KELLY PRISCILA PANDOLFI

**Efeitos da aldosterona sobre a expressão proteica do EGFR e ERK1/2
fosforilados e o desenvolvimento de lesões no rim de ratos**

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
2015

KELLY PRISCILA PANDOLFI

**Efeitos da aldosterona sobre a expressão proteica do EGFR e ERK1/2
fosforilados e o desenvolvimento de lesões no rim de ratos**

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

Orientação: Profa. Dra. Margarida de Mello Aires

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Kelly Priscila Pandolfi dos.

Efeitos da aldosterona sobre a expressão proteica do EGFR e ERK1/2 fosforilados e o desenvolvimento de lesões no rim de ratos / Kelly Priscila Pandolfi dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Margarida de Melo Aires.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia renal.

Versão do título para o inglês: Aldosterone effects on the protein expression of phosphorylated EGFR and ERK1/2 and development of lesions in the rat kidney.

1. Aldo 2. Efeito genômico 3. EGFR 4. ERK1/2 5. Injúrias renais
I. Aires, Profa. Dra. Margarida de Melo II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0188/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kelly Priscila Pandolfi dos Santos.

Título da Dissertação: Efeitos da aldosterona sobre a expressão proteica do EGFR e ERK1/2 fosforilados e o desenvolvimento de lesões no rim de ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Margarida de Melo Aires.

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:

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) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 033 nas fls. 04 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Margarida de Melo Aires**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da aldosterona sobre a expressão proteica de EGFR e ERK1/2 fosforilados e o desenvolvimento de lesões no néfron de ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Kelly Priscila Pandolfi dos Santos** e os pesquisadores **Regiane Cardoso Castelo Branco**, **Maria Oliveira de Souza**, **Deise Carla Almeida Leite Dellova**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **20.06.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esse trabalho a minha família por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, que me iluminou e me trouxe a sabedoria durante os momentos mais difíceis do caminho percorrido.

À Profa. Dra. Margarida de Mello Aires, por ter confiado em mim e em minha capacidade, pelo convívio e apoio e por sua contribuição intelectual para minha jornada, que está apenas começando.

À Profa. Dra. Deise Carla Almeida Leite Dellova, que me acompanha desde a graduação; responsável por me inspirar academicamente, acreditando em mim desde o começo, até mesmo mais do que eu, que me mostrou caminhos, apontou defeitos e me ajudou a encontrar as respostas corretas, com muita paciência.

À minha mãe Tania e meu avô Carmo, por estarem sempre comigo, me apoiando e me fazendo acreditar que era possível.

Ao Prof. Dr. Gerhard Malnic, à Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza, ao Prof. Dr. Rildo Aparecido Volpini e à Profa. Dra. Claudia Helou, pela disponibilização dos seus laboratórios e por suas contribuições para essa pesquisa.

Aos colegas Thaissa, Priscila, Regiane e Fernando do laboratório de Fisiologia Renal do ICBI/USP e Paula, Giovanna, Shirley e Fernanda do laboratório de Fisiologia Experimental da FZEA/USP, que me ajudaram e fizeram essa jornada mais leve.

Aos funcionários do ICBI/USP, da FZEA/USP e da FMUSP (LIM 12), que me receberam tão bem e contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Muito obrigada!

“Nunca é demasiado tarde para ser aquilo que sempre se quis ser.”

George Eliot

RESUMO

PANDOLFI, K. P. **Efeitos da Aldosterona sobre a expressão proteica do EGFR e ERK1/2 fosforilados e o desenvolvimento de lesões no rim de ratos.** 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento com a aldosterona (Aldo), por 21 dias, sobre a função e a morfologia renal de ratos, procurando correlacionar as alterações com a expressão do EGFR e da ERK1/2 fosforilados. A Aldo não alterou os parâmetros fisiológicos, a PA e a função renal dos ratos, mas verificou-se uma tendência para a redução das concentrações plasmáticas de K^+ . No córtex e na medula renal, a Aldo aumentou a expressão do EGFR e da ERK1/2 fosforilados, sendo que este efeito foi abolido pelo tratamento concomitante com a espironolactona ou o RU 486 (antagonistas dos receptores da Aldo). O tratamento hormonal também induziu um aumento na marcação imuno-histoquímica para essas proteínas no córtex e medula; contudo, este efeito foi reduzido, principalmente, com o tratamento conjunto com a espironolactona. Observou-se um aumento na área glomerular e na porcentagem da área intersticial, após o tratamento com a Aldo. As alterações na morfometria renal foram parcialmente reduzidas pelo tratamento com a espironolactona ou o RU 486. Esses resultados indicam que a Aldo pode induzir alterações morfológicas no rim, aparentemente, de maneira dependente dos receptores MR e GR e da via do EGFR-ERK1/2, mas sem o comprometimento da função renal.

Palavras-chave: Aldo. Efeito genômico. EGFR. ERK1/2. Injúrias renais.

ABSTRACT

PANDOLFI, K. P. Aldosterone effects on the protein expression of phosphorylated EGFR and ERK 1/2 and development of lesions in the rat kidney. 2015. 67 f. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The purpose of this study was to evaluate the effect of 21 days of treatment with aldosterone (Aldo) in the renal function and morphology of rats, correlating changes with the expression of EGFR and ERK1/2 phosphorylated. The Aldo did not alter physiological parameters, blood pressure and renal function of rats, but there was a tendency to reduce K⁺ plasma concentrations. In renal cortex and medulla, Aldo increased the expression of EGFR and ERK1/2 phosphorylated and this effect was abolished by treatment Aldo plus spironolactone or RU 486 (Aldo receptor antagonists). Hormonal treatment also induced an increase in immunohistochemical staining for these proteins in the cortex and medulla; however, this effect was limited mainly to treatment Aldo plus spironolactone. There was an increase in glomerular area and the percentage of interstitial area after treatment with Aldo. Changes in renal morphology were partially reduced by treatment Aldo plus spironolactone or RU 486. These results indicate that Aldo may induce morphological changes in the kidney of dependent manner of MR and GR receptors and EGFR-ERK1/2 signaling, but without the impairment of renal function.

Keywords: ALDO. Genomic effect. EGFR. ERK 1/2. Kidney injuries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Esquematisação do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	18
Figura 2:	Mecanismo de ação genômico da Aldo	19
Figura 3:	Mecanismo de indução de lesão renal pela Aldo	26
Figura 4:	Ilustração da metodologia para perfusão de tecidos e obtenção de amostras para estudos histopatológicos	34
Figura 5:	Figura representativa da delimitação da área intersticial e da área glomerular	35
Figura 6:	Valores médios de carga excretada (A) e da fração de excreção (B) de potássio, ao final dos tratamentos	38
Figura 7:	Valores médios do <i>clearance</i> de creatinina ao final dos tratamentos	39
Figura 8:	Efeito da Aldo sobre a expressão do EGFR fosforilado em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento	40
Figura 9:	Efeito da Aldo sobre a expressão do EGFR fosforilado em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento	40
Figura 10:	Efeito da Aldo sobre a expressão da ERK1/2 fosforilada em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento	42
Figura 11:	Efeito da Aldo sobre a expressão da ERK1/2 fosforilada em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento	42
Figura 12:	Área glomerular	44
Figura 13:	Análise da área intersticial	45
Figura 14:	Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica do EGFR fosforilado em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	46
Figura 15:	Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica do EGFR fosforilado em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	47
Figura 16:	Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica da ERK1/2 fosforilada em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	49
Figura 17:	Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica da ERK1/2 fosforilada em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Parâmetros Fisiológicos	37
Tabela 2:	Pressão Arterial máxima de cauda aos 0 e 21 dias de tratamento.....	37
Tabela 3:	Parâmetros plasmáticos, após 21 dias de tratamento.....	38
Tabela 4:	Valores médios de <i>clearance</i> de creatinina, carga excretada (CE) e fração de excreção (FE), após os tratamentos	39
Tabela 5:	Expressão normalizada e relativa da proteína EGFR fosforilada em córtex e medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	41
Tabela 6:	Expressão normalizada e relativa da proteína ERK1/2 fosforilada em córtex e medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	43
Tabela 7:	Valores médios da área glomerular, após 21 de tratamento	43
Tabela 8:	Valores médios da porcentagem da área intersticial em córtex de em rim de rato, após 21 dias de tratamento.....	45
Tabela 9:	Intensidade da marcação imuno-histoquímica (<i>score</i>) para a proteína EGFR fosforilado em de rim de rato, após 21 dias de tratamento	48
Tabela 10:	Intensidade da marcação imuno-histoquímica (<i>score</i>) para a proteína ERK1/2 fosforilada em de rim de rato, após 21 dias de tratamento	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Aldo	Aldosterona
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
BSA	Albumina de soro bovino
CE	Carga excretada
CF	Carga filtrada
ECA	Enzima conversora de Angiotensina
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EMT	Transição mesenqueimal epitelial
ERK 1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular
EXC	Excretada
Espiro	Espironolactona
FE	Fração de excreção
GR	Receptor para glicocorticoides
MAPK	Proteínas quinase ativada por mitógeno
MR	Receptor para mineralocorticoides
PC	Pressão arterial de cauda
PI3-K	Fosfatidilinositol-3 cinase
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RU	RU 486
SRA	Sistema Renina – Angiotensina
SRRA	Sistema Renina – Angiotensina – Aldo
V	Fluxo urinário
11 β HSD2	Enzima 11 β hidroxiesteroide desidrogenase tipo II

LISTA DE FÓRMULAS

(1) Fluxo urinário..... $V = (\text{volume/tempo})$

(2) Carga excretada..... $CE = V \times U_x$

(3) Fração de excreção..... $FE = CF/CE$

(4) *Clearance*..... $C_{cr} = V \cdot U_{creat} / P_{creat}$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Desenvolvimento histórico do estudo da Aldo	17
2.2	Síntese e mecanismo de ação da Aldo	17
2.3	Receptores da Aldo	19
2.3.1	<i>Receptor para mineralocorticoides (MR).....</i>	19
2.3.1.1	Espironolactona (antagonista do MR)	20
2.3.2	<i>Receptor para glicocorticoides (GR).....</i>	21
2.3.2.1	RU486 (mifepristone, antagonista do GR).....	21
2.4	Aldo e o balanço eletrolítico nos rins	22
2.5	Aldo e mecanismos de injúria renal	23
2.5.1	<i>Vias de sinalização da ALDO (ERK 1/2 e EGFR)</i>	24
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo geral	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	Animais	29
5.2	Anestesia	29
5.3	Análises Bioquímicas (plasma e urina)	29
5.4	Protocolos experimentais	30
5.4.1	<i>Grupos experimentais.....</i>	30
5.4.2	<i>Administração dos tratamentos</i>	30
5.4.3	<i>Mensuração de pressão arterial</i>	31
5.4.4	<i>Gaiola Metabólica</i>	31
5.5	Estudos com <i>Western blot</i> para determinação da expressão das proteínas ERK1/2 e da EGFR no tecido renal	31
5.5.1	<i>Preparo das amostras</i>	31
5.5.2	<i>Determinação da concentração total de proteína de cada amostra</i>	32
5.5.3	<i>Técnica de Western Blotting</i>	33
5.5.4	<i>Quantificação relativa do EGFR fosforilado e da ERK1/2 fosforilada ...</i>	33

5.6	Análise da função renal	33
5.7	Obtenção do tecido para histopatológico	34
5.8	Análises Histopatológicas	35
5.9	Imuno-histoquímica	36
5.10	Análise dos resultados	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Efeito da Aldo e/ou RU ou Espiro sobre os parâmetros fisiológicos .	37
6.2	Efeito da Aldo e/ou RU ou Espiro sobre os parâmetros bioquímicos plasmáticos	37
6.3	Efeito da Aldo e/ou RU ou Espiro sobre a função renal	38
6.4	Expressão do EGFR fosforilado em córtex e medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento	39
6.5	Expressão da ERK1/2 fosforilada em córtex e medula de rim de rato após 21 dias de tratamento	41
6.6	Área Glomerular	43
6.7	Análise da Área Intersticial	44
6.8	Expressão e co-localização do EGFR fosforilado em tecido renal, por marcação imuno-histoquímica	46
6.9	Expressão e co-localização da ERK1/2 em tecido renal, por marcação imuno-histoquímica	48
7	DISCUSSÃO	52
7.1	Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos plasmáticos	52
7.2	Efeito dos tratamentos sobre a função renal	53
7.3	Efeito da Aldo sobre a expressão do EGFR e da ERK 1/2 fosforilados e o papel dos receptores MR e GR	54
7.4	Alterações morfológicas e possível relação com a fosforilação do EGFR e da ERK1/2 no tecido renal, induzidos pela Aldo	55
8	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Aldosterona (Aldo) é um hormônio mineralocorticoide produzido e liberado pela glândula adrenal em resposta a dois estímulos fisiológicos muito distintos: 1) a produção de angiotensina II pelo sistema renina-angiotensina-Aldo (SRAA), que ocorre em situações de hipovolemia e de hipotensão, ou 2) concentração plasmática elevada de K^+ , responsável pela despolarização da membrana das células secretoras de Aldo (THOMAS; HARVEY, 2011).

O mecanismo de ação da Aldo tem sido o objeto de muitos estudos, não só pela sua grande importância na regulação do balanço de sal e água, mas também pelo seu papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais. Além do papel fisiológico no transporte iônico renal, a Aldo também induz lesões e participa da patogênese da disfunção renal, a partir do estímulo à lesão mesangial glomerular e à fibrose renal (HUANG et al., 2009; KRUG et al., 2003; NISHIYAMA et al., 2005; RAFIQ et al., 2011). Vários mecanismos têm sido propostos para a ação patológica da Aldo no rim, entre eles: a rápida ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e da via das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2).

O envolvimento da Aldo na disfunção renal progressiva, principalmente pela via da ativação do receptor para mineralocorticoide (MR) já é conhecido. No entanto, trabalhos do nosso grupo de pesquisa e de outros autores sugerem a participação do receptor para glicocorticoides (GR) no mecanismo de ação da Aldo, baseados no fato de que o GR apresenta 94% de homologia com o MR e o antagonismo ao GR (induzido pelo RU 486) reduz várias respostas renais e extra renais, promovidas pela Aldo (LEITE-DELLOVA et al., 2008; ROSSIER; PYTHON; MATURANA, 2010).

Estudos que contribuam para o entendimento da disfunção renal progressiva, induzida pela Aldo, são muito importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que poderão impedir o estabelecimento ou retardar a progressão desta doença.

Sendo assim, neste projeto estudou-se o efeito do tratamento com Aldo por 21 dias sobre a expressão do EGFR e da ERK1/2 no rim, o envolvimento dos receptores MR e GR no efeito hormonal e o possível desenvolvimento de lesões no rim de ratos, a longo prazo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desenvolvimento histórico do estudo da Aldo

Desde que a Aldo foi isolada e caracterizada pela primeira vez em 1953, seu estudo pode ser avaliado, historicamente, em três momentos distintos: 1) os primeiros 20 anos, com a Aldo sendo o foco principal das pesquisas; 2) de 1973 a 1993, com o MR sendo descoberto; e 3) desde 2003 até o presente momento, com achados apontando a relação e a importância, tanto do hormônio quanto de seu receptor (FUNDER, 2012).

Classicamente, era admitido que a Aldo atravessaria a membrana celular e se ligaria ao receptor MR citoplasmático e então, este complexo (Aldo-MR) seria translocado para o núcleo celular, onde atuaria como um fator de transcrição para proteínas envolvidas na regulação do balanço de sódio e potássio em células epiteliais (mecanismo de ação genômico). Porém, há cerca de duas décadas, iniciou-se o estudo de alguns efeitos deste hormônio que são muito rápidos (ocorrem em segundos ou minutos) e insensíveis aos inibidores de transcrição (actinomicina D) e de translação (cicloheximida), sendo incompatíveis com a modulação da transcrição gênica e com a síntese de novas proteínas, e, portanto, passaram a ser classificados como não genômicos (GOOD, 2007).

2.2 Síntese e mecanismo de ação da Aldo

A Aldo é um hormônio mineralocorticoide produzido na zona glomerulosa das células do córtex da glândula adrenal, a partir do colesterol. A concentração plasmática da Aldo é de 5-15 ng/dL. Cerca de 50% da Aldo circulante estão sob a forma livre e 50% encontram-se ligados a uma globulina específica, a transcortina, e à albumina (BARRETO-CHAVES et al., 2012).

Já foram relatados outros locais de síntese da Aldo, além do córtex da glândula adrenal, incluindo o cérebro, o tecido vascular e o miocárdio. A enzima aldosterona sintase, codificada pelo gene CYP11B2, converte a desoxicorticosterona em Aldo e a enzima β hidroxilase, codificada pelo gene CYP11B1, catalisa a conversão de desoxicortisol em cortisol (NAMSOLLECK; UNGER, 2014).

Dois estímulos principais regulam diretamente a secreção de Aldo: a Angiotensina II (Ang II) e o potássio. A Ang II é um peptídeo efetor do sistema renina-angiotensina (SRA). O SRA consiste em um sistema complexo, sendo capaz de gerar hormônios peptídeos com grande

importância na manutenção das funções fisiológica dos sistemas cardiovascular e renal. A renina foi descoberta há aproximadamente 100 anos, por Bergman & Tigerstedt. Esta enzima é produzida nos rins e tem como função metabolizar o seu substrato (o angiotensinogênio) no plasma, liberando, assim, o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I), que é então convertido no octapeptídeo Angiotensina II (Ang II), pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Finalmente, a Ang II é responsável pela estimulação da síntese e secreção de Aldo (Figura 1) (BADER, 2010).

Figura 1: Esquematização do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. A enzima renina converte angiotensinogênio em Angiotensina I; ECA converte a Angiotensina I em Angiotensina II; Angiotensina II estimula o córtex das glândulas adrenais, resultando na síntese e secreção de Aldo (Modificado de OPENSTAX COLLEGE, 2013).

O aumento do nível de potássio circulante estimula a liberação da Aldo, conduzindo a um aumento da excreção renal de potássio. Em condições fisiológicas, o potássio e Ang II regulam a secreção de Aldo de forma igual e independente. Outro estímulo potente para a secreção desse mineralocorticoide é o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), principalmente na fase aguda da secreção hormonal. A Aldo também pode ser secretada por meio do estímulo da endotelina, da vasopressina e da serotonina, porém de forma menos efetiva, em relação ao potássio e a Ang II (NAMSOLLECK; UNGER, 2014).

Conforme comentado anteriormente, os efeitos mediados pela Aldo podem ser divididos em duas categorias: genômico e não genômico. As ações não genômicas desse hormônio, ocorrem após a sua ligação com o receptor MR e quando são mediadas pelo ROS (espécies

reativas de oxigênio), que podem levar à transativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que é responsável por iniciar inúmeras cascatas de proteínas sinalizadoras, entre elas a ERK1/2 (NAMSOLLECK; UNGER, 2014).

Na ação genômica da Aldo (Figura 2), acontece a ligação com o MR citosólico, então, o complexo Aldo-MR é translocado para o núcleo celular, onde modula a síntese de proteínas responsáveis pela reabsorção de sódio e a secreção de potássio nos túbulos renais (GOOD, 2007).

Figura 2: Mecanismo de ação genômico da Aldo. Modelo de uma célula epitelial onde o hormônio se liga ao MR, resultando na reabsorção de Na^+ e a secreção de K^+ . ENaC = canal epitelial de Na^+ . Hsp = proteínas de choque térmico. Sgk = proteína induzida por glicocorticoides. Ki-RasA = proteína de proto-oncogenes. CHIF = fator hormonal induzido por corticosteroides. 11 β HSD2 = Enzima 11 β hidroxisteroide desidrogenase tipo II (Modificado de BOOTH; JOHN, STOCKAND, 2002).

2.3 Receptores da Aldo

2.3.1 Receptor para mineralocorticoides (MR)

Muitos efeitos da Aldo se dão por meio da ligação deste hormônio ao receptor MR. O MR pertence à superfamília de receptores de esteroides, que engloba também os receptores da progesterona, estrógeno, andrógenos e glicocorticoides (GEKLE; GROSSMANN, 2009). Estes receptores possuem uma estrutura comum, e isto faz com que o desenvolvimento de

antagonistas específicos seja muito difícil. O MR possui dois ligantes: a Aldo e o cortisol (ou corticosterona em roedores), com a mesma afinidade de ligação (FUNDER, 1997).

Em tecidos epiteliais, a enzima 11 β hidroxisteroide desidrogenase tipo II (11 β HSD2) protege o MR de ser ocupado por glicocorticoides, que circulam em concentrações muito mais elevadas do que a Aldo (FULLER et al., 2012). A 11 β HSD2 metaboliza cortisol em cortisona, nos seres humanos, e esta nova forma não é capaz de ligar-se ao MR; portanto, quando a enzima 11 β HSD2 está ativa, a Aldo pode ligar-se e ativar o MR livremente. Na ausência da 11 β HSD2 ou quando ela se encontra inativa, o local de ligação do MR é ocupado pelo cortisol. Vários tecidos não epiteliais, incluindo o coração, adipócitos e macrófagos, que expressam MR, não expressam 11 β HSD2 e, por conseguinte, nestes tecidos, o MR é ocupado predominantemente cortisol (ODERMATT; ATANASOV, 2009).

Há um verdadeiro interesse em encontrar formas de inibir os efeitos cardiovasculares (não benéficos) da ativação MR, deixando os efeitos fisiológicos sobre o rim intacto. Curiosamente, embora a comunidade científica esteja convencida dos efeitos benéficos do antagonismo ao MR, os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos da ativação da Aldo sobre o MR não foram completamente elucidados (BROWN, 2013).

A identidade do receptor responsável por iniciar a resposta rápida (não genômica) da Aldo tem sido o assunto de debate. Alguns autores sustentam a hipótese que existe um receptor de Aldo distinto, associado à membrana, que inicia exclusivamente as diferentes respostas rápidas não genômicas. Esta hipótese é sustentada pela evidência de que algumas destas respostas rápidas são detectadas em camundongos *knockout* para MR, ou não são bloqueados pelos antagonistas farmacológicos específicos do MR. A hipótese alternativa é que os receptores MR são responsáveis por todas as respostas não genômicas, quer diretamente ou por meio de moléculas de sinalização auxiliares (GROSSMANN; GEKLE, 2008; MIHAILIDOU, 2006 WILLIAMS, 2013).

2.3.1.1 Espironolactona (antagonista do MR)

A Espironolactona (Espiro) é um esteroide sintético, derivado da progesterona, que atua como antagonista da Aldo em células alvo, inibindo de forma competitiva a ligação do hormônio com o MR (COUETTE et al., 1992). A Espiro foi desenvolvida há mais de 40 anos (SADEE et al., 1972), sendo caracterizada como um diurético poupador de potássio e utilizada essencialmente para o tratamento do hiperaldosteronismo primário e secundário (FUNDER,

2012). Este fármaco possui uma estrutura química similar à de outros esteroides, apresentando o anel de lactona com um substituinte no C17.

A Espiro tem sido amplamente utilizada no tratamento de inúmeras doenças, incluindo a hipertensão e as lesões no tecido renal (LÖSEL; WEHLING, 2003).

Em 2002, um novo antagonista do MR, a eplerenone, foi lançado para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Em comparação com a Espiro, a eplerenona tem uma seletividade melhorada para o MR, mas apresenta uma potência reduzida (afinidade 40 vezes menor para o MR, quando comparado com a espironolactona) (NAMSOLLECK; UNGER, 2014).

2.3.2 Receptor para glicocorticoides (GR)

Projetos de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Renal do ICB/USP, que avaliaram os mecanismos de transporte iônico no túbulo proximal *in vitro* (LEITE-DELLOVA et al., 2008) e *in vivo* (PERGHER et al., 2009) sugerem a participação do receptor GR nos efeitos não genômicos da Aldo, neste segmento tubular. Esses trabalhos se apoiam no fato que, no túbulo proximal, o GR é muito mais abundante que o MR (TODD-TURLA et al., 1993) e de que os efeitos não genômicos da Aldo sobre o trocador Na^+/H^+ e a H^+ -ATPase foram abolidos pelo RU 486 (mifepristone, um antagonista do GR).

Vários estudos sugerem que a Aldo pode atuar via receptor GR. Em cardiomiócitos isolados do ventrículo de ratos, a Aldo, em doses supra-fisiológicas, induziu respostas cronotrópicas e o aumento da expressão de canais de cálcio (tipo $\text{Ca}_v3.2/\alpha1\text{H}$), por um mecanismo dependente da ativação do MR e do GR (LALEVÉE et al., 2005; ROSSIER; PYTHON; MATURANA, 2010). Porém, algumas respostas hipertróficas, induzidas pela dose elevada de Aldo, foram exclusivamente exercidas pela ligação com o GR (ROSSIER; PYTHON; MATURANA, 2010).

2.3.2.1 RU 486 (mifepristone, antagonista do GR)

O mifepristone (RU 486), é um derivado sintético da progestina noretindrona, foi desenvolvido na França em 1980, pela indústria farmacêutica, e é potencialmente abortivo nos primeiros meses de gestação. Em baixas doses, o RU 486 (RU) é um fármaco antagonista seletivo do receptor de progesterona e, em altas doses, bloqueia o receptor GR. O RU 486 ocupa o receptor com uma afinidade quatro vezes maior que a dexametasona e 18 vezes maior que o

cortisol e depois de ligado ao receptor promove a inibição transcripcional do GR, diminuindo os efeitos fisiológicos do excesso de corticosteroides. Este bloqueio é central, por meio do *feedback* negativo para o ACTH e o CRH, e periférico para o cortisol (JOHANSEN; ALLOLIO, 2007).

O RU 486 pode ser utilizado para o tratamento de algumas doenças como a hiperglicemia secundária, em decorrência da síndrome de Cushing (FARAH; LAUFGRABEN, 2013).

2.4 Aldo e o balanço eletrolítico nos rins

Nos rins a Aldo está relacionada com o manejo de eletrólitos, estimulando a reabsorção de Na^+ e a secreção de H^+ e K^+ no néfron. Até pouco menos de uma década, acreditava-se que a Aldo agisse especialmente no ducto coletor (OBERLEITHNER, 2004), promovendo expansão do fluido extracelular e o consequente aumento da pressão sanguínea. Seu efeito se faria pela reabsorção do sódio (filtrado no glomérulo) na região distal do néfron, por meio da ativação dos ENaCs (canais epiteliais de Na^+ , sensíveis à amilorida), e também da Na^+/K^+ ATPase da membrana basolateral (GOOD, 2007; HARVEY et al., 2002; PEARCE; KLEYMAN, 2007).

A Aldo é liberada pela glândula adrenal em resposta não apenas a ativação do SRAA, mas também frente a estímulos fisiológicos, como a elevação na concentração plasmática de K^+ . Esta elevação ocasiona a alteração na condutância ao K^+ , despolarização da membrana das células secretoras de Aldo e sua consequente liberação pela adrenal (THOMAS; HARVEY, 2011).

Estudos demonstraram o papel da Aldo na estimulação do trocador Na^+/H^+ , por meio de inserção e ativação desta proteína na membrana luminal (MALNIC et al., 1997), e também a estimulação da H^+ -ATPase vacuolar apical (MALNIC; GEIBEL, 2000; MARVER; KOKKO, 1983).

Pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório descrevem um efeito bifásico e dose dependente da Aldo sobre o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE1), em segmento S3 de túbulo proximal isolado de rato (LEITE-DELLOVA et al., 2008) e sobre o trocador Na^+/H^+ (isoforma NHE3) do túbulo proximal convoluto (segmento S2) *in vivo* (PERGHER et al., 2009). O efeito bifásico da Aldo sobre o trocador Na^+/H^+ indica que: em doses baixas o hormônio estimula essa proteína e em altas doses exerce um efeito inverso. Esse efeito da Aldo aparece apenas com 1 ou 15 minutos de tratamento, evidenciando um efeito hormonal rápido, não genômico.

Adicionalmente, foi descrito que o peptídeo Atrial Natriurético (ANP) inibe o efeito não genômico, bifásico, dose dependente, da Aldo sobre o NHE1, em segmento S3 de túbulo proximal isolado (BRAGA-SOBRINHO et al., 2012).

Good et al. (2007), mostraram que a Aldo inibe a atividade de NHE3 apical em ramo ascendente espesso da alça de Henle, por meio de um mecanismo independente do MR. Esses dois autores evidenciaram efeitos não genômicos da Aldo, relacionados ao balanço eletrolítico nos rins.

Em síntese, o principal efeito da Aldo é promover a reabsorção de sódio e a secreção de hidrogênio e potássio em tecidos epiteliais, desempenhando, assim, um papel importante na regulação do volume corporal, da pressão arterial, do equilíbrio eletrolítico e ácido-base (ELIAS et al., 2012).

2.5 Aldo e mecanismos de injúria renal

Além do papel fisiológico no transporte renal de sódio, hidrogênio e potássio, a Aldo provoca injúrias ao tecido renal, que ocorreriam de forma independente de alterações na pressão arterial, tais como: inflamação, fibrose (tubulointersticial) e lesões decorrentes da proliferação de células mesangiais, além de ser um potente indutor de proteinúria (RAFIQ et al., 2011). Vários mecanismos têm sido propostos para a ação patológica da Aldo, como o aumento da síntese de colágeno e fibronectina, a formação de espécies reativas de oxigênio, a diminuição do óxido nítrico disponível e a interação com peptídeos de sinalização.

O envolvimento da Aldo na patogênese da disfunção renal progressiva, principalmente pela via da ativação do receptor MR (mecanismo genômico) já é conhecido. No entanto, apesar de ainda não estarem totalmente elucidados, são fortes as evidências de que os mecanismos não genômicos da Aldo também poderiam participar do desenvolvimento da lesão renal (SINPHITUKKUL et al., 2011).

A modulação do crescimento de células pela Aldo, por uma estimulação metabólica (hipertrofia) ou da proliferação celular (hiperplasia), requer a coordenação das vias de sinalização e alterações rápidas na transcrição. A ativação de vias de sinalização pela Aldo, incluindo as vias da PKC, PKD1 e ERK1/2, foi identificada em células derivadas do néfron distal (THOMAS; DOOLEY; HARVEY, 2010). Essas mesmas vias estão sendo apontadas como responsáveis por promover a proliferação celular em resposta a agonistas miogênicos. Isso levanta a hipótese de que a Aldo pode modular o crescimento de células renais por meio da ativação de cascatas de sinalização (GEKLE; FREUDINGER; MILDENBERGER, 2002).

2.5.1 Vias de sinalização da Aldo (EGFR e ERK1/2)

Um importante peptídeo de sinalização celular envolvido com a ação da Aldo é o fator de crescimento epidermal (EGF) e o seu receptor (EGFR) (KRUG et al., 2003). O EGFR tem sido apontado nos eventos de sinalização relacionados com a ativação de receptores acoplados a proteínas G, hormônios de crescimento e citocinas, por meio de um mecanismo denominado transativação. Então, o EGFR pode desempenhar um papel central na transdução de sinais (HACKEL et. al., 1999; MOGHAL; STERNBERG, 1999). A interação entre o MR e a Aldo, além de desencadear as ações genômicas, também promove a transativação do EGFR, como já foi dito, sendo um evento necessário para a rápida e não genômica ativação da cascata da ERK1/2. A ERK1 e a ERK2 compõem as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), um grupo de quinases serina/treonina que, sob estimulação, fosforilam seus substratos nos resíduos serina e/ou treonina. Estas quinases estão envolvidas na transdução de sinais da membrana celular para o núcleo, em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo os hormônios (WADA; PENNINGER, 2004).

A via de sinalização da ERK1 e da ERK2 (ERK1/2) é ativada em cascata, onde MAP quinases do tipo RAF fosforilam e ativam as MAP quinases MEK 1 e MEK 2, que por sua vez também fosforilam e ativam as quinases ERK1 e ERK2. A ERK1 e a ERK2 ativadas passam a fosforilar várias moléculas efetoras envolvidas em processos celulares fundamentais como a diferenciação, a proliferação, a apoptose, a sobrevivência e o metabolismo (COWAN; STOREY, 2003). No rim, a via ERK1/2 participa da regulação hormonal de diferentes transportadores iônicos ao longo do néfron, para manutenção da homeostase do fluido extracelular (MICHLIG et al., 2004), porém a desregulação na proliferação de células epiteliais é um fator importante no desenvolvimento de doenças renais crônicas (THOMAS; HARVEY, 2011).

Estudos *in vitro* demonstraram que a Aldo aumentou a fosforilação do EGFR e da ERK1/2, sugerindo que estas proteínas possuam um papel importante nas ações não genômicas da Aldo nos rins (GEKLE; FREUDINGER; MILDENBERGER, 2002; GROSSMANN; GEKLE, 2008; KRUG et al., 2002). Em pesquisa realizada por Xu et al. (2008), foi evidenciado que a Aldo induziu a fosforilação da ERK1/2 de modo dose e tempo dependente, em células epiteliais de túbulo proximal humano. O pré-tratamento dessas células com inibidor de MAPKK/MEK (denominado U0126) não só impediu a ativação da ERK1/2 induzida pela Aldo, mas também inibiu a transição mesenquimal epitelial tubular (EMT; caracterizada pela

mudança do fenótipo epitelial para o mesenquimal) e a síntese de colágeno. Os resultados sugerem que a EMT tubular induzida pela Aldo e a síntese de colágeno é mediada pela ERK1/2.

De acordo com Grossmann et al. (2004), a Aldo regula a reabsorção epitelial de Na^+ e também estimula a cascata de sinalização EGF-EGFR-ERK1/2. Em células MDCK C7 (que apresentam características de células principais do ducto coletor, incluindo o transporte de Na^+ , mediado pelo ENaC), a Aldo estimulou a expressão do EGFR e a fosforilação da ERK1/2, ao mesmo tempo em que se observou um antagonismo ao efeito estimulatório da Aldo sobre o ENaC. Estes autores sugerem que a sinalização iniciada pelo EGFR pode limitar a reabsorção de Na^+ induzida pela Aldo, pelo menos em células MDCK C7. Desta forma, ficaria estabelecido um sistema de sinalização que antagoniza a própria ação da Aldo.

Apenas um estudo *in vivo* comprovou que a Aldo aumenta a quantidade e a expressão do EGFR e da ERK1/2 fosforilados em várias regiões do néfron. Sinphitukkul et al. (2011) constataram que este efeito hormonal é observado no rim de ratos, após um período de 30 minutos de exposição; no entanto, estes autores não estudaram a expressão diferencial entre as regiões cortical e medular renais e a participação dos receptores MR e GR sobre esse efeito.

Alguns estudos apontam a participação da ERK1/2 e do EGFR nas ações patológicas e crônicas da Aldo nos rins, como a lesão mesangial glomerular e a fibrose renal (HUANG et al., 2009; KRUG et al., 2003; NISHIYAMA et al., 2005; RAFIQ et al., 2011), propondo o início desta ação hormonal pela ligação com o MR, conforme esquematizado na Figura 3. Porém a relação entre a ativação destas proteínas, pela Aldo, e o desenvolvimento de lesões renais ainda requer um melhor entendimento.

Huang et al. (2012) descreveram uma relação entre a sinalização da PI3-K (fosfatidilinositol-3 cinase) e da MAPK, seguinte ao tratamento com Aldo, em células de fibroblastos renais, resultando em proliferação e sugerindo que a elevação dos níveis de Aldo pode induzir a fibrose renal.

É possível que tanto a ativação do EGFR e da ERK1/2, como o estabelecimento de injúrias ao tecido renal, em resposta à Aldo, sejam dependentes da ativação do MR e independentes do GR, uma vez que estas respostas foram abolidas pela Espiro e pela eplerenona (KRUG et al., 2003; LIANG et al., 2011). Contudo, o antagonismo ao GR não foi considerado nessas pesquisas.

Estudos que contribuam para o entendimento da disfunção renal progressiva, induzida pela Aldo, corroboram para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que poderão retardar – ou até mesmo impedir - a progressão desta doença.

Figura 3: Mecanismo de indução de lesão renal pela Aldo. A Aldo se liga ao MR citoplasmático resultando em transativação do EGFR, que ativa a via de sinalização Ras (MAP quinases). A ativação de Ras ativa a via ERK1/2 que leva a produção de genes responsáveis pela indução da lesão tecidual nos rins (Modificado de HUANG et al., 2012).

3 HIPÓTESE

Em um projeto piloto, evidenciamos que a Aldo aumentou a fosforilação do EGFR e da ERK1/2 no tecido renal de ratos (*in vivo*), após 30 minutos de exposição (PANDOLFI et al., 2015). Considerando, também, que vários autores correlacionaram a ativação rápida do EGFR e da ERK1/2 com ações tardias e patológicas da Aldo, que incluem: a indução de fibrose túbulo-intersticial, a proliferação e a injúria de células mesangiais glomerulares (BROWN et al., 2013; NISHIYAMA et al., 2005; RAFIQ et al., 2011), a hipótese desse estudo é que o tratamento hormonal estendido por 21 dias poderia causar alterações na função e na morfometria renal, aliadas à fosforilação do EGFR e da ERK1/2.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento com a Aldo, por 21 dias, sobre a função e a morfologia renal, procurando correlacionar as alterações com a expressão de proteínas, possivelmente, envolvidas com o mecanismo de lesão renal induzido pela Aldo.

4.2 Objetivos específicos

Neste contexto, os objetivos específicos deste projeto foram:

- Avaliar parâmetros bioquímicos e urinários, para o estudo da função renal em ratos;
- Comparar os valores iniciais e finais da pressão arterial;
- Estudar a expressão e a co-localização das proteínas EGFR e ERK1/2 fosforiladas no rim e
- Verificar a ocorrência de alterações morfológicas (lesões) no parênquima renal.
- Além disso, estudar também os efeitos do antagonismo aos receptores da Aldo (MR e GR) nesses processos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos, *Wistar*, com peso entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Central de Criação e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-I). Os ratos foram acondicionados em caixas apropriadas (máximo de 5 animais por caixa), com livre acesso a água e a ração, em temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo: 03304/03).

5.2 Anestesia

Para promover anestesia e analgesia nos ratos, para a colheita de sangue e realização dos procedimentos cirúrgicos, aplicou-se a associação de Tiletamina/Zolazepam (20-40 mg/kg) + Xilazina (5-10 mg/kg) (WILSON; ZAGON; LARACH, 1993), por via intramuscular. Após a comprovação da ausência de respostas de estímulos dolorosos, por meio de pinçamento interdigital e da base da cauda, foi dado início aos procedimentos experimentais.

5.3 Análises bioquímicas (plasma e urina)

Com os ratos devidamente anestesiados, as amostras de sangue foram obtidas a partir da punção da veia cava abdominal, utilizando uma seringa acoplada a uma agulha de largo calibre, para evitar a hemólise, durante a coleta. As amostras foram colocadas em microtubos e após a centrifugação, o plasma foi aspirado e congelado a -20 °C.

As amostras de urina de 24 horas (alíquotas de 2 mL) foram aspiradas do coletor de urina acoplado à gaiola metabólica.

A determinação das concentrações iônicas foi feita com o uso do equipamento 9180 *Electrolyte Analyzer*® (Roche, Mannheim, Germany), que possui um eletrodo de vidro e um eletrodo de membrana líquida, específicos para Na⁺ e K⁺. As concentrações de creatinina e de proteínas totais foram obtidas por teste colorimétrico e espectrofotometria (TP *Analyzer Plus Thermo Plate*® (Thermoplate, China)), utilizando-se, respectivamente, os reagentes picrato

alcalino (Creatinina K – Labtest® (Diagnóstica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), leitura em 510nm) e vermelho de piragalol (Sensiprot - Labtest®, leitura em 600nm).

Para a dosagem de: creatinina, proteína e K^+ , as amostras de urina foram diluídas nas seguintes proporções: 1:20, 1:4 e 1:10.

5.4 Protocolos experimentais

5.4.1 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos, e tratados por 21 dias de acordo com os protocolos a seguir:

- Sham: submetidos à cirurgia fictícia para a implantação de minibombas osmóticas;
- Aldosterona (Aldo, SIGMA® (Sigma, St Louis, MO, EUA)): que recebeu 150 μ /kg de Aldo (SINPHITUKKUL et al., 2011);
- Espironolactona (Espiro, PFIZER® (Pfizer SRL, Buenos Aires, Argentina)): que recebeu 20 mg/kg de Espiro (BARRERA-CHIMAL; BOBADILLA, 2012);
- Aldo e Espiro (AldoE): que recebeu 150 μ /kg de Aldo e 20 mg/kg de Espiro;
- RU 486 (RU, SIGMA®): que recebeu 1 mg/kg de RU (CASTAGLIUOLO et al., 2001);
- Aldo e RU (AldoR,): que recebeu 150 μ /kg de Aldo e 1 mg/kg de RU.

5.4.2 Administração dos tratamentos

Os grupos experimentais descritos no tópico 5.4.1 foram realizados por um período contínuo de 21 dias.

Para a infusão de Aldo (0,10 μ g/kg/min, totalizando 150 μ g/kg/dia) e de RU (0,69 μ g/kg/min, totalizando 1mg/kg/dia), foram implantadas minibombas osmóticas (Alzet, modelo 2004 e 2M® (Alza, Palo Alto, CA, EUA), respectivamente), no tecido subcutâneo cervical dorsal, sob anestesia.

A Espiro foi administrada na água de bebida, na dose de 20mg/kg/dia. No tratamento do grupo AldoR foram associadas duas minibombas, uma contendo Aldo e a outra contendo RU. No grupo AldoE foi implantada uma minibomba, contendo Aldo, e a Espiro foi administrada na água de bebida. Nos grupos Espiro e Sham (situação controle), os animais também foram submetidos à cirurgia fictícia, porém sem a implantação da minibomba.

Após 21 dias de tratamento, os ratos foram anestesiados para a colheita de sangue e a realização da nefrectomia bilateral total. As minibombas foram removidas para a avaliação do volume residual dos fármacos.

5.4.3 Mensuração da pressão arterial

A mensuração da pressão arterial foi feita de maneira indireta, sem anestesia, por meio da pletismografia de cauda (PC) (BP-2000-MR-4, *Visitech Systems*® (Visitech Systems Inc., Cary, NC, EUA)). Os ratos foram cuidadosamente manuseados (para que entrassem no sistema de contenção) e depois foram aquecidos. O esfigmomanômetro e o sensor foram colocados no terço médio da cauda. Foram feitas 25 aferições seriadas dos valores máximos da pressão obtida na cauda (PC), para a determinação do valor médio da PC de cada rato (MACHADO; GUERRA; PETERS, 2010). As mensurações da PC foram feitas antes do início e ao final dos 21 dias de tratamento.

5.4.4 Gaiola Metabólica

Para a obtenção do volume de urina de 24 horas, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas (*Tecniplast, Buguggiate*® (Buguggiate, Varese, Italy)). Além do volume de urina produzido, também foram mensurados: o consumo de água (por meio da diferença do volume de água disponibilizado para cada animal e o volume residual) e o consumo de alimento (determinado pela diferença da massa da ração inicial e a residual), após 24 horas. O consumo de ração e de água foram corrigidos para cada 100g de peso corpóreo e depois representados como g/100g de peso/dia e ml/100g de peso/dia, respectivamente. Esses parâmetros, assim como colheita de sangue, foram obtidos após os 21 dias de tratamento.

Os ratos foram pesados em balança semi-analítica milesimal (Quimis 6441) (dia 0 e após 21 dias).

5.5 Estudos com *Western blot* para determinação da expressão das proteínas ERK1/2 e da EGFR no tecido renal

5.5.1 Preparo das amostras

Os rins foram transferidos para uma placa de Petri, acondicionada em um recipiente com gelo e contendo uma solução de PBS gelada e acrescida de um *cocktail* de inibidores de

proteases (SIGMA®) e de inibidores de fosfatases [ortovanadato de sódio (10 mM), pirofosfato de sódio (10 mM) e fluoreto de sódio (100 mM)]. Esta solução foi utilizada no procedimento de extração das proteínas do córtex e da medula renal. A composição do *cocktail* de inibidores de proteases é descrita a seguir:

- AEBSF – [4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride] (2 mM): inibidor de serinas proteases;
- Aprotinina (0,3 µM): inibidor de serinas proteases;
- Bestatina (130 µM): inibidor de aminopeptidases;
- E-64 – [N-(trans-Epoxy succinyl) -L-leucine 4-guanidinobutylamide] (14 µM): inibidor de cisteínas proteases;
- EDTA [ácido etilenodiamino tetra-acético] (1 mM): inibidor de metaloproteases;
- Leupeptina (1 µM): inibidor de serinas e cisteínas proteases (*Cocktail* de inibidores de proteases, SIGMA®).

Uma vez imersos na solução de extração das proteínas, os rins foram seccionados longitudinalmente, para separação e fragmentação do córtex e da medula. Os fragmentos de córtex e de medula foram homogeneizados (*Dounce Homogenizer*), separadamente, em solução de extração de proteínas (na proporção de 1g de tecido para 2 mL da solução) e, em seguida, centrifugados (a 4 °C e 4 mil rotações/min, durante 10 min). O sobrenadante, correspondente ao córtex e a medula renal, foi separado em alíquotas e depois armazenado em freezer (-80° C), para posterior determinação da concentração total de proteínas e a realização da técnica de *Western blot*.

5.5.2 Determinação da concentração total de proteína de cada amostra

A concentração de proteínas do córtex e da medula renal foi feita com base na curva padrão de albumina e o método BCA (EGUTI et al., 2010). As amostras foram diluídas e distribuídas com os reagentes Bicinchoninic (SIGMA®) e Coper sulfato (SIGMA®) (BCA) em uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância (em 570 nm) e o cálculo da concentração proteica foram feitos no leitor de microplacas *Labsystems Multiskan MS*®.

Após a quantificação proteica, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Bio-rad®) e 2-mercaptoetanol (Amresco®), de forma a deixar todas as alíquotas que foram aplicadas no gel com a mesma concentração de proteínas (30µg/µL) e facilitar a migração eletroforética.

5.5.3 Técnica de Western Blotting

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, usando o gel de poliacrilamida 9%, de acordo com o método de Laemmli (1970). As proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e, para bloquear ligações não específicas, as membranas de PVDF foram incubadas com a solução de bloqueio 3% (leite ou BSA). Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários: anti-EGFR total e anti-EGFR fosforilado (p Tyr1068), produzidos em coelho (*Cell Signaling Technology*®); anti-ERK1/ERK2 total (R&D Systems®), produzido em camundongo; anti-ERK1/2 fosforilada [PHOSPHO-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187) (R&D Systems®)], produzido em coelho e anti- α -actina (*Novus biologicals*®), produzido em camundongo e, posteriormente, com os anticorpos secundários: IgG anti-coelho (R&D Systems®) e IgG anti-camundongo (SIGMA®). A ligação com os anticorpos foi detectada com *ECL-Plus Western blotting detection system* (GE Healthcare®). As bandas foram visualizadas e quantificadas pelo sistema *C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences®). Os experimentos foram feitos, no mínimo, em triplicata.

5.5.4 Quantificação relativa do EGFR fosforilado e da ERK1/2 fosforilada

Os valores da quantificação corresponderam à razão entre o EGFR fosforilado e o total e entre a ERK1/2 fosforilada e a total de cada amostra. A quantificação relativa foi apresentada em relação ao controle.

5.6 Análise da função renal

O fluxo urinário (V) foi calculado pela fórmula $V = \text{volume total de urina (em ml)} / \text{tempo (min)}$ (1).

A carga excretada (CE_x) de uma substância, foi obtida multiplicando-se o fluxo urinário (V) pela concentração urinária (U_x) desta substância, como mostra a equação: $CE = V \times U_x$ (2). A CE foi corrigida pelo peso corporal e apresentada para cada 100g.

A fração de excreção (FE, em %) de Na^+ e de K^+ , foi determinada pela relação entre a carga filtrada (CF) e a CE de cada íon, segundo a fórmula: $FE = CF/CE$ (3).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado utilizando-se a depuração plasmática de creatinina (*clearance* de creatinina, Ccr), obtida por multiplicação do fluxo urinário (V), e concentração urinária de creatinina (U_{creat}) e dividida pela concentração plasmática de creatinina (P_{creat}), como descrito na equação: $Ccr = V \cdot U_{\text{creat}} / P_{\text{creat}}$ (4). O Ccr foi corrigido pelo peso corporal e apresentado para cada 100g (mL/min/100g).

5.7 Obtenção do tecido para o histopatológico

Ao final dos tratamentos, os ratos foram anestesiados e submetidos à laparotomia mediana, para visualização dos rins; em seguida o gradil costal foi removido, para a exposição do coração e uma agulha de tamanho 18G, previamente passada em um esmeril, foi fixada ao ventrículo esquerdo (Figura 4 a e b) e ligada à bomba peristáltica (Masterflex L/S TM®) (Figura 4 c). A veia cava abdominal foi seccionada, após o acionamento da bomba, para a perfusão dos rins em “*in situ*”, primeiramente com uma solução tampão de fosfato salino (PBS – NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl 0,9%, pH7.4), a 37 °C e, posteriormente, com uma solução de formalina tamponada 10% (NaH_2PO_4 Na_2HPO_4 , formaldeído 16% e água destilada).

Após a perfusão, os rins foram retirados, depois seccionados em 2 ou 3 segmentos coronais e mantidos na mesma solução de formalina usada para a perfusão, por 24 horas. Após esse período, os fragmentos foram acondicionados em solução alcoólica a 70%, para posterior processamento em parafina, obtendo-se cortes (3-4 μm de espessura) para realização de análise histológica.

Figura 4: Ilustração da metodologia para perfusão de tecidos e obtenção de amostras para estudos histopatológicos. Descrição da figura ao longo do texto. (GAGE; KIPKE; SHAIN, 2012)

5.8 Análises Histopatológicas

Para análise histopatológica, os cortes renais foram corados com Tricrômico de Masson. O Masson é um tricrômico, ou seja, as estruturas são demonstradas em três cores: núcleos em violeta (hematoxilina); o citoplasma em vermelho (fucsina ácida) e colágeno em azul (azul de anilina) (STREET et al., 2014).

Para o cálculo da porcentagem da área túbulo-intersticial, os cortes histológicos foram avaliados por meio de microscopia ótica onde as imagens obtidas pela câmera *AxionCam MRc*, acoplada ao microscópio óptico *Axio Vert.A1* (Zeiss®) (200X, 50 μm) foram analisadas por um programa de morfometria computacional (*AxioVision*, Zeiss®) e a área intersticial foi cuidadosamente contornada (manualmente), para a determinação da sua porcentagem (em relação ao campo óptico), excluindo-se a área glomerular (Figura 5A). Estas análises foram feitas com a colaboração do Professor Dr. Rildo Volpini (Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM/12) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

A área glomerular foi determinada a partir de imagens obtidas pela câmera *AxionCam MRc*, acoplada ao microscópio óptico *Axio Vert.A1* (Zeiss®) (200X, 50 μm). As bordas externas de 50 tufo capilares glomerulares (por animal) foram delimitadas manualmente, como demonstrado na Figura 5B, e o cálculo feito pelo *software Zen 2 lite* (Zeiss®).

Figura 5: Figura representativa da delimitação da área intersticial e da área glomerular. A área intersticial (**A**) e as bordas externas do tufo capilar glomerular (**B**) foram delimitadas manualmente (linha amarela) (200 X, 50 μm). No exemplo, área glomerular = 5027 μ^2 .

5.9 Imuno-histoquímica

As análises imuno-histoquímicas foram feitas em cortes histológicos (2 a 3 μm de espessura) desparafinizados e hidratados, por meio de sucessivas lavagens em xilol e etanol, respectivamente. Foram utilizados os mesmos anticorpos primários empregados na técnica de *Western blott*: [anti EGFR (Tyr 1068) (*Cell Signaling Technology*®) e anti ERK 1/2 (Thr202 / Tyr204) (R&D Systems®)], seguindo os protocolos dos fabricantes. A fase de recuperação dos antígenos foi feita em panela a vapor (*steamer*, a 95 °C, por 20 min). O bloqueio de antígenos inespecíficos foi realizado com leite desnatado 5%. Para incubação do anticorpo secundário utilizou-se o *kit* Dako (LSAB+ *System-HRP*®), seguido de aplicação do cromógeno Diaminobenzidina (DAB). As amostras de controle negativo tiveram os mesmos tratamentos que as amostras positivas, com exceção do anticorpo primário, que foi substituído por IgG de coelho. A contra coloração foi realizada com hematoxilina. Os cortes histológicos foram avaliados de acordo com a intensidade da coloração e o envolvimento das estruturas glomerulares, tubulares e vasculares, sendo: 0 = negativo (não reativo), 1 = traços (coloração levemente amarronzada), 2 = fraco (coloração castanho claro), 3 = moderado (coloração castanho escuro) e 4 = forte (coloração quase enegrecida) (SINPHITUKKUL et al., 2011).

5.10 Análise dos resultados

Os valores médios foram apresentados com seus respectivos erros padrão, para a realização da análise estatística. As comparações estatísticas múltiplas foram feitas pelo teste *Bonferroni*, utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5.0 1) e considerando significativos os valores de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito da Aldo e/ou RU ou Espiro sobre os parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos: consumo de ração, consumo de água, fluxo urinário e peso, após 21 dias de tratamento, estão descritos na Tabela 1. Avaliando-se a média total do período, não houve diferença dos grupos tratados, em relação à situação controle.

Tabela 1: Parâmetros Fisiológicos.

Parâmetros	Sham (n=8)	RU (n=8)	Espiro (n=8)	Aldo (n=8)	AldoR (n=8)	AldoE (n=8)
Consumo de Ração	4,06 ± 0,2	4,90 ± 0,4	4,74 ± 0,3	5,26 ± 0,6	5,68 ± 0,3	5,63 ± 0,6
Consumo de água	9,99 ± 0,7	10,33 ± 0,7	9,70 ± 0,7	10,90 ± 0,9	10,78 ± 1,0	10,09 ± 0,2
Fluxo urinário	0,003 ± 0,0	0,004 ± 0,0	0,003 ± 0,0	0,003 ± 0,0	0,004 ± 0,0	0,003 ± 0,0
Peso Inicial	269 ± 10,9	250 ± 14,0	266 ± 12,5	247 ± 11,0	242 ± 15,4	248 ± 14,2
Peso Final	363 ± 8,7	357 ± 8,6	349 ± 7,9	365 ± 7,6	333 ± 12,6	357 ± 9,5

Valores apresentados como médias ± erro padrão. n = número de animais. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. Consumo de ração = g/100g de peso/dia. Consumo de água = mL/100 g de peso/dia. Fluxo urinário = mL/min/100 g de peso.

Os valores médios da pressão arterial de cauda (PC) são apresentados na Tabela 2. Não foram verificadas diferenças entres os grupos, comparando-se os períodos inicial e final dos diferentes tratamentos.

Tabela 2: Pressão Arterial máxima de cauda aos 0 e 21 dias de tratamento.

Parâmetros	Sham (n=8)	RU (n=8)	Espiro (n=8)	Aldo (n=8)	AldoR (n=8)	AldoE (n=8)
PC Inicial (mm Hg)	107,3 ± 5,9	106,7 ± 1,8	101,8 ± 2,0	109,4 ± 3,2	106,0 ± 1,9	109,3 ± 4,2
PC Final (mm Hg)	107,0 ± 5,0	106,1 ± 1,8	101,8 ± 1,5	111,1 ± 3,2	108,6 ± 2,1	107,3 ± 4,7

Valores apresentados como médias ± erro padrão. n = número de animais. PC = pressão arterial de cauda. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona.

6.2 Efeito da Aldo e/ou RU ou Espiro sobre os parâmetros bioquímicos plasmáticos

Fazendo a comparação entre os grupos, ao final dos 21 dias, nenhum tratamento alterou as concentrações plasmáticas de sódio e de potássio, em relação à situação controle; no entanto, foi possível observar, no grupo Espiro, uma tendência ao aumento da concentração do potássio

plasmático, em comparação ao grupo Sham ($P=0,06$). No grupo tratado com Aldo, verificou-se uma tendência ao efeito inverso, ou seja, uma diminuição da concentração do potássio plasmático, em relação ao grupo Sham ($P=0,08$). Esses resultados são descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros plasmáticos, após 21 dias de tratamento.

Parâmetros	Sham (n=8)	RU (n=8)	Espiro (n=8)	Aldo (n=8)	AldoR (n=8)	AldoE (n=8)
Creatinina (mg/dL)	$0,58 \pm 0,0$	$0,54 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,55 \pm 0,0$	$0,64 \pm 0,0$	$0,63 \pm 0,0$
Na⁺ (mEq/L)	$137,6 \pm 1,7$	$136,7 \pm 2,1$	$137,9 \pm 1,3$	$136,3 \pm 2,5$	$133,8 \pm 2,1$	$137,7 \pm 2,0$
K⁺ (mEq/L)	$4,45 \pm 0,1$	$4,63 \pm 0,1$	$4,86 \pm 0,1$	$4,10 \pm 0,1$	$4,18 \pm 0,1$	$4,27 \pm 0,1$

Valores apresentados como médias $\pm$ erro padrão. n = número de animais. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona.

6.3 Efeito da Aldo e/ou RU ou Espiro sobre a função renal

Os valores médios dos marcadores de função renal, avaliados ao final dos 21 dias de tratamento, constam da Tabela 4.

Fazendo a comparação entre os grupos, não houve diferença na carga excretada (CE) e na fração de excreção (FE) de sódio. No grupo Espiro, a CE e a FE de potássio foram inferiores aos valores do grupo Sham (Figura 6).

Figura 6: Valores médios de carga excretada (A) e da fração de excreção (B) de potássio, ao final dos tratamentos. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. * $P < 0,05$ vs. grupo Sham.

Observou-se um aumento do valor médio do *clearance* de creatinina no grupo RU, em comparação com a situação controle (Figura 7).

Figura 7: Valores médios do *clearance* de creatinina ao final dos tratamentos. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo controle.

Tabela 4: Valores médios de *clearance* de creatinina, carga excretada (CE) e fração de excreção (FE), após os tratamentos.

Parâmetros	Sham (n=8)	Aldo (n=8)	RU (n=8)	Espiro (n=8)	AldoR (n=8)	AldoE (n=8)
Clearance de Creatinina (ml/min/100g)	0,31 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,44 ± 0,0*	0,37 ± 0,0	0,30 ± 0,0	0,35 ± 0,0
CE Na⁺ (mEq/min/100g)	0,18 ± 0,0	0,20 ± 0,0	0,23 ± 0,0	0,17 ± 0,0	0,23 ± 0,0	0,18 ± 0,0
CE K⁺ (mEq/min/100g)	0,72 ± 0,0	0,90 ± 0,0	0,89 ± 0,1	0,49 ± 0,0*	0,94 ± 0,0	0,75 ± 0,1
CE Prot. (mg/min/100g)	0,003 ± 0,0	0,002 ± 0,0	0,002 ± 0,0	0,002 ± 0,0	0,002 ± 0,0	0,002 ± 0,0
FE Na⁺ (%)	0,45 ± 0,0	0,36 ± 0,0	0,35 ± 0,0	0,49 ± 0,0	0,52 ± 0,0	0,42 ± 0,0
FE K⁺ (%)	57,74 ± 7,5	52,88 ± 7,1	61,98 ± 5,7	30,50 ± 4,3*	65,17 ± 5,4	53,51 ± 5,6

Valores apresentados como médias ± erro padrão. n = número de animais. RU = RU486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham.

6.4 Expressão do EGFR fosforilado em córtex e medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento

No córtex e na medula renal de ratos, a Aldo foi capaz de aumentar a expressão do EGFR fosforilado em 29% e em 48%, respectivamente, em comparação ao grupo Sham. O RU e a Espiro, sozinhos, não reproduziram o mesmo efeito; no entanto, em ambas as regiões renais, esses fármacos foram capazes de inibir o efeito estimulatório da Aldo sobre expressão do EGFR fosforilado. Esses resultados são exemplificados nas Figuras 8 e 9, pelo aumento da intensidade da banda do EGFR fosforilado, somente no tratamento com Aldo, no córtex e na medula renal.

Os valores da quantificação relativa, referente à expressão do EGFR fosforilado são descritos na Tabela 6.

Figura 8: Efeito da Aldo sobre a expressão do EGFR fosforilado em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A)** imagem representativa do *imunoblot*. **B)** respectiva análise densitométrica da razão entre o EGFR fosforilado e o EGFR total (apresentada em relação ao controle). RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona. N=6.

Figura 9: Efeito da Aldo sobre a expressão do EGFR fosforilado em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A)** imagem representativa do *imunoblot*. **B)** respectiva análise densitométrica da razão entre o EGFR fosforilado e o EGFR total (apresentada em relação ao controle). RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona. N=6

Tabela 5: Expressão normalizada e relativa da proteína EGFR fosforilada em córtex e medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento.

Densidade normalizada EGFR fosforilado dos tratamentos / Densidade normalizada EGFR fosforilado do controle			N
Grupos			
Córtex			
Controle	1,00 ± 0,00		6
Aldo 150 µg/Kg	1,29 ± 0,07 *		6
RU 486 1mg/Kg	0,99 ± 0,13		6
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,87 ± 0,09 &		6
Espiro 80 mg/Kg	0,90 ± 0,06		6
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,69 ± 0,10 &		6
Medula			
Controle	1,00 ± 0,00		6
Aldo 150 µg/Kg	1,48 ± 0,21 *		6
RU 486 1mg/Kg	1,14 ± 0,12		6
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,44 ± 0,02 &		6
Espiro 80 mg/Kg	1,02 ± 0,13		6
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,79 ± 0,05 &		6

Os valores são apresentados como médias ± erro padrão. N = número de amostras biológicas analisadas (em triplicata). Aldo = aldosterona. Espiro = espironolactona. A normalização foi feita pela densidade da banda da proteína EGFR total. *P < 0,05 vs. grupo Sham &P < 0,05 vs. grupo aldosterona.

6.5 Expressão da ERK1/2 fosforilada em córtex e medula de rim de rato após 21 dias de tratamento

Verificou-se que, tanto no córtex (Figura 10), quanto na medula (Figura 11) renal de ratos, a Aldo aumentou a expressão da ERK1/2 fosforilada em 97% e em 260%, respectivamente, em comparação ao grupo Sham. O RU e a Espiro, sozinhos, não alteraram a expressão da ERK1/2 fosforilada; no entanto, em ambas as regiões renais, inibiram o efeito estimulatório da Aldo sobre a expressão dessa proteína.

Os valores da quantificação relativa, referente à expressão da ERK1/2 fosforilada são descritos na Tabela 6.

Figura 10: Efeito da Aldo sobre a expressão da ERK1/2 fosforilada em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A)** imagem representativa do *imunoblot*. **B)** respectiva análise densitométrica da razão entre a ERK 1/2 fosforilada e a ERK 1/2 total (apresentada em relação ao controle). RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona. N=6.

Figura 11: Efeito da Aldo sobre a expressão da ERK1/2 fosforilada em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A)** imagem representativa do *imunoblot*. **B)** respectiva análise densitométrica da razão entre a ERK 1/2 fosforilada e a ERK 1/2 total (apresentada em relação ao controle). RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona. N=6.

Tabela 6: Expressão normalizada e relativa da proteína ERK1/2 fosforilada em córtex e medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento.

Densidade normalizada ERK1/2 fosforilada dos tratamentos / Densidade normalizada ERK1/2 fosforilada do controle			N
Grupos			
Córtex			
Controle	1,00 ± 0,00		6
Aldo 150 µg/Kg	1,97 ± 0,39 *		6
RU 486 1mg/Kg	0,87 ± 0,11		6
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,86 ± 0,18 &		6
Espiro 80 mg/Kg	1,10 ± 0,15		6
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,84 ± 0,09&		6
Medula			
Controle	1,00 ± 0,00		6
Aldo 150 µg/Kg	2,60 ± 0,47 *		6
RU 486 1mg/Kg	1,03 ± 0,14		6
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	1,33 ± 0,28 &		6
Espiro 80 mg/Kg	1,26 ± 0,31		6
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,89 ± 0,19 &		6

Valores apresentados como médias ± erro padrão. N = número de amostras biológicas analisadas (em triplicata). Aldo = aldosterona. Espiro = espironolactona. A normalização foi feita pela densidade da banda da proteína ERK1/2 total. *P < 0,05 vs. grupo Sham. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona.

6.6 Área glomerular

Comparando-se os resultados, observou-se um aumento na área glomerular nos grupos Aldo, AldoR e AldoE, em relação aos seus respectivos controles (Tabela 7). Essa alteração é ilustrada na Figura 12.

Tabela 7: Valores médios da área glomerular, após 21 de tratamento.

Parâmetros	Sham (n=8)	RU (n=8)	Espiro (n=8)	Aldo (n=8)	AldoR (n=8)	AldoE (n=8)
Área Glomerular (µm²)	4468 ± 170	4361 ± 81	4328 ± 121	5694 ± 198*	5270 ± 128*#	5218 ± 120*&

Os valores são apresentados como médias ± erro padrão. n = número de animais. RU = RU486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR= aldosterona + RU486. AldoE = aldosterona + espironolactona. *P < 0.05 vs. grupo Sham. #P < 0.05 vs. grupo RU. &P < 0.001 vs. grupo Espiro.

Figura 12: Área glomerular. **A)** Figura representativa dos glomérulos, em cortes transversais de rim de rato (200X, 50 μm) e **B)** representação gráfica dos valores médios da área glomerular, após os 21 dias de tratamento. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0.005 vs. grupo Sham. #P < 0.005 vs. grupo RU. &P < 0.001 vs. grupo Espiro.

6.7 Análise da Área Intersticial

O tratamento com Aldo aumentou em 90% a área intersticial no córtex renal, em comparação à situação controle. Os grupos AldoR e AldoE também apresentaram um aumento na porcentagem da área intersticial, em relação ao grupo Sham e seus respectivos controles, porém foram capazes de reduzir o efeito da Aldo, conforme apresentado na Figura 13 e na Tabela 8.

Figura 13: Análise da área intersticial. **A)** Figura representativa do interstício cortical, em cortes transversais de rim de rato (200X, 50 µm) e **B)** representação gráfica dos valores médios da área intersticial, após 21 dias de tratamento. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. AldoR = aldosterona e RU 486. Aldo = aldosterona. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0.001 vs. grupo Sham. #P < 0.001 vs. grupo RU. &P < 0.001 vs. grupo Espiro. \$P < 0.001 vs. grupo Aldo.

Tabela 8: Valores médios da porcentagem da área intersticial em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento.

Parâmetros	Sham (n=8)	RU (n=8)	Espiro (n=8)	Aldo (n=8)	AldoR (n=8)	AldoE (n=8)
Área Intersticial (%)	10,6 ± 0,1	10,0 ± 0,4	10,6 ± 0,3	19,0 ± 0,3*	11,8 ± 0,1*#	12,8 ± 0,4*#&

Os valores são apresentados como médias ± erro padrão. N = número de animais. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0.001 vs. grupo Sham. #P < 0.001 vs. grupo RU. &P < 0.001 vs. grupo Espiro. \$P < 0.001 vs. grupo Aldo.

6.8 Expressão e co-localização do EGFR fosforilado em tecido renal, por marcação imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica para o EGFR fosforilado foi fraca (*score* de 0 a 1), ocorrendo principalmente nos túbulos proximais, na alça de Henle e nos ductos coletores. Os tratamentos com RU e Espiro sozinhos não aumentaram a marcação para o EGFR fosforilado, em todas as regiões renais; enquanto que o tratamento com Aldo aumentou essa marcação no córtex (Figura 14), na região medular externa (zona externa) e região medular interna (Figura 15). O efeito hormonal foi reduzido ou abolido pelo tratamento concomitante com a Espiro (Figuras 14 e 15, Tabela 9).

Figura 14: Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica do EGFR fosforilado em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A)** imagem representativa da marcação imuno-histoquímica. **B)** respectiva análise da intensidade de coloração (*score*). Neg. = controle negativo. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham. α P < 0,05 vs. grupo espironolactona. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona. N=4.

Figura 15: Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica do EGFR fosforilado em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A e B:** imagem representativa da marcação imuno-histoquímica. **C e D:** respectiva análise da intensidade de coloração (*score*). Neg. = controle negativo. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo Sham. #P < 0,05 vs. grupo RU 486. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona. N=4.

Tabela 9: Intensidade da marcação imuno-histoquímica (*score*) para a proteína EGFR fosforilado em de rim de rato, após 21 dias de tratamento.

Grupos	Valores médios para a intensidade da marcação imuno-histoquímica	N
Córtex		
Controle	0,33 ± 0,06	4
Aldo 150 µg/Kg	0,75 ± 0,14 *	4
RU 486 1mg/Kg	0,27 ± 0,02 &	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,52 ± 0,05 #	4
Espiro 80 mg/Kg	0,15 ± 0,05 &	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,34 ± 0,05 ^α &	4
Medula externa – zona externa		
Controle	0,15 ± 0,07	4
Aldo 150 µg/Kg	0,54 ± 0,11*	4
RU 486 1mg/Kg	0,13 ± 0,05 &	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,42 ± 0,08 #	4
Espiro 80 mg/Kg	0,08 ± 0,06 &	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,12 ± 0,04 &	4
Medula externa – zona interna		
Controle	0,40 ± 0,15	4
Aldo 150 µg/Kg	0,19 ± 0,12	4
RU 486 1mg/Kg	0,08 ± 0,03	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,27 ± 0,09	4
Espiro 80 mg/Kg	0,10 ± 0,08	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,04 ± 0,04	4
Medula interna		
Controle	0,06 ± 0,04	4
Aldo 150 µg/Kg	0,46 ± 0,14 *	4
RU 486 1mg/Kg	0,02 ± 0,02 &	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,23 ± 0,09 #	4
Espiro 80 mg/Kg	0,02 ± 0,02 &	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,02 ± 0,02 &	4

Os valores são apresentados como médias ± erro padrão. N = número de amostras biológicas analisadas (em duplicata). Aldo = aldosterona. Espiro = espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo controle. #P < 0,01 vs. grupo RU. ^αP < 0,05 vs. grupo espiro. &P < 0,05 vs. grupo aldosterona.

6.9 Expressão e co-localização da ERK1/2 em tecido renal, por marcação imuno histoquímica

A marcação imuno-histoquímica para a ERK fosforilada foi de fraca a moderada (*score* de 1 a 2), ocorrendo principalmente nos glomérulos, na alça de Henle e nos ductos coletores. Os tratamentos com RU e Espiro sozinhos não aumentaram, estatisticamente, a marcação para a ERK fosforilada nas regiões renais. O tratamento com Aldo aumentou essa marcação somente no córtex (Figura 16). Na região medular externa (zona externa e interna), observou-se uma tendência para o aumento da marcação para ERK fosforilada, mediante o tratamento com Aldo (P=0,10 e P=0,07, respectivamente), em comparação ao grupo Sham (Figura 17). No córtex, o efeito hormonal foi abolido pelo tratamento concomitante com o RU e a Espiro. Porém, na

medula, o efeito hormonal foi parcialmente reduzido pelo tratamento concomitante com a Espiro ($P > 0,067$) (Figuras 16 e 17, Tabela 10).

Figura 16: Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica da ERK1/2 fosforilada em córtex de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A)** imagem representativa da marcação imuno-histoquímica. **B)** respectiva análise da intensidade de coloração (*score*). Neg. = controle negativo. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. * $P < 0,05$ vs. grupo Sham. & $P < 0,05$ vs. grupo aldosterona. N=4.

Figura 17: Efeito da Aldo sobre a marcação imuno-histoquímica da ERK1/2 fosforilada em medula de rim de rato, após 21 dias de tratamento. **A e B:** imagem representativa da marcação imuno-histoquímica. **C e D:** respectiva análise da intensidade de coloração (*score*). Neg. = controle negativo. RU = RU 486. Espiro = espironolactona. Aldo = aldosterona. AldoR = aldosterona e RU 486. AldoE = aldosterona e espironolactona. N=4.

Tabela 10: Intensidade da marcação imuno-histoquímica (*score*) para a proteína ERK1/2 fosforilada em de rim de rato, após 21 dias de tratamento.

Grupos	Valores médios para a intensidade da marcação imuno-histoquímica	N
Córtex		
Controle	0,92 ± 0,11	4
Aldo 150 µg/Kg	1,79 ± 0,33 *	4
RU 486 1mg/Kg	0,75 ± 0,11^{&}	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,96 ± 0,10^{&}	4
Espiro 80 mg/Kg	1,04 ± 0,20	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,96 ± 0,04^{&}	4
Medula externa – zona externa		
Controle	0,42 ± 0,08	4
Aldo 150 µg/Kg	0,63 ± 0,08	4
RU 486 1mg/Kg	0,42 ± 0,22	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,71 ± 0,10	4
Espiro 80 mg/Kg	0,52 ± 0,11	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,40 ± 0,11	4
Medula externa – zona interna		
Controle	0,27 ± 0,10	4
Aldo 150 µg/Kg	0,63 ± 0,13	4
RU 486 1mg/Kg	0,56 ± 0,17	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,67 ± 0,12	4
Espiro 80 mg/Kg	0,44 ± 0,11	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,31 ± 0,06	4
Medula interna		
Controle	0,23 ± 0,05	4
Aldo 150 µg/Kg	0,34 ± 0,08	4
RU 486 1mg/Kg	0,08 ± 0,06	4
RU 486 1mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,93 ± 0,09[#]	4
Espiro 80 mg/Kg	0,27 ± 0,07	4
Espiro 80 mg/Kg + Aldo 150 µg/Kg	0,21 ± 0,02	4

Os valores são apresentados como médias ± erro padrão. N = número de amostras biológicas analisadas (em duplicata). Aldo = aldosterona. Espiro = espironolactona. *P < 0,05 vs. grupo controle. [&]P < 0,05 vs. grupo aldosterona. [#]P < 0,001 vs. grupos controle, RU, espiro, aldosterona, aldosterona e espiro.

7 DISCUSSÃO

7.1 Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos plasmáticos

Os tratamentos não alteraram o consumo de ração dos ratos (Tabela 1), mas foi possível observar a seguinte tendência: os grupos com o peso médio inicial menor (grupos Aldo, AldoR e AldoE) apresentaram maior consumo médio de ração no período, não gerando diferenças entre os grupos, em relação ao peso médio final.

Os valores médios do consumo de água e do fluxo urinário também não diferiram entre os grupos (Tabela 1), mesmo naqueles que receberam a espironolactona (Espiro; um antagonista do receptor da Aldo, capaz de aumentar a excreção urinária de sódio e, consequentemente, de água). Nos primeiros 7 dias, o volume de urina dos ratos tratados com a Espiro foi visivelmente maior; no entanto, os animais só foram colocados nas gaiolas metabólicas (para a colheita de urina de 24h e posterior determinação do fluxo urinário) no 21º dia, momento no qual não se confirmou a diurese. De acordo com alguns autores, os efeitos da Espiro sobre a diurese e a natriurese podem variar com a dose utilizada. Jeunesse et al. (2007) não observaram os efeitos diuréticos da Espiro em cães, mesmo após a administração de doses crescentes deste fármaco.

Não foram observadas diferenças na PA (Tabela 2) e nas concentrações plasmáticas de creatinina e de Na^+ (Tabela 3) entre os grupos.

Uma das funções da Aldo (desencadeadas em parte pela angiotensina II) é o aumento da reabsorção de Na^+ , com consequente diminuição da excreção urinária desse íon e de água, promovendo a expansão do volume do fluido extracelular e o aumento da PA (MELLO-AIRES, 2012b). Nesse estudo, o tratamento com Aldo por 21 dias não alterou a PA dos ratos, em comparação à situação controle; uma situação condizente com a ingestão de uma dieta padrão (com níveis normais de NaCl) e com os valores plasmáticos normais de sódio, mesmo após a administração da Aldo (Tabela 3). Os dados da literatura científica são variáveis no que se refere ao efeito da Aldo sobre a PA: Park e Schiffrin (2001) observaram que ratos tratados com Aldo e suplementados com NaCl (1%) apresentaram elevação da PA, somente após 2 semanas do início do tratamento. A mesma condição foi relatada por Li et al. (2012), na presença e na ausência de suplementação com excesso de sal. Camundongos uninefrectomizados, tratados com Aldo e suplementados com NaCl, apresentaram valores da PA próximos aos controles (OGAWA et al., 2012). Porém, Liang et al. (2011) e Mathew et al. (2008) observaram em ratos,

que os valores da PA aumentaram quase 70%, após 28 dias do tratamento com Aldo e dieta padrão.

Ainda, diante do aumento dos níveis circulantes de Aldo, os rins podem superar a retenção de sódio (decorrente da ação mineralocorticoide no néfron distal), por meio da diminuição da reabsorção proximal desse íon, durante o “fenômeno de escape da Aldo”; evitando-se, assim, a expansão de volume e a elevação da PA (WANG et al., 2001). Portanto, ao final do tratamento com Aldo por 21 dias, poderíamos evidenciar valores normais ou elevados da PA nos ratos.

Observou-se uma tendência à redução da concentração plasmática de K^+ no grupo Aldo ($P = 0,08$) e o efeito inverso no grupo Espiro ($P = 0,06$) (Tabela 3). Corroborando nossos resultados, Nielsen et al. (2006) e Seigneux et al (2007) notaram a diminuição da concentração plasmática de K^+ , após 1 semana de tratamento com Aldo, compatível com o aumento da secreção tubular de K^+ (induzida pela Aldo), mas sem modificações na concentração plasmática de Na^+ . O efeito da Aldo sobre a secreção de K^+ se deve a 3 fatores: 1) o aumento da atividade e da quantidade da Na^+/K^+ -ATPase na membrana basolateral das células principais, 2) a estimulação dos canais de Na^+ (ENaC), presentes na membrana luminal do túbulo distal final e do ducto coletor (que promovem a despolarização da membrana e a difusão de K^+ da célula para o lúmen tubular) e 3) ao aumento da condutância ao K^+ na membrana apical. Entretanto, durante a administração prolongada de Aldo pode-se observar a manutenção dos níveis de Na^+ e a diminuição dos níveis de K^+ , devido também ao “fenômeno de escape da Aldo” (citado anteriormente), que resulta em uma maior carga distal de Na^+ , que, por sua vez, estimula a secreção de K^+ , também no néfron distal (MELLO-AIRES, 2012a).

7.2 Efeito dos tratamentos sobre a função renal

Ao final dos 21 dias de tratamento, a carga excretada (CE) e a fração de excreção (FE) de Na^+ , não foram diferentes entre os tratamentos (Tabela 4). Estes resultados estão de acordo com os valores normais da concentração plasmática de Na^+ , em todos os grupos (Tabela 3), e poderiam estar relacionados ao fato dos ratos apresentarem volemia normal e receberem uma dieta padrão, sem a suplementação extra com NaCl.

O grupo Espiro apresentou diminuição na CE e na FE de K^+ (Tabela 4), efeito esperado para este fármaco, cumprindo seu papel de poupador de K^+ , a partir do antagonismo ao receptor da Aldo, com consequente redução da secreção de K^+ . Esse dado mostra também, que o tratamento por via oral (com a espiro diluída na água de bebida) foi efetivo. A retenção de K^+ ,

provocada pela espiro, não foi acompanhada pela excreção de Na^+ ; mas como já foi citado anteriormente, o efeito deste fármaco sobre a natriurese pode variar (JEUNESSE et al., 2007).

Numericamente, a CE de K^+ no grupo Aldo foi um pouco maior do que o controle (0,90 vs. 0,72 mEq/min/100g); situação, aparentemente, revertida pelo tratamento concomitante com a espiro (0,90 vs. 0,75 mEq/min/100g), mas não alterada pelo tratamento em conjunto com o RU (0,90 vs. 0,94 mEq/min/100g) (Tabela 4). Este indício, associado à tendência de hipocalemia, condiz com o mecanismo de ação da Aldo, mediado pela ligação com o MR. O aparente efeito hormonal sobre a secreção de K^+ não foi acompanhado pela reabsorção de Na^+ . Wang et al. (2001) sugerem uma resposta compensatória do néfron ao aumento dos níveis circulantes de Aldo, para evitar a retenção de Na^+ e a expansão de volume.

Além de seu importante papel fisiológico, a Aldo também pode induzir alterações glomerulares, como por exemplo a glomeruloesclerose (KIYOMOTO et al., 2008), que pode levar à diminuição do ritmo de filtração glomerular (RFG) e, geralmente, está associada a um aumento da excreção urinária de proteínas, devido ao comprometimento da barreira glomerular e dos podócitos, responsáveis pela retenção das proteínas nos capilares glomerulares (SHIBATA et al., 2007). No presente estudo, os ratos tratados com a Aldo por 21 dias não apresentaram alteração no *clearance* de creatinina ou o aumento na CE de proteínas (Tabela 4). Dados da literatura indicam que a ocorrência de proteinúria, induzida pela Aldo, parece depender da ligação com o MR e de outros fatores (não praticados ou não observados em nosso estudo), como uma dieta rica em sódio e a elevação da PA, para que ocorra o comprometimento de componentes glomerulares, responsáveis pela retenção de proteínas nos capilares glomerulares, a exemplo dos podócitos (SHIBATA et al., 2007; SUN et al., 2002).

Na literatura científica atual, são escassos os resultados sobre os efeitos do RU na função e na hemodinâmica renal, que justifiquem o aumento do *clearance* de creatinina identificado no grupo RU (Figura 7).

7.3 Efeito da Aldo sobre a expressão do EGFR e da ERK 1/2 fosforilados e o papel dos receptores MR e GR

Já foram descritas ações fisiológicas da Aldo, envolvendo o EGFR e a ERK 1/2, como por exemplo, na modulação da concentração de cálcio intracelular e da atividade do transportador Na^+/H^+ em túbulos renais (GEKLE et al., 2002; WATTS et al., 2006). No entanto, essas mesmas proteínas também foram relacionadas com ações patológicas da Aldo, como o remodelamento vascular, devido às modificações provocadas nas células endoteliais e nas

células da musculatura lisa vascular e alterações decorrentes da inflamação, do estresse oxidativo, da proliferação celular e da deposição de matriz extracelular (ZHONG, 2014).

Em nosso estudo, a Aldo aumentou a expressão das proteínas EGFR e ERK1/2 fosforiladas no córtex e na medula renal de ratos, após 21 dias de tratamento (Figuras de 8 a 11), assim como observado por Ogawa et al. (2012) e Sinphitukkul et al. (2011).

Na presença de Aldo, os antagonistas do MR e do GR (Espiro e RU, respectivamente) aboliram esse efeito estimulatório hormonal sobre a expressão do EGFR e da ERK1/2 fosforilados, sugerindo a participação dos dois receptores nesse mecanismo de ação da Aldo. Alguns autores já relataram o envolvimento do MR no efeito da Aldo sobre a fosforilação do EGFR e da ERK 1/2 (GEKLE et al., 2002; HUANG et al., 2009; KRUG et al., 2002).

Não existem informações na literatura sobre a modulação da expressão dessas proteínas pelo GR e/ou pelo RU no tecido renal; no entanto, em outros tipos celulares o efeito do RU é bem variado. Em células lúteas humanas, o RU diminuiu a fosforilação da ERK1/2, induzida pela gonadotrofina coriônica humana (TSAI et al., 2008). Porém, em células uNK (*uterine natural killer*) o RU induziu o aumento da expressão da ERK1/2 fosforilada, sendo que este efeito foi bloqueado pelo uso do cortisol (CHEN et al., 2012). Já em miométrio de ratos, o RU aumentou a expressão da ERK2 fosforilada, mas não alterou a expressão da ERK1 fosforilada (LI et al., 2004).

O efeito do RU sobre a expressão do EGFR fosforilado no rim não foi estudado por outros autores. Hernández-Hernández et al. (2012), evidenciaram que o RU inibe a expressão gênica do EGFR, induzida por esteroides, em linhagem celular de astrocitoma humano.

7.4 Alterações morfométricas e possível relação com a fosforilação do EGFR e da ERK1/2 no tecido renal, induzidos pela Aldo

Nossa pesquisa mostrou aumento da área glomerular em todos os grupos que receberam Aldo (Aldo, AldoR e AldoE). O tratamento concomitante com RU e com Espiro praticamente não alterou esse efeito hormonal (Tabela 7 e Figura 12). O tratamento com Aldo também aumentou a porcentagem da área intersticial, sendo que o RU e a Espiro conseguiram reduzir essa ação da Aldo (Tabela 8 e Figura 13).

De acordo com a literatura, as alterações morfológicas renais mais frequentemente associadas ao tratamento com a Aldo e reveladas por meio da avaliação histopatológica são: I) lesões vasculares (como necrose, proliferação da camada íntima e fibrose da camada adventícia), II) esclerose glomerular (caracterizada, principalmente, pela expansão da matriz

mesangial e dos tufo capilares) e III) lesões túbulo-intersticiais (com evidência da dilatação dos túbulos renais, da fibrose e do infiltrado de células inflamatórias no interstício) (BLASI et al., 2003; DOI et al., 2014; LIANG et al., 2011).

Estudos prévios relataram o efeito da Espiro (OGAWA et al., 2012) e do RU (HUANG et al., 2009) como atenuantes das alterações morfológicas da Aldo sobre o tecido renal, corroborando nossos resultados.

O efeito da Aldo sobre a proliferação de células mesangiais, condição que poderia comprometer a morfometria e acarretar na expansão da área glomerular, foi descrito por Huang et al. (2009) e Nishiyama et al. (2005). Assim como a expansão da área e os danos glomerular, decorrentes do tratamento com Aldo por 28 dias, associado à suplementação com NaCl (BLASI et al., 2003). Em nosso modelo experimental, constituído pelo tratamento com Aldo por 21 dias e dieta padrão, também evidenciamos o aumento da área, porém os danos glomerulares não foram visualmente tão intensos, quanto nos modelos suplementados com NaCl.

Da mesma forma, a fibrose, acompanhada pelo infiltrado de células inflamatórias, produz injúrias intersticiais severas, que por sua vez, podem levar ao aumento da porcentagem da área intersticial, em resposta ao tratamento com Aldo (BLASI et al., 2003; DOI et al., 2014). No presente estudo não foram explorados marcadores específicos para fibrose e inflamação, porém estas condições poderiam estar presentes em nosso modelo experimental e justificar o aumento da porcentagem da área intersticial.

Os mecanismos envolvidos com a proliferação de células renais e a indução de fibrose renal, dependentes do excesso de Aldo, foram associados à fosforilação/ativação do EGFR e da ERK1/2 (CHEN et al., 2012; HUANG et al., 2009; NISHIYAMA et al., 2005). Sendo assim, é possível admitir que o aumento da fosforilação do EGFR e da ERK1/2, que observamos nas regiões cortical e medular (Figuras de 8 a 12) e o aumento da marcação imuno-histoquímica para o EGFR fosforilado (nos túbulos renais, Figuras 14 e 15) e para a ERK1/2 (nos glomérulos e também nos túbulos renais, Figuras 16 e 17), possam ter relação com as alterações morfométricas provocadas pela Aldo descritas por esses autores.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que:

- O modelo experimental constituído pelo tratamento com Aldo por 21 dias e dieta padrão pode auxiliar no estudo das vias de sinalização e das lesões teciduais induzidas pela Aldo;
- As alterações nas concentrações plasmáticas de K^+ são condizentes com o mecanismo de ação da Aldo e da Espiro;
- As concentrações plasmáticas de Na^+ e a PA não se alteraram com o tratamento hormonal, provavelmente pela ocorrência do “efeito escape da Aldo”
- A Aldo aumentou a expressão do EGFR e da ERK1/2 no rim, aparentemente, por um mecanismo dependente dos receptores MR e GR;
- Mesmo sem a suplementação extra com NaCl, a Aldo pode induzir alterações morfológicas no rim, aparentemente, de maneira dependente dos receptores MR e GR e da via do EGFR-ERK1/2, mas sem o comprometimento da função renal.

REFERÊNCIAS*

- BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 2010.
- BARRETO-CHAVES, M. L. M.; LEITE-DELLOVA, D. C. A.; GOMES, D. A.; GOMES, G. N.; MAGALDI, A. J.; GIL F. Z.; LOPES, A. G.; LESSA, L. M. A.; FONTELES, M. C. Rim e hormônios. In: MELLO-AIRES, M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012. cap. 55, p.792-796.
- BARRERA-CHIMAL, J.; BOBADILLA, N. A. Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury? **Biomarkers**, v. 17, p. 385–393, 2012.
- BLASI, E. R.; ROCHA, R.; RUDOLPH, A. E.; BLOMME, E. A.; POLLY, M. L.; MCMAHON, E.G. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. **Kidney Int.**, v. 63, p. 1791-1800, 2003.
- BOOTH, R. E.; JOHN, P. J.; STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Ad. Physiol. Educ.**, v. 26, p. 8-20, 2002.
- BRAGA-SOBRINHO, C.; LEITE-DELLOVA, D. C. A.; MELLO-AIRES, M. Action of ANP on the nongenomic dose-dependent biphasic effect of Aldosterone on NHE1 in proximal S3 segment. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 128, n. 3-5, p. 89-97, 2012.
- BROWN, N. J. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 9, p. 459–469, 2013.
- CASTAGLIUOLO, I.; KARALIS, K.; VALENICK, L.; PASHA, A.; NIKULASSON, S.; WLK, M.; POTHOUKAKIS, C. Endogenous corticosteroids modulate *Clostridium Difficile* toxin A-induced enteritis in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. 539-545, 2001.
- CHEN, Y.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; ZHOU, F.; HUANG, L. Mifepristone increases the cytotoxicity of uterine natural killer cells by acting as a glucocorticoid antagonist via ERK activation. **PloS One**, v. 7, e36413, 2012.
- COUETTE, B.; LOMBES, M.; BAULIEU, E. E.; OBLIN-RAFESTIN, M. E. Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticoid receptor. **Biochem. J.**, v. 282, p. 697-70, 1992.
- COWA, N. K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 1107–1115, 2003.
- DOI, T.; DOI, S.; NAKASHIMA, A.; UENO, T.; YOKOYAMA, Y.; KOHNO, N.; MASAKI, T. Mizoribine ameliorates renal injury and hypertension along with the attenuation of renal caspase-1 expression in aldosterone-salt-treated rats. **PloS One**, v. 9, n. 4, 2014.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

EGUTI, D. M. N.; THIEME, K.; LEUNG, G.; MELLO-AIRES, M.; OLIVEIRA-SOUZA M. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) by calmodulin-binding sites: role of angiotensin II. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 26, p. 541-552, 2010.

ELIAS, L. L. K.; ROSA, F. F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M. Glândula adrenal. In: MELLO-AIRES, M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012. cap. 69, p.1089-1095.

FARAH, H.M.; LAUFGRABEN, M.J. Mifepristone for management of cushing's syndrome. **Pharmacotherapy**, v. 33, n. 3, p. 319–329, 2013.

FULLER, P. J.; YAO, Y.; YANG, J.; YOUNG, M. J. Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. **J. Endocrinol**, v. 213, p. 215–224, 2012.

FUNDER, J. W. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: Biology and clinical relevance. **Annu. Rev. Med.**, v. 48, p. 231–240, 1997.

FUNDER, J. W. The genetic basis of primary aldosteronism. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 14, n. 2, p. 120-124, 2012.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **J. Vis. Exp.**, v. 65, p. e3564, 2012.

GEKLE, M.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S. Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. **Am. J. Physiol.**, v. 282, p. 669–679, 2002.

GEKLE, M.; GROSSMANN, C. "Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good; the bad; and the ugly?." **Pflügers. Arch.**, v. 458, n. 2, p. 231-246, 2009.

GOOD, D. W. Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule. **Hypertension**, v. 49, p. 728–739, 2007.

GROSSMANN, C.; GEKLE, M. Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. **Steroids**, v. 73, p. 973–978, 2008.

GROSSMANN, C.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; KRUG, A. W.; GEKLE, M. Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption. **Am. J. of Physiol.**, v. 286, n. 6, p. 1226-1231. 2009

HACKEL, P. O.; ZWICK, E.; PRENZEL, N.; ULLRICH, A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 11, p. 184–189, 1999.

HARVEY, B. J.; ALZAMORA, R.; HEALY, V.; RENARD, C.; DOOLAN, C. M. Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. An homage to Hans Ussing. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1566, p. 116–128, 2002.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O. T.; GONZÁLEZ-GARCÍA, T. K.; CAMACHO-ARROYO, I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR

and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 132, n. 1-2, p. 127-134, 2012.

HUANG, L. L.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; MA, F. Y.; TESCH, G. H. Aldosterone induces kidney fibroblast proliferation via activation of growth factor receptors and PI3K/MAPK signalling. **Nephron. Exp. Nephrol.**, v. 120, n. 4, p. 115-122, 2012.

HUANG, S.; ZHANG, A.; DING, G.; CHEN, R. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 296, p. 1323–1333, 2009.

JEUNESSE, E.; WOEHRLE, F.; SCHNEIDER, M.; LEFEBVRE, H. P. Effect of spinorolactone on diuresis and urine sodium and potassium excretion in healthy dogs. **J. Vet. Cardiol.**, v. 9, p. 63-68, 2007.

JOHANSEN, S.; ALLOLIO, B. Mifepristone (RU486) in Cushing's syndrome. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 157, p. 561–569, 2007.

KIYOMOTO, H.; RAFIQ, K.; MOSTOFA, M.; NISHIYAMA, A. Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 108, p. 399–405, 2008

KRUG, A. W.; SCHUSTER, C.; GASSNER, B.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; TROPPMAIR, J.; GEKLE, M. Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 45892–45897, 2002.

KRUG, A. W.; GROSSMANN, C.; SCHUSTER, C.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; GOVINDAN, M. V.; GEKLE, M. Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 43060–43066, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LALEVÉE, N.; REBSAMEN, M. C.; BARRÈRE-LEMAIRE, S.; PERRIER, E.; NARGEOT, J.; BÉNITAH, J. P.; ROSSIER, M. F. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. **Cardiovasc. Res.**, v. 67, p. 216–224, 2005.

LEITE-DELLOVA, D. C. A.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic effects of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic Calcium. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 295, p. F1342-F1352, 2008.

LI, J. Y.; ZHANG, S. L.; REN, M.; WEN, Y. L.; YAN, L.; CHENG, H. High-sodium intake aggravates myocardial injuries induced by aldosterone via oxidative stress in Sprague-Dawley rats. **Acta. Pharm. Sinic.**, v. 33, n. 3, p. 393-400, 2012.

LIANG, W.; CHEN, C.; SHI, J.; REN, Z.; HU, F.; VAN-GOOR, H.; SINGHAL, P.C.; DING, G. Disparate effects of eplerenone, amlodipine and telmisartan on podocyte injury in aldosterone infused rats. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 26, n. 3, p.789-99, 2011.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.**, v. 4, p. 46-56, 2003.

MACHADO, H.; GUERRA, M. O.; PETERS, V.M. Implantação e Padronização da Técnica de aferição indireta da pressão arterial em ratos Wistar da Colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR). **Rev. Inter. Est. Exp.**, v. 2, n. 2, p.60- 61, 2010.

MALNIC, G.; ANSALDO, M.; LANTOS, C. P.; DAMASCO, M. C. Regulation of nephron acidification by corticosteroids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30(4), p. 479-486, 1997.

MALNIC, G.; GEIBEL, J. P. Cell pH and H⁺ secretion by S3 segment of mammalian kidney: Role of H⁺-ATPase and Cl⁻. **J. Memb. Biol.**, v. 178, p. 115-125; 2000.

MARVER, D. M.; KOKKO, J. P. Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone. **Mineral Electrolyte Metab.**, v. 9, p. 1-18, 1983.

MATHEW, J. T.; PATNI, H.; CHAUDHARY, A. N.; LIANG, W.; GUPTA, A.; CHANDER, P. N.; DING, G.; SINGHAL, P. C. Aldosterone Induces Mesangial Cell Apoptosis both *in vivo* and *in vitro*. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 295, p. F73–F81, 2008.

MELLO-AIRES, M. Excreção renal de solutos. In: _____. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012a. cap. 51, p.732-747.

MELLO-AIRES M. Papel do rim na regulação do volume e da tonicidade do fluido extracelular. In: _____. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012b. cap. 53, p.750-781.

MICHLIG, S.; MERCIER, A.; DOUCET, A.; SCHILD, L.; HORISBERGER, J. D.; ROSSIER, B. C.; FIRSOV, D. ERK1/2 controls Na/K-ATPase activity and transepithelial sodium transport in the principal cell of the cortical collecting duct of the mouse kidney. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 51002–51012, 2004.

MIHAILIDOU, A. S. Nongenomic actions of aldosterone: physiological or pathophysiological role? **Steroids**, v. 71, n. 4, p. 277-80, 2006.

MOGHAL, N.; STERNBERG, P. W. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 11, p. 190–196, 1999

NAMSOLLECK, P.; UNGER, T. Aldosterone synthase inhibitors in cardiovascular and renal diseases. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 29, n. 1, p. i62–i68, 2014.

NIELSEN, J.; KWON, T.nH.; FROKIAER, J.; KNEPPER, M. N. A.; NIELSEN, S. Maintained ENaC trafficking in aldosterone-infused rats during mineralocorticoid and glucocorticoid receptor blockade. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 292, n. 1, p. F382-F394, 2007.

NISHIYAMA, A.; YAO, L.; FAN, Y.; KYAW, M.; KATAOKA, N.; HASHIMOTO, K.; NAGAI, Y.; NAKAMURA, E.; YOSHIKUMI, M.; SHOKOJI, T.; KIMURA, S.; KIYOMOTO,

H.; TSUJIOKA, K.; KOHONO, M.; TAMAKI, T.; KAJIYA, F.; ABE, Y. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. **Hypertension**, v. 45, p. 710–716, 2005.

OBERLEITHNER, H. Unorthodox sites modes of aldosterone action. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 51-54, 2004.

ODERMATT, A.; ATANASOV, A.vG. Mineralocorticoid receptors: emerging complexity and functional diversity. **Steroids**, v. 74, p. 163–171, 2009.

OGAWA, Y.; MUKOYAMA, M.; YOKOI, H.; KASAKA, M.; MORI, K.; KATO, Y.; KUWABARA, T.; IMAMAKI, H.; KAWANISHI, T.; KOGA, K.; ISHII, A.; TOKUDOME, T.; KISHIMOTO, I.; SUGAWARA, A.; NAKAO, K. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 23, p. 1198–1209, 2012.

OPENSTAX COLLEGE. 2013. Disponível em: <https://openstaxcollege.org/about>. Acesso em: 04 out. 2014.

PANDOLFI, K. P.; SZRIBER, S. J.; LEITE-DELLOVA, D. C. A.; MELLO-AIRES, M. Rapid and Long Term Aldosterone Effect on the EGFR and ERK1/2 Phosphorylation in Rat Kidney (*in vivo*). **The FASEB Journal**, v. 29, p. 812.5, 2015.

PARK, J. B.; SCHIFFRIN, E. L. ETA receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. **Hypertension**, v. 37, p. 1444-1449, 2001.

PEARCE, D.; KLEYMAN, T. R. Salt, Sodium channels, and SGK1. **The J. Clin. Inves.**, v. 117, p. 592-595, 2007.

PERGHER, P. S.; LEITE-DELLOVA, D. C. A.; MELLO-AIRES, M. Direct action of aldosterone on bicarbonate reabsorption in vivo cortical proximal tubule. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 296 (5), p. F1185-F1193, 2009.

RAFIQ, K.; HITOMI, H.; NAKANO, D.; NISHIYAMA, A. Pathophysiological roles of aldosterone and mineralocorticoid receptor in the kidney. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 115, p. 1-7, 2011.

ROSSIER, M. F.; PYTHON, M.; MATURANA, A. D. Contribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors to the chronotropic and hypertrophic actions of aldosterone in neonatal rat ventricular myocytes. **Endocrinol.**, v. 151(6), p. 2777–2787, 2010.

SADEE, W.; RIEGELMAN, S.; JONES, S. Disposition of tritium-labeled spironolactone in the dog. **J. Pharm. Sci.**, v. 61, p. 1132–1135, 1972.

SEIGNEUX, S.; NIELSEN, J.; OLESEN, E. T.; DIMKE, H.; KWON, T. H.; FRØKIÆR, J.; NIELSEN, S. Long-term aldosterone treatment induces decreased apical but increased basolateral expression of AQP2 in CCD of rat kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 293, n. 1, p. F87-F99, 2007.

SHIBATA, S.; NAGASE, M.; YOSHIDA, S.; KAWACHI, H.; FUJITA, T. Podocyte as the target for aldosterone: Roles of oxidative stress and Sgk1. **Hypertension**, v. 49, p. 355–364, 2007.

SINPHITUKKUL, K.; EIAM-ONG, S.; MANOTHAM, K.; EIAM-ONG, S. Nongenomic effects of aldosterone on renal protein expressions of pEGFR and pERK1/2 in rat kidney. **Am. J. Nephrol.**, v. 33, p. 111–120, 2011.

STREET, J. M.; SOUZA, A. C. P.; ALVAREZ-PRATS, A.; HORINO, T.; HU, X.; YUEN, P. S.; STAR, R. A. Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. **Physiol. Rep.**, v. 2, n. 7, e12088, 2014.

SUN, Y.; ZHANG, J.; LU, L.; CHEN, S. S.; QUINN, M. T.; WEBER, K. T. Aldosterone-Induced Inflammation in the Rat Heart : Role of Oxidative Stress. **Am. J. Pathol.**, v. 161, p. 1773–1781, 2002

TODD-TURLA, K. M.; SCHNERMANN, J.; FEJES-TOTH, G.; NARAY-FEJES-TOTH, A.; SMART, A.; KILLEN, P. D.; BRIGGS, J. P. Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. F781-F791, 1993.

THOMAS, W.; DOOLEY, R.; HARVEY, B. J. Aldosterone as a renal growth factor. **Steroids**, v. 75, n. 8-9, p. 550-554, 2010.

THOMAS, W.; HARVEY, B. J. Mechanisms Underlying Rapid Aldosterone Effects in the Kidney. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 73, p. 5.1–5.23, 2011.

TSAI, E. M.; CHAN, T. F.; CHEN, Y. H.; HSU, S. C.; CHUANG, C. Y.; LEE, J. N. Mifepristone attenuates human chorionic gonadotropin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E production in human granulosa luteal cells. **Fertil and Steril**, v. 89, n. 5, p. 1522-1529, 2008.

WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v. 23, p. 2838–2849, 2004.

WANG, X. Y.; MASILAMANI, S.; NIELSEN, J.; KWON, T. H.; BROOKS, H. L.; NIELSEN, S.; KNEPPER, M. A. The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as mediator of the aldosterone-escape phenomenon. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 215-222, 2001.

WATTS, B. A.; GEORGE-THIRD, T.; GOOD, D. W. Aldosterone inhibits apical NHE3 and HCO₃⁻ absorption via a nongenomic ERK-dependent pathway in medullary thick ascending limb. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 291, p.1005-1013, 2006.

WILLIAMS, J. S. Evolving research in nongenomic actions of Aldosterone. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v. 20, p. 198–203, 2013.

WILSON, R. P.; ZAGON, I. S.; LARACH, D. R. Cardiovascular and respiratory effects of tiletamine-zolazepam. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 1-8, 1993.

XU, G.; LIU, A.; LIU, X. Aldosterone induces collagen synthesis via activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in renal proximal tubules. **Nephrol.**, v. 13, p. 694–701, 2008.

ZHONG, D. S. Mineralocorticoid receptor: a critical player in vascular remodeling. **Sci. China Life Sci.**, v. 57, n. 8, p. 809-817, 2014.