UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

NATHANNE DOS SANTOS FERREIRA

Contribuição do receptor GPER para as alterações de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência produzidas pela aldosterona: influência do diabetes mellitus.

RIBEIRÃO PRETO

2014

NATHANNE DOS SANTOS FERREIRA

Contribuição do receptor GPER para as alterações de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência produzidas pela aldosterona: influência do diabetes mellitus

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ferreira, Nathanne dos Santos

Contribuição do receptor GPER para as alterações de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência produzidas pela aldosterona: influência do diabetes mellitus.

106 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Tostes Passaglia, Rita de Cássia Aleixo

1. Diabetes Mellitus. 2. Aldosterona. 3. Artérias Mesentéricas de Resistência. 4. Receptor Mineralocorticoide. 5. Receptor GPER.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERREIRA, N.S. Contribuição do receptor GPER para as alterações de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência produzidas pela aldosterona: influência do diabetes mellitus. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração Farmacologia.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia
FMRP-USP

Prof. Dr Lusiane Maria Bendhack
FMRP/FCFRP-USP

Prof. Dr Fernando Paranaíba Filgueira
Universidade Federal de Goiás - Jataí

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Helena e Paulo

Pelo incentivo e apoio em todos os
momentos da minha vida.

Aos meus irmãos Allyne e Ulisses

Pela amizade e confiança sempre depositada
em mim.

Ao meu namorado Rangel

Pelo amor, dedicação e companheirismo a
cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me iluminado e me guiado em todos os momentos que precisei. Obrigada pelas bênçãos derramadas em minha vida e por nunca ter me abandonado.

À minha querida orientadora e mentora Professora Dra Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia pela oportunidade e confiança depositada em mim. Agradeço por ter me recebido de braços aberto em seu laboratório e confiado a mim seu tempo e ensinamentos, que foram essenciais para meu crescimento. Obrigada por me permitir acreditar que sempre vale a pena lutar pelo que queremos. Obrigada por ser essa mulher tão generosa e humilde, por ser um exemplo de pessoa.

As professoras Dra. Lusiane Maria Bendhack e Dr. Fernando Paranaíba Filgueira pelas contribuições e disponibilidade em participar dessa banca de mestrado

De maneira especial agradeço à Prof. Dr^a. Núbia Lobato e Prof. Fernando Filgueira por me proporcionarem a oportunidade de conhecer a professora Rita. Agradeço o incentivo e os conselhos, que foram essenciais para eu ter conseguido terminar mais essa etapa.

Agradeço ao Professor Stêfany Cau pelas ideias e sugestões importantes para a elaboração e desenvolvimento desse trabalho. Agradeço a atenção, paciência e a amizade durante esse período de aprendizado.

Agradeço ao Professor Fernando Carneiro pelos ensinamentos, pela paciência e conselhos durante essa trajetória. Agradeço toda a atenção nas sugestões e discussões das ideias.

À minha família pelo incentivo e pela confiança em mim. À minha querida e amada mãe Maria Helena por sempre me apoiar, agradeço mãezinha por me ensinar a buscar meus sonhos e por me mostrar com belos exemplos. Agradeço pelas orações, pelas lágrimas e pelo amor incondicional que me incentiva a continuar lutando. Ao meu pai Paulo por todos os ensinamentos e aos meus queridos irmãos Allyne e Ulisses pelo

apoio, companheirismo, carinho e incentivo. Saibam que podem contar sempre comigo. Obrigada por me apoiarem cada um do seu jeito, pelas ligações, pelas palavras de carinho e pelo cuidado mesmo à distância. O carinho de vocês permite que eu tenha confiança para superar todos os desafios. Agradeço ainda à minha avó Rita, às minhas madrinhas Lourdes e Lindaci e todos os tios, tias, primos e primas que torceram e contribuíram de alguma forma para a finalização de mais essa etapa da minha vida.

Ao meu querido namorado Rangel Carvalho Assis, pelo apoio, paciência, incentivo e dedicação. Obrigado por contribuir para a realização dessa etapa e mesmo a distância ser meu porto seguro seja nos momentos de alegria ou nos períodos mais difíceis. Agradeço também à sua família, que também já considero minha, pelo apoio durante essa caminhada.

Agradeço à minha amiga e Professora Sandra Aparecida Benite Ribeiro por ser a primeira a incentivar a minha carreira acadêmica. Agradeço por despertar em mim o interesse pela pesquisa e pelo incentivo durante esse período.

Aos meus queridos companheiros de laboratório Karla, Rhéure, Camila Zanotto, Camila André, Vânia, Marcondes, Thiago Dias, Thiago Bruder, Rafael Menezes, Rafael Fais, Fernanda Rodrigues, Fernanda Ramalho, as técnicas Carla Pavan e Fabíola, professor Fernando Carneiro e a Zidônia pelos momentos de descontração, de alegria e pela ajuda. Vocês se tornaram muito mais que colegas de trabalho, mas sim uma família. A companhia de vocês fizeram essa etapa mais prazerosa e a saudade de casa mais suportável.

Agradeço também as minhas amigas e minha outra família de Ribeirão Ana Paula, Tatiane e Ludmila. Obrigada meninas pelo companheirismo, pelas confidências, alegrias e momentos de descontração depois de um dia de trabalho. Muito bom saber que posso contar com pessoas tão especiais. Contem sempre comigo também.

Agradeço ainda a minhas queridas amigas Kassila, Ângara Nayane, Taíza, Aline, Jackeline, Andréia pelo incentivo e palavras amigas. Vocês são muito especiais e agradeço pela amizade sincera e sem cobranças.

À Universidade de São Paulo por me conceder toda estrutura para realização desse trabalho e também a CAPES e o CNPq pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

Agradeço de maneira especial a todos os professores e colegas do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e agradeço às secretarias Soninha e Fátima e ao Ramon pela atenção, disposição e apoio em todos os momentos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação seja por um gesto, uma palavra amiga, um incentivo e dando força para que esse objetivo fosse alcançado e que de alguma maneira não citei aqui, meus mais sinceros agradecimentos.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

(Esopo)

RESUMO

FERREIRA, N.S. Contribuição do receptor GPER para as alterações de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência produzidas pela aldosterona: influência do diabetes mellitus. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O diabetes é uma doença crônica que afeta mais de 8% da população mundial. As alterações vasculares estão relacionadas às principais complicações do diabetes. A aldosterona contribui para a disfunção endotelial após a ativação do receptor mineralocorticóide (MR). Recentemente, foi demonstrado que a aldosterona ativa o receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER). A ativação de GPER está relacionada a efeitos benéficos na vasculatura. Entretanto, ainda não existem estudos em artérias de resistência relacionando aldosterona e GPER e essa interação no diabetes. Dessa forma, o presente estudo testou a hipótese de que a aldosterona ativando receptores GPER promove efeitos benéficos na vasculatura, mas esses efeitos estão diminuídos no diabetes. Os objetivos foram investigar os níveis de expressão de GPER nos animais controle e db/db [camundongos com mutação no receptor de leptina que desenvolvem obesidade e diabetes tipo 2], quais efeitos da aldosterona são mediados por ativação de GPER e quais mecanismos envolvidos nessa ativação e verificar se estão alterados no diabetes. O grupo diabético apresentou maior expressão de GPER, mas não de MR. A aldosterona promoveu aumento da resposta máxima contrátil à fenilefrina (PE) somente no grupo controle, que foi revertido pelo uso do antagonista de GPER, G15. No grupo diabético, a resposta à PE já é aumentada, o uso dos antagonistas de MR e GPER reduziram a resposta da PE. A aldosterona ainda reduziu a potência de relaxamento da acetilcolina (ACh) em ambos os grupos, por ativação de MR. O antagonismo de GPER por G15 promoveu uma redução adicional na potência do relaxamento no grupo controle, mas não afetou a resposta do grupo diabético. Esses achados confirmam a hipótese de que GPER exerce um papel benéfico na vasculatura e esse efeito é perdido no diabetes. Nossos resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos que a aldosterona influencia os danos vasculares no diabetes através da ativação de receptores MR e GPER.

Palavras-chave: diabetes mellitus, aldosterona, receptor mineralocorticóide, GPER, artérias mesentérica de resistência.

ABSTRACT

FERREIRA, N.S. **Contribution of GPER for vascular reactivity changes in mesenteric resistance arteries produced by aldosterone: influence of diabetes mellitus.** 2014. 106 f. Dissertation (Master), Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Diabetes is a chronic disease that affects more than 8 % of the world population. Vascular changes are related to the major complications of diabetes. Aldosterone contributes to endothelial dysfunction after activation of the mineralocorticoid receptor (MR). It was recently shown that aldosterone also activates the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) and induces non genomic effects. The activation of GPER by estrogen or G1 is related to beneficial effects on the vasculature. However, there are no studies demonstrating the relationship between aldosterone and GPER in diabetes mellitus. Therefore, we hypothesized that the beneficial effects of aldosterone mediated by the activation of GPER receptors on vascular reactivity are decreased in diabetes mellitus. Female control and diabetic (db/db) mice [leptin receptor knockout mice that develop obesity and type 2 diabetes] were used. We determined the expression of GPER and the effect of aldosterone in the presence of MR and GPER antagonists in arteries from control and db/db mice and the major signaling pathways involved. The diabetic group showed increased GPER expression, but not MR. In the presence of aldosterone the control increased the maximal contractile response to phenylephrine (PE), and this increase was reversed by the use of GPER antagonist, G15. The response to PE is already increased in the diabetic group. Although aldosterone did not cause further increase the use of MR and GPER antagonists reduced the maximum response to PE at the same level of control. Aldosterone also reduced the potency of acetylcholine (ACh)-induced relaxation in both groups by the activation of MR. GPER antagonism caused further decrease in the potency of ACh-induced relaxation in the control group, while not affecting the response of the diabetic group. These findings confirm the hypothesis that the beneficial effects of aldosterone mediated by the activation of GPER receptors are decreased in diabetes mellitus. Our results contribute to understanding the mechanisms that aldosterone influences the vascular damage in diabetes through activation of MR and GPER receptors.

Keywords: diabetes, aldosterone, mineralocorticoid receptor, GPER, mesenteric resistance arteries.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

11βHSD2	11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2
ACh	Acetilcolina
Akt	proteína cinase B
Aldo	Aldosterona
AMPc	monofostato cíclico de adenosina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
AT1	receptores para angiotensina tipo 1
BSA	Soro Fetal Bovino
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	cloreto de cálcio
CMLV	células de músculo liso vascular
CO₂	dióxido de carbono
Ct	limiar do ciclo
CYP11B2	enzima aldosterona sintase
DAPI	4, 6-diamidino-2-fenilindol
db/db	Camundongos com depleção do receptor de leptina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
E2	Estrógeno
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidermal
E_{max}	efeito máximo produzido por uma agonista
ENaC	canal epitelial para íon sódio
eNOS	sintase de óxido nítrico endotelial
eple	Eplerenona
E.P.M.	erro padrão da média
ERK1/2	cinase regulada por sinalização extracelular 1/2
ERO	espécies reativas de oxigênio
GPER	Receptor de Estrógeno acoplado à Proteína G

GTP	trifosfato de guanosina
HbA1c	hemoglobina glicosilada
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IgG	Imunoglobulina G
IP₃	trifosfato de inositol
IRS	substrato do receptor de insulina
JNK	cinase c-Jun NH ₂ -terminal
K⁺	Potássio
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
Ki-ras2A	Proteína monomérica de ligação de GTP da proteína Kirsten Ras
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos
Mg⁺	Magnésio
MgSO₄.7H₂O	sulfato de magnésio heptahidratado
mN	miliNewton
MR	receptor mineralocorticóide
Na⁺	Sódio
NaCl	cloreto de Sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO	óxido nítrico
O₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	tampão salina fosfato
pD₂	logaritmo negativo da concentração de uma droga que induz 50% do efeito máximo
PE	Fenilefrina
PI₃K	cinase de fosfoinosítídeos na posição
PKC	proteína cinase C
PKB	proteína cinase B
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil

RAAS	sistema renina-angiotensina-aldosterona
RNA	ácido ribonucleico
SHC	proteína adaptadora com homologia-Src
u.a.	Unidades arbitrárias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese da aldosterona e cortisol a partir do colesterol..... 29

