATGHYNPFFPSTLITP ^V TSV ^P N--VTWPDLSALQLKSL	221
mUT-B	SKWDLPVFTLPPFNMA ^L SMYLSATGHYNTFFPSK ^L FTPASSV ^P N--ITWSELSALELLKSL	221
mUT-A2	SKWDLPVFTLPPFNIAV ^T LYLAATGH ^H NLFFPTLLQ ^P AT ^T TPN--ITWSDIQVSL ^L LRAI	225
mUT-A3	AKWDLPVFTLPPFNIA ^L TLYLAATGH ^H NLFFPTLLIK ^P ASAAPN--ITWTEIEMPLLQTI	295
	.**.:*.:* ** :* : : . . : . *. * * . *	: : : . : :
dvUT	GFNSVLCGIAMGGIFFYLNIR ^T FLYALGCMVLGAIATGAFSVLLSPIGMPAL ^T WPFIVVT	301
hUT-B	GFNSSLACIAMGGFMAL ^T WQTHLLALGCALFTAYLGVGMANFMAEVGLPACTWPFCLAT	402
bUT-B	GFNSSLACIAIGGTFMAL ^T WQTHLLALACALFTAYLGASMSHVMAVVG ^L PSGTWPFCLAT	341
mUT-B	GFNSSLACIAIGGFMAL ^T WQTHLLALACALFTAYFGACMAHLM ^A VVHL ^P ACTW ^S FCLAT	341
mUT-A2	GFNSTLACIAIGGMFYVITW ^Q THLLAIACALFAAYLGAALANMLSVFGLPPCTWPFCLSA	345
mUT-A3	SYNCLVSCIAIGGMFYALTW ^Q THLLALV ^C ALFCAYMGAALSNTMAVVG ^V PSGTWAFCLST	415
	..* . * . **:* * * : . : * . * * : * : : * : : : . : * * * * : :	

Fonte: (Arquivo pessoal)

Em 2005, Uchida e colaboradores observaram que camundongos *knockout* para UT-A2 submetidos a uma dieta com baixo teor de proteínas apresentavam diminuição na capacidade de concentrar a urina, bem como desidratação. Esses dados indicam que UT-A2 (presente no SDF da alça) mantém a quantidade de ureia no interstício medular quando o oferecimento de ureia é limitado. Em 2014, Fenton e Yang sugeriram que o UT-A2 tem um papel importante no acúmulo de ureia no interstício medular principalmente em estados de antidiurese (quando o organismo precisa conservar água).

Em 2007 Zhai e seus colaboradores observaram que o SDF da alça dos néfrons corticais (localizados no córtex renal e caracterizados por terem alças de Henle curtas) de rins de camundongos, ratos e humanos não tem expressão dos canais para água AQP1. Essa descoberta é muito importante para a compreensão dos mecanismos de concentração urinária uma vez que, em revisões anteriores (NESJUM, 2005; VERKMAN, 2006), a permeabilidade à água do SDF da alça dos néfrons corticais era atribuída à expressão de AQP1 neste segmento. Interessantemente, neste mesmo estudo, os autores observaram elevada expressão de UT-A2 no SDF da alça de Henle.

Recentemente, Kabutomori e colaboradores (2018) demonstraram que oócitos da rã *Lithobates catesbeianus* podem ser utilizados como modelo de expressão heteróloga para estudar a expressão e a função de proteínas de membrana envolvidos com o transporte de água. Além disso, Geyer e colaboradores (2013) demonstraram que hUT-B expresso em oócitos da rã *Xenopus laevis* (não comercializada no Brasil) exhibe permeabilidade à água, além da sua permeabilidade à ureia.

Portanto, devido à localização estratégica do UT-A2 no SDF da alça de Henle, com alta permeabilidade à água mas sem expressão de AQP1, e a demonstração de que hUT-B além de transportar ureia também transporta água (GEYER et al., 2013), decidimos estudar se mUT-A2 transporta água, assim como os mecanismos envolvidos nesse transporte, utilizando oócitos da rã *Lithobates* para expressão das proteínas de interesse. Em adição, com base nas características dos aminoácidos Thr e Val, decidimos mutar as Thr T176 ou T338 da região S_m do filtro de seletividade no poro monomérico da proteína mUT-A2^{WT} por Val, com o intuito de

avaliar a importância desses resíduos na expressão da proteína na membrana e na função de transporte de água. Nossa hipótese é que, além de seu papel como veículo para o transporte de ureia — importante para a concentração do interstício medular e excreção de ureia — o UT-A2 também transporta água — sendo, então, importante para conferir permeabilidade à água ao SDF da alça de Henle. A reabsorção de água no SDF da alça é importante para o mecanismo de concentração da urina, ou seja, para a conservação de água no organismo.

Aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na excreção de água pelos rins é fundamental para melhor compreensão da fisiologia renal e dos distúrbios do equilíbrio hidroeletrolítico do organismo.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar se após a injeção de cRNA para expressão da proteína mUT-A2 *wild type* (mUT-A2^{WT}) os oócitos de *Lithobates* são capazes de sintetizar e expressar essa proteína na membrana plasmática e se a mutação dos resíduos conservados de Thr, no filtro de seletividade de cada monômero da proteína mUT-A2 (mUT-A2^{T172V} e mUT-A2^{T338V}), influencia na expressão da proteína mUT-A2 na membrana plasmática. Após esta investigação, analisar o efeito da expressão da proteína mUT-A2^{WT} no transporte de água, assim como o efeito da mutação dos resíduos conservados de Thr no transporte de água.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 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) (Anexo 1: Protocolo nº 83, página 35, livro 3). As rãs fêmeas adultas da espécie *Lithobates catesbeianus* (Fig. 7) e peso médio de 450g foram adquiridas de um criadouro de rãs sob a responsabilidade da empresa Rã World (São Paulo, SP) e mantidas no biotério de rãs do laboratório, 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).

Figura 7 – Rã *Lithobates catesbeianus*



Fonte: (VYN, 2010)

3.2 Cirurgia

Para a cirurgia – laparotomia – montamos um espaço que possa ser facilmente limpo, desimpedido e distante do fluxo de pessoas de modo a minimizar a possibilidade de contaminação por outras atividades próximas. A rã foi anestesiada por imersão em solução de éster etílico do ácido 3 – aminobenzoato de etila (código A5040, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em HEPES 5 mM (código H3375, Sigma-Aldrich) pH 7,50, por aproximadamente 10 min ou quando insensível ao toque (KABUTOMORI, et al., 2018). A rã era, então, colocada em decúbito dorsal sobre uma plataforma gelada que funciona como uma anestesia adicional para anfíbios e suporte para a cirurgia. Na cirurgia uma incisão de 1 a 1,5 cm foi feita através da pele no abdômen, lateralmente à linha média, de modo a expor os ovários para a remoção de fragmentos ovarianos (contendo várias dúzias de oócitos). Cerca de 15 mL de fragmentos foram colocados em um tubo cônico de 50 mL contendo solução ND96. Posteriormente, a rã foi submetida a eutanásia por punção cardíaca. A partir da punção cardíaca foi feita a coleta de 1 mL de sangue para medidas do pH (Radiometer ABL5, Copenhagen, Dinamarca) e osmolaridade do plasma (Vapor Pressure Osmometer 5520, Wescor, Logan, UT). A osmolaridade plasmática da rã *Lithobates* medida é de 195 mOsmois e o pH plasmático é de 7,50 a 22°C. Essas medidas são importantes para assegurarmos a osmolaridade e o pH das soluções utilizadas para a coleta, manutenção e tratamento dos oócitos.

3.2 Soluções

A solução controle (“ND96”) para os oócitos de *Lithobates* contém (em mM): 96 NaCl, 2 KCl, 1 CaCl, 1 MgCl₂, e 5 HEPES. A solução Ø Ca²⁺-ND96 possui a mesma composição química que a solução ND96 com exceção de CaCl ausente nesta solução. O meio de cultura OR3, onde os oócitos são mantidos, contém 6,85 g/L de meio Leibovitz L-15 (código L4386-1L, Gibco/ Sigma-Aldrich), suplementado com 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 U/mL de estreptomicina (código 15140-122, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e HEPES 5 mM. A osmolaridade das soluções ND96, Ø Ca²⁺-ND96 e OR3 foram ajustadas para 195 mOsm/L H₂O e pH 7,50. Para os experimentos de biotilação foi utilizado um tampão com 100 µL de Triton X-100 (código T8532, Sigma-Aldrich), 10 mL de *Phosphate Buffered Saline*

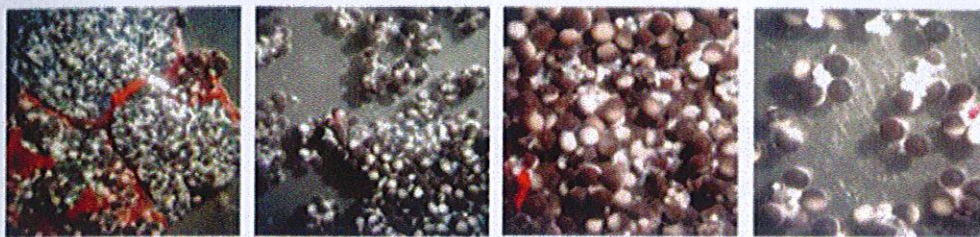
(PBS) a 195 mOsm/L H₂O e o inibidor de protease sem EDTA (código 11836170001, Sigma-Aldrich) (MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010; KABUTOMORI et al., 2018).

3.3 Isolamento dos oócitos

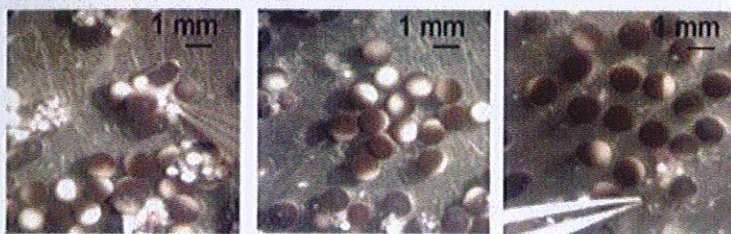
Cerca de 15 mL de fragmentos ovarianos (com oócitos envolvidos pela camada de células foliculares) foram colocados em um tubo cônico de 50 mL contendo 35 mL de solução ND96. Esses fragmentos foram transferidos para uma placa de petri de 9 cm de diâmetro contendo solução ND96. Com o uso de tesoura e pinças estéreis, os fragmentos foram reduzidos em fragmentos menores, aproximadamente 5 mm³, e, então, lavados em solução sem cálcio (\emptyset Ca²⁺-ND96) durante 15 min (total de 3 lavagens). Em sequência, os fragmentos foram tratados com colagenase tipo VII (código C0773, Sigma-Aldrich) em solução de \emptyset Ca²⁺-ND96, numa concentração de 0,25 mg/mL, durante 5 min. Sequencialmente, os oócitos foram novamente lavados em solução \emptyset Ca²⁺-ND96 durante 15 min (total de 3 lavagens) e em solução de ND96 controle durante 5 min (1 lavagem) (KABUTOMORI et al., 2018). Esse procedimento permite a dissociação dos oócitos, no entanto, a defoliculação (remoção da camada de células foliculares) não é completa. Assim, sob um microscópio especular (código PZMIII, World Precision Instruments, Sarasota, FL) e com o auxílio de 2 pinças de relojeiros, os resquícios da camada folicular dos oócitos foram removidos manualmente e oócitos saudáveis, maduros, nos estágios V-VI de desenvolvimento e viabilidade foram selecionados (Fig. 8). Oócitos individualizados foram colocados em uma placa de petri de 6 poços contendo meio de cultura OR3 que é específico para oócitos de rã, mantidos em ambientes sem manutenção de CO₂, a 22 C° (KABUTOMORI et al., 2018). (KABUTOMORI et al., 2018; MUSA-AZIZ; PARKER; BORON, 2010).

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

1- Tratamento enzimático



2- Isolamento mecânico



3- Oócito isolado



Fonte: (KABUTOMORI et al., 2018)

3.4 Plasmídeo

O vetor de expressão ou plasmídeo pT7TS, contendo a sequência de cDNA que codifica a nossa proteína de interesse mUT-A2^{WT}, foi gentilmente doado ao laboratório pelo Dr. Bryce MacIver, do Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard University, Boston, Massachusetts (MACIVER et al., 2008)

O plasmídeo pT7TS (Fig. 9) possui o sítio de restrição TCTAGA localizado após a sequência de cDNA para mUT-A2^{WT}. Este sítio de restrição é reconhecido pela enzima XbaI (código R0145S, New England BioLabs, Ipswich, MA) que, ao clivar o cDNA vetorial nessa região, permite a linearização eficiente do plasmídeo.

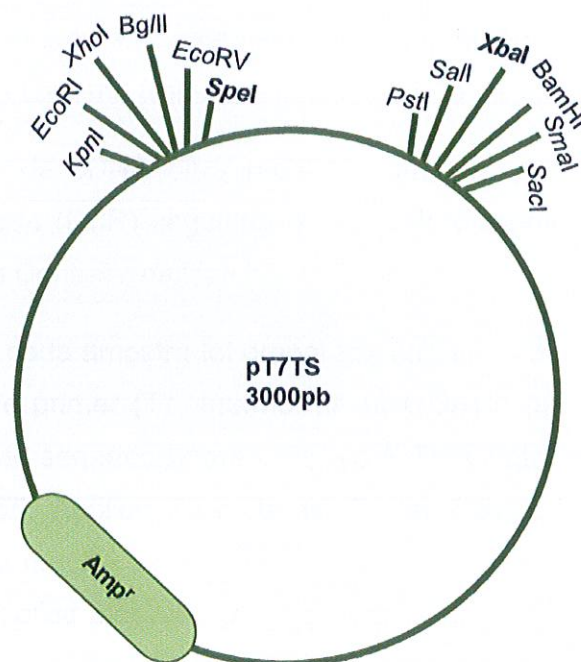
Esse vetor de expressão além de possuir um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, também apresenta as sequências promotoras T7 *forward*

(5'→3') e GI3B *reverse* (3'→5'). Essas regiões promotoras atuam como sítios de reconhecimento para a ação da enzima RNA polimerase e são, portanto, essenciais para conduzir a transcrição do cDNA linearizado de mUT-A2^{WT} em cRNA (ALBERTS et al., 2006).

O cDNA para a proteína mUT-A2^{WT} foi transformado em bactérias competentes *Escherichia coli* TOP 10 (obtidas no laboratório a partir de um processo que envolve a suspensão das mesmas numa solução contendo uma alta concentração de Ca²⁺) que foram colocadas para crescer em uma placa de ágar com ampicilina. Esse método seleciona apenas as bactérias que incorporaram o plasmídeo e que, portanto, possuem o gene que confere resistência a esse antibiótico. Sequencialmente, uma colônia de bactérias foi selecionada e colocada para crescer em meio de cultura com ampicilina para seleção e multiplicação do plasmídeo (que contém o cDNA de mUT-A2^{WT}). Esses plasmídeos foram extraídos das bactérias utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (código 27104, Qiagen, Hilden, Alemanha).

Após a extração, os cDNAs de mUT-A2^{WT} foram linearizados com a enzima de restrição específica Xba I e, sequencialmente, purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit (código 28104, Qiagen).

Figura 9 – Representação do vetor pT7TS e os seus sítios de restrição



Fonte: Adaptado do Addgene plasmid #17091; <http://n2t.net/addgene:17091>; RRID: Addgene_17091

3.5 Sequenciamento

Antes do início de qualquer experimento foi necessário confirmar a integridade do cDNA de interesse.

O cDNA que codifica a proteína mUT-A2^{WT} foi sequenciado pelo Serviço de Sequenciamento da Central Analítica do Instituto de Química na Universidade de São Paulo (Central Analítica IQ/USP) pelo método de Sanger (TSIATIS et al., 2010).

Para isso, os seguintes primers foram desenhados:

- T7 (Forward) 5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3';
- Interno #1 (Forward) 5'- GAGCACCGTCTTCAGCAAGT- 3';
- GI3B (Reverse) 5'- ACCAATGGCTACATTTTGGGGG - 3'.

Os primers T7 e GI3B — que correspondem às sequências promotoras do gene de mUT-A2 — foram utilizados para a leitura do começo e do final da sequência, respectivamente. A parte interna do gene de mUT-A2 foi sequenciada utilizando o primer Interno #1 desenhado pelo laboratório. Todos os primers foram confeccionados pela Exxtend Solução em Oligos, São Paulo, SP.

As amostras de cDNA para mUT-A2 foram amplificadas por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) seguindo o protocolo disponibilizado pelo Serviço de Sequenciamento da Central Analítica IQ/USP.

Brevemente, cada amostra foi preparada utilizando 300 ng do cDNA de mUT-A2^{WT}, 10 pmoles de primer (T7, Interno 1# ou GI3B) e os reagentes Buffer 5X e BigDye v3.1 do kit de sequenciamento BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Código 4337355, Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras foram, então, submetidas à reação de PCR no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (código 4375786, Applied Biosystems,) seguindo as etapas descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Etapas da amplificação do cDNA de mUT-A2^{WT} utilizando os primers T7, Interno 1# ou GI3b.

Etapas da PCR	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	96°C	2 minutos
Desnaturação		96°C	45 segundos
Anelamento dos primers	35	50°C	30 segundos
Amplificação		60°C	4 minutos
Armazenamento	1	4°C	∞*

*o termociclador fica a 4°C para manter as amostras conservadas até a próxima etapa do experimento.

Depois da reação de PCR, as amostras foram precipitadas com 25 μ L do cocktail de precipitação (2750 μ L de etanol 100%, 110 μ L de 3M de acetato de amônio e 110 μ L de glicogênio a 1 mg/mL), lavadas com 50 μ L de etanol 70%, e então secas por 1 min a 95°C no termociclador. Após todo esse processo as amostras foram enviadas à Central Analítica IQ/USP para a leitura.

3.6. Mutação

Os primers necessários para a substituição dos resíduos de Thr T176 e T338 por resíduos de Val (apresentados abaixo) foram desenhados utilizando a plataforma QuikChange Primer Design Program (<https://www.chem.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) e confeccionados pela Exxtend Solução em Oligos (São Paulo, SP). As trincas de nucleotídeos destacados em azul no esquema abaixo correspondem aos códons que codificam o aminoácido Val.

- Primers para a 1º mutação T176V:

5'- GATGTTGAAGGGCAG**TAC**GAAGACTGGGAGGTCCCAC-3' (Reverse)

5'- GTGGGACCTCCCAGTCTTC**GT**ACTGCCCTTCAACATC-3' (Foward)

- Primers para a 2º mutação T338V:

5'- GAGGCAAAGGGCCAG**GAC**GCAGGGTGGTAATCCAA-3' (Reverse)

5'- TTGGATTACCACCCTGC**GT**CTGGCCCTTTTGCCTC-3' (Foward)

A mutação no cDNA que codifica a proteína mUT-A2^{WT} foi realizada através da reação de PCR, seguindo as instruções disponíveis no protocolo do kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (código 200523-12, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Brevemente, para cada amostra, foram utilizados 50 ng do cDNA template (cDNA a ser mutado), 125 ng de cada Primer (Foward e Reverse), bem como as

dNTPs e a DNA polimerase presente no kit de mutação. Após a preparação das amostras, elas foram submetidas à reação de PCR seguindo as etapas descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Etapas dos ciclos de PCR para geração dos mutantes a partir do DNA de UT-A2 template com o uso do kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis.

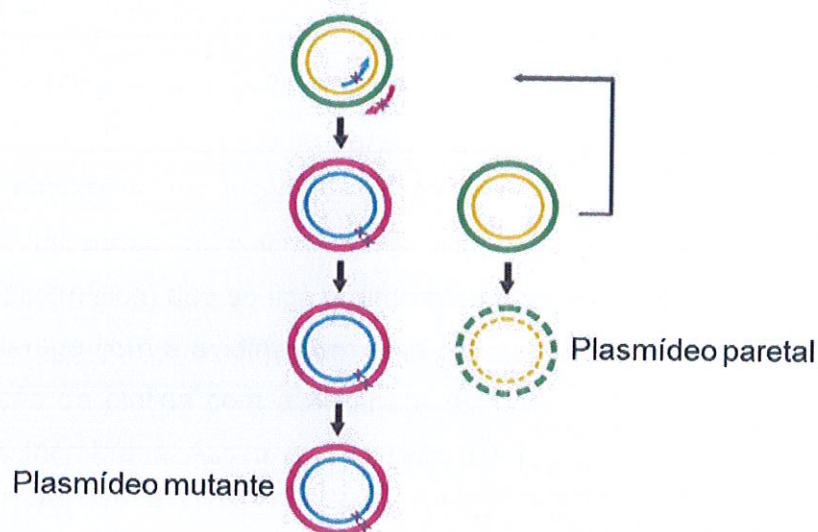
Etapas	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	95°C	30 segundos
Desnaturação		95°C	30 segundos
Anelamento dos primers	18	55°C	1 minuto
Amplificação		68°C	4 minutos e 30 segundos

Fonte: Adaptado do Protocolo do kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis, Agilent Agilent Technologies

O produto da reação de PCR foi, então, digerido utilizando a enzima de restrição DpnI, isolada e purificada da bactéria *Diplococos pneumoniae*. A DpnI é responsável por digerir regiões metiladas de cDNA a partir do reconhecimento e da clivagem de sequências GATC ligadas a um grupo metil. Apenas cDNAs que foram amplificadas em células competentes transformadas (*E. coli*) apresentam regiões metiladas. Dessa maneira, a DpnI digere somente o cDNA parental (utilizado como cDNA template para a mutação), restando apenas o cDNA mutado (produto da reação de PCR) (Fig. 10). Após a digestão com DpnI, o produto de PCR foi utilizado na transformação das células supercompetentes (XL1-Blue) presentes no kit de mutação e, posteriormente, linearizados como descrito no item 3.4 neste documento.

Os cDNAs obtidos ao final desse processo foram sequenciados (como descrito no item 3.5) para confirmar a mutação.

Figura 10 – Esquema da digestão do cDNA parental pela enzima DpnI



Fonte: (Protocolo do kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis, Agilent Technologies)

3.7 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 (código 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 (código 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. 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/ μ L) ou injetados com 25 nL de H₂O. Os oócitos injetados com H₂O são os oócitos controle (ALBERTS et al., 2006; MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010; KABUTOMORI et al., 2018).

3.8 Análise da expressão proteica por Biotinilação e *Western blot*.

3.8.1 Biotinilação

Para verificar a expressão heteróloga das proteínas UT-A2^{WT} e mutantes UT-A2^{T176V} e UT-A2^{T338V}, assim como para comprovar que os oócitos não apresentam expressão endógena da proteína UT-A2^{WT} foram realizados experimentos de biotinilação, utilizando a biotina, uma vitamina hidrossolúvel (impermeável à membrana plasmática) que se liga a diferentes biomoléculas, tal como o aminoácido Lisina, e interage com a avidina com uma constante de afinidade (K_a) de 10^{15} M^{-1} . Esta interação da biotina com a avidina é extremamente útil para isolar e separar proteínas de membrana. Assim, a expressão das proteínas de membrana UT-A2^{WT} e mutantes UT-A2^{T176V} e UT-A2^{T338V} foi avaliada através do método de biotinilação com o kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation (código 21425, Thermo Fisher Scientific), de acordo com a recomendação do fabricante e com algumas modificações padronizadas no laboratório.

Um cuidado que devia ser seguido durante o processo de biotinilação para marcação das proteínas de membrana de oócitos era a diluição das soluções preparadas de PBS e TBS (*Tris Buffered Saline*), do kit de biotinilação, para adequar a osmolaridade dessas soluções com a osmolaridade plasmática das rãs *Lithobates* (195 mOsmois) de modo a evitar a exposição dos oócitos a um meio hiperosmótico.

Para o processo de biotinilação foi utilizado 20 oócitos de cada grupo (oócitos injetados com cRNA para expressão de UT-A2^{WT} e mutantes UT-A2^{T176V} ou UT-A2^{T338V} versus oócitos injetados com H₂O, controle) foram incubados com biotina diluída em PBS na concentração de 0,24 mg/mL durante 1 hora, a 4°C, sob agitação constante. Após a incubação com biotina, os oócitos foram lavados com TBS durante 5 min, sob agitação constante, e, então, lisados com uma solução de lise (TBS, Triton X-100, inibidor de protease livre de EDTA). O lisado obtido foi centrifugado e apenas o sobrenadante foi separado e misturado com avidina (NeutrAvidin gel, do Kit de biotinilação) para possibilitar a interação da avidina com a biotina. Essa interação é uma das interações não-covalentes mais fortes até então conhecida e possibilita a obtenção das proteínas de membrana biotiniladas através de uma coluna de separação (*Spin X column* do Kit EZ-Link). Depois desse

processo de biotinylação, as amostras de proteínas biotiniladas dos oócitos de cada grupo foram analisadas por experimentos de *Western blot*.

3.8.2 *Western blot*

As amostras das proteínas biotiniladas dos oócitos de cada grupo foram separadas por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel Electrophoresis), em gel de poliacrilamida 12% de acordo com o seu peso molecular e, posteriormente, transferidas para uma membrana de filtração PVDF (difluoreto de polivinilideno). Sequencialmente, a membrana foi bloqueada com uma solução 5% de leite desnatado (Molico, Nestle, Vevey, Suíça) em TBST (TBST-B) durante 1 h, temperatura ambiente e, então, incubadas com o anticorpo primário monoclonal específico — anti-cMyc isolado de camundongo (código 40-0603, Invitrogen) na razão de 1:1000 (1 uL de anticorpo para 1mL de TBST-B) — para as proteínas de interesse, a 4°C, *overnight*.

A detecção da proteína expressa na membrana plasmática dos oócitos de *Lithobates* depende da especificidade do anticorpo primário. Como os anticorpos primários comerciais utilizados para detectar UTs não são tão específicos, o laboratório incluiu a adição de um epítipo pequeno — c-Myc tag (EQKLISEEDL) na terminação C da proteína mUT-A2, contra a qual existe anticorpo monoclonal altamente específico (anti-cMyc). Essa abordagem permite a realização de uma análise comparativa dos níveis de expressão da proteína mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} e UT-A2^{T338V}, já que essas proteínas compartilham este epítipo.

Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada em TBST durante 30 min, sob agitação constante, temperatura ambiente e incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo (isolado de cabra e que reconhece o anticorpo produzido pelo camundongo) (código 04-15-06, KPL, Gaithersburg, MD) durante 1 h, sob agitação constante, temperatura ambiente. Em sequência, a membrana foi lavada em TBST durante 30 min, sob agitação constante, temperatura ambiente. Para detecção da expressão proteica, a membrana foi incubada com substrato quimioluminescente do kit Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (código 32132, Thermo Fisher Scientific) e revelada no equipamento de

quimioluminescência Amersham Imager 600 (código 29013461, GE Healthcare, Chicago, IL) (KABUTOMORI et al., 2018; MUSA-AZIZ; BORON; PARKER, 2010).

3.9 Medidas de permeabilidade osmótica à água

A medida de permeabilidade osmótica à água (P_f) de oócitos que foram injetados com cRNA para expressão de UT-A2^{WT} e mutantes UT-A2^{T176V} ou UT-A2^{T338V} versus oócitos controle foi determinada através de um ensaio volumétrico utilizando um microscópio equipado com uma câmera de vídeo que possui um software que nos permite calcular a porcentagem de inchamento celular de oócitos expostos à uma solução hipotônica (MUSA-AZIZ et al., 2009; GEYER et al., 2013; KABUTOMORI et al., 2018).

Brevemente, 10 oócitos de cada grupo foram colocados em uma placa de petri contendo solução ND96 controle hipotônica, com osmolaridade reduzida de 195 para 70 mOsm/L H₂O, e imagens de vídeo foram coletadas a cada 1 s durante 1 min, obtendo uma variação da área de projeção de cada oócito ao longo do tempo. Considerando o oócito como sendo uma esfera com uma área total (S) 8-vezes maior do que a área da esfera projetada, a P_f é calculada de acordo com a equação:

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

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, ΔOsm é o gradiente osmótico através da membrana e V_w é o volume molar da H₂O.

3.10 Estatística

Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão. O (n) se refere ao número de oócitos. A diferença entre 2 valores médios foi comparada utilizando o test t de Student, não pareado. Quando comparado mais de 2 grupos foi utilizada Análise de Variância (one way ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), através do software Kaleida Graph (verão 4, Synergy Software). $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sequenciamento do cDNA mUT-A2^{WT} c-Myc

A sequência de cDNA, obtida a partir da leitura realizada pela Central Analítica IQ/USP, foi traduzida em sequência de aminoácidos utilizando a plataforma Expasy Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>).

Para analisar a integridade e a identidade do mUT-A2^{WT} c-Myc, a sequência de aminoácidos obtida foi comparada a uma sequência padrão de UT-A2 descrita para a espécie *Mus musculus* (encontrada na plataforma National Center for Biotechnology Information – NCBI). Essa comparação foi realizada a partir do alinhamento das duas sequências de aminoácidos utilizando o programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

Como é possível observar na figura 11, a sequência do mUT-A2^{WT} c-Myc não apresenta grandes diferenças em relação à sequência padrão de UT-A2, confirmando sua integridade e sua identidade.

Ainda é possível confirmar a presença da sequência EQKLISEEDL, que corresponde ao epítipo c-Myc adicionado à região C-terminal do mUT-A2 (destacado em verde).

Figura 11 – Alinhamento da sequência de aminoácidos padronizada para UT-A2 de *Mus musculus* com a sequência de mUT-A2^{WT}. Em verde está destacado a sequência do epítipo c-Myc

UT-A2_Mus_musculus	MEESTEIKVEANTARTSWIQSSMVAGGKRVSKALSYITGEMKECGEGLKDKSPVFQFLDW	60
mUT-A2_cMyc	MEESTEIKVEANTARTSWIQSSMVAGGKRVSKALSYITGEMKECGEGLKDKSPVFQFLDW	60

UT-A2_Mus_musculus	VLRGMSQVMFVNNPLSGILIVLGLFVQNPWWAISGCLGTVMSTLTALILLSQDKSAIAAGL	120
mUT-A2_cMyc	VLRGMSQVMFVNNPLSGILIVLGLFVQNPWWAILGCLGTVMSTLTALILLSQDKSAIAAGL	120

UT-A2_Mus_musculus	HGYNGVLVGLLMAVFSDKGNYWLLLLPVIVMSMTCPIILSSALSTVFSKWDLPVFTLPFN	180
mUT-A2_cMyc	HGYNGVLVGLLMAVFSDKGNYWLLLLPVIVMSMTCPIILSSALSTVFSKWDLPVFTLPFN	180

UT-A2_Mus_musculus	IAVTLYLAATGHHNLFPPPTLLQPATTPPNITWSDIQVSLLLRAIPVIGIQVYGCNDPWT	240
mUT-A2_cMyc	IAVTLYLAATGHHNLFPPPTLLQPATTPPNITWSDIQVSLLLRAIPVIGIQVYGCNDPWT	240
	*****:*	
UT-A2_Mus_musculus	GGIFLVALFISSPILCLHAAIGSTIGMLAALSIAFPFDSIYFGLCGFNSTLACIAIGGMF	300
mUT-A2_cMyc	GGIFLVALFISSPILCLHAAIGSTIGMLAALSIAFPFDSIYFGLCGFNSTLACIAIGGMF	300

UT-A2_Mus_musculus	YVITWQTHLLAIACALFAAYLGAALANMLSVFGLPPCTWPFCLSAITFLLTSNNPAIYK	360
mUT-A2_cMyc	YVITWQTHLLAIACXFAAYLGAALANMLSVFGLPPCTWPFCLSAITFLLTSNNPAIYK	360

UT-A2_Mus_musculus	LPLSRVTYPEANRIYFLSQEKNRRASTITKYQAYDVS-----	397
mUT-A2_cMyc	LPLSKVTYPEANRIYFLSQEKNRRASTITKYQAYDVS EOKLISEEDI	407
	****:*****	

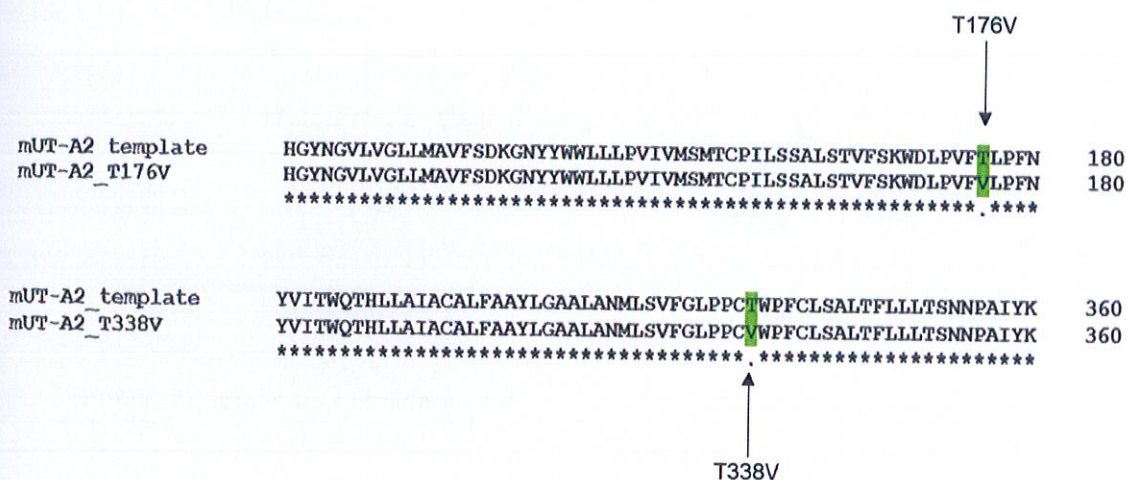
Fonte: (Arquivo Pessoal)

4.2 Sequenciamento dos cDNAs mutantes

A substituição dos resíduos de Thr T172 e T338 por resíduos de Val foi confirmada a partir do sequenciamento dos cDNAs obtidos ao final do experimento de mutação.

As sequências de aminoácidos dos mutantes mUT-A2^{T176V} e mUT-A2^{T338V} foram comparadas por alinhamento (como descrito no item 4.1) com a sequência de aminoácidos do mUT-A2^{WT} c-Myc, utilizado com cDNA template para a mutação (Fig.12).

Figura 12 – Alinhamento de parte da sequência de mUT-A2^{WT} (template) com a sequência dos mutantes mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V}. Em verde está evidenciado o êxito da mutação dos resíduos de Thr pela Val



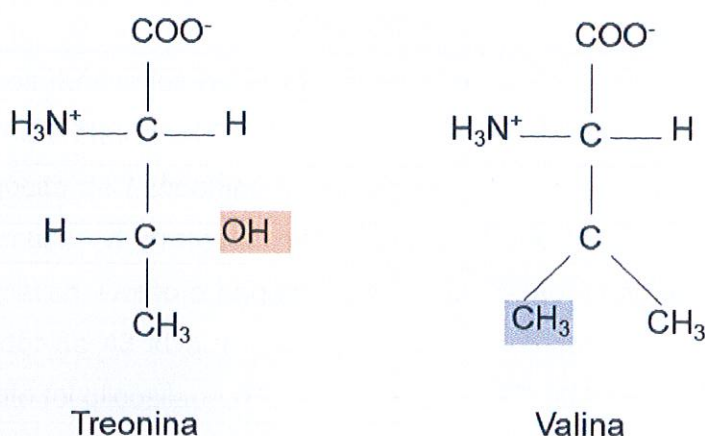
Fonte: (Arquivo Pessoal)

Depois de confirmar que a mutação dos resíduos de Thr pela Val foi efetiva, ou seja, que houve a geração dos mutantes mUT-A2^{T176V} e mUT-A2^{T338V} a partir de mUT-A2^{WT}, foram realizados experimentos para avaliar a expressão das proteínas WT ou mutantes em oócitos de *Lithobates*, assim como o efeito da mutação no transporte facilitado de água pelo mUT-A2, quando expresso em oócitos.

4.3 Análise da expressão da proteína mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} e mUT-A2^{T338V} na superfície de oócitos de *Lithobates*

A Thr é um aminoácido polar, sem carga, que possui um grupo hidroxila na cadeia lateral com característica hidrofílica. A Val é um aminoácido apolar, sem carga, que, diferentemente da Thr, não possui o grupamento hidroxila na cadeia lateral (Fig. 13), tendo característica hidrofóbica. Portanto, a substituição de um aminoácido polar como a Thr por um aminoácido apolar como a Val em mUT-A2, aumenta a hidrofobicidade do poro monomérico para ureia.

Figura 13 – Representação dos aminoácidos Treonina e Valina



Fonte: Adaptado de Lehninger (2008).

Com base nas características dos aminoácidos Thr e Val, neste trabalho, decidimos mutar as Thr T176 ou T338 da região S_m do filtro de seletividade no poro monomérico da proteína mUT-A2^{WT} pela Val com o intuito de avaliar a importância desses resíduos na expressão da proteína na membrana dos oócitos de *Lithobates* e no transporte de água.

Para verificar a expressão das proteínas na membrana plasmática, os oócitos foram injetados com cRNA para expressão de mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V} (todos com o c-Myc na terminação C). Foram realizados experimentos de biotinylação que permitem a marcação e o isolamento exclusivo de proteínas expostas na superfície celular. Com as amostras obtidas, realizamos experimentos de *Western blot*, utilizando o anticorpo primário específico anti-cMyc.

Nossos experimentos demonstraram que os oócitos de *Lithobates*, após a injeção de cRNA, são capazes de expressar mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V} na membrana plasmática devido à presença de bandas ao redor de 43 kDa e de 100 kDa, que correspondem, respectivamente, ao peso molecular das formas monomérica e trimérica da proteína UT-A2 já descrita (Fig. 14).

O peso molecular da proteína mUT-A2 é de 34 kDa (quando esta proteína não possui glicosilação) (MACIVER et al., 2008) e de 43 kDa (mais pesada, quando

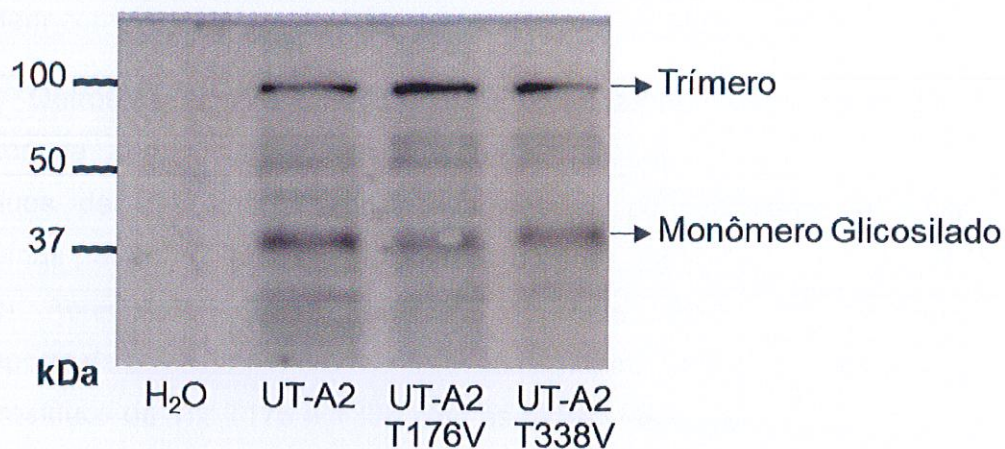
a proteína possui glicosilação no sítio específico) (POTTER; STEWART; SMITH, 2006).

Portanto, os resultados de *Western blot* indicam que, após injeção de cRNA para expressão da proteína mUT-A2^{WT}, mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V}, a maquinaria intracelular do oócito de *Lithobates* foi capaz de reconhecer e traduzir o cRNA em proteína e expressar a proteína mUT-A2^{WT}, mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V} na membrana plasmática. Como a banda correspondente ao monômero da proteína foi detectada ao redor de 43 kDa, nossos resultados também indicam que a proteína expressa no oócito foi glicosilada (POTTER; STEWART; SMITH, 2006).

Assim sendo, a mutação dos resíduos de Thr pela Val não prejudicou a expressão das proteínas mutantes na membrana plasmática dos oócitos, uma vez que, as canaletas correspondentes a essas proteínas no resultado de *Western blot* apresentam bandas com uma densidade semelhante àquela das bandas da proteína WT. Portanto, os resultados indicam que a ausência dos resíduos de Thr não alterou o tráfego da proteína para a membrana, nem sua ancoragem.

Além disso, não foram observadas bandas na coluna referente aos oócitos controle, injetados com H₂O, confirmando assim, que os oócitos de *Lithobates* não apresentam expressão endógena de UT-A2^{WT}. Esse resultado pode ser visto na coluna correspondente à H₂O.

Figura 14 – Análise de *Western blot* com as proteínas isoladas da membrana de oócitos de *Lithobates* para a detecção das proteínas mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} e mUT-A2^{T338V} utilizando anticorpo monoclonal anti-cMyc



4.4 Análise da *P_r* dos oócitos de *Lithobates* injetados com cRNA para a expressão de mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V}

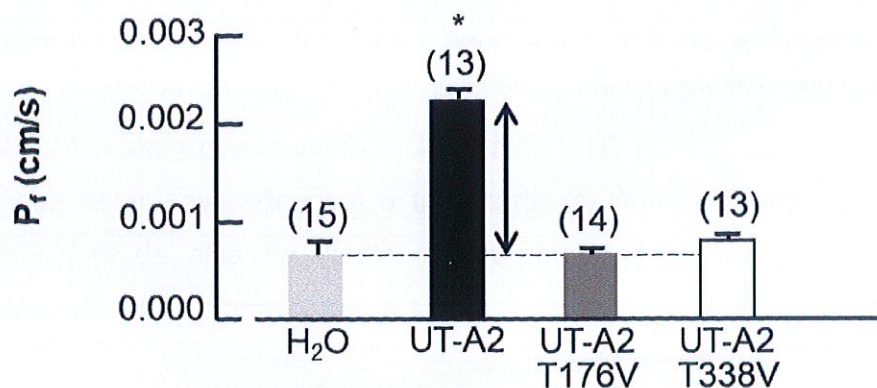
Depois de confirmar a expressão proteica de mUT-A2^{WT} e mutantes mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V} na membrana plasmática dos oócitos de *Lithobates* e a ausência da expressão de UT-A2 nos oócitos controle foram realizados experimentos de *P_r* dos oócitos injetados com cRNA para a expressão de mUT-A2^{WT} para avaliar o efeito da proteína no transporte de água através da membrana dos oócitos. Em adição, foi avaliado o efeito da mutação dos resíduos de Thr para a Val no possível transporte de água facilitado por mUT-A2, quando expresso nos oócitos.

Os resultados mostram que oócitos injetados com cRNA para expressão de mUT-A2^{WT} na membrana plasmática apresentam uma *P_r* significativamente maior quando comparada com àquela dos oócitos controle, injetados com H₂O, ou os oócitos injetados com cRNA para a expressão dos mutantes mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V} (Fig. 15). Assim, nossos resultados demonstram que a proteína mUT-A2^{WT} é capaz de transportar água, além de transportar ureia. Portanto, a substituição do resíduo de Thr por Val na posição T176 ou T338, afetou significativamente o transporte de água, indicando que os resíduos conservados de Thr no filtro de

seletividade do poro monomérico são essenciais para o transporte facilitado de água através da proteína mUT-A2. Como a água, assim como a ureia, é uma molécula polar, um aumento da hidrofobicidade do poro monomérico em mUT-A2 tende a interferir com o transporte de água.

Outros estudos realizados com as proteínas hUT-B e bUT-B expressas em oócitos de *Xenopus* demonstraram que a mutação dos resíduos de Thr pelos resíduos de Val diminui significativamente a permeabilidade à ureia dessas proteínas por aumentar a hidrofobicidade do poro (GEYER et al 2013; LEVIN et al., 2012). Acreditamos que o transporte de água pelo mUT-A2, semelhante ao transporte de ureia, depende da interação das hidroxilas presentes na cadeia lateral dos resíduos de Thr T176 e T338 com as moléculas de água na região S_m do filtro de seletividade do poro monomérico.

Figura 15 – Gráfico que ilustra a P_f para mUT-A2^{WT}, mUT-A2^{T176V} e mUT-A2^{T338V} versus oócitos controle



* $P < 0.05$ vs H₂O (Teste T "Student - 2 tails")

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os oócitos de *Lithobates* foram uma ferramenta útil no estudo das nossas proteínas de membrana. Por serem células grandes com 1,3 mm de diâmetro (facilita o seu manuseio), resistentes (sobrevivem após a inserção de uma micropipeta de vidro para a injeção de um volume de cRNA ou H₂O) e capazes de expressar proteínas heterólogas, permitiram o estudo isolado da expressão e função das nossas proteínas de membrana (sem a interferência de outras proteínas presentes no tecido original).

Os ensaios de *Western blot* obtidos demonstram que os oócitos de *Lithobates*, após injeção de cRNA para a expressão das proteínas mUT-A2^{WT}, mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V}, são capazes de traduzir e expressar essas proteínas na membrana plasmática e que a mutação dos resíduos de Thr nas posições T176 e T338 pela Val não interfere na expressão das proteínas mutantes (mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V}) na membrana dos oócitos de *Lithobates*.

A análise da medida da permeabilidade osmótica à água demonstra, pela primeira vez, que os oócitos de *Lithobates* injetados com cRNA para mUT-A2^{WT} c-Myc possuem permeabilidade osmótica à água significativamente maior que àquelas dos oócitos controle ou mutantes (mUT-A2^{T176V} ou mUT-A2^{T338V}). Portanto, nossos resultados confirmam a permeabilidade à água de mUT-A2^{WT} — sugerindo que essa proteína pode estar envolvida com o transporte de água ao longo do segmento descendente fino da alça de Henle, sendo importante para o mecanismo de concentração urinária (conservação da água no organismo) — e indicam que as Thr conservadas T176 e T338 no filtro de seletividade estão envolvidas com a passagem de água através do poro monomérico de mUT-A2^{WT}.

Se a permeabilidade à água observada para o mUT-A2^{WT} em oócitos de *Lithobates* for compatível com a função desta proteína no segmento descendente fino da alça de Henle (que apresenta permeabilidade à água mas não apresenta expressão dos canais para água AQP1), então, a permeabilidade à água do UT-A2 neste segmento contribuiria para a formação de uma urina concentrada, sendo este mecanismo importante para a conservação da água no organismo.

APOIO FINANCEIRO

Os autores deste trabalho agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento dos projetos de pesquisa (n^{os}. 2013/11364-3 e 2013/23087-4) do laboratório de Fisiologia e Biofísica de Transportadores coordenado pela Prof^a. Dr^a. Raif Musa Aziz e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa tipo PIBIC (Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica) administrado pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo e destinado a aluna de graduação Neydiana Belize de Pina Lopes (PIBIC n^o. 167146/2018-1).

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- BAGNASCO, S.M. The erythrocyte urea transporter UT-B. **Journal of Membrane Biology**, v.212, p.133–138, 2006.
- 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. 2014
- 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.
- FENTON, R. A.; YANG, B. Urea Transporter Knockout Mice and Their Renal Phenotypes. **Subcellular Biochemistry**, v.73, p.137-152, 2014.
- GEYER, R. R. et al. Movement of NH₃ through the human urea transporter B: a new gas channel. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 304, n. 12, p.1447-1457, abr. 2013.
- GIEBISCH, G.; WINDHAGER, E. Urine concentration and dilution. In: BORON, Walter F.; BOULPAEP, Emile L. **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. Filadélfia: Elsevier Saunders, 2017, cap 33, p. 835–850.
- JAMISON R. L.; GEHRIG J. J. Jr. Urinary concentration and dilution: Physiology. In: Terjung R (ed) Handbook of physiology, renal physiology. **American Physiological Society**, Bethesda, p.1219–1279. 2011.
- KABUTOMORI, J et al. Lithobates catesbeianus (American Bullfrog) oocytes: a novel heterologous expression system for aquaporins. **Biology Open**, v. 7, n.4, p. 809-822, mar. 2018.
- KLEIN, J. D.; SANDS, J. M. Urea transport and clinical potential of ureaeretics. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 25, n.5, p. 444–451. 2016
- 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, 2 abr. 2015.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.

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**, Waltham, 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.; YANG, B. Urea Transporter Physiology Studied in Knockout Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p.1-11, jun. 2012.

MACIVER, B et al. Functional characterization of mouse urea transporters UT-A2 and UT-A3 expressed in purified *Xenopus laevis* oocyte plasma membranes. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v.294, p.956-964, fev. 2008.

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. 2009

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.

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, 24 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.

POTTER, E. A.; STEWART, G.; SMITH, C. P. Urea flux across MDCK-mUT-A2 monolayers is acutely sensitive to AVP, cAMP, and $[Ca^{2+}]_i$. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 291, n. 1, p.122-128, jul. 2006.

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.

SMITH, C. P. Mammalian urea transporters. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 2, p.180-185, 15 jan. 2009

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, 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.

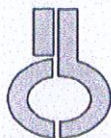
VERKMAN, A.S. Roles of Aquaporins in Kidney Revealed by Transgenic Mice. **Seminars in Nephrology**, v. 26, n. 3, p.200-208, mai. 2006.

YANG, B.; BANKIR, L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 288, n. 5, p.881-896, mai. 2005.

VYN, G. **Bullfrog partially submerged in a pond**. 2010. Color., 4288 x 2848 pixels, 36,31 x 24 cm.

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, 17 out. 2007



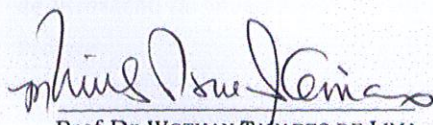
**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

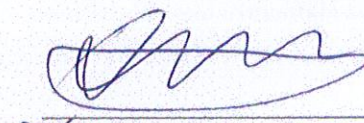
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **84** nas fls. **72** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Raif Musa Aziz, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Eletrofisiologia dos mecanismos de transporte envolvidos na secreção de amônia (NH₃/NH₄⁺) no ducto coletor renal** do qual participou(aram) o(s) alunos, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **13.07.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de julho de 2009.


Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP


Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP



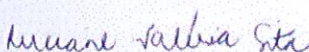
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.215.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **083/2015/CEUA**, válido até 25/08/2019, e por solicitação da Profa. Dra. **Raif Musa Aziz**, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Neydiana Belize de Pina Lopes** ao Projeto de Pesquisa "*Novo modelo de expressão heteróloga para estudos de proteínas de membrana: oócitos de Rana catesbeiana. Caracterização da expressão e função de transportadores de amônia (NH₃/NH₄⁺) em oócitos de Rana catesbeiana*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 19 de dezembro de 2017.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP