VANESSA GEROLDE CARDOSO

A ANGIOTENSINA II PROMOVE O AUMENTO DA
ATIVIDADE DO NHE1 PELA VIA DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR DA P38 MAPK E PROMOVE APOPTOSE
POR ALCALINIZAÇÃO DO CITOSOL EM PODÓCITOS

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

São Paulo

2016

VANESSA GEROLDE CARDOSO

A ANGIOTENSINA II PROMOVE O AUMENTO DA
ATIVIDADE DO NHE1 PELA VIA DE SINALIZAÇÃO
INTRACELULAR DA P38 MAPK E PROMOVE APOPTOSE
POR ALCALINIZAÇÃO DO CITOSOL EM PODÓCITOS

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gerolde Cardoso, Vanessa

A Angiotensina II promove o aumento da atividade do NHE1 pela via de sinalização intracelular da p38 mapk e promove apoptose por alcalinização do citosol em podócitos / Vanessa Gerolde Cardoso; orientador Maria Oliveira de Souza. -- São Paulo, 2016.

60 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Angiotensina II. 2. Estresse oxidativo. 3. Apoptose. 4. Trocador Na⁺/H⁺ isoforma 1 (NHE). I. Oliveira de Souza, Maria , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Gerolde Cardoso.

Título da Dissertação: A Angiotensina II promove o aumento da atividade do NHE1 pela via de sinalização intracelular da p38 MAPK e promove apoptose por alcalinização do citosol em podócitos

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **673/14** referente ao projeto intitulado: "*Efeito da Ang II nos mecanismos celulares envolvidos na injúria de podócitos*" sob a responsabilidade de **Vanessa Gerolde Cardoso**, foi analisado, na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 25 de junho de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe, Rose, por ser o meu maior modelo de mulher forte e independente. Por todo amor, dedicação, incentivo e apoio que sempre me deu em todos os caminhos que escolhi trilhar na vida, meu muito obrigado.

Ao meu pai, Nilson, por me ensinar o valor do estudo e conhecimento e ao meu padrasto, Nelson, por todos os conselhos.

A minha orientadora, Profa. Maria Oliveira de Souza, sou grata por sua dedicação, orientação e por todo o aprendizado.

A Juliana Martins, técnica do laboratório, pela paciência e ensinamentos durante o desenvolvimento deste estudo.

A Tatiana C. Alba Loureiro sou muito grata pelos ensinamentos sobre os experimentos de citometria de fluxo.

Aos amigos que ganhei no laboratório e no ICB Flávia, Bruna, Mariana, Jéssica, Guilherme, Luciana e Daniel agradeço pelo apoio, incentivo e ajuda nos momentos difíceis e por trazer leveza e alegria a minha rotina. Sem vocês, com certeza, minha jornada teria sido muito mais difícil.

A todos os meus amigos que me incentivaram e apoiaram, e de alguma forma contribuíram para tornar esse trabalho possível.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (processo n° 2014/19154-0), CNPq e CAPES.

RESUMO

CARDOSO, V. G. A Angiotensina II promove o aumento da atividade do NHE1 pela via de sinalização intracelular da p38 mapk e promove apoptose por alcalinização do citosol em podócitos. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Em concentrações elevadas no plasma ou no tecido renal a Angiotensina II (Ang II) induz, entre outras coisas, alterações na hemodinâmica renal, injúria glomerular, aumento da síntese de componentes da matriz extracelular glomerular, estresse oxidativo e apoptose de células glomerulares, incluindo as mesangiais e os podócitos. Os podócitos possuem um sistema renina-angiotensina (SRA) próprio e expressam os receptores AT1 e AT2 para o peptídeo, além do trocador Na^+/H^+ isoforma 1 (NHE1). O NHE1 está envolvido com a prevenção e indução de apoptose, controle do volume celular e manutenção do fenótipo celular. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar em podócitos, o papel da Ang II na indução de apoptose, e os eventos intracelulares associados à atividade do NHE1 nesta condição. Nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II em alta concentração por 24 horas induz estresse oxidativo e promove apoptose em podócitos. Porém, a ativação das subunidades da NADPH oxidase Nox4 e p22^(phox) e da via de sinalização pró-apoptótica Bax, são eventos anteriores a apoptose tardia observada em 24 horas de tratamento. Quanto a atividade do NHE1, em situações fisiológicas, este trocador contribui para a proteção contra acidificação intracelular, e, portanto, com a sobrevivência celular. Por outro lado a Ang II, via receptor AT1, promove ativação da via de sinalização intracelular p38 MAPK e aumenta a atividade do NHE1 levando a alcalose, ativação da Bax e apoptose nos podócitos.

Palavras-chave: Angiotensina II. Estresse oxidativo. Apoptose. Trocador Na^+/H^+ isoforma 1 (NHE).

ABSTRACT

CARDOSO, V. G. A Angiotensina II promove o aumento da atividade do NHE1 pela via de sinalização intracelular da p38 mapk e promove apoptose por alcalinização do citosol em podócitos. 2016. 60 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

It has been observed that high plasma, or kidney tissue concentrations of angiotensin II (Ang II) leads to changes in renal hemodynamics, severe glomerular injury, increased synthesis of glomerular extracellular matrix components, oxidative stress and apoptosis in glomerular cells, including podocyte and mesangial cells. Podocytes a local renin-angiotensin system (RAS), expresses the AT1 and AT2 receptors for Ang II and the Na^+ / H^+ exchanger (NHE1). The NHE1 is involved with resistance and induction of apoptosis, cell volume control and maintenance of cell phenotype. Thus, the goal of this study was to investigate in podocytes the role of Ang II in the induction of apoptosis, and intracellular events linked to the NHE1 activity in this condition. Our results indicate that the treatment with Ang II, in a high dose, for 24 hours induces apoptosis in podocytes, and promotes oxidative stress. However, the activation of NADPH oxidase subunits Nox4 and p22^(phox) and pro- apoptotic pprotein Bax, came before the late apoptosis observed in 24 hours of treatment with Ang II. Under physiological conditions, the NHE1 activity contributes to cell survival by preventing cytosolic acidification. Moreover, Ang II via the AT1 receptor, activates intracellular signaling pathway p38 MAPK and increases the NHE1 activity leading to alkalosis, Bax activation and apoptosis in podocytes.

Keywords: Angiotensin II. Oxidative stress. Apoptosis. Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da organização dos processos podais na membrana basal glomerular	16
Figura 2- Esquema do microscópio de fluorescência utilizado nos estudos de pH _i	29
Figura 3- Podócitos não diferenciados e diferenciados marcados com Faloidina e DAPI e expressão de podocina em podócitos diferenciados	35
Figura 4- Expressão de RNAm para AT1, AT2 e GAPDH e expressão proteica para AT1, AT2 e Actina	36
Figura 5- Expressão de RNAm para p22 e Nox 4 no tratamento com Ang II 1 µM por 4 horas	37
Figura 6- Expressão de RNAm para Bcl-2, Bax e razão Bax/Bcl-2 no tratamento com Ang II 1 µM por 4 horas	38
Figura 7- Efeito do tratamento com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 µM) por 24 horas na apoptose de podócitos.....	39
Figura 8- Ang II e/ou losartan (los) na ocorrência de apoptose.	40
Figura 9- Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células controle e tratadas com Ang II 1Mm, e efeito da Ang II na ocorrência de apoptose	42
Figura 10- Curva de recuperação do pH _i em células controle e na ausência de sódio (NMDG), e efeito do NMDG ou cariporide (10 µM) na velocidade de extrusão de H ⁺ de podócitos.....	44
Figura 11- Efeito da Ang II (1µM) e/ou cariporide (10 µM) na velocidade de extrusão de H ⁺ em podócitos e efeito da Ang II (1µM) e/ou cariporide na expressão de NHE1.	45
Figura 12- Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células controle, tratadas com Ang II (1µM), cariporide (10 µM) e Ang II/Carip e efeito da Ang II (1µM) e/ou cariporide (10 µM) na ocorrência de apoptose	47
Figura 13- Efeito da Ang II (1µM) e/ ou losartan (1µM) na velocidade de extrusão de H ⁺ em podócitos	49
Figura 14- Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células controle, tratadas com Ang II (1µM) e Ang II/SB. Efeito da Ang II (1µM) e SB 203580 (100 nM) na ocorrência de apoptose, e efeito da Ang II (1µM) e SB 203580 (100 nM) na velocidade de extrusão de H ⁺ em podócitos	50
Figura 15- Efeito da Ang II na expressão de RNAm para TNFα e interleucina 6	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito da Ang II (1µM) por 4 horas na expressão de RNAm para p22 <i>phox</i>	37
Tabela 2- Efeito da Ang II (1µM) por 4 horas na expressão de RNAm para Nox 4	38
Tabela 3- Efeito da Ang II (1µM) por 4 horas na expressão de RNAm para Bcl-2 e Bax.	39
Tabela 4- Efeito da Ang II (1 µM) por 4 horas na razão Bax/Bcl-2	40
Tabela 5- Apoptose de podócitos tratados com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 µM) por 24 horas	41
Tabela 6- Efeito da Ang II (1 µM) e/ou losartan (1 µM) por 24 horas na apoptose de podócitos.....	41
Tabela 7- Efeito da Ang II por 24 horas na apoptose de podócitos	43
Tabela 8- Tabela de pH _i dos grupos controles	45
Tabela 9- Efeito do NMDG e/ou cariporide (10 µM) por 24 horas na extrusão celular de H ⁺	45
Tabela 10- Efeito da Ang II (1 µM) e/ou cariporide (10 µM) por 24 horas na extrusão celular de H ⁺	47
Tabela 11- Expressão proteica de NHE1	47
Tabela 12- Efeito da Ang II (1 µM) e/ou cariporide (10µM) por 24 horas na apoptose de podócitos	48
Tabela 13- Efeito da Ang II (1 µM) e/ou losartan (1 µM) por 24 horas na extrusão celular de H ⁺	49
Tabela 14- Efeito da Ang II (1 µM) e SB 203580 (100 nM) por 24 horas na apoptose de podócitos	50
Tabela 15- Efeito da Ang II (1µM) e/ ou SB 303580 (100 nM) por 24 horas na extrusão celular de H ⁺	49
Tabela 16- Efeito da Ang II (1 µM) na expressão de RNAm para TNFα e interleucina 6 (IL6)	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina II
ANG (1-9)	Angiotensina (1-9)
ANG (1-7)	Angiotensina (1-7)
AT ₁	Receptor de ANG II tipo 1
AT ₂	Receptor de ANG II tipo 2
BCECF/AM	2', 7'- biscarboxietil - 5,6 - carboxifluoresceína – <i>Molecular Probes</i>
Carip	Cariporide
CD2AP	CD2- associated protein
dpHi/dt	Velocidade de extrusão de H ⁺
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ERK ½	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs	espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
INF-γ	Interferon gama
IF	Intensidade de fluorescência
Los	Losartan
MAPK	Proteína Quinase ativada por Mitose
MEK	Proteína quinase MAPK ERK
MBG	Membrana basal glomerular

Na ⁺	Sódio
NHE1	Trocador Na ⁺ /H ⁺ isoforma 1
NADPH oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NMDG	N-Metil-D-glucamina
NO	Óxido Nítrico
O ₂ [']	ânion superóxido
pH _i	pH intracelular
pH _e	pH extracelular
p38MAPK	Proteína quinase p38 ativada por mitógeno
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRPC6	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Glomérulo	14
1.1.1	<i>Células Mesangiais</i>	14
1.1.2	<i>Matriz extracelular glomerular</i>	15
1.1.3	<i>Células endoteliais</i>	15
1.1.4	<i>Membrana Basal Glomerular</i>	15
1.1.5	<i>Podócitos</i>	16
1.1.5.1	<i>Processos podais</i>	16
1.1.5.2	<i>Apoptose e Injúria de podócitos</i>	17
1.2	Apoptose	18
1.3	Sistema Renina-Angiotensina	18
1.4	SRA Intrarrenal	19
1.5	Ang II e o estresse oxidativo	20
1.6	Trocador Sódio/Hidrogênio (Na^+/H^+)	20
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	22
3	OBJETIVOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Cultura de Podócitos	24
4.2	Grupos Experimentais	25
4.2.1	<i>Tratamento das culturas celulares com Ang II e/ou Losartan</i>	25
4.2.2	<i>Tratamento das culturas celulares com Cariporide e/ou Ang II</i>	25
4.2.3	<i>Tratamento das culturas celulares com SB 303580 e/ou Ang II</i>	25
4.3	Ensaio de apoptose	
4.3.1	<i>ELISA</i>	25
4.3.2	<i>Citometria de fluxo</i>	26

4.4 Avaliação do pH intracelular (pHi) por microscopia de fluorescência	27
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
4.5.1 <i>Extração do RNA total</i>	29
4.5.2 <i>Síntese do cDNA a partir do RNAm</i>	29
4.5.3 <i>Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase</i>	29
4.5.4 <i>Eletroforese</i>	30
4.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).....	30
4.6.1 <i>Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real</i>	30
4.7 Análise da expressão proteica por Western Blot	31
4.7.1 <i>Preparação de membranas</i>	31
4.7.2 <i>Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose</i>	31
4.8 Imunofluorescência	32
4.9 Análise estatística	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Marcação do citoesqueleto e expressão de podocina.....	34
5.2 Expressão dos receptores AT1 e AT2	35
5.3 Angiotensina II e o estresse oxidativo	35
5.4 Sinalização para apoptose.....	36
5.5 Ensaio de apoptose: ELISA	38
5.6 Apoptose por citometria de fluxo.....	40
5.7 Regulação do pH intracelular (pHi) dependente de NHE1	41
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS*	54

1 INTRODUÇÃO

Os rins recebem cerca de 20% do débito cardíaco e são órgãos essenciais para a manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico do organismo. A organização da sua vasculatura essencial para a regulação do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e formação da urina (Basile, 2009; Sequeira Lopez e Gomez, 2011). A ultrafiltração glomerular ocorre nos capilares glomerulares e é controlada pelas forças de Starling e por ajustes funcionais da barreira de ultrafiltração (Kawada *et al.*, 2002). Além de manter a homeostase, os rins também exercem um importante papel endócrino, pois sintetizam diversos hormônios e compostos vasoativos como: angiotensina II (Ang II), endotelinas, prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (Touyz e Schiffrin, 2004).

Diversas doenças sistêmicas associadas às doenças renais como a hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e insuficiência cardíaca, podem induzir a perda progressiva da função renal essencialmente por alterar a morfologia e a função de vasos renais, mesângio, barreira de ultrafiltração glomerular e células tubulares (Kawada *et al.*, 2002). Frequentemente, a injúria na barreira de ultrafiltração glomerular leva à proteinúria e perda da função renal. Assim, a disfunção glomerular é o fator etiológico mais comum para a falência renal e o estudo das bases moleculares da biologia glomerular é essencial para o seu entendimento (Kawada *et al.*, 2002).

1.1 Glomérulo

Os capilares glomerulares são compostos de 3 tipos celulares: células mesangiais, células endoteliais dos capilares glomerulares e podócitos. Juntamente com a membrana basal glomerular, o endotélio e os podócitos formam a barreira de ultrafiltração glomerular.

1.1.1 Células mesangiais

As células mesangiais estão em contato direto com células endoteliais dos capilares glomerulares, estes capilares, por sua vez, estão separadas dos podócitos pela membrana basal glomerular (MBG). Sakai e Kirtz em 1987, estudando a relação entre a célula mesangial e a MBG, descreveram que esta última não cobre totalmente a camada endotelial de revestimento do leito capilar, restando áreas onde os prolongamentos mesangiais entram em contato direto com o endotélio glomerular fenestrado, denominadas regiões justamesangiais do capilar

glomerular (Sakai e Kriz, 1987). Nas áreas em que não se estabelece contato direto, a conexão entre a célula mesangial e a MBG é realizada por elementos de matriz extracelular, através de uma densa rede de microfibrilas que ancora a membrana celular à fibronectina presente nessa matriz (Kriz *et al.*, 1990). As células mesangiais produzem os componentes da matriz extracelular glomerular e mantêm a integridade do tufo glomerular, formando um arcabouço que suporta os capilares glomerulares. A sua capacidade contrátil permite que controlem a tensão e o fluxo intracapilar e assim, a ultrafiltração glomerular de cada néfron individualmente.

1.1.2 Matriz extracelular glomerular

Na matriz extracelular de glomérulos saudáveis predominam os elementos como fibronectina e colágeno do tipo IV. Nos estados patológicos em que se observa expansão da matriz extracelular ocorre aumento da expressão de fibronectina, laminina e colágeno total, com predomínio dos colágenos intersticiais do tipo I e III, normalmente encontrados na parede de arteríolas e no interstício (Funabiki *et al.*, 1990). A expansão de matriz extracelular influencia vários aspectos do comportamento celular glomerular, tais como adesão, crescimento, migração, proliferação, diferenciação e reparo (Kriz *et al.*, 1990).

1.1.3 Células endoteliais

As células endoteliais dos capilares glomerulares possuem fenestras com um diâmetro de aproximadamente 60-80 nm. Do lado luminal das fenestras, há um glicocálix carregado negativamente, que constitui uma barreira com seletividade para tamanho e carga (Leeuwis *et al.*, 2010). Essas células sintetizam compostos vasoativos, citocinas e proteínas de matriz extracelular como a laminina; que atuam no mesângio e em vasos pós-capilares como as arteríolas eferentes (Sun *et al.*, 2013).

1.1.4 Membrana Basal Glomerular

A membrana basal glomerular (MBG) é um componente da matriz extracelular, que atua como barreira de ultrafiltração, separando a luz do capilar glomerular dos podócitos. Assim como a matriz extracelular, a MBG é constituída basicamente por macromoléculas como a fibronectina e o colágeno do tipo IV, além da laminina, distroglicanos e proteoglicanos como a agrina (Yurchenco *et al.*, 2004).

1.1.5 Podócitos

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que exercem funções organizadoras e protetoras da estrutura e da função glomerular. São células envolvidas na ultrafiltração do plasma, na manutenção da membrana basal glomerular, na manutenção da forma e da integridade dos capilares glomerulares e respondem aos vários mecanismos de sinalização celular. Os podócitos são caracterizados por extensos processos podais, que contém filamentos de actina finamente orquestrados com diversas outras proteínas, a fim de manter a sua morfologia e a aderência à membrana basal glomerular (Leeuwis *et al.*, 2010).

1.1.5.1 Processos podais

Os processos podais (Figura 1) contêm 3 porções distintas: o lado basal (A), o lado apical (B) e o diafragma (C).

Figura 1- Esquema representativo da organização dos processos podais na membrana basal glomerular. (A) Membrana Basal, (B) Membrana Apical, (C) Diafragma. Modificado de Endlich K, 2001, Curr Opin Nephrol Hypertens10:331–340. PC, podocalixina; Ez, ezrina.

O lado basal (**Figura 1 A**) conecta o podócito à membrana basal glomerular através das integrinas e distroglicanos (proteínas que organizam a interação entre a laminina e a matriz extracelular). As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície

que auxiliam na adesão da célula à matriz extracelular e transmitem sinais químicos e mecânicos (Schwartz, 1997). A integrina $\alpha 3 \beta 1$ é abundante na membrana basal dos processos podais e interage com o domínio carboxi-terminal da laminina 521 e com o colágeno do tipo IV presentes na MBG (Chen e Miner, 2012).

A laminina $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$ (ou 521) é sintetizada pelos podócitos e células endoteliais dos capilares glomerulares e em seguida, depositada na MBG (Chen e Miner, 2012). O complexo protéico integrina/laminina auxilia a fusão dos processos podais na MBG (Yurchenco *et al.*, 2004).

O lado apical (**Figura 1 B**) contém proteínas carregadas negativamente como: podocalixina, sialoglicoproteína e podoplanina, que formam um glicocálix e contribuem para a seletividade por carga da barreira de ultrafiltração (Qian *et al.*, 2001; Kittikulsuth *et al.*, 2011).

O diafragma (**Figura 1 C**) é a camada mais complexa da barreira de ultrafiltração glomerular, com uma espessura constante de 40 nm (Carey, 2005). Proteínas específicas do diafragma interagem com a actina do citoesqueleto, influenciando vias de sinalização e a função dos podócitos. As proteínas expressas no diafragma incluem: nefrina, podocina, Neph 1 e 2, FAT 1 e 2 e o canal de cálcio TRPC6 (*Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6*) (Mundel e Shankland, 2002).

A nefrina, um membro da família das imunoglobulinas, é composta por um domínio intracelular e um extracelular e é capaz de traduzir sinais entre processos podais vizinhos (Chuang e He, 2009). A nefrina pode sofrer fosforilação, e juntamente com as proteínas associadas CD2AP e podocina, induzir vias de sinalização envolvidas na injúria de podócitos (Padia *et al.*, 2006). A nefrina fosforilada pode ser internalizada por interagir com a β -arrestina, contribuindo para os processos envolvidos na proteinúria (Quack *et al.*, 2006).

As alterações na expressão ou na função das várias proteínas de podócitos ou de processos podais apresentam um importante papel na perda dos podócitos, proteinúria e são candidatas a marcadores do desenvolvimento de doenças renais (Chuang e He, 2009).

1.1.5.2 Apoptose Injúria de podócitos

Diversos estudos apontam para três tipos principais de injúria de podócitos: (1) perda de processos podais; (2) desdiferenciação acompanhada de proliferação e (3) apoptose (Qian

et al., 2001). A perda dos processos podais é uma resposta importante destas células frente a qualquer tipo de injúria e envolve o rearranjo do citoesqueleto de actina e a sua interação com proteínas da membrana basal glomerular. A sua desdiferenciação resulta no decréscimo da sua função na barreira de ultrafiltração glomerular (Qian *et al.*, 2001). Finalmente, a apoptose de podócitos e/ou seu desprendimento da membrana basal glomerular leva à diminuição do número de podócitos (podocitopenia) e as células remanescentes são incapazes de cobrir toda a membrana basal glomerular e manter a correta barreira de ultrafiltração. Como consequência, os podócitos vão sendo substituídos por tecido cicatricial e matriz extracelular (Leeuwis *et al.*, 2010).

Há diversas causas hereditárias de injúria glomerular, resultantes de mutações genéticas, como é o caso da glomeruloesclerose focal. No entanto, há também uma extensa literatura demonstrando a injúria glomerular adquirida, principalmente devido ao aumento da pressão intraglomerular, à via final comum de doenças como a hipertensão arterial, a nefropatia diabética e a síndrome metabólica. Essas doenças são associadas a múltiplos fatores como: Angiotensina II (Ang II), estresse oxidativo, Endotelina 1 (ET-1), processos inflamatórios e hipertensão glomerular (Cardillo *et al.*, 2002).

1.2 Apoptose

Em 1972 Kerr e colaboradores (Kerr *et al.*, 1972) propuseram o termo “apoptose” para a morte celular programada que ocorre de forma não acidental. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes tóxicos (Saraste e Pulkki, 2000). Nessa condição, a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. Em seguida, o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Esses fragmentos são denominados corpos apoptóticos (Ziegler e Groscurth, 2004). Outra característica importante da morte celular por apoptose é a fragmentação do DNA (Saraste e Pulkki, 2000).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina

Desde a sua descoberta em 1898 por Tigerstedt e Bergman (Tigerstedt *et al.*, 1898), o sistema renina-angiotensina (SRA) é largamente estudado. Na cascata de sinalização sistêmica clássica, as células justaglomerulares secretam renina para a circulação, que cliva o

angiotensinogênio proveniente principalmente do fígado, em angiotensina I (Ang I). Esta, por sua vez, é clivada pela enzima conversora da Ang I (ECA), formando a angiotensina II (Ang II). A Ang II atua via dois receptores, AT1 e AT2, expressos em vários tecidos. O receptor AT1 desencadeia as respostas mais clássicas da Ang II como: vasoconstrição, liberação de aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal, retenção de sódio por diversos segmentos do néfron, estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais) e indução de estresse oxidativo (Bader, 2010).

1.4 SRA Intrarrenal

Diversos estudos demonstram a presença e a importância de SRA locais, em diversos tecidos como coração, tecido adiposo, glândulas adrenais, vasculatura, sistema nervoso central e rins. A ativação do SRA intrarrenal contribui para a hipertensão arterial e a progressão da lesão renal em doenças renais crônicas (Navar *et al.*, 2001; Saleh *et al.*, 2010). Porém, apesar de evidências sólidas da presença de um SRA intratubular, evidências funcionais de um SRA intraglomerular ainda não foram completamente elucidadas.

Diversos estudos demonstraram que assim como as células mesangiais e tubulares (Donowitz *et al.*, 2009), os podócitos também expressam os receptores AT1 e AT2 e os componentes do SRA. Liebau e colaboradores, em 2006, demonstraram que os podócitos humanos em cultura expressam RNAm para angiotensinogênio, renina e ECA (Wells *et al.*, 1992). Já Velez JCQ e colaboradores, em 2007, avaliaram a habilidade de podócitos de camundongos em cultura metabolizarem substratos do SRA (Thorens *et al.*, 1990). Os autores demonstraram, elegantemente, que os podócitos sintetizam Ang-(1-9) e Ang-(1-7), sendo a Ang-(1-7) o metabólito mais abundante. Nestes estudos verificou-se também que estas células são capazes de degradar Ang II exógena.

Em cultura de podócitos diferenciados oriundos de camundongos, há expressão predominante de receptores do tipo AT1 e menor expressão de receptores do tipo AT2 (Li *et al.*, 2012). Funções cruciais dos podócitos, como contração, autofagocitose, organização do citoesqueleto e apoptose são reguladas pela Ang II atuando sobre os receptores AT1 (Siragy e Carey, 1997). Além disso, um estudo recente demonstrou que a Ang II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em podócitos, e que a participação do trocador Na^+/H^+ isoforma 1 parece ser importante nessa condição (Touyz e Schiffrin, 2000).

1.5 Ang II e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produzidas como intermediárias no processo redox (redução-oxidação) e têm um importante papel fisiológico como moléculas de sinalização intracelular que regulam respostas biológicas como a expressão de genes, ciclo e sobrevivência celular, crescimento e diferenciação celular, regulação da produção e degradação da matriz extracelular, inativação do óxido nítrico e estimulação de diversas quinases pró-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas moléculas são produzidas por alguns tecidos, como o tecido renal (Touyz e Schiffrin, 2004).

As EROs incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), produzido a partir do oxigênio molecular por ação da nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase); um radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e um peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Dentre as EROs, o ânion superóxido é a molécula mais importante e está associada ao estresse oxidativo na progressão de patologias. A NADPH oxidase é representada por uma família denominada NOX que compreende sete membros: Nox1-Nox5, Duox1 e Duox2, que são expressos nos diversos tecidos, incluindo os rins (Bedard *et al.*, 2007). As Nox1-Nox4 dependem da atividade de outra subunidade da NADPH oxidase, a $p22^{(phox)}$ para se tornarem ativas e desempenharem suas atividades enzimáticas (Sedeek *et al.*, 2013).

Alguns estudos demonstraram que, no tecido renal, a Nox 4 é a principal isoforma envolvida com patologias, porém, há participação da Nox 2 (Sedeek *et al.*, 2010; Sedeek *et al.*, 2013). A Ang II em concentrações elevadas, ao interagir principalmente com o receptor AT1 induz aumento na expressão de Nox2 e Nox4 e consequentemente, aumento da reabsorção de Na^+ tubular, redução dos níveis de óxido nítrico intrarrenal, aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios o que pode resultar em injúria de mesângio, podócitos e túbulos (Datla e Griendling, 2010). No entanto, os fatores e mecanismos envolvidos com a sinalização celular associada a tais irregularidades renais são pouco conhecidos.

1.6 Trocador Sódio/Hidrogênio - Na^+/H^+ (NHE)

Em mamíferos, a família de trocadores Na^+/H^+ consiste de 10 membros (NHE₁₋₁₀) (Lee *et al.*, 2008). A isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE1) é a principal responsável pela regulação do pH intracelular (pH_i). Essa isoforma corresponde a uma glicoproteína de 110

kDa (Coimbra *et al.*, 2000), cujo domínio N-terminal (denominado unidade de transporte) é altamente sensível ao amiloride e cujo domínio C-terminal (ou citoplasmático regulatório) apresenta grande sensibilidade à vários sinais extracelulares, como: fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas (Dunn *et al.*, 2007). Além da regulação do pH_i tem sido demonstrado que o NHE1 participa do arranjo do citoesqueleto (Dworkin *et al.*, 1983) e do controle do volume celular (Cala e Maldonado, 1994).

O NHE1, ao regular o volume e pH_i pode desempenhar um papel protetor importante, já que as células em apoptose apresentam como principais características a acidificação do citoplasma, necessária para a ativação de proteínas pró apoptóticas como a caspase 3, e a redução do volume celular (Matsuyama *et al.*, 2000).

Alguns estudos demonstram que frente a uma acidificação do meio intracelular a via de sinalização MAPK/MEK/ERK 1/2 é ativada e fosforila a porção citoplasmática regulatória do NHE1 aumentando sua atividade para a correção do pH_i para garantir a sobrevivência celular. (Haworth *et al.*, 2003; Konstantinidis *et al.*, 2006).

Enquanto a via da ERK regula a atividade NHE1 para manter o pH_i dentro de valores fisiológicos, determinados estímulos apoptóticos como, por exemplo, a retirada de fatores tróficos pode diminuir a atividade da via da ERK 1/2 e induzir ativação da p38 MAPK. Esta por sua vez, fosforila a porção citoplasmática regulatória do NHE1 aumentando sua atividade, o que leva a alcalinização celular acima dos níveis fisiológicos. Essa condição favorece a ativação da proteína Bax (Khaled *et al.*, 2001).

A Bax é uma proteína intracelular pertencente à família da Bcl-2. Em pH_i fisiológico a Bax é antagonizada pela Bcl-2, permanecendo inativa no citosol. Entretanto, durante a acidificação ou alcalinização intracelular ocorre redução da atividade da Bcl-2, resultando em mudanças conformacionais da Bax e sua translocação para a membrana da mitocôndria iniciando, assim, o processo apoptótico (Antonsson *et al.*, 1997; Khaled *et al.*, 1999).

A diferença nos sítios de fosforilação na porção C-terminal, que são alvos da via ERK 1/2 e da p38 MAPK, pode ser uma possível explicação para os comportamentos distintos do NHE1 frente à ação dessas duas vias de sinalização celular nos sinais apoptóticos (Khaled *et al.*, 2001). Enquanto a via da ERK, através de seu substrato p90^{RSK}, fosforila a porção C-terminal na Serina 703 (Takahashi *et al.*, 1999), a via da p38 MAPK fosforila os aminoácidos Serina 726 e Serina 729 (Grenier *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que em ratos, a infusão de Ang II em doses elevadas por 42 dias, promoveu injúria glomerular e a presença de podócitos na urina (CASARE et al., 2016). Estes dados indicam que o tratamento com Ang II induz lesões na barreira de ultrafiltração glomerular que podem levar ao comprometimento da função renal, desta forma é pertinente estudar os efeitos deste peptídeo nos mecanismos intracelulares associados a apoptose.

Sabe-se que os podócitos expressam NHE1 (KAWADA et al., 2002), e na presença de elevadas concentrações de Ang II há um aumento na atividade deste trocador, uma consequente alcalinização intracelular e apoptose (LIU et al., 2013). Entretanto, as vias de sinalização intracelular envolvidas com tais respostas ainda não foram apresentadas na literatura. Assim a nossa hipótese é que, em podócitos, a atividade do NHE1, em situação fisiológica, contribui para a sobrevivência, protegendo contra acidificação e alterações do volume celular. Na presença de Ang II, atuando via receptor AT1 a via de sinalização intracelular da p38 MAPK estaria envolvida com uma maior ativação deste trocador, resultando em alcalinização intracelular e consequentemente, apoptose alcalina.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar, em podócitos, o papel da angiotensina II, via receptores do tipo AT1, na indução de apoptose. Além disso, investigamos os eventos intracelulares associados à atividade do NHE1 nesta condição.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) e a isenção está registrada sob o número 673/14.

4.1 Cultura de Podócitos

Os podócitos de camundongos (provenientes do Laboratório do Prof. Dr. Karlhans Endlich, University of Heidelberg, Alemanha e cedidos pelo Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) constituem uma linhagem celular imortalizada estabelecida a partir do camundongo *Immortomouse*, que contém uma variante termossensível (ts58A) do antígeno SV40. A expressão desse antígeno T pode ser estimulada por interferon gama - IFN- γ (Sakai e Kriz, 1987; Schiwek *et al.*, 2004).

Para a proliferação celular os podócitos foram cultivados em recipientes de plástico para cultura de 25 cm² e de 75 cm² da marca BD Biocoat comercializadas com colágeno tipo I, e mantidos em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) da Gibco, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 IU/mL penicillina, 100 μ g/mL streptomicona e 2 mmol/L L-glutamine, pH 7.1. Durante a proliferação celular o meio é suplementado com 30 U/ml de IFN- γ (Cell Sciences). Nesta fase as células são mantidas a 33 °C e 5% de CO₂. Para remover os podócitos da parede do recipiente de cultura se utiliza tripsina-EDTA (Gibco, 0.05%).

Para a diferenciação celular, os podócitos cultivados em meio contendo 30 U/mL de IFN- γ e em uma confluência de cerca de 90%, foram trispsinizados e subcultivados, em recipientes de plástico próprios para cultura, contendo 5 μ g/cm² de colágeno do tipo I. As células foram então mantidas em meio de cultura RPMI sem IFN- γ e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 IU/mL penicillina, 100 μ g/mL streptomicona e 2 mmol/L L-glutamine pH 7.1. Nesta situação os podócitos foram mantidos a 37 °C e 5% de CO₂, durante 10 dias, e então foram utilizados para os experimentos.

4.2 Grupos Experimentais

1. Controle
2. Tratado com Ang II (1 μ M) por 4 horas
3. Tratado com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M) por 24 horas.
4. Tratado com Ang II (1 μ M) + losartan por 24 horas.
5. Tratados com Cariporide (10 μ M, inibidor de NHE1) por 24 horas.
6. Tratados com Cariporide + Ang II (1 μ M)
7. Tratados com SB 303580 (100 nM) por 24 horas.
8. Tratados com SB + Ang II (1 μ M)

Todos os grupos são comparados aos respectivos controles.

4.2.1 *Tratamento das culturas celulares com Ang II e/ou Losartan*

No presente estudo, os podócitos em cultura foram tratados com Ang II nas concentrações de 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M, ou Ang II na concentração de 1 μ M e/ou losartan, antagonista do receptor AT1, na concentração de 1 μ M por 24 horas. Nessas condições foi avaliado o efeito da Ang II na apoptose de podócitos diferenciados, o que permitiu a escolha da concentração para o tratamento com Ang II nas etapas seguintes. Para a avaliação de alguns parâmetros foi feito, também, o tratamento com Ang II por 4 horas.

4.2.2 *Tratamento das culturas celulares com Cariporide e/ou Ang II*

Os podócitos foram tratados com Cariporide (10 μ M, inibidor específico de NHE1) e/ou Ang II (1 μ M) por 24 horas. Em seguida, se avaliou a apoptose e a atividade de NHE1 nessas células.

4.2.3 *Tratamento das culturas celulares com SB 303580 e/ou Ang II*

Os podócitos foram tratados com SB 303580 inibidor da via p38 MAPK (100 nM), e/ou Ang II 1 μ M por 24 horas. Em seguida, se avaliou a atividade de NHE1 e posteriormente foram realizados ensaios apoptóticos nessa mesma condição.

4.3 Ensaios de apoptose

4.3.1 *ELISA*

As células foram cultivadas em placas de 6 poços e após a diferenciação e confluência parcial (70%) foram tratadas com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M). Após o tratamento, foram adicionados 200 μ L de tampão de lise em cada poço e as placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida o lisado celular passou por leve centrifugação (200 g) durante 10 minutos e em seguida 20 μ L do sobrenadante foram transferidos para as placas do Kit Cell Death Detection ELISA Plus (Roche) contendo streptavidina, e foi realizado o acréscimo do imunoreagente que acompanha o Kit. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas a 300 rpm por 2 horas em temperatura ambiente, após esse período, as amostras foram lavadas 3 vezes com tampão de incubação e ao final, foram incubadas com 100 μ L de solução ABST (acompanha o Kit), e agitadas a 250 rpm por cerca de 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de ABST (stop solution) para interromper a reação, e então a leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro.

4.3.2 Citometria de Fluxo

Para verificar a apoptose por citometria de fluxo as células foram cultivadas em placas de 6 poços e após a diferenciação e confluência parcial (70%) foram tratadas conforme os grupos descritos acima e, então, marcadas com Anexina V e Iodeto de propídio (PI).

A Anexina V se liga a fosfatidilserina (PS), que é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. O Iodeto de Propídio (PI) é utilizado para distinguir as células em apoptose recente das que estão em apoptose tardia. A célula em apoptose tardia torna-se mais permeável, desta forma, o PI, que é um marcador de DNA de elevado peso molecular, se intercala no DNA.

Após o período de tratamento as células foram tripsinizadas (500 μ L de tripsina) e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida a tripsina foi adicionada à 3 mL do buffer BioLegend Cell Staining (BioLegend) para inativar a tripsina, esta mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o pellet foi ressuspensionado em 3 mL do buffer BioLegend Cell Staining e foi feita uma nova centrifugação de 2500 rpm por 5 minutos. Após a segunda centrifugação as células foram ressuspensionadas em Anexina V Binding Buffer (BioLegend), sendo que a concentração final foi de 1×10^6 células/mL, e então 100 μ L desta suspensão foi transferido para o tubo de citometria. No escuro, foram adicionados 1 μ L de FITC anexina V e 0,3 μ L de PI 5 μ g/mL, e então, os tubos foram agitados no vórtex e

incubados no escuro, em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 400 μL de Anexina V Binding Buffer em cada tubo e as amostras foram filtradas. Por fim, as amostras foram analisadas no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences), em que foram contados 10.000 eventos (cada evento corresponde a uma célula detectada).

4.4 Avaliação do pH intracelular (pHi) por microscopia de fluorescência

A atividade do trocador Na^+/H^+ foi monitorada por microscopia de fluorescência, utilizando a sonda intracelular fluorescente BCECF/AM (2', 7'- biscoxietil - 5,6 - carboxifluoresceína – *Molecular Probes*), sensível a concentração de H^+ . Para a leitura da fluorescência, emitida pela amostra tratada com BCECF, foi utilizado o modelo operacional do microscópio de fluorescência (108 da Nikon-draphot TMD) (**Figura 2**). A luz proveniente de duas lâmpadas de xenônio excita a amostra nos comprimentos de onda de 440 nm e 495 nm. A amostra por sua vez, emite uma fluorescência acima de 510 nm a qual é transferida para um fotomultiplicador, que gera uma corrente proporcional à potência da luz. Essa corrente é então amplificada e convertida em um sinal digital, adquirido pelo computador. A relação da excitação 495/440 nm traduz a intensidade de fluorescência (IF), correspondendo a um pH_i específico. Esta razão corrige as variações nas intensidades de fluorescência, induzidas pela perda do fluorescente.

Figura 2- Esquema do microscópio de fluorescência utilizado nos estudos de pHi. Modificado de Boron and Boyarsky, 1988.

Em nossos experimentos, as monocamadas de podócitos cultivadas sobre lamínulas de vidro (controle ou tratadas) foram inseridas na câmara termo-reguladora, instalada sobre a platina do microscópio de fluorescência, e então foram expostas a uma solução controle contendo Na^+ [(em mM) (NaCl-145, KCl-5, MgCl_2 -1, NaH_2PO_4 -1, Na_2HPO_4 -0.83, CaCl_2 -1.8, Hepes-20, Glicose-5, pH 7.4, 290 mOsm)] e 2 μM de BCECF-AM, por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, a lamínula contendo a monocamada celular foi lavada com a solução controle para remover o excesso de BCECF e em seguida, as células foram incubadas com a mesma solução a 37 °C. Nessa condição foi avaliada a fluorescência basal.

Posteriormente, utilizando um sistema de cânulas controlado por bomba de vácuo, a solução controle foi substituída pela solução contendo cloreto de amônio (NH_4Cl) [(em mM) NaCl-125, KCl-5, MgCl_2 -1, NaH_2PO_4 -1, Na_2HPO_4 -0.83, CaCl_2 -1, Hepes-20, Glicose-5, NH_4Cl -20, pH 8,0 (valor próximo do pK de $\text{NH}_4 = 9,2$) e 290 mOsm] e a fluorescência celular foi avaliada por 2 minutos. Nesse período, foi observada uma alcalinização transitória do pH_i devido a entrada de NH_3 (amônia) na célula, que ao reagir com o H^+ intracelular, formou o NH_4^+ (íon amônio). Após esse período, a solução contendo NH_4Cl foi substituída pela solução controle contendo Na^+ e nessa condição ocorreu uma acentuada acidificação intracelular, devido à dissociação do NH_4^+ intracelular em NH_3 e H^+ .

Após o pulso ácido descrito acima, a imediata recuperação do pH intracelular ocorreu pela extrusão celular do íon H^+ , que foi observado por cerca de 15 minutos após o pulso ácido. Para o cálculo das medidas de pH_i foi utilizada uma curva de calibração do pH_i obtida pelo uso de nigericina [(em mM) NaCl-20, KCl -130, MgCl_2 -1, CaCl_2 -1, Hepes-5 e 290 mOsm]. Na presença da nigericina, o pH_i foi levado a um valor igual ao do pH_e (pH extracelular), pois esta substância (antibiótico derivado da *Streptomyces hygroscopicus*) aumenta a permeabilidade da membrana celular aos íons H^+ e K^+ . A partir da solução contendo nigericina foram preparadas 4 amostras com diferentes pHs (7,5, 7,0, 6,5 e 6,0), as quais foram utilizadas para construir cada curva de calibração (curva padrão), que foi obtida pela relação dos diferentes pH_e utilizados, indicados no eixo x, com os respectivos valores da IF encontrados e indicados no eixo y. A curva de calibração foi utilizada para converter os valores de intensidade de fluorescência (IF) encontrados no experimento, para valores de pH_i .

O cálculo da velocidade de extrusão celular de H^+ , após o pulso ácido, foi realizado por regressão linear dos valores de pH_i encontrados nos dois primeiros minutos, pelo método dos quadrados mínimos. A velocidade de extrusão celular de H^+ foi expressa pelo valor do coeficiente angular da reta de regressão (dpH_i/dt). Ou seja: $y = a + bx$, sendo $b = dpH_i/dt$.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.5.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído em mini-colunas do kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. As células foram removidas da placa de cultura com o reagente de lise RA1 que compõe o kit da GE Healthcare. Em seguida, foi adicionado ao homogenato 350 μ L de etanol 70% para que ocorresse a ligação do RNA a coluna de separação do kit.

4.5.2 Síntese do cDNA a partir do RNAm

Para a síntese de cDNA à partir do RNAm (RT-PCR) extraído foi utilizado o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 500 ng de RNA. As sondas utilizadas foram:

- *AT1R sense*: CCATTGTCCACCCGATGAAG;
- *AT1R antisense*: CAGTCCTATGGGGAGCGTTG
- *AT2R sense*: GGCACTTCCTTTTGCCATCC;
- *AT2R antisense*: TCCTGTTCTCGGGGGAGTAA
- *GAPDH sense*: GGGGGCTCTCTGCTCCTCCC;
- *GAPDH antisense*: GCCCCACCCTTCAGGTGAGC

4.5.3 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase

O cDNA (100 ng) obtido no RT-PCR foi utilizado para análise de expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a amplificação do cDNA foi utilizado o kit *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). As amostras de cDNA foram adicionadas ao mix contendo reagentes do kit, primer sense e antisense (para AT1, AT2 e

GAPDH). Em seguida as amostras foram colocadas no termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

4.5.4 Eletroforese

Para visualização das bandas de cDNA e confirmação da expressão dos genes de interesse, após a amplificação do cDNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 10% contendo Brometo de Etídio, e a corrida foi realizada em tampão Tris-acetato-EDTA 1x (TAE 1x). Em cada amostra foram adicionados 5 µl de blue juice, um corante que permite a visualização da corrida no gel. Em cada poço do gel foram adicionados 20 µl de cDNA amplificado e, em um poço, 5 µl do marcador *1kB Plus DNA Ladder* (Invitrogen) para determinação do tamanho das bandas das amostras. A corrida das amostras no gel foi efetuada a 100 V, sendo interrompida quando a linha do corante blue juice atinge a extremidade inferior do gel. A fotografia do gel foi feita no fotodocumentador *Eagle Eye II* (Stratagene).

4.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Os procedimentos para extração de RNA e síntese de cDNA a partir do RNAm são iguais aos descritos no tópico anterior.

4.6.1 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real

O cDNA (20 ng) obtido no RT-PCR foi utilizado na análise de expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Na obtenção das sondas, foram selecionadas aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir ainda mais o impacto de contaminação por DNA genômico. Sendo assim, foram sempre escolhidas as sondas "*Best Coverage*". As sondas utilizadas foram:

Bax: Mm00432051_m1; *Bcl-2*: Mm00477631_m1; *Nox4*: Mm00479246_m1; *P22* (*phox*): Mm00514478_m1; *TNF-α*: Mm00443258_m1; *Interleucina 6*: Mm 00446190_m1; *GAPDH* (*gene endógeno*): nMm99999915_m1

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados pelo software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems), seguidos pela análise estatística no software GraphPad Prism (San Diego, EUA).

A semelhança das eficiências de amplificação das sondas (próximo a 100%) permitiu a utilização do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o cálculo das diferenças de expressão entre os

genes alvo e endógeno. Assim, os resultados foram apresentados na forma de *fold change*, ou seja, aumento ou diminuição da expressão em relação ao grupo controle.

Para analisar a expressão de Bax e Bcl-2 foi feita a razão entre os valores finais de *fold change* dos dois genes.

4.7 Análise da expressão proteica por Western Blot

4.7.1 Preparação de membranas

As células controle ou tratadas foram cultivadas em placas de Petri e, após total confluência, o meio de cultura de cada placa foi substituído por 1 ml de PBS 1X. Em seguida, as células foram removidas por raspagem e a suspensão celular foi então, submetida à centrifugação (3000 g) por 1 minuto. O “pellet” de cada amostra foi ressuspendido em 100 µl de [solução Fosfato de Sódio (5 mM, pH 8.0) mais cocktail de inibidores de proteases (Sigma Aldrich) e 100 µl de tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 1.96% e azul de bromofenol 0.05%)] e incubado a 100°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas, juntamente com um padrão de massa molecular específico (Bio-Rad), no gel de poliacrilamida (8.5% a 10 %, com espessura de 1.5 mm), que foi submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e pH 7.3). A corrida das amostras no gel foi efetuada a 150 mA, e interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel

4.7.2 Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). A membrana foi previamente tratada com tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), por cerca de 20 minutos. Para a transferência, foi utilizado um sistema “tipo sanduíche”, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 100 mV, durante 1 hora. Após esse período, a membrana foi transferida para uma solução de bloqueio (NaCl 150 mM, Fosfato de Sódio Monobásico (2.8 mM), Fosfato de Sódio Dibásico (7.2 mM), leite em pó desnatado (5%), Tween 20 (0.1 %, da Sigma) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário específico, previamente diluído em solução

de bloqueio (1:1000 v/v), por 12 horas a 4 °C, com leve agitação. Para remover o excesso do anticorpo, foram realizadas 5 lavagens com TBS 1x com tween 0,1% (cada uma por 5 minutos). Em seguida, a membrana foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário conjugado, em solução de bloqueio (1:2000 v/v) e novamente lavada como acima descrito. Após essas etapas, a membrana foi exposta ao reagente para imunodeteção através de luminescência ECL (Amersham), por 1 minuto. Subsequentemente, foi exposta ao filme HyperfilmTM MP (Amersham), por 30 segundos ou mais, a temperatura ambiente.

Proteínas que foram analisadas por *Western blot*, com os anticorpos específicos: anti-NHE1 (Abcam), anti-podocina (Sigma), e actina (Abcam).

4.8 Imunofluorescência

Para verificar a morfologia celular dos podócitos e caracterizar células diferenciadas e não diferenciadas, foi feita a marcação do citoesqueleto de actina com Faloidina (Life Technologies) e do núcleo celular com DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (Life Technologies). As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e após a diferenciação o meio de cultura foi removido e as lamínulas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com 500 µl de PBS 1x à 37 °C. Em seguida os podócitos foram incubados com Paraformaldeído 4% por 8 minutos em temperatura ambiente para fixação das células, e as lavagens se repetiram com PBS 1x gelado. Para permeabilização as células foram expostas a solução de 0,25% de Triton por 20 minutos, e novamente foram feitas 3 lavagens com PBS 1x em temperatura ambiente. O bloqueio da reação foi feito com 100 µl de albumina 10% em cada lamínula, por 1 hora, em temperatura ambiente e em câmara úmida, e repetiram-se as lavagens com PBS 1x em temperatura ambiente. Por fim as lamínulas foram incubadas por 30 minutos, também em câmara úmida, em 70 µl de Faloidina para marcação do citoesqueleto (1:250 v/v). Após as lavagens as lamínulas foram transferidas para gotas da solução de DAPI para marcação do núcleo celular, as análises foram realizadas em microscópio de fluorescência.

4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo método one-way ANOVA e o pós teste de Bonferroni, foi utilizado também o teste t para a expressão de RNAm; $p < 0.05$ foi considerado significativo. Os resultados foram apresentados como um valor médio $\pm$ erro padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Marcação do citoesqueleto e expressão de podocina

A linhagem celular utilizada está no estado não diferenciado quando em fase de proliferação, na temperatura de 33 °C e suplementação com INF- γ ou diferenciado após cultivo em temperatura de 37 °C e sem INF- γ por cerca de dez dias. Morfologicamente estes dois estágios celulares são distintos (SCHIWEK et al., 2004), e devido a marcação do citoesqueleto com Faloidina e do núcleo celular com DAPI foi possível verificar tais diferenças. Conforme apresentado na **figura 3**, as células não diferenciadas (**A**) são menores e mais alongadas quando comparadas com as diferenciadas (**B**) que são maiores e com formato irregular.

A podocina é uma proteína exclusiva de podócitos diferenciados (Boute *et al.*, 2000). De fato, a expressão de podocina foi confirmada em nosso modelo celular (**figura 3 C**).

Para todos os experimentos foram utilizadas células diferenciadas.

Figura 3- (A) Podócitos não diferenciados e (B) diferenciados marcados com Faloidina e DAPI em aumento de 400x. (C) Expressão de podocina em podócitos diferenciado

5.2 Expressão dos receptores AT1 e AT2

Para confirmar a viabilidade dos podócitos responderem ao tratamento com Ang II, investigamos a expressão dos receptores para Ang II nessas células. Conforme apresentado na **figura 4**, a expressão para os receptores AT1 e AT2 foi confirmada por PCR (**A**) e *Western Blot* (**B**), em podócitos diferenciados.

Figura 4- (A) Expressão de RNAm para AT1 (200 pb), AT2 (340 pb) e GAPDH (416 pb). (B) Expressão proteica para AT1, AT2 e Actina.

5.3 Angiotensina II e o estresse oxidativo

Considerando que em nosso protocolo o tempo de tratamento é de 24 horas e que, no entanto, a geração de espécies reativas de oxigênio antecede o processo de apoptose (Zhang *et al.*, 2007), investigamos a expressão de RNAm da isoforma 4 e subunidade 22 da NADPH oxidase (Nox 4 e p22 *phox*) nas condições em que as células foram tratadas com Ang II 1 μ M por 4 horas. Nossos resultados indicam que nesse período ocorreu aumento significativo da expressão de RNAm para a Nox 4 e p22 *phox* no grupo tratado com Ang II (**figura 5 e tabelas 1 e 2**).

Figura 5- (A) Expressão de RNAm para p22 no tratamento com Ang II 1 μM por 4 horas. Os valores são média $\pm$ erro padrão, controle (n=5) e Ang II 1 μM (n=3) *** p<0,001 vs. controle. (B) Expressão de RNAm para Nox 4 com Ang II 1 μM por 4 horas. Os valores são média $\pm$ erro padrão, controle (n=5) e Ang II 1 μM (n=3) *** p<0,001 vs. controle.

Tabela 1- Efeito da Ang II (1 μM) por 4 horas na expressão de RNAm para p22 *phox*.

	Controle	Ang II 1 μM
Diferença de Expressão	1,00 $\pm$ 0,04	2,06 $\pm$ 0,10***
de RNAm (fold change)	(5)	(3)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, *** p< 0.001 vs. controle.

Tabela 2- Efeito da Ang II (1 μM) por 4 horas na expressão de RNAm para Nox 4.

	Controle	Ang II 1 μM
Diferença de Expressão	1,00 $\pm$ 0,03	1,71 $\pm$ 0,04***
de RNAm (fold change)	(5)	(3)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, *** p< 0.001 vs. controle.

5.4 Sinalização para apoptose

Com a finalidade de determinar a via de sinalização celular envolvida na indução de apoptose associada ao estresse oxidativo, avaliamos a expressão de RNAm para as proteínas apoptóticas Bax e Bcl2. O tratamento com Ang II por 4 horas induziu aumento significativo na expressão de Bcl2 (**figura 6 A e tabela 3**) e potencializou a expressão de RNAm para Bax (**figura 6 B e tabela 3**). Assim, a razão entre Bax e Bcl 2 foi significativamente aumentada no

grupo tratado com Ang II em comparação ao grupo controle (**figura 6 C e tabela 4**), sugerindo que nesse período já havia evolução no processo apoptótico.

Figura 6- (A) Expressão de RNAm para Bcl-2 no tratamento com Ang II 1 µM por 4 horas. Os valores são média $\pm$ erro padrão, $n=5$ *** $p<0,001$ vs. Controle; (B) Expressão de RNAm para Bax no tratamento com Ang II 1 µM por 4 horas. Os valores são média $\pm$ erro padrão, $n=5$ *** $p<0,001$ vs. Controle; (C) Razão Bax/Bcl-2 na expressão de RNAm no tratamento com Ang II 1 µM por 4 horas. Os valores são média $\pm$ erro padrão, $n=5$ ** $p<0,01$ vs. Controle.

Tabela 3- Efeito da Ang II (1 µM) por 4 horas na expressão de RNAm para Bcl-2 e Bax.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II Bcl-2</i>	<i>Ang II Bax</i>
Diferença de Expressão	1,001 $\pm$ 0,03	1,743 $\pm$ 0,03 ***	2,265 $\pm$ 0,08 *** +++
de RNAm (<i>fold change</i>)	(5)	(4)	(5)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, *** $p<0.001$ vs. Controle; +++ $p<0.01$ vs. Ang II Bcl-2.

Tabela 4- Efeito da Ang II (1 μ M) por 4 horas na razão de RNAm Bax/Bcl-2.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1 μM</i>
Diferença de Expressão	1,004 $\pm$ 0,04	1,261 $\pm$ 0,03 ^{**}
de RNAm (<i>fold change</i>)	(5)	(5)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, ^{**} p< 0.01 vs. Controle

5.5 Ensaios de apoptose: ELISA

Inicialmente foram realizados ensaios pelo método de ELISA para investigar se outras concentrações de Ang II poderiam induzir o processo apoptótico. Além disso, se investigou a contribuição do receptor AT1 nesse processo. Para tal, as células foram tratadas com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M) por 24 horas. Destes, somente o tratamento com Ang II (1 μ M) induziu significativa apoptose em comparação ao controle (**figura 7 e tabela 5**) e o losartan mantém esse parâmetro próximos ao valor controle (**figura 8 e tabela 6**).

Figura 7- Efeito do tratamento com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M) por 24 horas na apoptose de podócitos. Os valores são média $\pm$ erro padrão; n = 4 – 5 por grupo. ^{***} p<0.001 vs. Controle.

Tabela 5- Apoptose de podócitos tratados com Ang II (1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M) por 24 horas.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1nM</i>	<i>Ang II 10 nM</i>	<i>Ang II 100 nM</i>	<i>Ang II 1μM</i>
Apoptose	100 $\pm$ 6,03	76,43 $\pm$ 9,05	76,55 $\pm$ 2,87	118,4 $\pm$ 13,59	193,8 $\pm$ 12,14 ^{***}
24 horas	(4)	(5)	(4)	(6)	(4)
(% do controle)					

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão. O número de experimentos está representado entre parênteses, ^{***} p<0.001 vs. controle.

Figura 8- Ang II e/ou losartan (los) na ocorrência de apoptose. Os valores são média $\pm$ erro padrão, n = 4- 7 por grupo (experimentos em duplicata). * p<0,05 vs. controle e + p<0,05 vs. Ang II 1 μ M.**Tabela 6-** Efeito da Ang II (1 μ M) e/ou losartan (1 μ M) por 24 horas na apoptose de podócitos.

	<i>Controle</i>	<i>los 1μM</i>	<i>Ang II 1μM</i>	<i>Ang II + los</i>
Apoptose	98,67 $\pm$ 4,16 (6)	76,29 $\pm$ 14,49 (5)	153 $\pm$ 16,57* (7)	97,16 $\pm$ 3,74 ⁺ (4)
24 h				

Os valores são expressos em unidades arbitrárias e apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, * p<0.05 vs. controle; + p<0.05 vs. Ang II.

Para dar continuidade ao estudo passamos a utilizar Ang II na concentração de 1 μ M por 24 horas, porém, para confirmar o efeito apoptótico, passamos a utilizar o método de citometria de fluxo, que permite verificar a porcentagem de células viáveis e aquelas afetadas pelos tratamentos e, portanto, configura uma metodologia mais precisa para avaliação da apoptose.

5.6 Apoptose por citometria de fluxo

Na análise por citometria de fluxo cada célula detectada pelo aparelho é um evento, e cada evento é plotado em um gráfico, como os representados na **figura 9 A e B**. No gráfico, as células estão distribuídas das seguintes maneiras: As que estão no quadrante superior esquerdo são as marcadas apenas com anexina V e, portanto, em apoptose recente; as que se encontram no quadrante superior direito são as marcadas com anexina V e iodeto de propídio (IP), portanto, em apoptose tardia; no quadrante inferior esquerdo estão as células viáveis, ou seja, sem nenhuma marcação e, por fim, as células que estão presentes no quadrante inferior direito são as marcadas apenas com IP.

O efeito estimulador da Ang II na concentração de 1 μ M sobre a apoptose foi confirmado pela citometria de fluxo (**figura 9 A, B e C e tabela 7**). As **figuras 9 A e B** mostram a distribuição das células marcadas com anexina V e Iodeto de propídio em células controle e tratadas com Ang II, respectivamente. É possível observar um aumento na porcentagem de células em apoptose tardia (quadrante superior direito) no grupo tratado com Ang II em relação ao controle, observado também na **figura 9 C e tabela 7**. Porém, apesar de um aumento na porcentagem de células em apoptose recente (quadrante superior esquerdo) no grupo tratado, não há alteração significativa neste parâmetro. Este padrão se repete em todos os grupos de tratamento, por este motivo apenas a apoptose tardia foi considerada nos grupos estudados.

Figura 9- (A) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células controle (B). Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células tratadas com Ang II 1µM (C). Efeito da Ang II na ocorrência de apoptose. Os valores são média $\pm$ erro padrão, controle (n=5) e Ang II 1µM (n=6). ** $p < 0,01$ vs. controle.

Tabela 7- Efeito da Ang II (1 µM) por 24 horas na apoptose de podócitos.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1 µM</i>
Apoptose tardia (%)	4,99 $\pm$ 0,28	6,47 $\pm$ 0,29**
	(5)	(6)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, ** $p < 0.01$ vs. Controle.

5.7 Regulação do pH intracelular (pHi) dependente de NHE1

A linhagem de podócitos utilizada no estudo atual expressa o NHE1, proteína essencial na regulação do pHi em condições de acidificação do citoplasma como ocorre durante o processo apoptótico (Matsuyama *et al.*, 2000). Inicialmente, monitoramos a velocidade de extrusão celular de H^+ sensível ao íon sódio (Na^+) e cariporide (inibidor específico de NHE1), e em seguida avaliamos o efeito da Ang II e/ou cariporide na atividade e expressão de NHE1.

Nossos resultados apresentados na **tabela 8** indicam os valores de pH_i nas diferentes manobras experimentais do grupo controle. Após o pulso ácido com cloreto de amônio (NH_4Cl), onde o Na^+ da solução foi substituído por N-Metil-D-glucamina (NMDG), não ocorreu recuperação do pH_i (**figura 10 B**), quando comparado à condição controle (**figura 10 A**). No entanto, a recuperação do pH_i foi reestabelecida após a reposição do Na^+ extracelular. Os valores médios da velocidade de extrusão celular de H^+ (dpH_i/dt) nessas condições são expressos na **figura 10 C e tabela 9**, onde se observa também que na vigência de cariporide a recuperação do pH_i foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle.

Figura 10- (A) Curva de recuperação do pH_i em células controle. (B) Curva de recuperação do pH_i na ausência de sódio (NMDG) e posteriormente com adição de sódio. (C) Efeito do NMDG ou cariporide (10 μM) na velocidade de extrusão de H^+ de podócitos. Os valores são média $\pm$ erro padrão e $n = 8-11$ por grupo. *** $p < 0.001$ vs. controle, +++ $p < 0.001$ vs. NMDG.

Tabela 8- Valores de pH_i dos grupos controles

	<i>pHi Basal</i>	<i>NH4Cl</i>	<i>Acidificação</i>	<i>Recuperação</i>
Valores de pH_i	7.18 ± 0.01 (47)	7.69 ± 0.03 (47)	6.53 ± 0.04 (47)	7.11 ± 0.02 (47)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão. O número de experimentos está representado entre parênteses.

Tabela 9- Efeito do NMDG e/ou cariporide (10 μ M) por 24 horas na extrusão celular de H^+ .

	<i>Controle</i>	<i>NMDG</i>	<i>Add Na⁺</i>	<i>Carip (10μM)</i>
Extrusão	0,185 $\pm$ 0,017	0,045 $\pm$ 0,006 ^{***}	0,179 $\pm$ 0,025 ⁺⁺⁺	0,070 $\pm$ 0,007 ^{***}
celular de H⁺	(11)	(11)	(11)	(8)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, ^{***} p< 0.001 vs. controle; ⁺⁺⁺ p<0.001 vs. NMDG.

Para verificar a ação da Ang II na atividade de NHE1 realizamos medidas de pHi em células tratadas com este peptídeo, na **figura 11 A e tabela 10** nota-se que a Ang II aumentou a velocidade de extrusão celular de H^+ . Para confirmar se este efeito observado da Ang II se deve a atividade do NHE1 foram realizadas medidas de pHi com cariporide e Ang II. O tratamento com Ang II (1 μ M) induziu aumento significativo na velocidade de extrusão celular de H^+ em comparação ao grupo controle e este efeito foi abolido pelo cariporide (**figura 11 A e tabela 10**). Nenhum tratamento modificou a expressão proteica de NHE1 (**figura 11 B e C e tabela 11**).

A

B

C

Figura 11- (A) Efeito da Ang II (1 μM) e/ou cariporide (10 μM) na velocidade de extrusão de H⁺ em podócitos. Os valores são média ± erro padrão e n = 6-10 por grupo. *** p<0.05 vs. controle. (B e C) Efeito da Ang II (1 μM) e/ou cariporide na expressão de NHE1. Os valores são média ± erro padrão e n = 10-11 por grupo. *** p<0.001 vs. Controle. M: Marcador

Tabela 10- Efeito da Ang II (1 μM) e/ou cariporide (10 μM) por 24 horas na extrusão celular de H⁺.

	Controle	Ang II 1 μM	Carip (10 μM)	AngII/Carip
Extrusão celular de H⁺	0,185 ± 0,017 (11)	0,361 ± 0,027*** (11)	0,070 ± 0,007*** (8)	0,071 ± 0,006*** (10)

Os valores são apresentados como média ± erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, ***p< 0.001 vs. Ang II.

Tabela 11- Expressão proteica de NHE1

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1 μM</i>	<i>Carip (10μM)</i>	<i>AngII/Carip</i>
Expressão proteica de NHE1	97,62 $\pm$ 2,38 (2)	79,40 $\pm$ 11,05 (3)	84,42 $\pm$ 18,63 (3)	83,41 $\pm$ 17,77 (3)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses.

Diante destes resultados obtidos passamos investigar a contribuição do NHE1 no processo de apoptose induzido por Ang II. O tratamento com Ang II aumentou a porcentagem de células em apoptose tardia em relação ao controle, e no tratamento com cariporide este aumento foi potencializado (**figura 12 A-C e E e tabela 12**).

Figura 12- (A) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células controle. (B) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células tratadas com Ang II (1 μ M). (C) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células tratadas com cariporide (10 μ M). (D) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células tratadas com Ang II/Carip. (E) Efeito da Ang II (1 μ M) e/ou cariporide (10 μ M) na ocorrência de apoptose. Os valores são média $\pm$ erro padrão, n= 5-6, *p<0,05 vs. Controle; ***p<0,001 vs. Controle; +++p<0,001 vs. Ang II; \$\$\$p<0,001 vs. Carip.

Tabela 12- Efeito da Ang II (1 μ M) e/ou cariporide (10 μ M) por 24 horas na apoptose de podócitos.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1 μM</i>	<i>Carip. 10μM</i>	<i>AngII/Carip</i>
Apoptose tardia 24 h	4,99 $\pm$ 0,28 (5)	6,47 $\pm$ 0,29* (6)	14,60 $\pm$ 0,26*** (5)	8,87 $\pm$ 0,43+++ \$\$\$ (6)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses *p<0,05 vs. Controle; ***p<0,001 vs. Controle; +++p<0,001 vs. Ang II; \$\$\$p<0,001 vs. Carip.

Com a finalidade de verificar se as ações da Ang II na atividade do NHE1 se dão pela interação com o receptor AT1, foi utilizado o losartan, antagonista do receptor AT1, em experimentos de medidas de pH_i. Na **figura 13 e tabela 13** é possível observar que o tratamento apenas com losartan não alterou a atividade do NHE1, e o tratamento com Ang II e losartan reduz significativamente o efeito da Ang II na dpH_i/dt.

Figura 13- Efeito da Ang II (1 μ M) e/ ou losartan (1 μ M) na velocidade de extrusão de H⁺ em podócitos. Os valores são média $\pm$ erro padrão e n = 6-10 por grupo. *** p<0.001 vs. Controle; *p<0.05 vs. Controle; +p<0.05 vs. Ang II.

Tabela 13- Efeito da Ang II (1 μ M) e/ ou losartan (1 μ M) por 24 horas na extrusão celular de H⁺.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II (1 μM)</i>	<i>Los (1 μM)</i>	<i>Ang II/Los</i>
Extrusão celular de H⁺	0,185 $\pm$ 0,017 (11)	0,361 $\pm$ 0,027*** (11)	0,226 $\pm$ 0,018 (10)	0,270 $\pm$ 0,020*+ (10)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, *** p<0.001 vs. Controle; *p<0.05 vs. Controle; +p<0.001 vs. Ang II.

Para determinar a via de sinalização intracelular que regula a atividade do NHE1 diante do tratamento com Ang II (1 μ M), e considerando a importância da via de sinalização celular associada à ativação da p38 MAPK na indução de apoptose e regulação da atividade de NHE1, passamos a investigar o efeito de Ang II e/ou SB 203580 (inibidor de p38 MAPK) na

apoptose de podócitos e velocidade de extrusão celular de H^+ . Conforme apresentado na **figura 14 (A-D)** e **tabela 14** o SB aboliu o efeito apoptótico induzido por Ang II. Quanto a velocidade de extrusão de H^+ , o SB 203580 não alterou este parâmetro em comparação ao grupo controle, mas aboliu o efeito estimulador da Ang II (**figura 14 D e tabela 15**).

Figura 14- (A) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células controle. (B) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células tratadas com Ang II (1 μM). (C) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas em células tratadas com Ang II/SB. (D) Efeito da Ang II (1 μM) e SB 203580 (100 nM) na ocorrência de apoptose. Os valores são média $\pm$ erro padrão, n= 5-6, *p<0,05 vs. Controle; **p< 0.01 vs. Ang II. (E) Efeito da Ang II (1 μM) e SB 203580 (100 nM) na velocidade de extrusão de H^+ em podócitos. Os valores são média $\pm$ erro padrão, n= 5-6, *** p<0,001 vs. Controle; **p< 0.01 vs. Ang II.

Tabela 14- Efeito da Ang II (1 μM) e SB 203580 (100 nM) por 24 horas na apoptose de podócitos.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1 μM</i>	<i>Ang II/SB</i>
Apoptose	4,99 $\pm$ 0,28	6,47 $\pm$ 0,29*	4,65 $\pm$ 0,30 ⁺⁺
tardia 24 h	(5)	(6)	(6)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, * p< 0.05 vs. Controle; **p< 0.01 vs. Ang II.

Tabela 15- Efeito da Ang II (1 μ M) e/ ou SB 303580 (100 nM) por 24 horas na extrusão celular de H⁺.

	<i>Controle</i>	<i>Ang II (1 μM)</i>	<i>SB (1 μM)</i>	<i>Ang II/SB</i>
Extrusão celular de H⁺	0,185 $\pm$ 0,017 (11)	0,361 $\pm$ 0,027*** (11)	0,157 $\pm$ 0,026 (4)	0,217 $\pm$ 0,042 ⁺⁺ (6)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, *** p< 0.001 vs. Controle; ++ p< 0.01 vs. controle.

A estimulação da p38MAPK pela Ang II pode resultar na ativação do NF κ B (fator nuclear **kappa B**) e este por sua vez pode induzir a síntese de citocinas. Nossos resultados indicam um aumento significativo na expressão de RNAm para ambas TNF α e interleucina 6 no grupo tratado com Ang II quando comparado ao grupo controle (**figura 15 e tabela 16**).

Figura 15- Efeito da Ang II na expressão de RNAm para TNF α (A) e interleucina 6 (B). Os valores são média $\pm$ erro padrão; n = 5 por grupo. * p<0.05 vs. controle.**Tabela 16-** Efeito da Ang II (1 μ M) na expressão de RNAm para TNF α e interleucina 6 (IL6)

	<i>Controle</i>	<i>Ang II 1/TNFα</i>	<i>Ang II 1/IL6</i>
Diferença de Expressão de RNAm	1,69 $\pm$ 0,14 (7)	1.81 $\pm$ 0,25* (6)	1.67 $\pm$ 0,17* (6)

Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão, o número de experimentos está representado entre parênteses, * p< 0.05 vs. Controle

6 DISCUSSÃO

Os podócitos são células epiteliais glomerulares especializadas e envolvidas na organização e função da membrana basal glomerular (MBG), manutenção da forma e integridade dos capilares glomerulares, além de responderem aos diferentes mecanismos de sinalização celular (Leeuwis *et al.*, 2010). Sabe-se que podócitos de camundongos em cultura expressam os componentes do SRA [angiotensinogênio, renina e a enzima conversora de Ang I (ECA1)] (Thorens *et al.*, 1990), além dos receptores AT1 e AT2 para Ang II. No modelo celular do atual estudo a expressão de RNAm e proteínas para AT1 e AT2 foram confirmadas pelas técnicas de PCR e *Western Blot*, respectivamente.

A apoptose de podócitos leva à diminuição do número de células viáveis e a incapacidade de manter a estrutura e função da barreira de ultrafiltração glomerular (Leeuwis *et al.*, 2010). Existem vários fatores associados à injúria glomerular como, por exemplo, os fatores genéticos, Angiotensina II, estresse oxidativo, Endotelina 1 (ET-1), processos inflamatórios e hipertensão glomerular (Cardillo *et al.*, 2002). Em estudo anterior de nosso grupo, se observou que em ratos, o tratamento crônico com Ang II induziu lesão de barreira glomerular com injúria de podócitos, sugerindo um processo de morte celular. De fato, no estudo atual observamos que em cultura de podócitos, o tratamento com Ang II por 4 horas já é suficiente para induzir aumento na expressão de RNAm para subunidades Nox 4 e p22 *phox* da NADPH oxidase.

Sabe-se que em pH fisiológico a Bax é antagonizada pela Bcl-2, permanecendo inativa no citosol. Entretanto, durante a acidificação intracelular induzida por estresse oxidativo ocorre redução da atividade da Bcl-2, resultando em mudanças conformacionais da Bax e sua translocação para a membrana da mitocôndria iniciando, assim, o processo apoptótico (Antonsson *et al.*, 1997; Khaled *et al.*, 1999). Nossos resultados corroboram com esses achados, visto que na mesma condição que observamos alterações na expressão de RNAm para os componentes da NADPH oxidase, observamos também um significativo aumento na expressão de RNAm para Bax (indicador de apoptose), apesar de ainda persistir a expressão de RNAm para Bcl2 (indicador de sobrevivência celular).

No conjunto, os nossos resultados apontam para um efeito positivo da Ang II na indução de espécies reativas de oxigênio e consequentemente no desencadeamento do processo apoptótico em podócitos. Esses resultados estão de acordo com outros achados da

literatura que relatam em diferentes situações, como por exemplo, em animais diabéticos ou tratados com altas concentrações de lipopolissacarídeos ou Ang II, a participação da Nox 2 e Nox4 e p22 *phox* em lesões glomerulares e tubulares renais (Bedard *et al.*, 2007; Datla e Griendling, 2010; Sedeek *et al.*, 2010; Sedeek *et al.*, 2013). No entanto, os fatores e mecanismos envolvidos com a sinalização celular associada a tais irregularidades renais são pouco conhecidos. Além disso, Okamura e colaboradores (Okamura *et al.*, 2013), observaram que a exposição de podócitos a albumina por 24 horas aumentou a taxa de apoptose nestas células, porém, a ativação de proteínas pró-apoptóticas iniciou-se com 2 horas de tratamento sendo que sua atividade máxima ocorreu em 6 horas. Portanto, a ativação da via Bax/Bcl-2 pode seguir um padrão similar ao observado no estudo de Okamura e colaboradores.

Considerando que as observações acima descritas podem anteceder o processo apoptótico com tal, ampliamos o período de tratamento das células para 24 horas no intuito de avaliar os principais mecanismos envolvidos na apoptose dessas células. Ao final desse período observamos um efeito da Ang II dependente da concentração na progressão de apoptose dos podócitos. Na sequência escolhemos a concentração de 1µM do peptídeo para dar continuidade ao estudo. Vale ressaltar que em condições fisiológicas, as concentrações de Ang II intrarrenais são na faixa de nM (Von Thun *et al.*, 1994; Zhuo *et al.*, 2002) e em condições de hipertensão arterial, este parâmetro é expressamente aumentado. Além disso, os podócitos possuem um SRA próprio (Thorens *et al.*, 1990), o que pode potencializar os níveis de Ang II intrarenal e assim aumentar a vulnerabilidade das células ao peptídeo.

Nessa etapa, observamos que ação da Ang II na indução de apoptose é dependente de sua interação com o receptor, visto que o tratamento com losartan (antagonista de AT1) reduziu o efeito de Ang II sobre este parâmetro. Além disso, confirmamos a apoptose pela técnica de citometria de fluxo, considerada “padrão ouro”.

Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 2013) demonstraram que o tratamento de podócitos com Ang II (100 nM) por 24 horas induziu produção de espécies reativas de oxigênio, apoptose e fosforilação de NHE1. Entretanto, nesse estudo os autores não investigaram a atividade do NHE1 e as vias de sinalização celular envolvidas com a apoptose e a atividade de NHE1. No estudo atual, confirmamos a expressão proteica por Western blotting e a atividade de NHE1 pelo monitoramento experimental utilizando NMDG (substituto do Na⁺ extracelular) e cariporide (inibidor específico de NHE1). Contudo, mesmo subtraindo a contribuição de NHE1, observamos discreta recuperação do pH_i, sugerindo a participação de

outros mecanismos como a H^+ -ATPase ou até mesmo outras isoformas de NHE. Tais resultados não foram apresentados anteriormente em outros estudos.

Sabe-se que o NHE1 é essencial para a regulação do pH_i (SARDET; FRANCHI; POUYSSEGUR, 1989) e controle do volume celular (CALA; MALDONADO, 1994), e, portanto, previne a acidificação e a redução do volume celular exercendo, assim, papel protetor contra a apoptose induzida por acidose (MATSUYAMA *et al.*, 2000). No corrente estudo o bloqueio do NHE1 por cariporide aumentou significativamente a taxa apoptótica em relação ao controle, provavelmente devido a intensa acidificação intracelular. Este resultado confirma a função protetora do NHE1 na sobrevivência de podócitos.

Apesar de seu papel protetor descrito acima, o NHE1, quando estimulado por Ang II, pode induzir intensa alcalose intracelular em podócitos, também um potente estímulo para apoptose (apoptose alcalina) (Khaled *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2013). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, visto que, o tratamento com Ang II por 24 horas induziu um expressivo aumento da atividade de NHE1 e concomitante apoptose. Além disso, a contribuição de Ang II/NHE1 para a indução de apoptose alcalina foi confirmada pelo uso de cariporide, que reduziu parcialmente a resposta estimulatória induzida por Ang II. Esta redução discreta na apoptose no grupo Ang II/cariporide sugere uma tentativa da célula em reparar a apoptose alcalina induzida por Ang II, visto que a atividade de NHE1 está reduzida pelo cariporide. Este resultado confirma a participação do NHE1 na indução de apoptose por Ang II.

É conhecido que a p38 MAPK pode ativar o NHE1 e induzir alcalose celular (Khaled *et al.*, 2001), esta alteração do pH_i intracelular pode contribuir para a ativação da Bax verificada neste estudo. Por este motivo, decidimos investigar a contribuição da via de sinalização intracelular p38 MAPK na indução de apoptose alcalina por Ang II em podócitos. O tratamento com SB 203580 (inibidor específico da p38 MAPK) reduziu a atividade do NHE1, portanto, preveniu a alcalinização celular e, desta forma, reduziu a porcentagem de células apoptóticas para valores próximos ao controle. Assim, confirmamos a contribuição da via de sinalização p38 MAPK na regulação da atividade do NHE1 na presença de Ang II.

O aumento na atividade da p38 MAPK resulta na ativação de várias moléculas intracelulares, incluindo o NF κ B que uma vez ativado permite a geração de citocinas intracelulares. Estas citocinas ao serem liberadas pela célula podem por ação autócrina ou parácrina modular diversas funções celulares (Sun *et al.*, 2008) incluindo os próprios podócitos, células mesangiais e tubulares (Lai *et al.*, 2008). Além disso, o estresse oxidativo

estimula a produção de diversas quinases pró-inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas moléculas são produzidas por alguns tecidos, como o tecido renal (Touyz e Schiffrin, 2004). De fato, observamos que no grupo tratado com Ang II ocorreu aumento significativo na expressão de TNF α e interleucina 6.

7 CONCLUSÕES

Portanto, nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II 1 μ M por 24 horas induz estresse oxidativo e apoptose em podócitos, porém, a geração de espécies reativas de oxigênio e a ativação da via pró-apoptótica da Bax, são eventos prematuros na apoptose induzida pelo tratamento com Ang II por 24 horas, estes eventos são observados com apenas 4 horas de tratamento. O NHE1 pode estar envolvido tanto com a manutenção do equilíbrio ácido-base quanto com a indução de apoptose alcalina em podócitos. Na situação fisiológica o NHE1 protege estas células contra possíveis acidificações intracelulares, e na presença de Ang II há uma ativação da via de sinalização intracelular p38 MAPK que aumenta a atividade do NHE1, de forma que ocorre a alcalinização do citosol ativação da Bax e, consequentemente, apoptose.

REFERÊNCIAS*

ANTONSSON, B. et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. **Science**, v. 277, n. 5324, p. 370-2, Jul 18 1997. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 439-65, 2010. ISSN 1545-4304 (Electronic)0362-1642 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610> >.

BASILE, J. New therapeutic options in patients prone to hypertension: a focus on direct Renin inhibition and aldosterone blockade. **Am J Med Sci**, v. 337, n. 6, p. 438-44, Jun 2009. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390429> >.

BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. **Biochimie**, v. 89, n. 9, p. 1107-12, Sep 2007. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400358> >.

BOUTE, N. et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 349-54, Apr 2000. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742096> >.

CALA, P. M.; MALDONADO, H. M. pH regulatory Na/H exchange by Amphiuma red blood cells. **J Gen Physiol**, v. 103, n. 6, p. 1035-53, Jun 1994. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931136> >.

CARDILLO, C. et al. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 105, n. 4, p. 452-6, Jan 2002. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815427> >.

CAREY, R. M. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.45, 2005. p.840-4. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

CASARE, F. A. et al. Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. **Am J Physiol Renal Physiol**, p. ajprenal.00471.2015, Mar 2016. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962104> >.

CHEN, Y. M.; MINER, J. H. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. **Transl Res**, v. 160, n. 4, p. 291-7, Oct 2012. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683419> >.

CHUANG, P. Y.; HE, J. C. **Signaling in regulation of podocyte phenotypes.** *Nephron Physiol.* Switzerland: 2009 S. Karger AG, Basel. 111: p9-15 p. 2009.

COIMBRA, T. M. et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int*, v. 57, n. 1, p. 167-82, Jan 2000. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620198> >.

DATLA, S. R.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension*, v. 56, n. 3, p. 325-30, Sep 2010. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644010> >.

DONOWITZ, M. et al. NHE3 regulatory complexes. In: (Ed.). *J Exp Biol*. England, v.212, 2009. p.1638-46. ISBN 0022-0949 (Print)0022-0949 (Linking).

DUNN, A.; LO, V.; DONNELLY, S. The role of the kidney in blood volume regulation: the kidney as a regulator of the hematocrit. *Am J Med Sci*, v. 334, n. 1, p. 65-71, Jul 2007. ISSN 0002-9629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630596> >.

DWORKIN, L. D.; ICHIKAWA, I.; BRENNER, B. M. Hormonal modulation of glomerular function. *Am J Physiol*, v. 244, n. 2, p. F95-104, Feb 1983. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297313> >.

FUNABIKI, K. et al. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. *Clin Nephrol*, v. 34, n. 6, p. 239-46, Dec 1990. ISSN 0301-0430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2073766> >.

GRENIER, A. L. et al. Apoptosis-induced alkalization by the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 is mediated through phosphorylation of amino acids Ser726 and Ser729. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 295, n. 4, p. C883-96, Oct 2008. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701649> >.

HAWORTH, R. S. et al. Stimulation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway. *J Biol Chem*, v. 278, n. 34, p. 31676-84, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791686> >.

KAWADA, N. et al. A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*, v. 13, n. 12, p. 2860-8, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444204> >.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >.

KHALED, A. R. et al. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 25, p. 14476-81, Dec 7 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 22, p. 7545-57, Nov 2001. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.21.22.7545-7557.2001> >.

KITTIKULSUTH, W.; POLLOCK, J. S.; POLLOCK, D. M. Sex differences in renal medullary endothelin receptor function in angiotensin II hypertensive rats. **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 212-8, Aug 2011. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646601> >.

KONSTANTINIDIS, D. et al. Inhibition of the Na⁺-H⁺ exchanger isoform-1 and the extracellular signal-regulated kinase induces apoptosis: a time course of events. **Cell Physiol Biochem**, v. 18, n. 4-5, p. 211-22, 2006. ISSN 1015-8987 (Print)1015-8987. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000097668> >.

KRIZ, W. et al. Mesangial cell-glomerular basement membrane connections counteract glomerular capillary and mesangium expansion. **Am J Nephrol**, v. 10 Suppl 1, p. 4-13, 1990. ISSN 0250-8095. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256475> >.

LAI, K. N. et al. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF- α : glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 4, p. F945-55, Apr 2008. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256312> >.

LEE, S. H. et al. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 369, n. 2, p. 320-6, May 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269914> >.

LEEuwis, J. W. et al. Targeting podocyte-associated diseases. In: (Ed.). **Adv Drug Deliv Rev**. Netherlands: 2010 Elsevier B.V, v.62, 2010. p.1325-36. ISBN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking).

LI, X. C.; HOPFER, U.; ZHUO, J. L. Novel signaling mechanisms of intracellular angiotensin II-induced NHE3 expression and activation in mouse proximal tubule cells. In: (Ed.). **Am J Physiol Renal Physiol**. United States, v.303, 2012. p.F1617-28. ISBN 1522-1466 (Electronic)1522-1466 (Linking).

LIU, Y. et al. Roles of Na(+)/H(+) exchanger type 1 and intracellular pH in angiotensin II-induced reactive oxygen species generation and podocyte apoptosis. **J Pharmacol Sci**, v. 122, n. 3, p. 176-83, 2013. ISSN 1347-8613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MATSUYAMA, S. et al. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 6, p. 318-25, Jun 2000. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854321> >.

MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 12, p. 3005-15, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221> >.

NAVAR, L. G. et al. Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 2, p. S176-S184, Mar 2001. ISSN 1752-8976 (Electronic)1470-3203 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/14703203010020013001> >.

OKAMURA, K. et al. Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54817, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382978> >.

PADIA, S. H. et al. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.47, 2006. p.537-44. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

QIAN, H.; PIPOLO, L.; THOMAS, W. G. Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. **Mol Endocrinol**, v. 15, n. 10, p. 1706-19, Oct 2001. ISSN 0888-8809 (Print)0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

QUACK, I. et al. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 38, p. 14110-5, Sep 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968782> >.

SAKAI, T.; KRIZ, W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. **Anat Embryol (Berl)**, v. 176, n. 3, p. 373-86, 1987. ISSN 0340-2061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3631536> >.

SALEH, M. A. et al. Endothelin-1 increases glomerular permeability and inflammation independent of blood pressure in the rat. **Hypertension**, v. 56, n. 5, p. 942-9, Nov 2010. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823379> >.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 528-37, Feb 2000. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728374> >.

SCHIWEK, D. et al. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. **Kidney Int**, v. 66, n. 1, p. 91-101, Jul 2004. ISSN 0085-2538 (Print)0085-2538. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00711.x> >.

SCHWARTZ, M. A. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. **J Cell Biol**, v. 139, n. 3, p. 575-8, Nov 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348275> >.

SEDEEK, M. et al. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 299, n. 6, p. F1348-58, Dec 2010. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00028.2010> >.

_____. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. **J Am Soc Nephrol**, v. 24, n. 10, p. 1512-8, Oct 2013. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970124> >.

SEQUEIRA LOPEZ, M. L.; GOMEZ, R. A. Development of the renal arterioles. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 12, p. 2156-65, Dec 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052047> >.

SIRAGY, H. M.; CAREY, R. M. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. **J Clin Invest**, v. 100, n. 2, p. 264-9, Jul 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218502> >.

SUN, J. et al. Substance P enhances NF-kappaB transactivation and chemokine response in murine macrophages via ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 294, n. 6, p. C1586-96, Jun 2008. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434625> >.

SUN, Y. B. et al. Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55027, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359116> >.

TAKAHASHI, E. et al. p90(RSK) is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 29, p. 20206-14, Jul 16 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

THORENS, B.; LODISH, H. F.; BROWN, D. Differential localization of two glucose transporter isoforms in rat kidney. **Am J Physiol**, v. 259, n. 6 Pt 1, p. C286-94, Dec 1990. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TIGERSTEDT et al. **Kidney and circulation**: Skand. Arch. Physiol. 8: 223-271 p. 1898.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 639-72, Dec 2000. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121512> >.

_____. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 339-52, Oct 2004. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338229> >.

VON THUN, A. M. et al. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. **Am J Physiol**, v. 266, n. 1 Pt 2, p. F120-8, Jan 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304477> >.

WELLS, R. G. et al. Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. **Am J Physiol**, v. 263, n. 3 Pt 2, p. F459-65, Sep 1992. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol**, v. 22, n. 7, p. 521-38, Jan 2004. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996432> >.

ZHANG, G. X. et al. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. **Cardiovasc Res**, v. 76, n. 2, p. 204-12, Nov 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698051> >.

ZHUO, J. L. et al. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor. **Hypertension**, v. 39, n. 1, p. 116-21, Jan 2002. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11799089> >.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-8, Jun 2004. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143207> >.