Figura 2. Hipótese de trabalho: Os efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores GPER sobre a reatividade vascular estão diminuídos no diabetes mellitus. . 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados	50
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. CLASSIFICAÇÃO	20
1.2. EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES	21
1.3. DIAGNÓSTICO DE DIABETES	23
1.4. COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DIABETES.....	24
1.5. FISIOPATOLOGIA DO DIABETES.....	26
1.5.1. Aldosterona	28
1.5.2. Efeitos cardiovasculares da aldosterona.....	30
1.5.3. Aldosterona e doenças cardiovasculares.....	32
1.5.4. Aldosterona e doenças metabólicas	32
1.5.5. Receptores Mineralocorticóides.....	33
1.5.6. Receptores GPER.....	35
2. HIPÓTESE	39
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	41
3.1. OBJETIVOS GERAIS	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. ANIMAIS	43
4.1.1. Massa Corporal e Glicemia.....	43
4.2. ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR	43
4.2.1. Preparo dos Anéis de Artérias Mesentéricas de Resistência Isoladas.....	43
4.2.2 Normalização das artérias mesentéricas de resistência	44
4.2.3. Protocolos experimentais.....	45
4.2.3.1. Efeitos da aldosterona sobre a contração induzida por PE	45
4.2.3.2. Efeitos da aldosterona sobre a vasodilatação induzida por ACh.....	45
4.2.3.3. Participação de receptor MR nos efeitos da aldosterona sobre a contração induzida por PE e a vasodilatação induzida por ACh.....	46
4.2.3.4. Participação de receptor GPER nos efeitos da aldosterona sobre a contração induzida por PE e a vasodilatação induzida por ACh	46
4.3. QUANTIFICAÇÃO GÊNICA E PROTÉICA	46
4.3.1. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (Q-PCR em tempo real).....	46
4.3.1.1. Homogeneização do tecido	47
4.3.1.2. Extração do RNA.....	47
4.3.1.3. Precipitação do RNA	47

4.3.1.4. <i>Quantificação do RNA</i>	47
4.3.1.5. <i>Reação de Transcriptase Reversa</i>	48
4.3.1.6. <i>PCR quantitativo em tempo real</i>	48
4.3.2. <i>Western blotting</i>	49
4.3.2.1 <i>Extrato total</i>	49
4.3.2.2 “ <i>Immunoblotting</i> ”	50
4.3.2.3 <i>Participação da aldosterona na fosforilação da ERK 1/2</i>	51
4.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA	51
4.4.1. <i>Preparação das lâminas</i>	51
4.4.2. <i>Imunomarcção do Receptor Mineralocorticóide</i>	51
4.4.3. <i>Imunomarcção do Receptor GPER</i>	52
4.4.4. <i>Leitura das lâminas</i>	52
4.5. DROGAS E SAIS UTILIZADOS	53
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	76
Certificado da Comissão de Ética.....	76

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença crônica considerada como problema grave de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. É caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de glicose, o que contribui para o surgimento de complicações associadas a essa doença. As alterações no sistema vascular desempenham papel crucial nas principais complicações clínicas atribuídas ao diabetes, aumentando o risco de claudicação, úlceras isquêmicas, gangrena e amputação de membros inferiores (A.D.A., 2003; Huysman e Mathieu, 2009).

As alterações vasculares da microcirculação e da macrocirculação podem ser estruturais e/ou funcionais e estão associadas à disfunção das células endoteliais, das células do músculo liso vascular, do processo inflamatório e de fatores coagulantes. Os danos vasculares ainda contribuem para a elevação do risco de doenças cardiovasculares, além de ocasionar lesões em vários órgãos-alvo como coração, cérebro, olhos, rins e nervos (A.D.A., 2003; Hile e Veves, 2003; Huysman e Mathieu, 2009). Estes fatos justificam a importância de se estudar os mecanismos relacionados às alterações vasculares associadas ao diabetes.

1.1. CLASSIFICAÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Who, 2006) e a Federação Internacional de Diabetes (IDF) o diabetes pode ser classificado em:

- **Diabetes Tipo 1:** Resulta em destruição das células β pancreáticas, levando à deficiência absoluta de insulina. Ela é causada geralmente por uma reação autoimune em que o sistema de defesa do corpo ataca as células que produzem insulina e, por esse motivo, as pessoas que desenvolvem este tipo de diabetes necessitam de injeções diárias de insulina para controlar os níveis plasmáticos de glicose. Autoanticorpos circulantes como antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina são responsáveis pela destruição das células β pancreáticas. Algumas vezes, o diabetes tipo 1 está associado a outras doenças autoimunes como a tireoidite de Hashimoto, doença de Addison e miastenia gravis. Em menor proporção, a causa da destruição das células β é desconhecida, ou idiopática. Essa forma de diabetes pode afetar pessoas de qualquer idade, mas geralmente se desenvolve em crianças ou jovens adultos.

- **Diabetes Tipo 2:** É caracterizado pela resistência à ação da insulina e deficiência relativa da secreção de insulina, sendo que um ou ambos sinais podem estar presentes no momento do diagnóstico. Esse tipo de diabetes pode ocorrer em qualquer idade, mas é característico da fase adulta e é responsável por pelo menos 90% de todos os casos de diabetes. O diabetes tipo 2 pode permanecer despercebido durante muitos anos e o diagnóstico é muitas vezes feito quando surge uma complicação ou quando exames de sangue são realizados rotineiramente ou testes de glicose na urina. É muitas vezes, mas nem sempre, associado a excesso de peso ou obesidade, o que por si pode causar resistência à insulina e levar a altos níveis de glicose no sangue. Pessoas com diabetes tipo 2 conseguem inicialmente controlar a sua condição através de exercícios e dieta. No entanto, ao longo do tempo é necessário o uso de medicamentos orais e ou insulina para o controle da glicemia.

- **Diabetes Gestacional:** É uma forma de diabetes que consiste em altos níveis de glicose no sangue durante a gravidez. Ela se desenvolve em uma a cada 25 gestações em todo o mundo e está associada a complicações para a mãe e o bebê. Esse tipo de diabetes geralmente desaparece após a gravidez, mas as mulheres com diabetes gestacional e seus filhos têm um risco aumentado de desenvolver diabetes tipo 2 posteriormente. Cerca de metade das mulheres com histórico de diabetes gestacional desenvolve diabetes tipo 2 dentro de cinco a dez anos após o parto.

- **Outros tipos:** Incluem defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças no pâncreas exócrino e drogas ou tratamentos que induzem diabetes.

1.2. EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES

A IDF estimou que em 2012, 371 milhões de pessoas no mundo apresentavam diabetes, atingindo prevalência de 8,3% na população mundial. As regiões que apresentam maior prevalência de casos de diabetes são Oriente Médio e o Norte da África, seguidos da América do Norte e Caribe. O Brasil é o quarto país com maior número de pessoas por território com diabetes, sendo o primeiro a China, seguido da Índia e dos Estados Unidos (Guariguata, 2012; I.D.F., 2012a). Estima-se que em 2030 o Brasil ainda permanecerá o quarto país em maior número de casos de diabetes com cerca de 19,6 milhões de pessoas diabéticas (Whiting *et al.*, 2011).

Apesar do grande número de pessoas com diabetes é preocupante o fato de que 50% da população ainda não seja diagnosticada, o que pode contribuir para a descoberta da doença em fases mais avançadas, em que lesões em órgãos-alvo são notadas. Na África do Sul estima-se que existam 81,2% de casos de diabetes não diagnosticados, enquanto nas Américas do Sul e Central, cerca de 40% da população não tem o diagnóstico (Guariguata, 2012; I.D.F., 2012a).

De acordo com o IDF, quatro em cada cinco pessoas com diabetes vivem em países de baixa e média renda, onde os sistemas de saúde estão em desenvolvimento para tentar controlar o ritmo crescente de casos de doenças não transmissíveis (Guariguata, 2012; I.D.F., 2012a).

No Brasil a prevalência de diabetes passou de 6,6% em 2011 para 7,4% em 2012 de acordo com a pesquisa realizada pela Vigitel - Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis, por meio de Inquérito Telefônico, encomendada pelo Ministério de Saúde. Segundo essa pesquisa, a prevalência de diabetes foi de 8,1% em mulheres e de 6,5% em homens (Brasil, 2012; 2013).

Nas 26 capitais brasileiras e Distrito Federal analisadas pela Vigitel o diagnóstico de diabetes aumenta a partir dos 35 anos de idade. A região do país mais acometida com essa doença foi a Sudeste com 5,8%, seguida da região Nordeste com 5,5% da população; a prevalência de diabetes na população da região Centro-Oeste foi de 4,0%. As capitais com maior porcentagem de casos foram Vitória e Fortaleza, ambas com 7% de adultos com diagnóstico médico de diabetes (Brasil, 2012).

As complicações geradas pelo diabetes contribuem para o aumento de internações, além de gerar custos para o país. Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2010 ocorreram 148.452 internações devido o diabetes, com média de permanência de aproximadamente seis dias, o que corresponde a uma taxa de 78 internações a cada 100.000 habitantes. Comparando o gasto com as internações por causa do diabetes a partir de 2008 observa-se que o valor passou de 60 milhões para 87,9 milhões em 2011, com o valor médio de R\$ 603,28 para cada internação (Brasil, 2012). Em 2012, mais de 471.000 milhões de dólares foram gastos globalmente em cuidados de saúde para diabetes. Mas esse número pode ser maior, uma vez que gastos com deslocamento para tratamentos mais especializados não são contabilizados (Guariguata, 2012; I.D.F., 2012a).

Os países com renda média apresentam maior mortalidade em decorrência do diabetes com 130 mortes a cada 100.000 habitantes. Em seguida aparecem países de baixa renda e por último com 50 mortes/100.000 habitantes países com renda alta. A faixa etária da população com o maior número de mortes em decorrência do diabetes são pessoas acima dos 60 anos de idade. Nessa faixa etária, morreram no ano de 2012 1,3 milhões de pessoas no mundo devido o diabetes e na faixa etária dos 70 anos foram 1,2 milhões de mortes devido essa doença (Guariguata, 2012; I.D.F., 2012a). Em 2012, 4,8 milhões de pessoas morreram em decorrência do diabetes e o número de mortes até 2030 por diabetes irá duplicar e essa será a sétima causa principal de óbitos (Shaw, Sicree e Zimmet, 2010). O número de mortes por diabetes no Brasil também aumenta a partir dos anos; em 2006 foram 24,1 óbitos/100.000 habitantes e esse número passou para 28,8 óbitos em 2010 (Brasil, 2012).

1.3. DIAGNÓSTICO DE DIABETES

O diagnóstico de diabetes pode ser feito por alterações em exames laboratoriais de rotina utilizando amostras de sangue para avaliar os níveis plasmáticos de glicose. A glicemia capilar também pode ser usada em locais com poucos recursos para demonstrar alterações.

A classificação para estabelecer o diagnóstico de diabetes e hiperglicemia intermediária por várias entidades relacionadas ao diabetes como a OMS (Who, 2012), Associação Americana de Diabetes (A.D.A., 2013) e Ministério da Saúde (Brasil, 2006) são mencionadas abaixo:

- Diabetes:

Glicemia de Jejum – $\geq 126\text{mg/dL}$ (7,0 mmol/L).

Glicemia plasmática 2 horas após ingestão da dose oral de 75 gramas de glicose – $\geq 200\text{mg/dL}$ (11,1 mmol/L).

- Tolerância à Glicose Diminuída:

Glicemia de Jejum – $< 126\text{mg/dL}$ (7,0 mmol/L).

Glicemia plasmática 2 horas após ingestão da dose oral de 75 gramas de glicose – ≥ 140 e $< 200\text{mg/dL}$ ($\geq 7,8$ e $< 11,1$ mmol/L).

- Glicemia de Jejum Alterada:

Glicemia de Jejum – 110 a 125mg/dL (6,1 a 6,9 mmol/L).

Glicemia plasmática 2 horas após ingestão da dose oral de 75 gramas de glicose – $< 140\text{mg/dL}$ ($< 7.8\text{ mmol/L}$).

- Hemoglobina Glicosilada:

$\text{HbA1c} \geq 6.5\%$ (48 mmol/mol).

É importante mencionar que se a glicemia plasmática após 2 horas não é mensurada, o diagnóstico é incerto e o quadro de Diabetes ou Tolerância à Glicose Diminuída não pode ser excluído.

A hemoglobina glicosilada (HbA1c) reflete a média dos níveis plasmáticos de glicose nas últimas oito a doze semanas, refletindo o controle da glicemia dos pacientes durante esse período (Nathan, Turgeon e Regan, 2007). Recentemente, houve grande interesse em usar os níveis de hemoglobina glicosilada como teste diagnóstico para diabetes e como teste de triagem para pessoas com alto risco de diabetes (International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes, 2009; Lapolla, Mosca e Fedele, 2011). Além disso, a hemoglobina glicosilada pode ser um preditor de retinopatia. Apesar de não estar claro qual a melhor metodologia (glicemia plasmática ou HbA1c) para prever o desenvolvimento da retinopatia, relatório recente da Austrália mostrou que um modelo incluindo HbA1c para prever retinopatia incidente é tão bom quanto, ou possivelmente melhor, que outro incluindo somente a glicemia de jejum (Who, 2006; Tapp *et al.*, 2008).

Além da metodologia diagnóstica proposta pelas organizações, elas também recomendam que todas as pessoas a partir dos 40 anos de idade devem ter as seguintes medidas avaliadas: circunferência da cintura, pressão arterial média, glicemia de jejum ou capilar, proteínas na urina, cetonas na urina em diabetes recém-diagnosticado, colesterol plasmático e teste de impulsos e sensibilidade no pé (Who, 2006; 2012; A.D.A., 2013).

1.4. COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DIABETES

Diabetes é uma condição definida principalmente pela hiperglicemia dando origem a riscos de danos microvasculares como retinopatia, nefropatia e neuropatia. Está associada com a redução da expectativa e qualidade de vida, devido à morbidade que aumenta significativamente devido às complicações microvasculares e macrovasculares, que aceleram o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como

doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (Who, 2006; Forbes e Cooper, 2013). Depressão (Campayo, Gomez-Biel e Lobo, 2011; Nouwen *et al.*, 2011), demência (Cukierman, Gerstein e Williamson, 2005) e disfunção sexual (Carneiro *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2010) são outras complicações associadas ao diabetes.

A nefropatia é caracterizada por proteinúria com subsequente declínio na taxa de filtração glomerular, que progride durante um longo período de tempo e pode ser fatal se não tratada, uma vez que a progressão da doença renal é um importante fator de risco para o desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (Mogensen, Christensen e Vittinghus, 1983). A nefropatia também altera outras funções renais como a liberação de hormônios como a eritropoetina, vitamina D e o controle agudo da hipoglicemia e do balanço eletrolítico (Forbes e Cooper, 2013). Na nefropatia diabética se observa o desenvolvimento de hipertrofia e hiperplasia renal, com alteração na estrutura dos túbulos, o que acarreta hiperfiltração. A hiperfiltração aumenta a perda de glicose, ácidos graxos, proteínas e aminoácidos (Viberti *et al.*, 1982; Viberti, Jarrett e Keen, 1982) contribuindo para o desequilíbrio energético, anormalidades na sinalização redox, fibrose e inflamação. O maior determinante para a progressão da doença renal no diabetes é a deposição de matriz extracelular nos túbulos renais (Viberti, 1982; Viberti *et al.*, 1982; Viberti, Jarrett e Keen, 1982; Mauer *et al.*, 1984; Forbes e Cooper, 2013).

A retinopatia diabética é a maior causa de cegueira em adultos (Pascolini *et al.*, 2004; Who, 2012). É definida pelo conjunto de lesões na retina como alteração na permeabilidade vascular, degeneração capilar e formação excessiva de novos vasos, além da disfunção na retina neural devido à morte de células com a habilidade de distinção de cores. A isquemia e produção de fatores angiogênicos relacionados à hipóxia podem levar a degeneração ou oclusão dos capilares da retina sendo associadas à piora do prognóstico (Rosberger, 2013). Nesse momento da isquemia observa-se a formação do edema macular devido à neovascularização e acúmulo de líquido e exsudato lipídico dentro da retina contribuindo para a deficiência visual. Em casos mais graves, pode ocorrer sangramento associado à alteração da estrutura da retina, incluindo o desenvolvimento de uma membrana fibrovascular que pode subsequentemente provocar o descolamento da retina (Dobree, 1970; Bresnick *et al.*, 1976; Tapp *et al.*, 2008; Rosberger, 2013).

A neuropatia é uma síndrome que engloba danos em nervos somáticos e nervos do sistema nervoso periférico autonômico (Sharma e Thomas, 1974). Entretanto, também

se associa a danos na medula espinhal (Selvarajah *et al.*, 2006) e no sistema nervoso central (Wessels *et al.*, 2006). É caracterizada pelas anomalias vasculares, tais como espessamento da membrana basal capilar e hiperplasia endotelial com diminuição subsequente na tensão de oxigênio e hipóxia. Em seguida, progride para deterioração de fibras nervosas com alteração da sensibilidade a vibrações e limiares térmicos e, posteriormente, para perda da percepção sensorial (Sharma e Thomas, 1974; Vinik *et al.*, 2013). Essas alterações nos nervos são importantes mecanismos associados à disfunção erétil, à dificuldade de cicatrização de feridas, problemas gastrointestinais e à disfunção cardiovascular em pacientes diabéticos. Entre as lesões associadas à perda de sensibilidade, a mais grave e que gera maiores gastos e causa de internação são as associadas aos pés. As ulcerações nos pés não controladas aumentam o risco de amputações e perda na qualidade de vida do paciente (I.D.F., 2012b; Forbes e Cooper, 2013).

Entre as complicações associadas à macrocirculação, destaca-se a macroangiopatia, caracterizada por lesões arterioescleróticas das coronárias e circulação arterial periférica que contribui para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A doença arterial periférica ocorre de forma precoce em pacientes diabéticos comparados a não diabéticos, e geralmente se apresenta de forma mais grave e difusa. É uma condição caracterizada por doença aterosclerótica oclusiva das extremidades inferiores e é precedida por disfunção endotelial, inflamação, distúrbios da coagulação, alterações no fluxo sanguíneo e anormalidades plaquetárias que contribuem para a evolução precoce deste evento (A.D.A., 2003; Creager *et al.*, 2003; Luscher *et al.*, 2003; Huysman e Mathieu, 2009; Beckman *et al.*, 2013; Paneni *et al.*, 2013).

1.5. FISIOPATOLOGIA DO DIABETES

A hiperglicemia induz dano tecidual por diferentes mecanismos que geram alterações agudas no metabolismo celular. Essas alterações cumulativas podem sofrer influência de fatores genéticos, sejam eles associados às alterações a que cada indivíduo está susceptível ou alteração por fatores independentes que aceleram o processo de dano. As principais células afetadas pela alteração da glicemia são as relacionadas às lesões na microcirculação como as células endoteliais da retina e dos vasos, as células mesangiais dos glomérulos renais e os neurônios e as células de Schwann nos nervos periféricos (Beckman *et al.*, 2013; Forbes e Cooper, 2013; Paneni *et al.*, 2013).

A maioria das células é capaz de reduzir o transporte da glicose a seu interior quando expostas à hiperglicemia, de modo que a concentração de glicose interna permanece constante. Pelo contrário, as células danificadas pelo diabetes, principalmente as células endoteliais, não reduzem rapidamente o transporte de glicose em situações de hiperglicemia, conduzindo assim a elevada concentração de glicose no interior da célula (Kaiser *et al.*, 1993), indicando que mecanismos intracelulares também são alterados (Brownlee, 2005; Paneni *et al.*, 2013).

Brownlee (2005) descreveu como peças de um quebra cabeça quatro principais mecanismos ativados pela hiperglicemia que danificam o interior dessas células, sendo eles: aumento do fluxo da via dos polióis (Gabbay, Merola e Field, 1966), aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (Giardino, Edelstein e Brownlee, 1994), ativação da proteína cinase C (PKC) (Xia *et al.*, 1994) e aumento da via da hexosamina levando a modificação de proteínas por glicosilação (Sayeski e Kudlow, 1996; Federici *et al.*, 2002). Esses mecanismos isoladamente culminam na ativação de uma via comum que é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Du *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2000) e, segundo Brownlee, esse seria o principal mecanismo de dano relacionado à hiperglicemia (Brownlee, 2005). Contudo, é interessante mencionar que as EROs levam a ativação dos quatros mecanismos iniciais que danificam as células (Brownlee, 2005; Paneni *et al.*, 2013).

A produção de ERO é um dos mecanismos envolvidos em um dos principais efeitos prejudiciais da hiperglicemia nos vasos, a disfunção endotelial. A disfunção endotelial é caracterizada pelo prejuízo do relaxamento dependente de endotélio, em consequência do desequilíbrio entre o aumento da produção de ERO (Gryglewski, Palmer e Moncada, 1986) e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (De Vriese *et al.*, 2000). Além disso, observa-se aumento de fatores vasoconstritores como endotelina 1 (Yanagisawa *et al.*, 1988; Schneider *et al.*, 2002) e esse desequilíbrio entre redução de fatores relaxantes e aumento de fatores vasoconstritores contribui para o desenvolvimento de hipertensão arterial (Cooper *et al.*, 2007; Manrique *et al.*, 2009), diabetes (Oelze, Schuhmacher e Daiber, 2010) e aterosclerose (Beckman *et al.*, 2013; Paneni *et al.*, 2013), além de outras doenças.

Em modelo animal de diabetes tipo 2 [camundongos com depleção do receptor de leptina (camundongos db/db)] é característico o quadro de disfunção endotelial, com prejuízo no relaxamento dependente de endotélio induzido pela acetilcolina devido ao aumento da produção de ânion superóxido e redução da biodisponibilidade do cofator

BH4, o qual é necessário para a atividade da sintase endotelial do NO (eNOS), que produz o NO (Pannirselvam *et al.*, 2002; Pannirselvam *et al.*, 2003). Nessa condição também se observa aumento na resposta máxima a vários agentes contráteis como fenilefrina (Pannirselvam *et al.*, 2002), serotonina, cloreto de potássio, angiotensina II e produtos da enzima ciclooxigenase (Guo *et al.*, 2005).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) é um dos principais fatores que estimulam a produção de ERO principalmente em células vasculares (Cooper *et al.*, 2007). Em condições fisiológicas, o RAAS é, em condições fisiológicas, ativado em resposta à redução da pressão arterial e do fluxo sanguíneo na artéria renal. Entretanto, em situações patológicas como diabetes (Price *et al.*, 1999) e hipertensão arterial (Wisgerhof, Carpenter e Brown, 1978), esse sistema pode estar superativado. A queda da pressão arterial estimula as células justaglomerulares a secretarem a enzima renina na corrente sanguínea. Na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio, produzido no fígado, e produz o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). A Ang I é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), que está presente em vários órgãos, dando origem ao octopeptídeo ativo angiotensina II (Ang II). A ligação da Ang II aos receptores tipo 1 para angiotensina (AT1) presentes nas células glomerulosas que se encontram no córtex da glândula supra renal, estimula a síntese e liberação da aldosterona (Carpenter, Davis e Ayers, 1961; Davis *et al.*, 1961; Ganong e Mulrow, 1961; Davis *et al.*, 1962).

Ang II (Griendling *et al.*, 1994) e aldosterona (Johar *et al.*, 2006) são os mediadores do RAAS que produzem ERO via ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase [NAD(P)H oxidase] no sistema vascular. Esses efeitos da aldosterona na geração de ERO estão relacionados à sua ligação a receptores mineralocorticóides (MR) e ativação de vias não genômicas (Stas *et al.*, 2007). Entretanto, outros efeitos desse hormônio podem estar relacionados às alterações vasculares no diabetes (Mcfarlane e Sowers, 2003; Cooper *et al.*, 2007; Lastra-Lastra *et al.*, 2009; Lastra *et al.*, 2010; Luther e Brown, 2011).

1.5.1. Aldosterona

A aldosterona é um hormônio mineralocorticóide sintetizado principalmente na zona glomerular do córtex da supra-renal (Tait, Simpson e Grundy, 1952). A síntese de aldosterona também ocorre em tecidos extra-adrenais, principalmente no sistema

nervoso central (Stromstedt e Waterman, 1995; Mackenzie *et al.*, 2000), sistema cardiovascular (miocárdio e células da musculatura lisa vascular) (Takeda *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2005; Lombes, 2009) e, recentemente, sua síntese foi demonstrada em adipócitos (Briones *et al.*, 2012). O colesterol é o precursor da síntese de aldosterona e de outros hormônios lipossolúveis. A biossíntese dos mineralocorticóides diverge da via de síntese dos glicocorticóides a partir da progesterona. A progesterona é hidroxilada pela enzima CYP21B para 11-desoxicorticosterona. As próximas duas etapas são mediadas pela enzima aldosterona sintase (CYP11B2), que converte 11-desoxicorticosterona em corticosterona e, subsequentemente, em aldosterona (Connell e Davies, 2005; Williams, 2005; Ye *et al.*, 2005) (Figura 1).

Figura 1. Biossíntese da aldosterona e cortisol a partir do colesterol. CYP11B2- aldosterona sintase, CYP21B-21-hidroxilase, 3β-HSD-3β-dehidrogenase, CYP11A1-colesterol desmolase, CYP11B1-11β-hidroxilase, CYP17- 17α-hidroxilase. Adaptado (Connell e Davies, 2005).

O estímulo para produção e liberação de aldosterona inclui vários fatores, entre eles ativação do RAAS (Carpenter, Davis e Ayers, 1961; Davis *et al.*, 1961; Ganong e Mulrow, 1961; Davis *et al.*, 1962; Takeda *et al.*, 1996), liberação de adreconocorticotropina (Farrell, Banks e Koletsky, 1956; Bartter, 1958) e aumento da

concentração dos íons potássio (K^+) (Bartter, 1958; Ganong e Mulrow, 1958; Dluhy *et al.*, 1972).

A aldosterona em situações fisiológicas estimula a expressão de determinados transportadores iônicos ativos, como canal epitelial de íon sódio (Na^+) (ENaC), na membrana das células epiteliais na parte distal do néfron. Estas proteínas são responsáveis pelo transporte unidirecional de Na^+ através do epitélio, a partir do lúmen dos túbulos renais para o espaço intersticial. Isso só é possível devido ao gradiente eletroquímico produzido pela bomba Na^+/K^+ -ATPase. Além disso, também ocorre reabsorção de água e excreção de K^+ e magnésio (Mg^{2+}) (Ganong e Mulrow, 1958). Essas respostas desencadeadas em situações de queda da pressão arterial promovem equilíbrio hidroeletrolítico e o aumento da pressão arterial (Williams, 2005; Viengchareun *et al.*, 2007).

1.5.2. Efeitos cardiovasculares da aldosterona

A aldosterona também tem sido relacionada com o estímulo de um grande número de vias rápidas de sinalização incluindo mobilização de íon cálcio (Ca^{2+}), K^+ e Na^+ em leucócitos mononucleares e em células do músculo liso vascular (CMLV) de humanos *in vitro*. Outros efeitos desencadeados por este hormônio são a síntese de colágeno, ativação das vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), além de fatores de transcrição intracelulares que aumentam ou diminuem a expressão de genes alvos (Falkenstein *et al.*, 2000; Gekle *et al.*, 2002; Funder, 2005; Grossmann *et al.*, 2005; Chun e Pratt, 2006).

Em CMLV e células endoteliais de porco a aldosterona produz diacilglicerol e trifosfato de inositol (IP_3), e ativação da cinase de fosfoinosítídeos na posição 3 (PI_3K) por mecanismos dependentes da ativação da PKC. Também nessas células são observados aumentos de monofostato cíclico de adenosina (AMPc). Ativação da cinase reguladora de sinal extracelular (ERK1/2), da cinase c-Jun NH_2 -terminal (JNK), da c-Src e da fosforilação do receptor do fator de crescimento epidermal (EG) também foram descritos em células do ovário de hamster chinês ou células de rim embrionário humano transfectadas com o receptor MR (Falkenstein *et al.*, 2000; Gekle *et al.*, 2002; Funder, 2005; Grossmann *et al.*, 2005; Chun e Pratt, 2006). Os efeitos decorrentes da ativação

da transcrição gênica pela aldosterona são denominados efeitos genômicos, enquanto aqueles decorrentes da ativação de vias rápidas são denominados efeitos não genômicos.

Em CMLV, um dos efeitos não genômicos da aldosterona é a ativação de vias associadas a processos pró-fibróticos como p38MAPK e NAD(P)H oxidase por ativação de vias dependentes de c-Src (Callera *et al.*, 2005). O tratamento simultâneo dessas células com aldosterona e Ang II aumenta a atividade da ERK1/2, atenua a atividade da fosfatase 1 da proteína cinase ativada por mitógeno (MKP-1) e aumenta a expressão da proteína monomérica de ligação de GTP da proteína Kirsten Ras(Ki-ras2A), vias que estão associadas com estimulação da proliferação de fibroblastos cardíacos (Min *et al.*, 2005).

A ativação de algumas das vias descritas acima também contribui para os efeitos produzidos pela aldosterona na reatividade vascular. Em preparações de anéis aórticos com endotélio, a aldosterona atenua a resposta vasoconstritora do agonista alfa adrenérgico, fenilefrina. Esse efeito ocorre pela ativação da eNOS dependente de PI₃K e geração do NO. Em preparações de anéis aórticos sem endotélio foi observado o efeito oposto, ou seja, aumento da resposta vasoconstritora (Liu *et al.*, 2003).

Em artérias mesentéricas de ratos Sprague Dawley, a aldosterona potencializa a contração induzida por fenilefrina, aumenta o influxo de Ca²⁺ e aumenta o pH. Esses mecanismos são dependentes da ativação da PKC, PI₃K e do trocador Na⁺/H⁺ e são bloqueados pela eplerenona, um antagonista do receptor MR (Michea *et al.*, 2005).

O tratamento de ratos Dahl sensíveis ao sal com aldosterona por três semanas, potencializa o efeito constritor da fenilefrina em anéis de aorta torácica, além de aumentar a expressão da ciclooxigenase 2 (enzima pró-inflamatória) nesses vasos e também em vasos renais (Eatman *et al.*, 2011).

Em arteríolas pré-glomerulares aferentes a aldosterona leva a vasoconstrição por vias não genômicas (ativação da fosfolipase C) (Arima *et al.*, 2003) e a liberação de NO pelo endotélio interfere nesse efeito (Arima *et al.*, 2004). A inibição farmacológica da eNOS, da PKC e do IP₃ pode modular a vasoconstrição mediada pela aldosterona (Schiffrin, 2006; Schmidt, 2008).

Farquharson e Struthers (2002) demonstraram em um estudo *in vivo* de pletismografia por oclusão venosa bilateral do antebraço de humanos que a infusão de aldosterona prejudica a função endotelial por reduzir o relaxamento dependente de endotélio induzido pela acetilcolina. Por outro lado, o relaxamento independente de endotélio induzido por nitroprussiato de sódio e a contração estimulada por Ang I e Ang

II não foram alterados (Farquharson e Struthers, 2002), sugerindo que a aldosterona afeta a atividade do NO.

O conjunto destes estudos indica que a aldosterona desencadeia efeitos opostos sobre a reatividade vascular e que as alterações finais dependem do balanço entre os efeitos vasodilatadores, geralmente mediados pelo endotélio, e dos efeitos vasoconstritores, por ações em CMLV, apesar de ambos serem dependentes da ativação de PI₃K (Liu *et al.*, 2003; Michea *et al.*, 2005; Eatman *et al.*, 2011; Feldman e Gros, 2011; Briet e Schiffrin, 2012; Briones *et al.*, 2012).

1.5.3. Aldosterona e doenças cardiovasculares

Os efeitos da aldosterona são importantes para regulação do equilíbrio hidroeletrolítico e regulação da pressão arterial. Entretanto, o excesso desse hormônio pode prejudicar o organismo. O excesso de aldosterona (hiperaldosteronismo primário) impacta de forma negativa o coração ocasionando remodelamento cardíaco (Okoshi *et al.*, 2004) e vascular (Schiffrin, 2006; Briet e Schiffrin, 2012), diminuição da sensibilidade dos barorreceptores e redução da variabilidade da frequência cardíaca (Heindl *et al.*, 2006; Monahan, Leuenberger e Ray, 2007).

Nos rins o excesso de aldosterona promove alterações como proteinúria, esclerose glomerular e proliferação de células mesangiais (Greene, Kren e Hostetter, 1996; Rocha *et al.*, 1999; Ponda e Hostetter, 2006; Lombes, 2009). Nos vasos sanguíneos prevalece o quadro de disfunção endotelial, formação de ERO (Nietlispach *et al.*, 2007) e resistência à insulina contribuindo para o desenvolvimento de diabetes e obesidade (Hirata *et al.*, 2009; Patel e Mehta, 2012).

1.5.4. Aldosterona e doenças metabólicas

Pacientes com obesidade, hipertensão arterial e diabetes tipo 2 apresentam maior risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica, que é caracterizada por resistência à insulina, hipertensão arterial, dislipidemias, relação cintura quadril aumentada e excreção urinária de albumina (I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA, 2005). A principal alteração fisiopatológica da síndrome metabólica é a resistência à insulina. A

ativação do RAAS contribui para as alterações na sinalização da insulina e resistência à insulina em tecidos como o músculo esquelético, fígado, tecido cardíaco, tecidos vasculares e renais (Lastra-Lastra *et al.*, 2009). Estudos mostram que a resistência à insulina pode desencadear hiperinsulinemia compensatória e alterações cardiovasculares como hipertensão arterial sistêmica (Modan *et al.*, 1985; Goodfriend *et al.*, 1999).

A aldosterona além de contribuir para a disfunção endotelial no diabetes por aumento do estresse oxidativo, também induz resistência à insulina através da degradação do substrato do receptor de insulina (IRS-1 e -2), inibição da proteína desacopladora-1 e inibição da produção dos transportadores de glicose (Hitomi *et al.*, 2007; Lastra-Lastra *et al.*, 2009; Luther e Brown, 2011). Em CMLV, a aldosterona promove hetero-dimerização do IRS e do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1R), causando uma diminuição da sinalização por estes receptores, o que também explicaria em parte a resistência vascular à insulina (Sherajee *et al.*, 2012).

Vasos com tecido adiposo perivascular, o qual produz aldosterona localmente, apresentam prejuízo no relaxamento induzido por acetilcolina em camundongos diabéticos. Esse prejuízo é menos notório em vasos desprovidos de tecido adiposo perivascular e é revertido parcialmente pelo uso do antagonista de MR, eplerenona, nos vasos com tecido adiposo perivascular (Briones *et al.*, 2012).

Em pacientes com diabetes a aldosterona contribui para o desenvolvimento de fibrose do miocárdio e aumento do volume do ventrículo esquerdo. Esse quadro é revertido pelo uso de antagonistas dos receptores para aldosterona, como espironolactona e eplerenona, mostrando a importância do efeito deste hormônio nos eventos associados ao diabetes (Macfadyen, Barr e Struthers, 1997; Pitt *et al.*, 1999; Davies e Struthers, 2002; Davies *et al.*, 2005).

1.5.5. Receptores Mineralocorticóides

Os efeitos desencadeados pela aldosterona são mediados pela ligação á receptores específicos. Os MRs são responsáveis pelas respostas clássicas da aldosterona, ou seja, efeitos genômicos (Funder, Feldman e Edelman, 1972). Esses efeitos genômicos relacionam-se com a transcrição de fatores reguladores da expressão de genes-alvo. Vários órgãos como os rins, o cólon, as glândulas sudoríparas e salivares são alvos para ações genômicas da aldosterona (Feldman e Gros, 2011; Unger, Paulis e Sica, 2011).

O receptor MR é um receptor citoplasmático que apresenta estruturalmente três domínios, um domínio de ligação a aldosterona, um domínio determinante para ligação no DNA que permite a execução das ações genômicas e um domínio capaz de recrutar co-reguladores específicos para garantir o controle coordenado da expressão do gene alvo (Viengchareun *et al.*, 2007).

A ligação da aldosterona aos MRs promove a translocação do complexo MR-aldosterona para o núcleo da célula e a consequente modulação da transcrição de genes alvos. A transcrição eleva o volume do núcleo em cerca de 15% a 28% do volume total da célula em um período menor que 10 minutos. Esse efeito desaparece dentro de 30 minutos, quando a transcrição de genes é encerrada e o RNAm é translocado para o citoplasma (Oberleithner *et al.*, 2000).

O MR é capaz de se ligar com quase a mesma afinidade a duas classes distintas de hormônios, tanto aos mineralocorticóides (aldosterona) como aos glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores). A enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 β HSD2) converte os glicocorticóides, presentes no citosol, em compostos inativos garantindo que somente os mineralocorticóides, como a aldosterona, ative os MRs e desencadeie suas ações clássicas (Edwards *et al.*, 1988; Lombes, 2009).

A ativação de vias rápidas pela aldosterona tem início de ação em um curto período de tempo (segundos a minutos), podendo ser mediada tanto por receptores MR clássicos quanto por receptores MR não clássicos. Esses receptores MR não clássicos também são associados a efeitos de longo prazo (Feldman e Gros, 2011). A existência de um receptor de membrana responsável pelos efeitos da aldosterona é sugerida em função de algumas ações da aldosterona independentes de sua ligação ao MR clássico. Algumas dessas ações incluem a ativação de vias de sinalização em células que não possuem o MR clássico (Markos, Healy e Harvey, 2005); ou insensibilidade de algumas linhagens de células renais ao tratamento com antagonista de MR quando estimuladas com aldosterona (Rossol-Haseroth *et al.*, 2004); ou a capacidade da aldosterona aumentar Ca^{2+} em células humanas e o uso de eplerenona, antagonista MR, não bloquear esse efeito (Grossmann *et al.*, 2005; Thomas, Mceneaney e Harvey, 2007) ou ainda sítios de ligação na superfície das células que são insensíveis a espironolactona (antagonista MR) e dexametasona (corticoide exógeno) (Wildling *et al.*, 2009; Wendler e Wehling, 2011). É importante mencionar que a aldosterona também induz efeitos não genômicos que são revertidos pelo uso de antagonista de receptores MR, como por exemplo, ativação da cadeia leve de miosina (Gros *et al.*, 2007), ativação de ERK 1/2

(Gros *et al.*, 2011) e alteração da resposta vasoconstritora da fenilefrina em aortas após 10 minutos de estímulo com aldosterona (Liu *et al.*, 2003; Briet e Schiffrin, 2012).

A identidade desses MR não clássicos é desconhecida, mas estudos indicam que o receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) está relacionado a algumas das ações rápidas da aldosterona (Gros *et al.*, 2011; Gros *et al.*, 2013).

1.5.6. Receptores GPER

O receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER, anteriormente designado GPR30/GPER-1) é um receptor com sete domínios transmembrana acoplado à proteína G e possui alta afinidade de ligação ao hormônio 17 β -estradiol (E2). Ele é amplamente expresso no coração, artérias, glândulas mamárias, pulmão, sistema nervoso central e leucócitos. O receptor GPER foi descoberto pela primeira vez na vasculatura em 2007, quando sua expressão foi demonstrada em CMLV e em células endoteliais, tanto de artérias quanto de veias humanas e confirmou-se sua ativação pelo E2 (Haas *et al.*, 2007; Olde e Leeb-Lundberg, 2009; Nilsson, Olde e Leeb-Lundberg, 2011).

O G1, agonista de GPER, estimula a proteína G α s e a proteína G α i sensível a toxina Pertussis, modulando positiva ou negativamente, respectivamente, a atividade da adenilato-ciclase, os níveis de AMPc e, conseqüentemente, a ativação da proteína cinase A. A estimulação da proteína G α i/o também produz a liberação das subunidades G $\beta\gamma$ que leva à: (i) ativação de PI $_3$ K e, subsequentemente, da proteína cinase Akt/PKB, (ii) ativação de c-Src e posterior recrutamento da proteína adaptadora com homologia-Src (SHC), (iii) ativação de metaloproteinases da matriz extracelular, (iv) liberação do fator de crescimento epidermal (EGF) ligado à heparina resultando na transativação do receptor de EGF que, por sua vez, leva à ativação de ERK1/2 e PI $_3$ K. A ativação de c-Src também ocorre independentemente da ativação de G $\beta\gamma$. A estimulação de GPER eleva a concentração de Ca $^{2+}$ intracelular por meio de mecanismos ainda desconhecidos mas que envolvem sinalização primária através de G $\beta\gamma$ ou secundária através de sinalização por transativação do receptor do EGF (Olde e Leeb-Lundberg, 2009; Nilsson, Olde e Leeb-Lundberg, 2011).

No sistema vascular, o GPER é expresso principalmente em células endoteliais em pequenas artérias sistêmicas, mas tanto artérias como veias expressam os receptores GPER e MR (Haas *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado que CMLV

estimuladas com aldosterona podem utilizar tanto GPER quanto MR para produzir seus efeitos, levando à ativação de vias de sinalização, tais como PI₃K, ERK1/2, e desencadeando apoptose, bem como fosforilação da cadeia leve da miosina (Gros *et al.*, 2011). Em células endoteliais, a fosforilação de ERK1/2 e a indução de apoptose também foram observadas pela ligação da aldosterona em receptores GPER (Gros *et al.*, 2013).

Mårtensson e colaboradores (2009) descreveram em camundongos fêmeas nocautes para o receptor GPER diminuição na liberação de insulina estimulada por estrógeno, aumento nos níveis plasmáticos de glicose, aumento da pressão arterial e redução do crescimento ósseo, sugerindo a importância do GPER para a homeostasia do metabolismo de carboidratos. Além disso, o GPER é importante para a manutenção das ilhotas pancreáticas, uma vez que animais nocaute apresentam maior susceptibilidade à lesão induzida por estreptozotocina (Liu *et al.*, 2009; Martensson *et al.*, 2009; Balhuizen *et al.*, 2010).

O agonista de GPER, G1, induz relaxamento dependente de endotélio em anéis aórticos e artérias mesentéricas de ratas hipertensas ovariectomizadas (Ren2.Lewis), e esse relaxamento não é diferente do induzido pelo estrógeno, outro agonista desse receptor (Lindsey *et al.*, 2011). O relaxamento induzido por G1 é descrito por Jang e colaboradores em aorta de ratos Sprague-Dawley como dependente da via da Src com ativação do receptor do fator de crescimento epidermal e da via da Akt (Jang *et al.*, 2013). Por outro lado, em artérias coronárias o agonista de GPER induz relaxamento independente de endotélio por aumento do efluxo de K⁺ através de canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta condutância (Yu *et al.*, 2011).

Em ratas diabéticas ovariectomizadas o tratamento com G1 por oito semanas, melhorou o relaxamento dependente do endotélio para acetilcolina por aumento da atividade da eNOS via fosforilação desta enzima. Esse efeito foi parcialmente atenuado pelo inibidor da eNOS, o éster metílico de nitro-L-arginina (L-NAME), e o antagonista seletivo de GPER, G15. Em células endoteliais expostas a hiperglicemia a administração aguda de G1 aumenta significativamente a atividade e fosforilação da eNOS e a concentração de NO. Também há evidências de que a ativação de GPER conduz à ativação da eNOS, assim como a vasodilatação, e tem efeitos benéficos sobre a função vascular em ratas diabéticas ovariectomizadas (Li *et al.*, 2012).

Em anéis aórticos de ratos, a aldosterona por mecanismos dependentes de GPER atenua a constrição do agonista contrátil fenilefrina. O antagonista de GPER bloqueia

esse efeito da aldosterona, além de reverter a apoptose induzida em células endoteliais tanto pelo agonista de GPER quanto pela aldosterona (Gros *et al.*, 2013), sugerindo que a apoptose vascular induzida por aldosterona é mediada por GPER. Esses resultados evidenciam os efeitos vasodilatadores da aldosterona associados à ativação de GPER em contraste aos efeitos mediados por MR, responsáveis por efeitos contráteis (Feldman e Gros, 2013).

Em artérias de resistência ainda não foram demonstrados se os efeitos da aldosterona podem ser mediados por GPER e se os mesmos estão alterados em condições clínicas como o diabetes mellitus. Devido à ausência desses estudos esse projeto tem por objetivo avaliar se as ações da aldosterona são mediadas pela ativação de GPER e se o complexo aldosterona-GPER está alterado em animais geneticamente diabéticos, camundongos db/db.

2. HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Considerando que:

1. No diabetes mellitus a aldosterona diminui a liberação de insulina e a captação de glicose, além de prejudicar o relaxamento vascular dependente do endotélio.
2. A aldosterona liga-se a receptores MR e GPER e desencadeia efeitos genômicos e não genômicos. A ligação a receptores GPER ativa ERK 1/2 em células do músculo liso vascular e em células endoteliais. Além disso, ativa em células musculares cadeia leve de miosina e induz apoptose. Em anéis aórticos a aldosterona por mecanismos dependentes de GPER inibe a vasoconstrição mediada pela fenilefrina por aumento da expressão de eNOS.
3. Há ausência de estudos em artérias de resistência relacionando aldosterona e GPER e essa interação em doenças como o diabetes mellitus.

Formulamos a seguinte hipótese de trabalho: Os efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores GPER sobre a reatividade vascular estão diminuídos no diabetes mellitus.

Figura 2. Hipótese de trabalho: Os efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores GPER sobre a reatividade vascular estão diminuídos no diabetes mellitus.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Determinar se os efeitos vasculares da aldosterona (em artérias de resistência) envolvem ativação de receptores GPER e se os efeitos decorrentes da ativação de GPER por aldosterona estão alterados em animais diabéticos db/db.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar os níveis de expressão dos receptores GPER em artérias mesentéricas de animais controle e diabéticos db/db.
- 2) Determinar quais efeitos da aldosterona sobre a reatividade vascular são mediados por ativação de GPER, utilizando artérias de resistência de animais controle e db/db.
- 3) Determinar se os mecanismos de sinalização rápido induzidos pela aldosterona são mediados pelos receptores GPER em artérias mesentéricas.
- 4) Determinar se os mecanismos de sinalização rápido estão alterados em animais db/db e a influência destes mecanismos na disfunção vascular associada ao diabetes mellitus.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

O protocolo para uso de animais em experimentação está em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brasil (protocolo nº 012/2013).

Foram utilizadas fêmeas de camundongos geneticamente diabéticos db/db da linhagem B6.BKS-*Lepr^{db}* e seus controles (B6.BKS-*Lepr^{db}/+* ou B6.BKS+/+), ambos com 14 a 16 semanas de idade, provenientes da colônia mantida no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, a qual foi iniciada a partir de camundongos da linhagem B6.BKS-*Lepr^{db}/+* adquirida da empresa The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Os animais foram mantidos em ciclo claro / escuro de 12 horas com temperatura controlada (22±1°C) com acesso a ração e água *ad libitum*. O ciclo estral das fêmeas foi verificado e ambos os grupos foram utilizados na fase do diestro.

O grupo db/db (B6.BKS-*Lepr^{db}*) será denominado a partir de agora como grupo diabético e fêmeas controle (B6.BKS-*Lepr^{db}/+* ou B6.BKS+/+) como grupo controle.

4.1.1. Massa Corporal e Glicemia

A massa corporal dos animais foi avaliada no momento do estudo utilizando uma balança de precisão (WTB 2000, RADWAG®, Polônia). Para a dosagem da glicemia os animais permaneceram em jejum por oito horas, e o sangue foi retirado após corte na ponta da cauda e colocado em fitas individuais e a leitura foi realizada no glicosímetro (Accu-Check® Active, Roche, Mannheim, Alemanha).

4.2. ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

4.2.1. Preparo dos Anéis de Artérias Mesentéricas de Resistência Isoladas

Após a eutanásia dos animais por inalação em câmara de dióxido de carbono (CO_2), o leito mesentérico foi removido e colocado em uma placa de petri e ramos de segunda ordem da artéria mesentérica (150-200 mm de diâmetro) foram dissecados em solução de Krebs-Henseleit modificada (composição em mM: NaCl 130; KCl 4,7; NaHCO_3 14,9; CaCl_2 1,6; KH_2PO_4 1,18; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17; EDTA 0,026 e glicose 5,5). O segundo ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos de 2,0 mm de comprimento com o auxílio de uma lupa. Dois fios de tungstênio (25 μm de diâmetro) foram então inseridos no lúmen das artérias.

Os anéis foram montados em miógrafo para vasos de resistência (modelo 610M; Danish Myo Technology – DMT, Copenhagen, Denmark) para o estudo da tensão isométrica, conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab8/8SP, ADInstruments, Austrália) acoplado a um computador. Os canais do miógrafo foram preenchidos com solução de Krebs gaseificada com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de CO_2 e aquecidos à 37° C. Esses procedimentos foram realizados conforme descrito por Mulvany e Halpern (Mulvany e Halpern, 1977).

4.2.2 Normalização das artérias mesentéricas de resistência

O propósito do procedimento de normalização é distender o segmento vascular até que se atinja a chamada circunferência interna normalizada (IC_1): definida como uma fração determinada da circunferência interna (IC_{100}) que um segmento totalmente relaxado teria em uma determinada pressão transmural. Para artérias mesentéricas de resistência, a pressão transmural alvo é de 100 mmHg, que corresponde a 13,3 kPa.

Após o período de estabilização e aquecimento dos segmentos vasculares (10 minutos) em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), as artérias mesentéricas foram distendidas de forma gradativa e a leitura do micrômetro e da força aplicada foram registrados a cada ponto. Estes dados foram convertidos em valores de circunferência interna (μm) e de tensão na parede vascular (mN/mm), respectivamente. A plotagem da tensão na parede do vaso contra a circunferência interna revela uma curva exponencial. Pela aplicação da curva isobárica correspondente a 100 mmHg, a IC_{100} foi então calculada a partir do ponto de interseção, utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). A IC_1 foi calculada a partir da IC_{100} por meio da fórmula $\text{IC}_1 = 0,90 \times \text{IC}_{100}$, dando uma circunferência interna na qual a produção de força ativa

bem como a sensibilidade do segmento a agonistas é máxima. O diâmetro interno normalizado foi calculado dividindo-se IC_1 por π .

4.2.3. Protocolos experimentais

Após 30 minutos do processo de normalização, as artérias foram contraídas com cloreto de potássio (KCl, 120 mM), com a finalidade de avaliar a integridade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 20 minutos, a integridade do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à acetilcolina (ACh, 10^{-5} mol/L – vasodilatador dependente de endotélio) em vasos pré-contraídos com fenilefrina (PE, 3×10^{-6} mol/L – agonista alfa adrenérgico). A ausência de relaxamento à ACh foi critério de exclusão dos vasos para os experimentos, dessa maneira todos os protocolos experimentais foram realizados em vasos com endotélio. A resposta vasoconstritora induzida pela PE foi expressa como porcentagem em relação aos valores de contração de KCl que não foi diferente entre os grupos (Controle: $9,36 \pm 2,7$ mN, 28 e db/db: $10,31 \pm 3,15$ mN, 31) e a vasodilatação induzida pela ACh, como porcentagem em relação à pré-contração com PE. Todas as incubações com a aldosterona e antagonistas foram realizadas por um período de 30 minutos.

4.2.3.1. Efeitos da aldosterona sobre a contração induzida por PE

Para verificar os efeitos da aldosterona sobre a contração induzida pela PE em artérias mesentéricas nos grupos controle e diabético, curvas concentração-resposta cumulativas para PE (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas previamente incubadas com veículo (água + etanol 1%) ou aldosterona (10^{-6} , 10^{-8} ou 10^{-10} mol/L) por 30 minutos.

4.2.3.2. Efeitos da aldosterona sobre a vasodilatação induzida por ACh

Com o intuito de averiguar os efeitos da aldosterona sobre a vasodilatação induzida por ACh em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético, curvas concentração-resposta cumulativas para ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) foram realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com PE submetidas à incubação com veículo ou aldosterona (10^{-6} , 10^{-8} ou 10^{-10} mol/L) por 30 minutos.

4.2.3.3. Participação de receptor MR nos efeitos da aldosterona sobre a contração induzida por PE e a vasodilatação induzida por ACh

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos vasculares induzidos pela aldosterona curvas concentração-resposta cumulativas para PE (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) e ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) foram obtidas em anéis de artérias mesentéricas dos grupos controle e diabéticos, na presença ou não do antagonista seletivo para receptor MR, eplerenona (10^{-5} mol/L), adicionado 30 minutos antes da incubação com aldosterona.

4.2.3.4. Participação de receptor GPER nos efeitos da aldosterona sobre a contração induzida por PE e a vasodilatação induzida por ACh

Para investigar o papel dos receptores GPER nos efeitos vasculares induzidos pela aldosterona nos grupos controle e diabético, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas para PE (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) e ACh (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) em anéis de artérias mesentéricas na presença ou ausência do antagonista seletivo para receptor GPER, G15 (10^{-6} mol/L), adicionado 30 minutos antes da incubação com aldosterona.

4.3. QUANTIFICAÇÃO GÊNICA E PROTÉICA

A expressão gênica (RNAm) e protéica dos receptores para aldosterona e componentes de vias de sinalização foram determinados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (Q-PCR em tempo real) e por técnica de *Western blotting*, respectivamente, em artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético estimuladas com aldosterona ou veículo e antagonistas.

4.3.1. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (Q-PCR em tempo real)

Com o objetivo de avaliar se os grupos controle e diabéticos expressavam em quantidades diferentes o RNAm para os receptores MR e GPER realizamos a técnica de PCR em tempo real em artérias mesentéricas de ambos os grupos.

4.3.1.1. Homogeneização do tecido

As artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético foram rapidamente isoladas e congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos congelados foram homogeneizados e colocados em tubos contendo 1mL de Trizol® (isotiocianato de guanidina em solução de fenol) (Invitrogen-EUA).

4.3.1.2. Extração do RNA

Após a incubação do tecido homogeneizado durante 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol®. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos, 4°C) e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo.

4.3.1.3. Precipitação do RNA

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram acrescentados 500 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão dos tubos e incubados em -20°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto ao *pellet*. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 12000 g, por 5 minutos a 4°C. Verteu-se o sobrenadante, incubou-se o *pellet* a temperatura ambiente por 5-10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 10 µL de água contendo 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato).

4.3.1.4. Quantificação do RNA

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 nm) no aparelho NANODROP® (Thermo Scientific,USA). O critério de pureza utilizado foi a razão entre os comprimentos de onda de 260/280 nm (ácido nucléico/proteína) de aproximadamente 1,8. Uma razão menor que 1,8 é indica contaminação por proteínas. A concentração foi obtida em ng/µL, e foram utilizados para leitura 2 µL de amostra.

4.3.1.5. *Reação de Transcriptase Reversa*

A reação de transcrição reversa é o processo pelo qual o ácido ribonucleico (RNA) é usado como um molde para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Para esta reação foi utilizado o Kit Multiscrib reverse transcription (Multiscrib RT®, Life Technologies). A reação foi preparada com 2 µL de tampão (10x), 2 µL de solução de sondas (*primers*) randômicas (10x), 0,8 µL de solução de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (25x), 1 µL de solução de enzima Multiscrib RT (50 U/µL), 1 µL de inibidor de RNase (20 U/µL), 0,25 µL de solução de *primers* oligo-dT (0,5 µg/µL), 5 µL de cada amostra de RNA (200 ng/µL), totalizando um volume de 20 µL.

As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos e a 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da reação de PCR em tempo real.

4.3.1.6. *PCR quantitativo em tempo real*

A expressão dos genes foram quantificadas pelo sistema TaqMan (Life Technologies). Este sistema utiliza sonda fluorescente para permitir a detecção de produto específico conforme este se acumula durante os ciclos de PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante sinalizador (*reporter*) fluorescente na extremidade 5' e um corante silenciador (*quencher*) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do silenciador reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante sinalizador através da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após a um dos *primers* e é clivada pela atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante sinalizador do corante silenciador, aumentando o sinal do primeiro, além de remover a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde.

As amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos, em seguida a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos com temperaturas de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, no aparelho 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi realizada em um volume final

de 13 µL contendo oligonucleotídeos específicos, que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK.

Foram analisados os seguintes genes: receptor MR (Nr3c2) [Mm01241596_m1] e receptor GPER (Gpr30) [Mm02620446_s1]. Como controle interno, utilizamos a β -actina (actb) [Mm00607939_s1], [código de ensaio Taqman - Life Technologies].

Foi fixado um valor de limiar (*threshold*) para cada gene. O *threshold* é um nível de sinal do corante sinalizador normalizado utilizado para determinação do Ct (ciclo *threshold*) em ensaios de tempo real. É o nível arbitrário de fluorescência estabelecido acima da linha basal e dentro da região de crescimento exponencial. O Ct é a quantidade de ciclos que cada amostra precisa para cruzar a linha *threshold*. Os valores de Ct são logarítmicos e são usados para as análises quantitativas. A expressão gênica foi analisada pelo método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. Calculou-se a média de Ct e desvio padrão das duplicatas. Se o desvio padrão foi maior que 0,2 ciclos, o valor da duplicata mais discrepante foi excluído e recalculou-se a média. Os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ de cada amostra foram normalizados (log10) e os grupos foram comparados por teste t.

4.3.2. Western blotting

4.3.2.1 Extrato total

Artérias mesentéricas dos grupos controle e diabético foram incubadas por 30 minutos com aldosterona em presença de veículo ou antagonistas e congeladas em nitrogênio líquido, pulverizadas e homogeneizadas em tampão de lise gelado (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF] 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL). Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo protéico total, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditioneitol [DTT] 200 mM e 40 a 50 µg de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com dodecil sulfato de sódio [SDS PAGE] em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel havia um marcador com pesos moleculares de valores estabelecidos.

4.3.2.2 “Immunoblotting”

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente, por meio de aparelho da BioRad por 2 horas a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução bloqueadora (soro fetal bovino [BSA] 1%, Tris 10 mM, cloreto de sódio [NaCl] 150 mM e Tween 20 0,02%) a 25°C durante 1 hora para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos para proteínas cujas vias de sinalização/receptores foram avaliadas após incubação com aldosterona.

As incubações com diferentes anticorpos primários foram feitas com solução bloqueadora (1% de BSA) *overnight* na geladeira (4° C) e a concentração de cada anticorpo variou de 1:300 a 1:3000. Em seguida, as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora por 1 h e posteriormente incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase por 1h, em temperatura ambiente. A detecção das bandas foi obtida após incubação com o ECL (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*). A emissão de luz foi detectada e visualizada por fotodocumentador ImageQuant 350 (GE *Healthcare Piscata Way*, NJ, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ®, NIH, USA). O anticorpos utilizados estão descritos no quadro abaixo:

Tabela 1. Lista dos anticorpos utilizados

Alvo	Diluição	Marca
Receptor Mineralocorticóide	1:300	Abcam (ab2774)
Receptor GPER	1:300	Abcam (ab39742)
β-Actina	1:3000	Cell Signalling
pERK	1:1000	Millipore (05-797R)
ERK total	1:1000	Millipore (05-1152)

4.3.2.3 Participação da aldosterona na fosforilação da ERK 1/2

As expressões dos receptores MR e GPER, e ativação da proteína ERK1/2 foram avaliadas em artérias mesentéricas previamente incubadas com aldosterona ou veículo e antagonistas por 30 minutos.

4.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

A localização dos receptores MR e GPER nas artérias mesentéricas dos grupos controle e diabéticos foi determinada pela técnica de imunofluorescência.

4.4.1. Preparação das lâminas

As artérias mesentéricas foram isoladas e fixadas em paraformaldeído (4%) em tampão salina fosfato (PBS) por 12 horas e, em seguida, as mesmas foram preservadas por mais 12 horas em sacarose (30%) em PBS. Posteriormente os segmentos arteriais foram congelados em Optimal Cutting Temperature (OCT[®], COMPANY) e mantidos em freezer -80°C até o momento do corte.

Para a realização da técnica de imunofluorescência as artérias foram cortadas em criostato, com 4 lâminas para cada amostra e cada lâmina contendo 4 cortes com espessura de 10 micrômetros. As lâminas foram mantidas em freezer -80°C até o dia do experimento.

4.4.2. Imunomarcção do Receptor Mineralocorticóide

As lâminas dos grupos controle e diabético foram retiradas do freezer e colocadas em uma caixa com isolamento de luz. Em seguida, foi feito bloqueio em TBS, 3% de leite em pó e 0,1% de Triton X-100 por 20 minutos a 22 °C.

Em seguida, os vasos foram incubados com o anticorpo primário (Tabela 1) na diluição 1:200, na solução de bloqueio, *overnight* a 4 °C. Após esse período os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS-Tween 0,1%.

O anticorpo secundário (Anti-mouse IgG (H+L) HSA, dyLight 549 labedel, KLP, 042-04-18-06) foi utilizado na diluição de 1:500 em solução de HEPES [Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico] durante 1 hora a temperatura ambiente.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 minutos com PBS-Tween 0,1%, e logo após os cortes foram incubados com a sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), que cora núcleos (1µg/mL) por 1 minuto.

Após novo período de lavagem, as lâminas foram preparadas para leitura com o meio de montagem Fluoromount (F4680, Sigma, St. Louis. MO, USA) e lamínula.

4.4.3. Imunomarcacão do Receptor GPER

As lâminas dos grupos controle e diabético foram retiradas do freezer e colocadas em uma caixa com isolamento de luz. Foi realizado bloqueio em BSA 1%, 10% de soro de cabra, 0,3M glicina em PBS-Tween 0,1%, por 1 hora a temperatura ambiente, para inibição de interações não específicas de proteínas.

Após o bloqueio, os vasos foram incubados com o anticorpo primário (Tabela 1) na diluição 1:500, na solução de bloqueio, *overnight* a 4 °C. Em seguida os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS-Tween 0,1%.

O anticorpo secundário (Texas red goat anti-rabbit IgG antibody, Vector, TI-1000) foi utilizado na diluição de 1:100 em solução de HEPES durante 1 hora a temperatura ambiente.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas novamente 3 vezes durante 5 minutos com PBS-Tween 0,1% e, logo após, os cortes foram incubados com o anticorpo DAPI (1µg/mL) por 1 minuto.

Após novo período de lavagem, as lâminas foram preparadas para leitura com Fluoromount (F4680, Sigma, St. Louis. MO, USA) e lamínula.

4.4.4. Leitura das lâminas

Secções representativas dos vasos de 3 a 5 animais de cada condição experimental foram capturadas em alta resolução por uma câmera (Leica Digital FireWire Camera Captures High-quality Monochrome Images Leica DFC340 FX) acoplada a um microscópio (Automated Inverted Microscope for Life Science Research Leica DMI4000 B) na objetiva de 40x e transmitidas a um computador dotado de um programa digitalizador (Leica Application Suite, versão 3.7). A quantificação foi realizada por meio do programa Image J, adotando-se o mesmo limiar de cor para as

análises em todos os grupos. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência por área (μm^2) em relação à intensidade do controle.

4.5. DROGAS E SAIS UTILIZADOS

Cloridrato de fenilefrina, cloreto de acetilcolina, aldosterona e eplerenona foram obtidos da Sigma Chemical Co (EUA). G-1 e G-15 foram obtidos da Calbiochem. Todos os reagentes utilizados no Q-PCR em tempo real foram obtidos da Invitrogen Life Technologies. Inibidor de protease, ortovanadato de sódio, Tween, BSA, Triton, EDTA e PMSF foram adquiridos da Sigma Chemical CO (EUA); DTT foi adquirido da Millipore; Tris, glicerol, mercaptoetanol e SDS foram obtidos da Synth®. Todos os outros sais utilizados foram obtidos da Merck®.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O teste “t” ou a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni foram utilizados quando pertinente. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A aldosterona altera a reatividade vascular em artérias mesentéricas por mecanismos dependentes de MR e GPER. Na contração a aldosterona potencializa a resposta da PE por ativação de MR e GPER ativando proteínas de vias contráteis como ERK 1/2 tanto nos grupo controle e diabético. A aldosterona também prejudica a vasodilatação induzida pela ACh mas esse efeito é dependente somente da ativação do receptor MR. O receptor GPER tem um papel protetor no grupo controle a esses efeitos da aldosterona, entretanto esses efeitos não são observados no diabetes. O receptor GPER contribui de duas formas distintas à ação da aldosterona na reatividade vascular: 1) contribuindo para o aumento da resposta contrátil em situações normais e no diabetes e 2) um papel benéfico no relaxamento vascular que é perdido no diabetes. Esses resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos que a aldosterona influencia os danos vasculares no diabetes através da ativação de receptores MR e GPER.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.D.A. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION: Peripheral arterial disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 12, p. 3333-41, Dec 2003. ISSN 0149-5992 (Print)

0149-5992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633825> >.

_____. Standards of medical care in diabetes--2013. **Diabetes Care**, v. 36 Suppl 1, p. S11-66, Jan 2013. ISSN 1935-5548 (Electronic)

0149-5992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264422> >.

ARIMA, S. et al. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 9, p. 2255-63, Sep 2003. ISSN 1046-6673 (Print)

1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937301> >.

ARIMA, S. et al. Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 352-7, Feb 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14691200> >.

BALHUIZEN, A. et al. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. **Mol Cell Endocrinol**, v. 320, n. 1-2, p. 16-24, May 14 2010. ISSN 1872-8057 (Electronic)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20122988> >.

BARTTER, F. C. The Physiological Control of Aldosterone Secretion [Abridged]. **Proc R Soc Med**, v. 51, n. 3, p. 201-2, Mar 1958. ISSN 0035-9157 (Print)

0035-9157 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19993956> >.

BECKMAN, J. A. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. **Eur Heart J**, v. 34, n. 31, p. 2444-52, Aug 2013. ISSN 1522-9645 (Electronic)

0195-668X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625211> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRASIL. Diabetes Mellitus - Cadernos de Atenção Básica, n. 16. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica - Brasília: Ministério da Saúde.**, v. Série A. Normas e Manuais Técnicos, p. 64, 2006.

_____. Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde**, v. Série G. Estatística e Informação em Saúde, p. 132, 2012.

_____. VIGITEL BRASIL 2012: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde**, n. 978-85-334-2054-0, p. 136, 2013.

BRESNICK, G. H. et al. Patterns of ischemia in diabetic retinopathy. **Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol**, v. 81, n. 4 Pt 1, p. OP694-709, Jul-Aug 1976. ISSN 0161-6978 (Print)
0161-6978 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/822560> >.

BRIET, M.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular Actions of Aldosterone. **J Vasc Res**, v. 50, n. 2, p. 89-99, Nov 21 2012. ISSN 1423-0135 (Electronic)
1018-1172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172373> >.

BRIONES, A. M. et al. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. **Hypertension**, v. 59, n. 5, p. 1069-78, May 2012. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493070> >.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-25, Jun 2005. ISSN 0012-1797 (Print)
0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919781> >.

CALLERA, G. E. et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. **Hypertension**, v. 45, n. 4, p. 773-9, Apr 2005. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699470> >.

CAMPAYO, A.; GOMEZ-BIEL, C. H.; LOBO, A. Diabetes and depression. **Curr Psychiatry Rep**, v. 13, n. 1, p. 26-30, Feb 2011. ISSN 1535-1645 (Electronic)
1523-3812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21052874> >.

CARNEIRO, F. S. et al. Erectile dysfunction in young non-obese type II diabetic Goto-Kakizaki rats is associated with decreased eNOS phosphorylation at Ser1177. **J Sex Med**, v. 7, n. 11, p. 3620-34, Nov 2010. ISSN 1743-6109 (Electronic) 1743-6095 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807325> >.

CARNEIRO, F. S. et al. Adenosine actions are preserved in corpus cavernosum from obese and type II diabetic db/db mouse. **J Sex Med**, v. 5, n. 5, p. 1156-66, May 2008. ISSN 1743-6109 (Electronic) 1743-6095 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221284> >.

CARPENTER, C. C.; DAVIS, J. O.; AYERS, C. R. Relation of renin, angiotensin II, and experimental renal hypertension to aldosterone secretion. **J Clin Invest**, v. 40, p. 2026-42, Nov 1961. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13876766> >.

CHUN, T. Y.; PRATT, J. H. Nongenomic renal effects of aldosterone: dependency on NO and genomic actions. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 636-7, Apr 2006. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520408> >.

CONNELL, J. M.; DAVIES, E. The new biology of aldosterone. **J Endocrinol**, v. 186, n. 1, p. 1-20, Jul 2005. ISSN 0022-0795 (Print) 0022-0795 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002531> >.

COOPER, S. A. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 4, p. H2009-23, Oct 2007. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586614> >.

CREAGER, M. A. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. **Circulation**, v. 108, n. 12, p. 1527-32, Sep 23 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504252> >.

CUKIERMAN, T.; GERSTEIN, H. C.; WILLIAMSON, J. D. Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2460-9, Dec 2005. ISSN 0012-186X (Print) 0012-186X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283246> >.

DAVIES, J. et al. Spironolactone reduces brachial pulse wave velocity and PIIINP levels in hypertensive diabetic patients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 520-3, May 2005. ISSN 0306-5251 (Print)

0306-5251 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15842549> >.

DAVIES, J.; STRUTHERS, A. The potential benefits of aldosterone antagonism in Type 2 diabetes mellitus. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 3, n. 3, p. 150-5, Sep 2002. ISSN 1470-3203 (Print)

1470-3203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563564> >.

DAVIS, J. O. et al. Evidence for secretion of an aldosterone-stimulating hormone by the kidney. **J Clin Invest**, v. 40, p. 684-96, Apr 1961. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13720200> >.

DAVIS, J. O. et al. The role of the renin-angiotensin system in the control of aldosterone secretion. **J Clin Invest**, v. 41, p. 378-89, Feb 1962. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13883925> >.

DE VRIESE, A. S. et al. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 5, p. 963-74, Jul 2000. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882379> >.

DLUHY, R. G. et al. Studies of the control of plasma aldosterone concentration in normal man. II. Effect of dietary potassium and acute potassium infusion. **J Clin Invest**, v. 51, n. 8, p. 1950-7, Aug 1972. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5054456> >.

DOBREE, J. H. Simple diabetic retinopathy. Evolution of the lesions and therapeutic considerations. **Br J Ophthalmol**, v. 54, n. 1, p. 1-10, Jan 1970. ISSN 0007-1161 (Print)

0007-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5417650> >.

DU, X. L. et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 22, p. 12222-6, Oct 24 2000. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050244> >.

EATMAN, D. et al. The involvement of prostaglandins in the contractile function of the aorta by aldosterone. **BMC Res Notes**, v. 4, p. 125, 2011. ISSN 1756-0500 (Electronic)

1756-0500 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492462> >.

EDWARDS, C. R. W. et al. Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase -- tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. **The Lancet**, v. 332, n. 8618, p. 986-989, 1988. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673688907428> >.

FALKENSTEIN, E. et al. Specific nongenomic actions of aldosterone. **Kidney Int**, v. 57, n. 4, p. 1390-4, Apr 2000. ISSN 0085-2538 (Print)
 0085-2538 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760072> >.

FARQUHARSON, C. A.; STRUTHERS, A. D. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. **Clin Sci (Lond)**, v. 103, n. 4, p. 425-31, Oct 2002. ISSN 0143-5221 (Print)
 0143-5221 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12241543> >.

FARRELL, G. L.; BANKS, R. C.; KOLETSKY, S. The effect of corticosteroid injection on aldosterone secretion. **Endocrinology**, v. 58, n. 1, p. 104-8, Jan 1956. ISSN 0013-7227 (Print)
 0013-7227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13285453> >.

FEDERICI, M. et al. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. **Circulation**, v. 106, n. 4, p. 466-72, Jul 23 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)
 0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135947> >.

FELDMAN, R. D.; GROS, R. Unraveling the mechanisms underlying the rapid vascular effects of steroids: sorting out the receptors and the pathways. **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 6, p. 1163-9, Jul 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)
 0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21545416> >.

FELDMAN, R. D.; GROS, R. Vascular effects of aldosterone: Sorting out the receptors and the ligands. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 40, n. 12, p. 916-21, Dec 2013. ISSN 1440-1681 (Electronic)
 0305-1870 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902478> >.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 137-88, Jan 2013. ISSN 1522-1210 (Electronic)
 0031-9333 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303908> >.

FUNDER, J. W. The nongenomic actions of aldosterone. **Endocr Rev**, v. 26, n. 3, p. 313-21, May 2005. ISSN 0163-769X (Print)
 0163-769X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814845> >.

FUNDER, J. W.; FELDMAN, D.; EDELMAN, I. S. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. **J Steroid Biochem**, v. 3, n. 2, p. 209-18, Feb 1972. ISSN 0022-4731 (Print)

0022-4731 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4651322> >.

GABBAY, K. H.; MEROLA, L. O.; FIELD, R. A. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. **Science**, v. 151, n. 3707, p. 209-10, Jan 14 1966. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5907911> >.

GANONG, W. F.; MULROW, P. J. Rate of change in sodium and potassium excretion after injection of aldosterone into the aorta and renal artery of the dog. **Am J Physiol**, v. 195, n. 2, p. 337-42, Nov 1958. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13583172> >.

GANONG, W. F.; MULROW, P. J. Evidence of secretion of an aldosterone-stimulating substance by the kidney. **Nature**, v. 190, p. 1115-6, Jun 17 1961. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13703358> >.

GEKLE, M. et al. Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 282, n. 4, p. F669-79, Apr 2002. ISSN 1931-857X (Print)

1522-1466 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880328> >.

GIARDINO, I.; EDELSTEIN, D.; BROWNLIE, M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. **J Clin Invest**, v. 94, n. 1, p. 110-7, Jul 1994. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8040253> >.

GOODFRIEND, T. L. et al. Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. **Obes Res**, v. 7, n. 4, p. 355-62, Jul 1999. ISSN 1071-7323 (Print)

1071-7323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10440591> >.

GREENE, E. L.; KREN, S.; HOSTETTER, T. H. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. **J Clin Invest**, v. 98, n. 4, p. 1063-8, Aug 15 1996. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770880> >.

GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 74, n. 6, p. 1141-8, Jun 1994. ISSN 0009-7330 (Print)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8187280> >.

GROS, R. et al. Rapid effects of aldosterone on clonal human vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 292, n. 2, p. C788-94, Feb 2007. ISSN 0363-6143 (Print)
0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971490> >.

GROS, R. et al. Aldosterone Mediates Its Rapid Effects in Vascular Endothelial Cells through Gper/Gpr30 Activation. **Am J Physiol Cell Physiol**, Jan 2 2013. ISSN 1522-1563 (Electronic)
0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283935> >.

GROS, R. et al. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 442-51, Mar 2011. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242460> >.

GROSSMANN, C. et al. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 7, p. 1697-710, Jul 2005. ISSN 0888-8809 (Print)
0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761031> >.

GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v. 320, n. 6061, p. 454-6, Apr 3-9 1986. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3007998> >.

GUARIGUATA, L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 98, n. 3, p. 524-5, Dec 2012. ISSN 1872-8227 (Electronic)
0168-8227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217268> >.

GUO, Z. et al. COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. **Cardiovasc Res**, v. 67, n. 4, p. 723-35, Sep 1 2005. ISSN 0008-6363 (Print)
0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885672> >.

HAAS, E. et al. Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of

patients with atherosclerosis. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1358-63, Jun 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17452498> >.

HEINDL, S. et al. Acute effects of aldosterone on the autonomic nervous system and the baroreflex function in healthy humans. **J Neuroendocrinol**, v. 18, n. 2, p. 115-21, Feb 2006. ISSN 0953-8194 (Print)

0953-8194 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16420280> >.

HILE, C.; VEVES, A. Diabetic neuropathy and microcirculation. **Curr Diab Rep**, v. 3, n. 6, p. 446-51, Dec 2003. ISSN 1534-4827 (Print)

1534-4827 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14611739> >.

HIRATA, A. et al. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. **Cardiovasc Res**, v. 84, n. 1, p. 164-72, Oct 1 2009. ISSN 1755-3245 (Electronic)

0008-6363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505930> >.

HITOMI, H. et al. Aldosterone suppresses insulin signaling via the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 750-5, Oct 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646573> >.

HUYSMAN, E.; MATHIEU, C. Diabetes and peripheral vascular disease. **Acta Chir Belg**, v. 109, n. 5, p. 587-94, Oct 2009. ISSN 0001-5458 (Print)

0001-5458 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19994800> >.

I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 65, 2005.

I.D.F. International Diabetes Federation - Diabetes Atlas. v. 5th Edition, 2012a.

_____. International Diabetes Federation. Global Guideline for Type 2 Diabetes. Clinical Guidelines Task Force. **International Diabetes Federation**, p. 117, 2012b.

International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1327-34, Jul 2009. ISSN 1935-5548 (Electronic)

0149-5992 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502545> >.

JANG, E. J. et al. GPER-1 agonist G1 induces vasorelaxation through activation of epidermal growth factor receptor-dependent signalling pathway. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, n. 10, p. 1488-99, Oct 2013. ISSN 2042-7158 (Electronic)

0022-3573 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028616> >.

JOHAR, S. et al. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1546-8, Jul 2006. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720735> >.

KAISER, N. et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Diabetes**, v. 42, n. 1, p. 80-9, Jan 1993. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678404> >.

LAPOLLA, A.; MOSCA, A.; FEDELE, D. The general use of glycated haemoglobin for the diagnosis of diabetes and other categories of glucose intolerance: still a long way to go. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 21, n. 7, p. 467-75, Jul 2011. ISSN 1590-3729 (Electronic)

0939-4753 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641782> >.

LASTRA-LASTRA, G. et al. Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 71, n. 1, p. 1-6, Jul 2009. ISSN 1365-2265 (Electronic)

0300-0664 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138313> >.

LASTRA, G. et al. Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system. **Nat Rev Cardiol**, v. 7, n. 10, p. 577-84, Oct 2010. ISSN 1759-5010 (Electronic)

1759-5002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697411> >.

LI, Z. L. et al. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the GPR30 agonist G1 in experimental diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38787, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679517> >.

LINDSEY, S. H. et al. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 57, n. 5, p. 598-603, May 2011. ISSN 1533-4023 (Electronic)

0160-2446 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326105> >.

LIU, S. et al. Importance of extranuclear estrogen receptor-alpha and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2292-302, Oct 2009. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587358> >.

LIU, S. L. et al. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. **Circulation**, v. 108, n. 19, p. 2400-6, Nov 11 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)
 0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557368> >.

LOMBES, M. Various actions of aldosterone: the kidney and beyond. **Ann Endocrinol (Paris)**, v. 70, n. 3, p. 173-5, Jun 2009. ISSN 0003-4266 (Print)
 0003-4266 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286156> >.

LUSCHER, T. F. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. **Circulation**, v. 108, n. 13, p. 1655-61, Sep 30 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)
 0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517152> >.

LUTHER, J. M.; BROWN, N. J. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 12, p. 734-9, Dec 2011. ISSN 1873-3735 (Electronic)
 0165-6147 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880378> >.

MACFADYEN, R. J.; BARR, C. S.; STRUTHERS, A. D. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. **Cardiovasc Res**, v. 35, n. 1, p. 30-4, Jul 1997. ISSN 0008-6363 (Print)
 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302344> >.

MACKENZIE, S. M. et al. Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. **J Mol Endocrinol**, v. 24, n. 3, p. 321-8, Jun 2000. ISSN 0952-5041 (Print)
 0952-5041 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828825> >.

MANRIQUE, C. et al. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. **Med Clin North Am**, v. 93, n. 3, p. 569-82, May 2009. ISSN 1557-9859 (Electronic)
 0025-7125 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427492> >.

MARKOS, F.; HEALY, V.; HARVEY, B. J. Aldosterone rapidly activates Na⁺/H⁺ exchange in M-1 cortical collecting duct cells via a PKC-MAPK pathway. **Nephron Physiol**, v. 99, n. 1, p. p1-9, 2005. ISSN 1660-2137 (Electronic)
 1660-2110 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637466> >.

MARTENSSON, U. E. et al. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 687-98, Feb 2009. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845638> >.

MAUER, S. M. et al. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **J Clin Invest**, v. 74, n. 4, p. 1143-55, Oct 1984. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6480821> >.

MCFARLANE, S. I.; SOWERS, J. R. Cardiovascular endocrinology 1: aldosterone function in diabetes mellitus: effects on cardiovascular and renal disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 2, p. 516-23, Feb 2003. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574172> >.

MICHEA, L. et al. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 973-80, Mar 2005. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550504> >.

MIN, L. J. et al. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 97, n. 5, p. 434-42, Sep 2 2005. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081869> >.

MODAN, M. et al. Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. **J Clin Invest**, v. 75, n. 3, p. 809-17, Mar 1985. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3884667> >.

MOGENSEN, C. E.; CHRISTENSEN, C. K.; VITTINGHUS, E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 32 Suppl 2, p. 64-78, May 1983. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6400670> >.

MONAHAN, K. D.; LEUENBERGER, U. A.; RAY, C. A. Aldosterone impairs baroreflex sensitivity in healthy adults. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 1, p. H190-7, Jan 2007. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920805> >.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res**, v. 41, n. 1, p. 19-26, Jul 1977. ISSN 0009-7330 (Print)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/862138> >.

NATHAN, D. M.; TURGEON, H.; REGAN, S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2239-44, Nov 2007. ISSN 0012-186X (Print)
0012-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851648> >.

NIETLISPACH, F. et al. Influence of acute and chronic mineralocorticoid excess on endothelial function in healthy men. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 82-8, Jul 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic)
0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502494> >.

NILSSON, B. O.; OLDE, B.; LEEB-LUNDBERG, L. M. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 6, p. 1131-9, Jul 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)
0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250980> >.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787-90, Apr 13 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783895> >.

NOUWEN, A. et al. Prevalence of depression in individuals with impaired glucose metabolism or undiagnosed diabetes: a systematic review and meta-analysis of the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. **Diabetes Care**, v. 34, n. 3, p. 752-62, Mar 2011. ISSN 1935-5548 (Electronic)
0149-5992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357362> >.

OBERLEITHNER, H. et al. Aldosterone and nuclear volume cycling. **Cell Physiol Biochem**, v. 10, n. 5-6, p. 429-34, 2000. ISSN 1015-8987 (Print)
1015-8987 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125225> >.

OELZE, M.; SCHUHMACHER, S.; DAIBER, A. Organic nitrates and nitrate resistance in diabetes: the role of vascular dysfunction and oxidative stress with emphasis on antioxidant properties of pentaerithrityl tetranitrate. **Exp Diabetes Res**, v. 2010, p. 213176, 2010. ISSN 1687-5303 (Electronic)
1687-5214 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21234399> >.

OKOSHI, M. P. et al. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. **J Card Fail**, v. 10, n. 6, p. 511-8, Dec 2004. ISSN 1071-9164 (Print) 1071-9164 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599842> >.

OLDE, B.; LEEB-LUNDBERG, L. M. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 8, p. 409-16, Oct 2009. ISSN 1879-3061 (Electronic) 1043-2760 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734054> >.

PANENI, F. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. **Eur Heart J**, v. 34, n. 31, p. 2436-43, Aug 2013. ISSN 1522-9645 (Electronic) 0195-668X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23641007> >.

PANNIRSELVAM, M. et al. Chronic oral supplementation with sepiapterin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in small mesenteric arteries from diabetic (db/db) mice. **Br J Pharmacol**, v. 140, n. 4, p. 701-6, Oct 2003. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534153> >.

PANNIRSELVAM, M. et al. Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 2, p. 255-63, May 2002. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010774> >.

PASCOLINI, D. et al. 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. **Ophthalmic Epidemiol**, v. 11, n. 2, p. 67-115, Apr 2004. ISSN 0928-6586 (Print) 0928-6586 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255026> >.

PATEL, B. M.; MEHTA, A. A. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. **Eur J Pharmacol**, Oct 4 2012. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041273> >.

PITT, B. et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. **N Engl J Med**, v. 341, n. 10, p. 709-17, Sep 2 1999. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471456> >.

PONDA, M. P.; HOSTETTER, T. H. Aldosterone antagonism in chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 1, n. 4, p. 668-77, Jul 2006. ISSN 1555-905X (Electronic)

1555-9041 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699271> >.

PRICE, D. A. et al. The state and responsiveness of the renin-angiotensin-aldosterone system in patients with type II diabetes mellitus. **Am J Hypertens**, v. 12, n. 4 Pt 1, p. 348-55, Apr 1999. ISSN 0895-7061 (Print)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10232494> >.

ROCHA, R. et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 232-7, Jan 1999. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931110> >.

ROSBERGER, D. F. Diabetic retinopathy: current concepts and emerging therapy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 42, n. 4, p. 721-45, Dec 2013. ISSN 1558-4410 (Electronic)

0889-8529 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286948> >.

ROSSOL-HASEROTH, K. et al. Mineralocorticoid receptor antagonists do not block rapid ERK activation by aldosterone. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 318, n. 1, p. 281-8, May 21 2004. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110785> >.

SAYESKI, P. P.; KUDLOW, J. E. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. **J Biol Chem**, v. 271, n. 25, p. 15237-43, Jun 21 1996. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663078> >.

SCHIFFRIN, E. L. Effects of aldosterone on the vasculature. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 312-8, Mar 2006. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432039> >.

SCHMIDT, B. M. Rapid non-genomic effects of aldosterone on the renal vasculature. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 961-5, Oct 2008. ISSN 0039-128X (Print)

0039-128X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242654> >.

SCHNEIDER, J. G. et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. **Am J Hypertens**, v. 15, n. 11, p. 967-72, Nov 2002. ISSN 0895-7061 (Print)

0895-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441216> >.

SELVARAJAH, D. et al. Early involvement of the spinal cord in diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Care**, v. 29, n. 12, p. 2664-9, Dec 2006. ISSN 0149-5992 (Print) 0149-5992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130202> >.

SHARMA, A. K.; THOMAS, P. K. Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. **J Neurol Sci**, v. 23, n. 1, p. 1-15, Sep 1974. ISSN 0022-510X (Print) 0022-510X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4277605> >.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 87, n. 1, p. 4-14, Jan 2010. ISSN 1872-8227 (Electronic) 0168-8227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896746> >.

SHERAJEE, S. J. et al. Aldosterone induces vascular insulin resistance by increasing insulin-like growth factor-1 receptor and hybrid receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 2, p. 257-63, Feb 2012. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173225> >.

STAS, S. et al. Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. **Endocrinology**, v. 148, n. 8, p. 3773-80, Aug 2007. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494996> >.

STROMSTEDT, M.; WATERMAN, M. R. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 34, n. 1, p. 75-88, Dec 1 1995. ISSN 0169-328X (Print) 0169-328X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8750863> >.

TAIT, J. F.; SIMPSON, S. A.; GRUNDY, H. M. The effect of adrenal extract on mineral metabolism. **Lancet**, v. 1, n. 6699, p. 122-4, Jan 19 1952. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14889780> >.

TAKEDA, Y. et al. Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 8, p. 2797-800, Aug 1996. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8768832> >.

TAKEDA, Y. et al. Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. **Hypertension**, v. 25, n. 2, p. 170-3, Feb 1995. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7843766> >.

TAPP, R. J. et al. Longitudinal association of glucose metabolism with retinopathy: results from the Australian Diabetes Obesity and Lifestyle (AusDiab) study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1349-54, Jul 2008. ISSN 1935-5548 (Electronic) 0149-5992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411241> >.

THOMAS, W.; MCENEANEY, V.; HARVEY, B. J. Aldosterone-stimulated PKC signalling cascades: from receptor to effector. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1049-51, Nov 2007. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956276> >.

UNGER, T.; PAULIS, L.; SICA, D. A. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. **Eur Heart J**, v. 32, n. 22, p. 2739-47, Nov 2011. ISSN 1522-9645 (Electronic) 0195-668X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951628> >.

VIBERTI, G. C. The effect of glycaemic control on the early abnormalities of the diabetic kidney. **Minerva Nefrol**, v. 29, n. 3 Suppl, p. 5-8, Jul-Sep 1982. ISSN 0026-4873 (Print) 0026-4873 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7145222> >.

VIBERTI, G. C. et al. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, n. 8287, p. 1430-2, Jun 26 1982. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6123720> >.

VIBERTI, G. C.; JARRETT, R. J.; KEEN, H. Microalbuminuria as prediction of nephropathy in diabetics. **Lancet**, v. 2, n. 8298, p. 611, Sep 11 1982. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6125757> >.

VIENGCHAREUN, S. et al. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. **Nucl Recept Signal**, v. 5, p. e012, 2007. ISSN 1550-7629 (Electronic) 1550-7629 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174920> >.

VINIK, A. I. et al. Diabetic neuropathy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 42, n. 4, p. 747-87, Dec 2013. ISSN 1558-4410 (Electronic)

0889-8529 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286949> >.

WENDLER, A.; WEHLING, M. Is GPR30 the membrane aldosterone receptor postulated 20 years ago? **Hypertension**, v. 57, n. 5, p. e16; author reply e17, May 2011. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422381> >.

WESSELS, A. M. et al. Microvascular disease in type 1 diabetes alters brain activation: a functional magnetic resonance imaging study. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 334-40, Feb 2006. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443765> >.

WHITING, D. R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 94, n. 3, p. 311-21, Dec 2011. ISSN 1872-8227 (Electronic)

0168-8227 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079683> >.

WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. **WHO Document Production Services**, v. World Health organization / International Diabetes Federation, 2006.

_____. Prevention and Control of Noncommunicable Diseases: Guidelines for Primary Health Care in Low Resource Settings. **World Health organization - WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee.**, Care in Low Resource Settings 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844451> >.

WILDLING, L. et al. Aldosterone receptor sites on plasma membrane of human vascular endothelium detected by a mechanical nanosensor. **Pflugers Arch**, v. 458, n. 2, p. 223-30, Jun 2009. ISSN 1432-2013 (Electronic)

0031-6768 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018563> >.

WILLIAMS, G. H. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. **Heart Fail Rev**, v. 10, n. 1, p. 7-13, Jan 2005. ISSN 1382-4147 (Print)

1382-4147 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947886> >.

WISGERHOF, M.; CARPENTER, P. C.; BROWN, R. D. Increased adrenal sensitivity to angiotensin II in idiopathic hyperaldosteronism. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 47, n. 5, p. 938-43, Nov 1978. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/400738> >.

XIA, P. et al. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. **Diabetes**, v. 43, n. 9, p. 1122-9, Sep 1994. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8070612> >.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411-5, Mar 31 1988. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2451132> >.

YE, P. et al. The aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-hydroxylase (CYP11B1) genes are not expressed in the rat heart. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5287-93, Dec 2005. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179417> >.

YU, X. et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 5, p. E882-8, Nov 2011. ISSN 1522-1555 (Electronic)

0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791623> >.

ANEXOS

Certificado da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 012/2013-1, sobre o projeto intitulado "*Contribuição do receptor GPER para as alterações de reatividade vascular produzidas por Aldosterona: influência no diabetes mellitus.*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 06 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº 012/2013-1, entitled "*Contribution of GPER receptor to aldosterone-induced changes in vascular reactivity: influence of diabetes mellitus*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 05/06/2013.

Ribeirão Preto, 06 de maio de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP