UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PAULA IRUSTA FERREIRA

**Estudo de respostas fibróticas e apoptóticas em rins de ratos tratados com
aldosterona**

Pirassununga
2016

PAULA IRUSTA FERREIRA

“VERSÃO CORRIGIDA”

**Estudo de respostas fibróticas e apoptóticas em rins de ratos tratados com
aldosterona**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Deise Carla
Almeida Leite-Dellova

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383e   Ferreira, Paula Irusta
             Estudo de resposta fibrótica e apoptótica em rins
             de ratos tratados com aldosterona / Paula Irusta
             Ferreira ; orientadora ProfaDra Deise Carla
             Almeida Leite-Dellova. -- Pirassununga, 2016.
             58 f.

             Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
             em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
             Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

             1. Aldo . 2. BAX. 3. Injúria renal. 4. PAI-1. 5.
             TGF-betal. I. Leite-Dellova, Profa Dra Deise Carla
             Almeida, orient. II. Título.

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 aos meus pais Roberto e Joence,
por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela fé que sempre me fortaleceu e me orientou a seguir o caminho da perseverança e do bem.

Aos meus pais, por sempre terem me apoiado nas escolhas que fiz, por terem tido paciência e compreensão, durante toda minha trajetória acadêmica.

À minha irmã Renata, por sempre me motivar e me presentear com uma das minhas maiores motivações para meu crescimento pessoal e profissional, minha afilhada amada Isabella.

Ao meu namorado William, por estar compartilhando comigo mais uma conquista.

À Prof^a. Dr^a. Deise Carla Almeida Leite Dellova, por toda paciência e compreensão durante nosso trabalho. Por ter acreditado que eu seria capaz de desenvolver essa pesquisa e concluí-la com sucesso.

À Prof^a. Dr^a. Helena Lage Ferreira, Prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi e ao Prof. Dr. Heidge Fukumasu pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa e por terem compartilhado seus equipamentos e conhecimentos.

Às técnicas de laboratório Giovanna Krempel Fonseca Merighe e Júlia Cristina Benassi, ambas da FZEA/USP, por terem me orientado e ajudado no desenvolvimento prático da pesquisa.

Ao Prof. Livre docente Gerhard Malnic (ICBI/USP), pela disponibilidade do laboratório e orientação para o experimento.

À colega de laboratório, Fernanda Nastri Gouvêa, pela ajuda e, em especial, a minha grande amiga, Kelly Pandolfi (ICBI/USP), por toda parceria, amizade, cumplicidade, risadas, alegrias e partilha de seu conhecimento e de toda bondade que possui, permitindo que essa jornada fosse possível.

À agência de fomento FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

“O segredo da mudança é o foco não na luta contra o velho,
mas na construção do novo”.
(Sócrates)

RESUMO

FERREIRA, P.I. **Estudo de respostas fibróticas e apoptóticas em rins de ratos tratados com aldosterona**. 2016. 58f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Procurando compreender o envolvimento da aldosterona (Aldo) na injúria renal, o objetivo deste projeto foi avaliar o efeito do tratamento crônico com Aldo sobre a função renal e a histologia das arteríolas renais, procurando correlacionar os achados com a expressão de genes reguladores do processo de fibrose e apoptose. A Aldo não alterou os parâmetros fisiológicos, PA, ritmo de filtração glomerular (estimado pela depuração plasmática de creatinina), proteinúria e a morfologia das arteríolas corticais. No entanto, aumentou a expressão do RNAm para TGF- β 1, PAI-1 e BAX no tecido renal, além da contagem de células TUNEL positivas nos glomérulos. O antagonismo ao receptor MR (pelo uso da espironolactona) aboliu o efeito hormonal somente sobre a expressão do RNAm para BAX e a marcação do DNA degradado (TUNEL), enquanto que o antagonismo ao GR (pelo uso do RU 486) reduziu ou aboliu todos os efeitos da Aldo. Os resultados indicam que a Aldo pode induzir respostas precoces sobre o remodelamento do tecido renal, sem ainda comprometer a função renal ou alterar a PA. Essas respostas foram independentes da sobrecarga de sal e ocorreram por um mecanismo que envolveu os receptores MR e GR.

Palavras-chave: Aldo, TGF- β 1, PAI-1, BAX, injúria renal.

ABSTRACT

FERREIRA, P.I. Study of fibrotic and apoptotic responses in rat kidney after aldosterone treatment. 2016. 58f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

In order to understand the aldosterone (Aldo) involvement in renal injury, the objective of this project was to evaluate the effect of Aldo chronic treatment on renal function and renal arterioles histology, trying to correlate the findings with the regulatory genes of fibrosis and apoptosis. Aldo did not change the physiological parameters, BP, glomerular filtration rate (estimated by creatinina clearance), proteinuria and cortical arterioles morphology. However, Aldo increased mRNA expression for TGF- β 1, PAI-1 and BAX in renal tissue, as well as TUNEL-positive cell count in glomeruli. MR receptor antagonism (by spironolactone) abolished only the hormonal effect on the mRNA expression for BAX and degraded DNA labeling (TUNEL); whereas GR antagonism (by RU 486) reduced or abolished all Aldo effects. The results indicated that Aldo can induce early responses on renal tissue remodeling, without altering renal function or BP. These responses were salt independent and involved MR and GR receptors.

Keywords: Aldo, TGF- β 1, PAI-1, BAX, renal injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Transporte iônico no néfron distal	17
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação da aldosterona via MR	19
Figura 3: Animais com minibombas osmóticas implantadas em tecido subcutâneo	29
Figura 4: Plestimografia de cauda.....	29
Figura 5: Imagem representativa de arteríolas renais (setas), em cortes transversais de rim de rato (200x, 50µm)	39
Figura 6: Eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR convencional.....	40
Figura 7: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a expressão de RNAm para TGF-β1 no rim de rato.....	41
Figura 8: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a expressão de RNAm para PAI-1 no rim de rato.....	41
Figura 9: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a expressão de RNAm para BAX no rim de rato.....	42
Figura 10: Figura representativa de células TUNEL positivas em glomérulo de rato.....	43
Figura 11: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a contagem de células TUNEL positivas em glomérulo de rato	43
Figura 12: Detecção de células TUNEL positivas em glomérulos, por microscopia de fluorescência	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios dos parâmetros fisiológicos avaliados em gaiola metabólica ou antes e após o término dos tratamentos	37
Tabela 2: Valores médios da concentração plasmática de Na ⁺ , K ⁺ e creatinina após os 21 dias de tratamento.....	38
Tabela 3: Valores médios da depuração plasmática de creatinina e relação proteína/creatinina urinárias, após os 21 dias de tratamento	38
Tabela 4: Valores médios do raio do lúmen, da área da túnica íntima+média e da relação íntima+média/lúmen de arteríolas renais	39
Tabela 5: Valores médios da expressão de RNAm para TGF-β1, PAI-1 e BAX no rim de ratos após 21 dias de tratamento	42
Tabela 6: Valores médios da contagem de células TUNEL positivas em glomérulos de rato após 21 de tratamento	44

LISTA DE FÓRMULAS

- (1) Consumo de água = água disponível – água residual
- (2) Consumo de ração = massa ração inicial – ração residual
- (3) Ganho de peso = peso corporal final – peso corporal inicial
- (4) Fluxo urinário (V) = volume total de urina (em ml)/ tempo (min)
- (5) Depuração plasmática de creatinina (DPc) = $V \cdot U_{\text{creat}}/P_{\text{creat}}$
- (6) PU/C = [proteínas totais na urina]/[creatinina na urina]
- (7) Raio do lúmen = diâmetro/2
- (8) Área túnica = $\pi \times \text{raio}^2$
- (9) Área túnica íntima+média = área íntima+média – área do lúmen
- (10) Relação íntima+média /lúmen = (área íntima+média – área do lúmen)/área do lúmen
- (11) Expressão relativa RNAm = $2^{-\Delta\Delta CT}$

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Aldo	Aldosterona
Ang II	Angiotensina II
BCL-2	Proteína oncogênica inibidora de apoptose
BAX	Antagonista pró-apoptótico do BCL-2
bp	Pares de bases
cDNA	DNA complementar
CHIF	Fator indutor de corticosteroides
CYP40	Ciclofilina
DPc	Depuração plasmática de creatinina
ECA	Enzima de conversão da Ang II
ENaC	Canal epitelial de sódio
ERK 1/2	Quinase regulada por sinal extracelular
Espiro	Espironolactona
FKB	Regulador de sinal em receptor esteroide
GAPDH	Proteína essencial na glicólise e gliconeogênese
GILZ	Leucina induzida por glicocorticoides
GR	Receptor para glicocorticoides
Hsp	Proteínas de choque térmico
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
Ki-RasA	Proteína G Kirsten Ras
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MR	Receptor de mineralocorticoide
PAI-1	Inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1
PAN	Peptídeo atrial natriurético
PA	Pressão arterial
Pcreat	Creatinina plasmática
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PU	Proteínas totais urinárias
RFG	Ritmo de filtração glomerular

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROMK	Canal de potássio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RU 486	Mifepristone
<i>Sham</i>	Grupo controle
Sgk-1	Quinaseserina/treonina
SRA	Sistema renina angiotensina
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante- β 1
TUNEL	Terminal deoxiribonucleotídeo transferase
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
Ucreat	Creatinina urinária
u-PA	Ativação do plasminogênio uroquinase
V	Fluxo urinário
11 β HSD2	Enzima 11 β hidroxisteroidesdesidrogenase tipo II

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Ações fisiológicas da Aldo.....	17
2.2 MR	18
2.2.1 Espironolactona (Espiro) – antagonista do MR	19
2.3 GR	20
2.3.1 RU 486 (mifepristone) – antagonista do GR.....	21
2.4 Ações deletérias da Aldo.....	21
2.4.1 Injúria renal	21
2.4.2 Desordens cardiovasculares	22
2.5 Fatores pró-fibróticos	23
2.5.1 Fator de crescimento transformante β -1 (TGF β -1)	23
2.5.2 Inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1)	24
2.6 Fatores pró-apoptóticos	25
3 HIPÓTESE.....	26
4 OBJETIVOS	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Animais	28
5.2 Protocolo anestésico e grupos experimentais	28
5.3 Mensuração da pressão arterial (PA)	29
5.4 Procedimentos para obtenção de amostras (urina e sangue) e parâmetros fisiológicos.....	30
5.4.1 Amostras de urina, cálculo do consumo de água e ração	30
5.4.2 Determinação do ganho de peso	30
5.4.3 Coleta de sangue	30
5.5 Análises bioquímicas plasmáticas e urinárias	31
5.6 Análise da função renal	31
5.7 Análise histopatológica	31
5.7.1 Obtenção das amostras	31
5.7.2 Morfometria das arteríolas renais.....	32
5.8 Expressão do MR e GR no tecido renal.....	32
5.8.1 Preparo das amostras	32

5.8.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	32
5.8.3 PCR convencional para MR e GR	33
5.9 Expressão RNAm para TGF-β1, PAI-1 e BAX (PCR em tempo real)	34
5.10 Detecção da apoptose celular pela técnica de TUNEL(Terminal DeoxyribonucleotideTransferase (TdT)-mediated dUTP Nick-end Labeling) 35	35
5.11 Análise dos resultados	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Parâmetros fisiológicos.....	37
6.2 Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros bioquímicos.....	37
6.3 Efeito dos tratamentos sobre a função renal.....	38
6.4 Arteríolas renais.....	38
6.5 Expressão MR e GR no tecido renal	39
6.6 Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU sobre a expressão de RNAm para TGF-β1, PAI-1 e BAX.....	40
6.7 Avaliação da apoptose em glomérulos de rato pela técnica de TUNEL ..	42
7 DISCUSSÃO.....	45
8 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A aldosterona (Aldo) exerce um papel crucial na regulação da pressão arterial e na homeostase eletrolítica, atuando em conjunto com o sistema renina-angiotensina (SRA) para a manutenção da função cardiovascular e renal (NISTALA; WHALEY-CONNELL; SOWERS, 2008).

O papel do SRA na progressão da doença renal é amplamente discutido (principalmente, pela ação da angiotensina II (Ang II), via receptor AT1, na indução de hipertensão, proliferação celular, inflamação e fibrose), assim como a eficácia dos inibidores da enzima de conversão da Ang II (ECA), no retardo dessa doença (MIZUIRI; OHASHI, 2015). Contudo, há mais uma década, pesquisadores apontam para o fato de que o aumento da concentração plasmática de Aldo desencadeia injúrias ao tecido renal, de maneira independente do SRA (HOSTETTER; IBRAHIM, 2003).

Nesses casos, a injúria tecidual ocorreria por meio da ligação da Aldo com seu receptor clássico (MR; receptor para mineralocorticoides) e, conseqüentemente, pelo desenvolvimento de: inflamação, estresse oxidativo, glomeruloesclerose, apoptose e fibrose no tecido renal (RAFIQ et al., 2011).

Além do MR, a Aldo pode atuar pela ligação com outros receptores, por exemplo, o GR (receptor para glicocorticoides), que apresenta alta afinidade por esse hormônio e é muito expresso no rim (LEITE-DELLOVA et al., 2008). Entretanto, poucos estudos abordam a participação do GR nas vias de sinalização ativadas pela Aldo, tanto para as ações fisiológicas, quanto para o desenvolvimento da doença.

Sendo assim, tornam-se relevantes os estudos que procuram entender: 1) os efeitos diretos da Aldo sobre a estrutura e a função renal e 2) avaliar o antagonismo aos receptores da Aldo (MR e GR), como estratégias terapêuticas para impedir ou retardar o estabelecimento da doença renal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ações fisiológicas da Aldo

A Aldo é um mineralocorticoide, produzido na zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal, a partir do colesterol. O processo de biossíntese, denominado esteroidogênese, envolve a participação de enzimas da família citocromo P450 e é regulado, principalmente, por variações na concentração plasmática de Na^+ e/ou K^+ e pela ação estimulatória do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e Ang II e inibitória do peptídeo atrial natriurético (PAN) (HUYNH et al., 2009; PORZIONATO et al., 2010).

Esse mineralocorticoide regula o transporte transepitelial de Na^+ e K^+ no néfron distal (SALYER et al., 2013). No ducto coletor, a reabsorção de Na^+ ocorre através do canal epitelial de sódio (ENaC), presente na membrana luminal das células tubulares (AIRES, 2012a). Na membrana basolateral (voltada para o interstício), a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase gera um gradiente eletroquímico favorável para a secreção de K^+ pelos canais do tipo ROMK (*renal outer medullary potassium channel*), localizados também na membrana luminal (Figura 1).

Figura 1: Transporte iônico no néfron distal.

A célula principal do ducto coletor expressa o canal de Na^+ (ENaC) na membrana luminal. A Na^+ , K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral, gera o gradiente eletroquímico (elevando a negatividade e a concentração de K^+ no citoplasma), que permite a reabsorção de Na^+ pelo ENaC e a secreção de K^+ pelos canais ROMK. **Fonte:** Adaptado de SOEIRO, E. M. D. et al. Aspectos clínicos, fisiopatológicos e genéticos das tubulopatias hereditárias na infância. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 3, p. 385-398, 2015.

A Aldo aumenta a atividade e a expressão do ENaC e Na^+ , K^+ -ATPase, estimulando, assim o transporte iônico citado anteriormente. Além disso, promove a

regulação do pH intracelular, atuando sobre proteínas transportadoras de H^+ (o trocador Na^+/H^+ e a H^+ -ATPase) nas células tubulares renais (LEITE-DELLOVA et al., 2008, 2011). O mecanismo de ação confere a Aldo um papel crucial da regulação da homeostase eletrolítica e da pressão arterial (PA) (uma vez que, por osmose, o aumento da reabsorção da Na^+ leva à retenção de água). A expansão do volume circulatório eleva a resistência vascular e, conseqüentemente, a PA. A Aldo também exerce outros efeitos sobre o sistema cardiovascular, de forma independente do Na^+ : aumentando a sensibilidade às catecolaminas e o número de receptores para a Ang II (um potente vasoconstritor) (ELIAS et al., 2012).

2.2 MR

O MR (uma proteína com 107 kDA) é altamente expresso no rim, cólon, glândulas salivares e regiões cerebrais específicas (principalmente, no hipocampo), mas também está presente no tecido cardiovascular, adipócitos e células imunes (CHAPMAN; HOLMES; SECKL, 2013; YE et al., 2014).

A modulação do transporte iônico se dá a partir da ligação da Aldo com o MR. Na ausência do hormônio, o MR se encontra, predominantemente, no citoplasma associado a um complexo proteico (que estabiliza o receptor no citoplasma celular na sua forma inativa), composto por: proteínas de choque térmico (hsp), incluindo a hsp90 e hsp70; imunofilinas como FKBP52 e FKBP54 e ciclofilina CYP40. A ligação ao hormônio induz a modificação conformacional do MR, seguida pela dissociação do complexo hétero-oligomérico e depois a fosforilação desse receptor (BOOTH; JOHNSON; STOCKAND, 2002).

O MR ligado a Aldo forma um novo complexo, que é movido do citoplasma para o núcleo celular, onde se liga a elementos específicos do DNA, localizados em regiões regulatórias de genes-alvo codificadores das subunidades da Na^+ , K^+ -ATPase, ENaC e de outras proteínas envolvidas no transporte de Na^+ (Figura 2), como por exemplo: a Sgk-1 (quinase serina/treonina), Ki-RasA (proteína G *Kirsten Ras*), fator indutor de corticosteroides (CHIF) e uma leucina induzida por glicocorticoides (GILZ) (RIEPE, 2010; VERREY et al., 2000; STUDER et al., 2011).

Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de ação da aldosterona via MR

A aldosterona é lipossolúvel, por isso atravessa livremente a membrana basolateral. Já no citoplasma, liga-se ao receptor MR e, então, o complexo hormônio+receptor é translocado para o núcleo celular, onde estimula a transcrição de subunidades do ENaC, Na^+ , K^+ -ATPase e também da proteína quinase serina/treonina (Sgk1). A Sgk1, por sua vez, fosforila a ubiquitina Nedd4-2, bloqueando a sua ligação ao ENaC e a degradação do canal. Portanto, a aldosterona aumenta a expressão e estabilidade do ENaC e, conseqüentemente, o transporte de Na^+ . **Fonte:** Adaptado de STUDER, R. A. et al. Evolution of the epithelial sodium channel and the sodium pump as limiting factors of aldosterone action on sodium transport. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 13, p. 844-854, 2011.

O MR possui 94% de homologia com o GR, em seu domínio de ligação ao DNA, e 57% de homologia, em seu domínio de ligação ao ligante (hormônio), de forma que os esteroides podem compartilhar os seus receptores. Considerando que o MR apresenta alta afinidade pela Aldo, mas também pelos glicocorticoides, e que a concentração circulante da Aldo pode ser de 100 a 1000 vezes menor, a maioria dos receptores (MR e GR) estaria ocupada pelos glicocorticoides. No entanto, a enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (11 β -HSD2) transforma os glicocorticoides em metabólitos inativos, garantindo, assim, a ligação da Aldo ao MR em tecidos alvos (ELIAS et al., 2012; NISHIYAMA et al., 2009).

2.2.1 Espironolactona (Espiro) – antagonista do MR

A Espiro é um fármaco com estrutura similar aos esteroides, que compete pela ligação com o MR intracelular, antagonizando, assim, os efeitos da Aldo e

resultando no aumento da excreção de Na^+ e na diminuição da secreção de K^+ nos rins. É facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal (LARINI, 2009).

Devido ao mecanismo de ação, é classificada como um diurético poupador de K^+ (apesar de promover diurese limitada). Atualmente, sabe-se que a Espiro também bloqueia os efeitos da Aldo em células não epiteliais e por isso tem sido indicada para o tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca e disfunção sistólica ventricular, uma vez que essas alterações parecem ser desencadeadas pela ativação do MR (BRIET; SCHIFFRIN, 2013; PARVIZ et al., 2015).

Na doença renal, o tratamento com a Espiro foi capaz de reduzir a albuminúria e a hipertensão (MAKHLOUGH et al., 2014), assim como alterações moleculares e celulares relacionadas à fibrose e apoptose (HANS et al., 2006; TRACHTMAN et al., 2004), indicando que, além da ação fisiológica (no transporte iônico), o MR também participa da fisiopatogenia da doença renal.

2.3 GR

O GR (uma proteína com 86 KDa) é um receptor para hormônios esteroides (principalmente, o cortisol e a corticosterona), que exercem ações no núcleo celular. Assim como o MR, na ausência do hormônio, reside no citoplasma ligado à Hsp90 e a outros cofatores estabilizadores. Com a ligação, o complexo GR+esteróide é translocado para o núcleo, onde modula a transcrição gênica e diversas vias de sinalização celular. O GR também é o alvo de uma série de esteroides sintéticos utilizados na terapia de doenças autoimunes e inflamatórias (GOODWIN et al., 2013).

Este receptor está presente em quase todos os tecidos do corpo e é amplamente conservado entre as espécies, destacando seu papel crítico na homeostase e na sobrevivência, já que entre outras ações, modula o metabolismo de carboidratos e lipídios (ELIAS et al., 2012).

O GR apresenta baixa afinidade de ligação pela Aldo; entretanto, dados da literatura indicam sua participação em ações renais (como o aumento da reabsorção de Na^+ e a secreção de H^+ no túbulo proximal renal) (LEITE-DELLOVA et al., 2008, 2011) e extra renais da Aldo, como disfunção de células β pancreáticas, aumento da expressão e secreção de citocinas no tecido adiposo e ações hipertróficas e

cronotrópicas em cardiomiócitos (CHEN et al., 2015; JIANG et al., 2013; ROSSIER; PYTHON; MATURANA, 2010).

O conjunto desses resultados sugere que a Aldo pode exercer seus efeitos de maneira independente do MR (BRIET; SCHIFFRIN, 2013).

2.3.1 RU 486 (mifepristone) – antagonista do GR

O RU 486 é um derivado sintético da noretindrona, com estrutura semelhante às progestinas e ao cortisol; por essa razão, atua como um antiprogestágeno e um antiglicocorticoide. Foi desenvolvido para atuar como um contraceptivo e para o tratamento de endometriose, câncer de útero e hipercortisolismo. O mecanismo de ação do RU 486 envolve a modulação da expressão genômica, devido ao antagonismo à progesterona e glicocorticoides (FEITEIRO et al., 2016).

Trabalhos demonstraram que o antagonismo ao GR (pelo uso do RU 486) foi capaz de bloquear os efeitos da Aldo no transporte iônico renal (NIELSEN et al., 2007; BRAGA-SOBRINHO et al., 2012) e na hipertrofia do miocárdio (REN et al., 2012).

2.4 Ações deletérias da Aldo

2.4.1 Injúria renal

Além do papel fisiológico, o interesse nos efeitos da Aldo sobre a saúde e a doença é emergente, uma vez que estudos apontam o envolvimento deste hormônio e seus receptores (MR e GR) em processos patológicos que incluem: inflamação, remodelação e fibrose, em diversos órgãos alvo, como os rins, vasos e coração (GUICHARD et al., 2013; RAFIQ et al., 2011; REN et al., 2012).

Estudos *in vitro*, utilizando fibroblastos renais, indicaram que a Aldo promoveu respostas fibróticas, envolvendo um aumento na produção do fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e do inibidor da ativação do plasminogênio (PAI-1) (HUANG et al., 2008).

In vivo, a Aldo também induziu injúria glomerular e fibrose tubulointersticial, envolvendo múltiplos fatores como: as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), PAI-1, TGF- $\beta 1$, citocinas pró-inflamatórias (como a osteopontina) e

espécies reativas de oxigênio (ROS) (KIYOMOTO et al., 2008; LU; KU; CAMPESE, 2010; NISHIYAMA et al., 2004).

A infusão de Aldo (em ratos suplementados com NaCl) esteve associada à lesão de podócitos e proteinúria (NAGASE; FUJITA, 2008; SHIBATA et al., 2007). Estudos realizados por Blasi et al., (2003) indicaram que nessa condição (Aldo + excesso de sal) há injúria vascular renal e fibrose, associada ao infiltrado leucocitário e aumento da expressão de osteoponina, proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), sugerindo assim, que a inflamação também contribui para os danos renais.

Rafiq et al., (2011) também descreveram a importância da Aldo em processos oxidativos, inflamatórios e fibróticos no rim, uma vez que estudos clínicos revelaram uma maior incidência de proteinúria e albuminúria em pacientes com hiperaldosteronismo primário.

De acordo com resultados obtidos por Nagai et al. (2005), a Aldo estimulou a fibrose renal por meio da síntese de colágeno tipo I, III e IV. A ERK 1/2 (uma MAP quinase, envolvida com a síntese de colágeno no rim) pode ser ativada/fosforilada pela Aldo (KIM; IWAQ, 2000). Nishiyama et al., (2004), observaram que a ativação da ERK 1/2, induzida pela Aldo, ocasionou fibrose e deposição de colágeno tubulointersticial.

Além da fibrose, já foi demonstrado que a Aldo induziu a apoptose de células glomerulares (SUGIYAMA et al., 1996) e mesangiais (MISHRA et al., 2005), colaborando ainda mais para a progressão da doença renal (MATHEW et al., 2008) e proteinúria. Vários genes regulam a apoptose, entre eles o BCL-2 (um proto-oncogene que inibe a apoptose) e o BAX (um antagonista pró-apoptótico do BCL-2) (YANG et al., 2001b).

Vale ressaltar que a Aldo também pode provocar injúrias ao tecido renal, independentemente de alterações na pressão sanguínea (hipertensão) (RAFIQ et al., 2011), tornando a doença silenciosa e ainda mais grave.

2.4.2 Desordens cardiovasculares

A Aldo exerce várias e complexas ações em tecidos do sistema cardiovascular, como coração e endotélio vascular (NAMSOLLECK; UNGER, 2014). Quando se avalia a pressão sanguínea de pacientes com hiperaldosteronismo,

observa-se o risco de infarto do miocárdio. Estes resultados sugerem que a Aldo pode promover arteroesclerose (CACHOFEIRO et al., 2008; LI et al., 2014). Avaliando endotélio vascular, observou-se ainda inflamação, estresse oxidativo, fibrose e alterações hemodinâmicas (induzidos pela Aldo), que culminaram no aumento da permeabilidade vascular, na disfunção endotelial e no remodelamento vascular.

A falência cardíaca pode ser acompanhada pelo aumento significativo dos níveis de Aldo, e como resultado (direto ou indireto), observou-se a formação de fibrose, hipertrofia de miócitos e distúrbios de condução elétrica, que proporcionam a progressão da doença cardíaca (BRILLA, 2000; CAT; JAISSE, 2012; PATEL; MEHTA, 2012).

O SRA é considerado um dos maiores promotores do remodelamento e disfunção cardíaca. A Ang II, além de exercer ações diretas nos cardiomiócitos e células endoteliais, também estimula a secreção de Aldo. Estudos demonstram que ratos tratados com Aldo apresentaram hipertrofia e fibrose cardíaca e, quando submetidos ao tratamento com antagonista de MR, houve redução da morbidade e mortalidade (HILFINKER-KLEINER et al., 2006).

As doenças cardiovasculares e a doença renal estão intimamente relacionadas, de forma que a injúria de um órgão pode induzir a disfunção do outro e, em última análise, levar ao comprometimento de ambos (na denominada "síndrome cardiorrenal") (LEKAWANVIJIT; KRUM, 2014). Sendo assim, o estudo dos efeitos da Aldo nos rins também pode auxiliar no entendimento dessa síndrome.

2.5 Fatores pró-fibróticos

2.5.1 Fator de crescimento transformante β -1 (TGF β -1)

O TGF β -1 é uma citocina pleiotrópica, que se liga ao receptor tipo 1, por meio das proteínas Smad (SHI; MASSAGUÉ, 2003), sinalizando, assim, processos celulares, como proliferação e diferenciação fibroblástica (PATTERSON; PADGETT, 2000; LIU; PRAVIA, 2010).

Além disso, o TGF- β 1 pode promover a expansão da matriz extracelular, inibição das proteases que atenuam a progressão da fibrose e ainda regular a expressão do PAI-1 em tecidos renais (CHUN et al., 2008).

Já foi relatado o aumento da expressão do TGF β -1 em doenças fibróticas como fibrose pulmonar (KHALIL et al., 1996), cirrose hepática (BATALLER; BRENNER, 2005), fibrose renal (SCHNAPER et al., 2009), esclerose sistêmica e fibrose cardíaca (VARGAS, 2008). Em pacientes humanos com glomeruloesclerose segmental focal e em modelos experimentais de fibrose, o TGF β -1 esteve associado ao acúmulo de matriz extracelular (SCHNAPER et al., 2009).

2.5.2 Inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1)

A fibrinólise é o resultado da interação entre a ativação do plasminogênio e os inibidores da cascata de coagulação, para que ocorra a degradação da fibrina. A ativação do plasminogênio é a chave para que ocorra o processo de fibrinólise, pois é necessário a conversão do plasminogênio em plasmina. A plasmina apresenta uma atividade proteolítica importante para a degradação do colágeno (FAY; GARG; SUNKAR, 2007).

A ativação do plasminogênio em plasmina é mediada pela ativação do plasminogênio uroquinase (u-PA) e o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA). A ativação do u-PA e do t-PA é regulada pelos inibidores da ativação do plasminogênio, a saber: PAI-1, PAI-2 e PAI-3. O PAI-1 é o mais importante dos inibidores da conversão do plasminogênio em plasmina, devido a sua ação rápida (CESARI; PAHOR; INCALZI, 2010); atuando, portanto, como um fator fibrinogênico.

Níveis não fisiológicos (aumento ou diminuição) dos PAIs estão associados com várias desordens em humanos, como: obesidade, resistência insulínica, doenças cardíacas, enfisema, trombose, arteroesclerose, câncer e fibrose em diferentes tecidos (De TAEYE; SMITH; VAUGHAN, 2005). Estudos demonstraram que altos níveis de PAI-1 resultaram em fibrose tecidual (GHOSH; VAUGHAN, 2012).

O PAI-1 ainda promove o recrutamento de células inflamatórias e o acúmulo de matriz extracelular; em geral, é pouco expresso no rim normal, porém as doenças renais agudas e crônicas (como esclerose glomerular, nefroesclerose arterial, nefropatia diabética e nefropatias crônicas) podem induzir de forma marcante a expressão do PAI-1 (HE et al., 2010; MA; FOGO, 2009).

Avaliando a injúria renal, observou-se o aumento da expressão de PAI-1 em túbulos renais, vasos, glomérulos, áreas mesangiais, podócitos e células endoteliais

(REVELO et al., 2005) e altas concentrações séricas de PAI-1, em modelos experimentais de glomeruloesclerose (MA; FOGO, 2009).

2.6 Fatores pró-apoptóticos

A apoptose é um processo celular ordenado e orquestrado, que ocorre em condições fisiológicas (como na destruição celular, seguida por proliferação e substituição) e na doença (por exemplo, em nefropatias) (SUGIYAMA et al., 1996; WONG, 2011).

As características da apoptose incluem a condensação da cromatina, a ruptura nuclear e a fragmentação celular em corpos apoptóticos, sendo que este processo pode ser observado nas várias fases do estabelecimento da lesão renal (BASILE; ANDERSON; SUTTON, 2012).

Vários genes regulam a apoptose, entre eles o BCL-2, um proto-oncogene que inibe a apoptose e aumenta a sobrevivência celular, e o BAX, um antagonista pró-apoptótico do BCL-2 (YANG et al., 2001a). O aumento da expressão do BAX (associado à diminuição da expressão do BCL-2) e a atividade das caspases, compreendem o evento chave para a indução da apoptose. As caspases são proteases que clivam substratos com resíduos de aspartato, levando à condensação e fragmentação do núcleo e à externalização dos fosfolipídios de membrana para que as células possam ser fagocitadas (BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

Durante a lesão renal, a apoptose pode estar diretamente relacionada com a fibrose, uma vez que a perda das células renais pode resultar na substituição das mesmas por matriz extracelular e fibroblastos (YANG et al., 2001b). De acordo com Chen et al. (2009), a apoptose dos podócitos é crucial para o desenvolvimento da fibrose renal.

Alguns autores relataram que os hormônios esteroides podem ser capazes de induzir a apoptose em diferentes tecidos (DORSCHIED et al., 2001; ELMORE, 2007), enquanto que Mathew et al. (2008), Patni et al. (2007) e Chen et al. (2009) demonstraram que a Aldo promoveu a apoptose em células mesangiais renais, em células do túbulo proximal e em podócitos, respectivamente, e que o antagonismo ao MR atenuou (mesmo que parcialmente) os efeitos pró-apoptóticos deste hormônio; porém não existem relatos a respeito da participação do GR e do efeito dos seus antagonistas na apoptose induzida pela Aldo.

3 HIPÓTESE

Em um projeto anterior, realizado pelo nosso grupo de pesquisa (PANDOLFI, 2015), foram encontrados fortes indícios de alterações na morfometria renal (como a expansão da área glomerular e intersticial), após 21 dias de tratamento com Aldo. No entanto, tais alterações não foram esclarecidas quanto ao tipo, ou seja: proliferação, hipertrofia, fibrose, migração e/ou morte celular. Vale ressaltar que os efeitos hormonais observados foram independentes da suplementação com Na^+ , mediante o fornecimento de uma dieta padrão aos animais, diferentemente do que foi relatado por outros autores (DOI et al., 2014; WANG et al., 2015b). Portanto, a hipótese do presente estudo é que o tratamento com Aldo (por 21 dias e sem a suplementação com Na^+) também poderia causar fibrose e/ou apoptose no tecido renal.

4 OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto foi avaliar, após o tratamento crônico com Aldo, a função renal e histologia das arteríolas renais, procurando correlacionar as possíveis alterações com a expressão de genes que modulam o processo de fibrose e apoptose.

Neste contexto, após os 21 dias de tratamento com Aldo, foram elaboradas as seguintes estratégias:

- Avaliar parâmetros bioquímicos e urinários, para o estudo da função renal em ratos;
- Analisar a PA;
- Verificar a ocorrência de alterações nas camadas das arteríolas renais;
- Estudar a expressão do RNAm para TGF- β 1, PAI-1 (fatores pró-fibróticos) e BAX (fator pró-apoptótico);
- Identificar a ocorrência de apoptose glomerular pela técnica de TUNEL e
- Além disso, avaliar a expressão do MR e GR no tecido renal e os efeitos do antagonismo aos receptores da Aldo em todos os parâmetros avaliados.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos, com aproximadamente 270 g, fornecidos pelo 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 plásticas (forradas com maravalha), em grupos (com até 5 animais), com livre acesso à água e ração, em temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

Para todos os procedimentos, foram considerados os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Animais de Laboratório (SBCAL) e obteve-se a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/ICBI) (protocolo: 033/04/03).

5.2 Protocolo anestésico e grupos experimentais

Os ratos foram anestesiados pela administração da associação Tiletamina/Zolazepam (40 mg/kg) (Zoletil, Virbac®) e Xilazina (5 mg/kg) (Anasedan, CEVA®), por via intramuscular (FLECKNELL, 2015), para a implantação de minibombas osmóticas (Alzet®, modelos 2004 e 2M) no tecido subcutâneo da região cervical dorsal, com a finalidade de administrar Aldo e RU486 (antagonista competitivo do GR) (SIGMA®) (Figura 3). A Espiro (antagonista competitivo do MR) (PFIZER®) foi administrada por via oral, diluída na água de bebida. O período de tratamento foi de 21 dias e os grupos experimentais são descritos a seguir:

- *Sham*: controle;
- Aldo: 150 µg/kg/dia de Aldo (SINPHITUKKUL et al., 2010);
- Espiro: 20 mg/kg/dia de Espiro (BARREIRA-CHIMAL; BOBADILLA, 2012);
- Aldo + Espiro: 150 µg/kg/dia de Aldo mais 20 mg/kg/dia de Espiro;
- RU: 1 mg/kg/dia de RU 486 (CASTAGLIUOLO et al, 2001);
- Aldo+ RU: 150 µg/kg/dia de Aldo mais 1 mg/kg de RU 486.

O uso das minibombas osmóticas possibilitou a infusão contínua de Aldo (0,10 µg/kg/min, totalizando 150µg/kg/dia) e RU (0,69 µg/kg/min, totalizando

1mg/kg/dia). Os ratos pertencentes ao grupo Espiro e *Sham* foram submetidos à cirurgia fictícia, porém sem a implantação da minibomba osmótica.

Ao término dos procedimentos, as minibombas foram retiradas para avaliação residual dos fármacos.

Figura 3: Ratos com minibombas osmóticas implantadas em tecido subcutâneo.

A - Animal pertencente ao grupo Aldo+RU (com 2 minibombas implantadas); B - Animal pertencente ao grupo Aldo (com 1 minibomba implantada). **Fonte:** Própria autoria.

5.3 Mensuração da pressão arterial(PA)

A PA foi mensurada em dois momentos distintos (antes do início e ao término dos tratamentos) e foi realizada de forma indireta, por meio de pletismografia de cauda (BP-2000-MR-4, *Visitech Systems*®) (Figura 4). Os ratos foram colocados nos contêntores, de forma a causar o menor nível de estresse possível. Após um breve período de adaptação, o esfigmomanômetro e o sensor foram posicionados no terço médio da cauda. Foram registradas 25 aferições seriadas da PA.

Figura 4: Pletismografia de cauda em ratos.

Ratos nos contêntores com a cauda posicionada para a medida da PA. **Fonte:** Própria autoria

5.4 Procedimentos para obtenção de amostras (urina e sangue) e parâmetros fisiológicos

5.4.1 Amostras de urina, cálculo do consumo de água e ração

No 20º dia de tratamento, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas (*Tecniplast, Buguggiate®*), individualmente, para a obtenção da urina e a mensuração do consumo de água e ração em 24 h.

O volume total de urina foi mensurado e alíquotas (com 1,5ml cada) foram armazenadas (-20 °C) para as análises bioquímicas.

O consumo de água foi obtido calculando a diferença entre o volume de água disponibilizado para cada animal e o volume residual (1). O consumo de ração foi determinado pela diferença da massa da ração inicial e a residual (2). 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.

5.4.2 Determinação do ganho de peso

Os ratos foram pesados em balança semi-analítica milesimal (Quimis 6441®), antes do início dos tratamentos e após serem retirados da gaiola metabólica. O ganho de peso (em gramas) foi calculado pela fórmula: peso corporal final – peso corporal inicial (3).

5.4.3 Coleta de sangue

Após serem retirados da gaiola metabólica, os ratos foram novamente anestesiados, conforme descrito no item 5.2. Então, após a abertura da cavidade abdominal, o sangue foi coletado pela punção da veia cava, utilizando uma agulha 25x7 mm, acoplada a uma seringa. As amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,5ml e, após a centrifugação, o plasma foi aspirado e armazenado a -20°C.

5.5 Análises bioquímicas plasmáticas e urinárias

No plasma, foram mensuradas as concentrações de creatinina, Na^+ e K^+ e na urina, as concentrações de creatinina e proteínas totais.

As concentrações de creatinina e de proteínas totais foram obtidas por testes colorimétricos e espectrofotometria (*TP Analyzer Plus Thermo Plate*®), utilizando os reagentes picrato alcalino (Creatinina K – Labtest®, leitura em 510 nm) e vermelho de pirogalol (Sensiprot - Labtest®, leitura em 600 nm), respectivamente.

A determinação das concentrações de Na^+ e K^+ foi feita pela técnica de captação de íons, com o uso do equipamento 9180 *Electrolyte Analyzer* (Roche®), que possui um eletrodo de vidro e um eletrodo de membrana líquida, específicos para esses íons.

5.6 Análise da função renal

O fluxo urinário (V) foi calculado pela fórmula $V = \text{volume total de urina (em ml)} / \text{tempo (min)}$ (4). O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado utilizando-se a depuração plasmática de creatinina (DPc), obtida por multiplicação do fluxo urinário (V) pela concentração urinária de creatinina (U_{creat}) e, depois, dividindo pela concentração plasmática de creatinina (P_{creat}), como descrito na equação: $DPc = V \cdot U_{\text{creat}} / P_{\text{creat}}$ (5). A DPc foi corrigida pelo peso corporal e apresentada para cada 100g (mL/min/100g).

A relação entre a concentração de proteínas totais (PU) e a concentração de creatinina (C) na urina (PU/C) (6) foi utilizada para avaliação da proteinúria.

5.7 Análise histopatológica

5.7.1 Obtenção das amostras

Ao final dos tratamentos e sob anestesia, os ratos foram submetidos à laparotomia mediana, para visualização dos rins; em seguida o gradil costal foi removido, para a exposição do coração. Uma agulha de tamanho 18G foi fixada ao ventrículo esquerdo e ligada à bomba peristáltica (*Masterflex L/S TM*®). 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 – NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl 0,9%, pH7.4), a 37 °C e, posteriormente, com uma solução de formalina tamponada 10% (NaH₂PO₄ Na₂HPO₄, 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 h. Após esse período, os fragmentos foram acondicionados em solução alcoólica a 70%, para posterior inclusão na parafina, obtendo-se cortes (3-4 µm de espessura) para realização de análise histopatológica.

5.7.2 Morfometria das arteríolas renais

Os cortes renais foram corados com Tricrômio de Masson. A morfometria das arteríolas renais foi determinada a partir de imagens obtidas pela câmera *Axion CamMRc*, acoplada ao microscópio óptico *Axio Vert.A1* (Zeiss®) (200X, 50 µm). O raio do lúmen, a área luminal e da túnica íntima+média foram delimitados, manualmente, em 10 arteríolas do córtex renal (por animal) e calculadas com auxílio do software *Image J*®, considerando as fórmulas: raio = diâmetro/2 (7) e área = $\pi \times \text{raio}^2$ (8). A área da túnica íntima+média foi obtida pela fórmula: área íntima+média – área do lúmen (9) e utilizada para o cálculo da relação íntima+média/lúmen (10).

5.8 Expressão do MR e GR no tecido renal

5.8.1 Preparo das amostras

Após os 21 dias de tratamento e com os ratos devidamente anestesiados, procedeu-se a laparotomia mediana, seguida pela nefrectomia. Então, o rim foi seccionado longitudinalmente e fragmentos renais ($\pm 0,5\text{cm}$) do córtex e medula foram coletados e armazenados (-80°C), separadamente, em microtubos, contendo *RNA Later* (Invitrogen®).

5.8.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA, a solução de *RNA Later* foi descartada e os fragmentos do córtex e medula foram lisados com um tampão à base de

isotiocianato de guanidina (*ReliaPrep RNA TissueMiniprepSystemI*, Promega®). Após a homogeneização, adicionou-se isopropanol (100 %) e as amostras foram processadas através de mini colunas, na qual o RNA se liga. As impurezas foram removidas por lavagens subsequentes e, então, o RNA purificado foi eluído com água livre de RNases, para ser utilizado na síntese de cDNA.

O cDNA foi sintetizado a partir de 300 ng do RNA total, utilizando o kit *GoScript Reverse Transcriptions System* (Promega®) e o termociclador (Applied Biosystems Veriti®), de acordo com o protocolo do fabricante.

5.8.3 PCR convencional para MR e GR

A detecção da expressão gênica do MR e GR no córtex e medula renal foi feita pela técnica de PCR convencional.

Os *primers* foram selecionados para a amplificação de fragmentos dos genes MR, GR e GAPDH. As sequências dos *primers* utilizados foram descritas no Quadro 1.

Os fragmentos de GAPDH, MR e GR foram amplificados por PCR, durante 30 ciclos, em 25 µl do volume total, contendo: 2.5U de TaqDNA Polimerase, 0.5 mMdNTPs e 10 pmol dos *primers* específicos.

A eletroforese dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose (1,5%). As bandas foram observadas com o corante Sybr safe (Invitrogen®) no fotodocumentador (Imaging System UVP®).

Quadro 1: *Primers* utilizados nas reações de PCR convencional.

Gene	Orientação	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
GAPDH	Senso	CCC TTC ATT GAC	216	ZHOU et al. (2012)
		CTC AAC TAC ATG		
GAPDH	antissenso	CTT CTC CAT GGT	380	LEITE-DELLOVA et al. (2008)
		GGT GAA GAC		
		AGA AGA TGC ATC		
MR	senso	AGT CTG CC	380	LEITE-DELLOVA et al. (2008)
MR	antissenso	GTG ATG ATC TCC		
		ACC AGC AT	530	LEITE-DELLOVA et al. (2008)
GR	Senso	TGC AGC AGT GAA		
		ATG GGC AA		
GR	antissenso	GGG AAT TCA ATA	530	LEITE-DELLOVA et al. (2008)
		CTC ATG GTC		

pb = pares de base. **Fonte:** Própria autoria.

5.9 Expressão RNAm para TGF- β 1, PAI-1 e BAX (PCR em tempo real)

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para quantificar o RNAm para TGF- β 1, PAI-1 e BAX no tecido renal (córtex + medula). Essa etapa foi realizada com a colaboração do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA/ZMV) da FZEA/USP. Para a extração do RNA total e síntese do cDNA utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item 5.8.2. As análises foram feitas no sistema *LightCycler 480* (Roche®). O reagente usado foi o *SyBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems®). O PCR em tempo real foi realizado em 40 ciclos, sendo que a reação foi iniciada pela ativação da polimerase a 95°C por 9 min, seguida pela desnaturação por 30 s na mesma temperatura. A temperatura de anelamento de todos os *primers* foi de 60 °C, por 30 s, e da extensão da fita de DNA foi de 72 °C, por 1 min. Realizado uma reação de extensão final de 72°C por 7 min. Cada amostra de cDNA foi analisada em duplicata. As diferenças entre a expressão do RNAm dos genes alvo e endógeno foram calculadas utilizando o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT(11)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram apresentados em relação ao controle. As sequências dos *primers* utilizados são descritas no Quadro 2.

Quadro 2: *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Orientação	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
18S	senso	AGT CCC TGC CCT TTG TAC ACA	69	LI et al. (2009)
18S	antissenso	GAT CCG AGG GCC TCA CTA AAC		
TGF- β 1	senso	CTT TGT ACA ACA GCA CCC GC	94	WANG et al. (2015a)
TGF- β 1	antissenso	CGG GTG ACT TCT TTG GCG TA		
PAI-1	senso	GAT GGG CAC GAG TAC GAC ATC	66	CHUN et al. (2008)
PAI-1	antissenso	TGC AAT GAA CAT GCT GAG GG		
BAX	senso	TGTTTGCTGATGGCAA CTTC	104	PARK et al. (2014)
BAX	antissenso	GATCAGCTCGGGCAC TTTAG		

pb = pares de base. **Fonte:** Própria autoria.

5.10 Detecção da apoptose celular pela técnica de TUNEL (*Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP Nick-end Labeling*)

Para a técnica de TUNEL utilizou-se um *kit* de detecção de morte celular *in situ* (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System), seguindo as orientações do fabricante (Promega®). Resumidamente, a marcação do DNA fragmentado em células apoptóticas ocorre pela incorporação da fluoresceína no final da fita de DNA, usando a enzima deoxinucleotídeo terminal transferase. A fluoresceína envolve o DNA fragmentado e permite a visualização do mesmo em microscópios de fluorescência.

O procedimento foi iniciado pela desparafinização dos cortes histológicos, por meio da imersão desses em uma cuba contendo xilol (em duas etapas consecutivas de 15 min). Depois fez-se a reidratação pela imersão seriada (por 5 min) em cubas contendo diferentes concentrações decrescentes de álcool (100%, 95%, 85%, 70% e

50%), então as lâminas foram submersas, sequencialmente, em solução de NaCl 0,85%, PBS 1X, formaldeído 4% (por 15 min) e novamente no PBS.

Então, o tecido renal foi tratado com proteinase K (20 µg/mL), durante 8 min e, em seguida, lavado com uma solução de PBS (2 vezes), formaldeído 4% e novamente PBS. Foi adicionado o *Equilibration Buffer* à lâmina por 5 min e sobre este, foi colocado o reagente de TUNEL, à 37°C (em atmosfera umidificada), por 60 min. Após este período, as lâminas foram lavadas com uma solução composta por cloreto de sódio e citrato de sódio (SSC 2x) (15 min cada), para a parada da reação.

Para o controle da reação, os cortes histológicos foram tratados com o corante fluorescente Hoechst 33342 (SIGMA®), no qual foi empregado para corar o DNA de células viáveis. Do mesmo modo, também foi realizado o controle positivo com a aplicação de DNase (60 min de incubação, à 37°C). As amostras foram analisadas utilizando microscopia de fluorescência (*Axio Scope.A1 – Zeiss®*). Para a avaliação do TUNEL, utilizou-se o filtro verde (na faixa de excitação de 450-500nm e de detecção de 515-565 nm) e para a avaliação da coloração Hoechst 33342 a faixa de excitação foi de 350 nm e a de detecção, 461 nm. A apoptose celular (células TUNEL positivas) foi quantificada nos glomérulos, em 3 campos aleatórios (40X), para todos os animais. O resultado foi apresentado como a porcentagem de células TUNEL positivas (YANG *et al.*, 2001b).

5.11 Análise dos resultados

Os valores médios foram apresentados com seus respectivos erros padrão, para a realização da análise estatística. A comparação entre PA inicial e a PA final, em cada grupo, foi feita teste t não pareado. As comparações múltiplas foram feitas pelo método *one-way* ANOVA e o pós teste de *Bonferroni*, utilizando o programa *GraPhPad Prism®* (versão 5.01). Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos não foram modificados pelos tratamentos (Aldo e/ou Espiro ou RU), em comparação à situação controle (*Sham*). A PA de cauda também não foi diferente entre os períodos (inicial e final) e os diferentes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios dos parâmetros fisiológicos avaliados em gaiola metabólica ou antes e após o término dos tratamentos.

Parâmetros	<i>Sham</i>	Espiro	RU	Aldo	Aldo+Espiro	Aldo+RU
Consumo de ração	4,08±0,19	4,1±0,26	4,81±0,45	5,26±0,62	5,42±0,60	5,79±0,47
Ganho de peso	95,57±12,47	91,90±16,94	104,10±12,88	117,00±12,8	106,80±14,28	102,10±20,30
Consumo de água	10,02±0,64	9,88±0,26	10,26±0,87	10,90±0,96	11,40±0,62	10,96±1,27
Fluxo urinário	0,003±0,004	0,003±0,0001	0,004±0,0003	0,004±0,004	0,004±0,0004	0,004±0,0008
PA inicial	102,90±0,90	101,60±1,89	105,80±1,89	105,60±1,72	105,90±2,5	112,20±6,37
PA final	103,60±1,40	101,80±1,57	106,60±1,99	108,60±2,1	102,70±1,48	114,20±6,86

Valores apresentados como médias ± erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. Consumo de ração = g/100g de peso/dia. Ganho de peso em g. PA em mmHg. Consumo de água = mL/100 g de peso/dia. Fluxo urinário = mL/min/100 g de peso. N=5 a 10. **Fonte:** Própria autoria.

6.2 Efeito dos tratamentos sobre os parâmetros bioquímicos

Os valores médios da concentração plasmática de Na⁺, K⁺ e creatinina, após os 21 dias de tratamento com Aldo e/ou Espiro ou RU, constam da Tabela 2.

O tratamento com a Espiro promoveu um aumento do K⁺ (P=0,029), em relação à situação controle. A Espiro é um fármaco poupador de K⁺, devido à diminuição da secreção desse íon no ducto coletor renal, como uma consequência do antagonismo ao MR e aos efeitos da Aldo. No grupo Aldo, a concentração plasmática de K⁺ foi numericamente menor (P=0,230), com a aparente melhora dessa condição com o tratamento conjunto com a Espiro.

Tabela 2: Valores médios da concentração plasmática de Na⁺, K⁺ e creatinina após os 21 dias de tratamento.

Parâmetros	Sham	Espiro	RU	Aldo	Aldo+Espiro	Aldo+RU
Na ⁺ (mEq/L)	137,60±1,70	137,90±1,31	136,80±2,62	135,40±2,72	137,7±2,00	133,90±2,40
K ⁺ (mEq/L)	4,45±0,19	4,95±0,08*	4,71±0,16	4,13±0,14	4,27±0,19	4,19±0,17
Creatinina (mg/dL)	0,58±0,03	0,64±0,02	0,55±0,04	0,55±0,04	0,63±0,03	0,67±0,04

Valores apresentados como médias ± erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. *P=0,029 *Sham versus Espiro*. N=6 a 9. **Fonte:** Própria autoria.

6.3 Efeito dos tratamentos sobre a função renal

Os valores médios dos parâmetros utilizados na avaliação da função renal nos ratos, após o tratamento com Aldo e/ou Espiro ou RU por 21 dias, são apresentados na Tabela 3. Nenhum dos tratamentos alterou a depuração plasmática de creatinina (DPc; um parâmetro utilizado para estimar o ritmo de filtração glomerular) e a perda urinária de proteínas (analisada pela relação PU/C). No grupo Aldo+RU, observou-se uma tendência para a redução da PU/C (P=0,074), em relação ao grupo Aldo.

Tabela 3: Valores médios da depuração plasmática de creatinina e relação proteína/creatinina urinárias após os 21 dias de tratamento.

Parâmetros	Sham	Espiro	RU	Aldo	Aldo+Espiro	Aldo+RU
DPc (mL/min/100g)	0,43±0,06	0,37±0,04	0,41±0,06	0,35±0,03	0,32±0,02	0,38±0,04
PU/C	1,35±0,22	1,20±0,21	1,29±0,22	1,64±0,23	1,51±0,25	1,11±0,14

Valores apresentados como médias ± erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. DPc=depuração plasmática de creatinina. PU=concentração da proteína total na urina. PU/C=relação entre a concentração da proteína total e a concentração de creatinina urinárias. N=8 a 10. **Fonte:** Própria autoria.

6.4 Arteríolas renais

Os tratamentos não alteraram o raio do lúmen, a área da túnica íntima+média e a relação média+íntima sobre o lúmen nas arteríolas renais corticais, em comparação ao grupo *Sham* (Tabela 4). Imagens representativas de arteríolas renais de ratos, na situação controle e após os 21 dias de tratamento com Aldo são apresentadas na Figura 5.

Tabela 4: Valores médios do raio do lúmen, da área da túnica íntima+média e da relação íntima+média/lúmen de arteríolas renais.

Parâmetros	Sham	Espiro	RU	Aldo	Aldo+Espiro	Aldo+RU
Raio do lúmen (µm)	2,89±0,03	2,77±0,11	2,75±0,08	2,80±0,08	2,878±0,08	2,79±0,10
Área íntima+média (µm ²)	4,13±0,20	4,02±0,20	3,81±0,16	3,86±0,11	4,12±0,22	3,82±0,12
Íntima+média/lúmen	1,85±0,11	2,08±0,17	1,92±0,10	1,87±0,11	2,18±0,24	1,73±0,10

Valores apresentados como médias ± erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. N=6. **Fonte:** Própria autoria.

Figura 5: Imagem representativa de arteríolas renais (setas), em cortes transversais de rim de rato (200X, 50 µm).

Nos dois grupos (*Sham* e *Aldo*), o diâmetro das arteríolas foi muito próximo (2,96 versus 3,09 µm, respectivamente). Aldo=aldosterona. **Fonte:** Própria autoria.

6.5 Expressão MR e GR no tecido renal

Na Figura 6 observa-se que a técnica do PCR convencional foi padronizada, de acordo com a correta visualização da banda correspondente ao gene constitutivo (GAPDH) e a não evidência de bandas nos controles negativos. Também foi evidenciada a expressão dos genes MR e GR no córtex e medula renal.

Figura 6: Eletroforese dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR convencional.

Genes MR (380 pares de base), GR (530 pares de base) e GAPDH (216 pares de base) no córtex (**C**) e medula renal (**M**) de animais pertencentes ao grupo Aldo. Marcador= 100 pb DNA Ladder®. **Fonte:** Própria autoria.

6.6 Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU sobre a expressão de RNAm para TGF- β 1, PAI-1 e BAX

O tratamento com Aldo por 21 dias aumentou a expressão renal do RNAm para TGF- β 1 e PAI-1 (Figuras 7, 8e Tabela 5), dois fatores pró-fibróticos envolvidos com o acúmulo progressivo de matriz extracelular (LANG; DAI, 2016). A Espiro (antagonista do MR) não conseguiu reverter o efeito hormonal (Figura 7); no entanto, o RU (antagonista do GR) pareceu reduzir a ação da Aldo, principalmente sobre a expressão do RNAm para PAI-1 ($P=0,145$) (Figura 8).

Figura 7: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a expressão de RNAm para TGF- β 1 no rim de rato.

Os valores correspondem à média $\pm$ erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. * $P < 0,05$ versus Sham. # $P < 0,001$ versus grupo Espiro. $P = 0,312$ grupo Aldo versus grupo Aldo+RU. N=3 a 4. **Fonte:** Própria autoria.

Figura 8: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a expressão de RNAm para PAI-1 no rim de rato.

Os valores correspondem à média $\pm$ erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. * $P < 0,05$ versus Sham. # $P < 0,05$ versus grupo Espiro. $P = 0,145$ grupo Aldo versus grupo Aldo+RU. N= 3 a 4. **Fonte:** Própria autoria.

Conforme apresentado na Figura 9, o tratamento com Aldo por 21 dias também aumentou a expressão renal do RNAm para BAX, um fator indutor de apoptose. O tratamento concomitante com Espiro (antagonista do MR) ou RU

(antagonista do GR) foi capaz de abolir o efeito da Aldo sobre a expressão do RNAm para BAX ($P < 0,05$).

Figura 9: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a expressão de RNAm para BAX no rim de rato.

Os valores correspondem à média $\pm$ erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. ** $P < 0,001$ versus Sham. & $P < 0,05$ versus grupo Aldo. N=3 a 4. **Fonte:** Própria autoria.

Na Tabela 5, são apresentados os valores médios da expressão renal do RNAm para TGF- β 1, PAI-1 e BAX, em todos os tratamentos.

Tabela 5: Valores médios da expressão de RNAm para TGF- β 1, PAI-1 e BAX no rim de ratos após 21 dias de tratamento.

Gene	Sham	Espiro	RU	Aldo	Aldo+Espiro	Aldo+RU
TGF- β 1	1,00 $\pm$ 0,21	1,20 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,21	2,55 $\pm$ 0,59*	3,13 $\pm$ 0,32 [#]	1,59 $\pm$ 0,59
PAI-1	0,99 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,38	1,12 $\pm$ 0,11	3,22 $\pm$ 0,87*	3,66 $\pm$ 0,80 [#]	1,40 $\pm$ 0,27
BAX	1,02 $\pm$ 0,16	1,53 $\pm$ 0,23	0,99 $\pm$ 0,08	3,07 $\pm$ 0,60**	1,24 $\pm$ 0,31 ^{&}	1,30 $\pm$ 0,25 ^{&}

Valores apresentados como médias $\pm$ erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. * $P < 0,05$ versus Sham. [#] $P < 0,001$ versus grupo Espiro. ** $P < 0,001$ versus Sham. & $P < 0,05$ versus grupo Aldo. N=3 a 4. **Fonte:** Própria autoria.

6.7 Avaliação da apoptose em glomérulo de rato pela técnica de TUNEL

As células TUNEL positivas foram identificadas nos glomérulos devido à marcação verde fluorescente circunscrita, como demonstrado na Figura 10A. Essa avaliação foi confirmada a partir da contra coloração com Hoechst, onde, as células TUNEL positivas deveriam se apresentar como Hoechst negativa (Figura 10B).

Figura 10: Figura representativa de células TUNEL positivas em glomérulo de rato.

No detalhe, células TUNEL positivas, marcadas pela fluorescência verde (A) e as mesmas células não marcadas pela fluorescência azul (Hoechst negativas) (B). (40X, 200 μ m). **Fonte:** Própria autoria.

Em comparação ao grupo *Sham*, os tratamentos com Espiro e RU sozinhos não aumentaram a contagem de células TUNEL positivas nos glomérulos. Porém, no grupo Aldo observou-se o aumento dessa contagem, em relação aos demais grupos ($P < 0,05$). Os tratamentos concomitantes com Aldo e/ou Espiro e RU reverteram esse efeito hormonal (Figuras 11 e 12).

Figura 11: Efeito da Aldo e/ou Espiro e RU486 sobre a contagem de células TUNEL positivas em glomérulo de rato.

Os valores correspondem à média $\pm$ erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. ** $P < 0,01$ versus *Sham*. & $P < 0,05$ versus grupo Aldo. N=6. **Fonte:** Própria autoria.

Os valores médios da contagem de células TUNEL positivas nos glomérulos constam da Tabela 6 e uma representação da marcação fluorescente é apresentada na Figura 12.

Tabela 6: Valores médios da contagem de células TUNEL positivas em glomérulo de rato após 21 dias de tratamento.

	<i>Sham</i>	Espiro	RU	Aldo	Aldo+Espiro	Aldo+RU
Contagem de células TUNEL positivas	3,17±0,67	5,34±0,94	12,33±6,4	35,29±10,06**	7,83±2,37 ^{&}	10,61±0,76 ^{&}

Valores apresentados como médias $\pm$ erro padrão. Aldo=aldosterona. Espiro=espironolactona. RU=RU486. **P<0,01 *versus Sham*. [&]P<0,05 *versus* grupo Aldo. N=6.**Fonte:** Própria autoria.

Figura 12: Detecção de células TUNEL positivas em glomérulos, por microscopia de fluorescência.

A) Situação controle (*Sham*): no detalhe (seta), 1 célula TUNEL positiva. **B)** Tratamento com aldosterona: observa-se o aumento da marcação fluorescente. **C)** Tratamento com espironolactona. **D)** Tratamento concomitante com aldosterona + espironolactona: nota-se a redução do número de células TUNEL positiva, em relação ao tratamento com aldosterona. **E)** Tratamento com RU 486. **F)** Tratamento com aldosterona + RU486: observa-se a redução das células TUNEL positivas, em relação ao tratamento com aldosterona.**Fonte:** Própria autoria.

7 DISCUSSÃO

Os tratamentos não interferiram sobre os parâmetros fisiológicos avaliados, indicando que não ocorreram alterações metabólicas nos animais. Nos grupos Aldo, Aldo+Espiro e Aldo+RU, foi possível observar uma tendência para o maior consumo de ração e, conseqüentemente, maior ganho de peso. Essa observação pode estar relacionada ao fato de que nesses grupos, os ratos iniciaram os experimentos com um peso corporal um pouco menor (240 g *versus* 260 g) e por isso apresentaram maior consumo médio de ração no período, mas sem diferença estatística entre os tratamentos.

Mesmo nos grupos tratados com a Espiro (Espiro e Aldo+Espiro), não houve diferença no consumo de água e no fluxo urinário. A Espiro é considerada um diurético de potência fraca, uma vez que atua no ducto coletor, um segmento do néfron distal, responsável pela reabsorção de apenas 1 a 3 % da carga filtrada de Na^+ . Além disso, a ausência da diurese e polidipsia compensatória, mediante o tratamento com a Espiro, podem ser explicadas pelo “efeito escape do diurético”, onde a diminuição na reabsorção de Na^+ em um segmento tubular, desencadeia mecanismos que compensam esse efeito. Por exemplo, a diminuição da reabsorção de Na^+ no ducto coletor, provavelmente, provocada pela Espiro, pode ter induzido a perda de soluto e de água. Essa perda, por sua vez, levaria à diminuição do volume extracelular (mesmo que pequena), suficiente para ativar o SRA. A Ang II, com a capacidade de aumentar reabsorção de Na^+ no túbulo proximal, compensaria a perda de soluto e água no néfron distal, limitando, assim, o efeito do diurético (SEGURO; HELOU, 2006).

Não ocorreu a elevação na PA nos ratos, após os 21 dias de tratamento com Aldo. Considerando o mecanismo de ação da Aldo, esperava-se pela retenção de Na^+ e a expansão do volume extracelular, que levariam ao aumento da PA (ELIAS et al., 2012). Entretanto, esse efeito hormonal não foi observado. De acordo com Schrier (2010), a administração de doses elevadas de Aldo (como foi feito nessa pesquisa) promove, inicialmente, a diminuição na excreção urinária de Na^+ e a retenção desse íon. Porém, na sequência, a excreção urinária de Na^+ aumenta para a manutenção do balanço de Na^+ , evitando a ocorrência de edemas. Esse fenômeno é denominado “efeito paradoxal da Aldo” e envolve diferentes mecanismos: 1) a expansão de volume (ocasionada pela Aldo), inibe a reabsorção de Na^+ no túbulo

proximal, compensando, assim, a reabsorção distal desse íon e 2) ocorre o aumento da concentração circulante dos hormônios natriuréticos (como o peptídio atrial natriurético), em decorrência da expansão de volume, sendo que esses hormônios inibem as ações da Aldo. Em conjunto, esses dois mecanismos contribuem para o “efeito paradoxal da Aldo” e previnem a formação de edema e a hipertensão.

Em relação ao balanço de Na^+ (ou seja, equilíbrio entre a ingestão e a excreção do Na^+) o “escape do diurético” e o “efeito paradoxal da Aldo” são similares.

Vários autores relataram hipertensão em ratos, induzida pela Aldo. Mas nesses experimentos, além da administração do hormônio, os animais receberam uma dieta suplementada com NaCl, destacando, assim, a importância do sal na sensibilização dos tecidos para a ação da Aldo (NISHIYAMA et al., 2004; SHIBATA et al., 2007). Portanto, a não elevação da PA, observada na presente pesquisa, foi condizente com: a ingestão de uma dieta padrão (com níveis normais de NaCl), os valores plasmáticos normais de Na^+ e a manutenção do volume extracelular, mesmo após a administração da Aldo.

Caso o tratamento com a Aldo fosse mais prolongado (além dos 21 dias), a hipertensão poderia ser detectada, uma vez que Li et al. (2012), Mathew et al. (2008) e Park e Schiffrin (2001) observaram a elevação da PA em ratos somente após 2 ou 4 semanas do início do tratamento com Aldo, com ou sem suplementação com NaCl (1%).

Os valores médios da concentração plasmática de Na^+ não diferiram entre os grupos. Possivelmente, a retenção de sódio no ducto coletor (decorrente da ação mineralocorticoide) foi compensada pela diminuição da reabsorção desse íon no túbulo proximal, de acordo com os mecanismos descritos anteriormente para o “efeito paradoxal da Aldo” (SCHRIER, 2010; WANG et al., 2001).

O tratamento com a Espiro promoveu o aumento da concentração plasmática de K^+ , em comparação à situação controle. De acordo com Seguro e Helou (2006), a hipercalemia é resultante do uso prolongado da Espiro e coincide com o mecanismo de ação desse fármaco. Mesmo sem comprovação estatística, o valor médio da concentração plasmática de K^+ no grupo Aldo foi numericamente menor do que no grupo Espiro. A Aldo estimula a expressão e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na membrana basolateral das células principais do ducto coletor, incrementando o influxo celular de K^+ , a partir do interstício (STUDER et al., 2011). Considerando que

nesse segmento tubular, o gradiente eletroquímico favorece o efluxo de K^+ em direção ao lúmen (através dos canais do tipo ROMK), a diminuição da concentração plasmática de K^+ poderia ser observada no grupo Aldo. Possíveis perdas urinárias de K^+ também seriam compensadas pela ingestão alimentar ou pela ação de outros tecidos reguladores da concentração extracelular desse íon, como o fígado e a musculatura esquelética, evitando a hipocalcemia (OH; KIM; YON, 2013).

Os valores médios da depuração plasmática de creatinina (DPc) e da relação entre a concentração da proteína total e a concentração de creatinina urinárias (PU/C) não foram alteradas pelos tratamentos, indicando que a Aldo e/ou Espiro e RU não interferiram com o ritmo de filtração glomerular e não induziram a proteinúria. De acordo com a literatura, o tratamento com Aldo pode comprometer a estrutura da barreira de filtração glomerular, principalmente pela injúria aos podócitos, levando à proteinúria (NAGASE; FUJITA, 2008; SHIBATA et al., 2007). Mas nesses trabalhos, a suplementação com NaCl e a hipertensão (não praticada e não detectada na presente pesquisa, respectivamente) foram cruciais para desenvolvimento das alterações glomerulares provocadas pela Aldo.

No tratamento concomitante com Aldo+RU, verificou-se uma tendência para redução da PU/C, em relação ao tratamento apenas com a Aldo. Nas glomerulopatias, o antagonismo aos receptores da Aldo (principalmente ao MR) é eficaz na redução da proteinúria (SHIBATA et al., 2007). Porém, essa condição não foi constatada, avaliando os resultados apresentados; além disso, as informações sobre os efeitos do RU 486 na função glomerular, que justifiquem uma possível redução na PU/C são escassas.

As lesões vasculares mais frequentemente associadas ao tratamento com a Aldo e reveladas por meio da avaliação histopatológica são: proliferação das células endoteliais (túnica íntima) e musculares lisas (túnica média) e deposição de colágeno, que uma vez presentes, reduziriam o diâmetro vascular e comprometeriam o fluxo sanguíneo (BRIET; SCHIFFRIN, 2013). A Aldo ainda poderia reduzir o diâmetro das arteríolas renais e alterar o ritmo de filtração glomerular (RFG) (LIANG et al., 2011). Contudo, no nosso experimento, a Aldo não provocou alterações na estrutura das arteríolas do córtex renal. Esses resultados são condizentes com a ausência de alterações no RFG (estimado pela DPc) e no fluxo urinário. O RFG e o fluxo urinário são diretamente afetados pela resistência vascular e o fluxo sanguíneo nas arteríolas renais (AIRES et al., 2012b).

Mesmo sem provocar alterações na função e na estrutura das arteríolas renais, o tratamento com a Aldo induziu respostas precoces relacionadas ao remodelamento tecidual. Entre elas, o aumento na expressão renal do RNAm para TGF- β 1 e PAI-1; ou seja, dois genes envolvidos em respostas pró-fibróticas e no acúmulo de matriz extracelular (LANG; DAI, 2016). Esses resultados concordam com experimentos *in vitro* (HAN et al., 2009; HUANG et al., 2008) e *in vivo* (CHUN et al., 2008), que evidenciaram o aumento da expressão do RNAm para esses genes em células renais, mediante o tratamento com Aldo. No entanto, ao contrário do que foi descrito por esses autores, o antagonismo aos receptores da Aldo não foi eficiente para reverter o efeito hormonal.

O antagonismo ao GR (pelo uso do RU 486) produziu evidências mais promissoras para a redução do efeito estimulatório da Aldo, principalmente sobre a expressão do RNAm para PAI-1. Em cardiomiócitos de rato, o RU 486 aboliu a resposta fibrótica (deposição de colágeno) induzida pela dexametasona (De PRIYANKA et al., 2011), mas resultados semelhantes (com antagonismo ao GR) ainda não haviam sido descritos para o tecido renal. De acordo com Wang et al. (2015a), muitas evidências sugerem que a Espiro pode atuar como um agente antifibrótico (devido ao antagonismo ao MR); entretanto, na rotina clínica os resultados da Espiro no controle da fibrose induzida pela Aldo, ainda são insatisfatórios.

Em um projeto anterior do nosso grupo de pesquisa (PANDOLFI, 2015), o mesmo tratamento com Aldo por 21 dias levou a um aumento da área glomerular. Uma alteração que pode ser explicada pela expansão da matriz extracelular. Os resultados atuais, com o aumento da expressão do RNAm para TGF- β 1 e PAI-1 no tecido renal (induzido também pela Aldo), cooperaram para o entendimento da alteração na morfometria glomerular, evidenciada anteriormente.

O aumento na expressão renal do RNAm para BAX, assim como o aumento na contagem de células TUNEL positivas nos glomérulos, sugerem que a Aldo pode induzir respostas pró-apoptóticas no tecido renal, precoces e independentemente da suplementação com NaCl e do desenvolvimento da hipertensão. Aparentemente, esse efeito pode ser desencadeado tanto pela ligação da Aldo com o MR, quanto com o GR, uma vez que a Espiro e o RU conseguiram abolir o efeito hormonal.

A avaliação inicial de que a Aldo pode induzir a apoptose no rim está de acordo com os resultados de Lee et al. (2009), Yang et al. (2014) e Liang et al.

(2011), que evidenciaram (*in vitro* e *in vivo*) a apoptose em podócitos de ratos, em resposta à Aldo.

Foram encontradas evidências de que o antagonismo ao MR é capaz de reduzir a ação da Aldo sobre a indução de respostas apoptóticas no rim, concordando com nossos resultados (LIANG et al., 2011). Porém, não foram encontradas evidências semelhantes para o antagonismo ao GR e seus efeitos na apoptose de células renais, relacionados à Aldo. Em células cardíacas fetais, o RU 486 reduziu a apoptose provocada pela infusão de cortisol (FENG et al., 2013).

Os efeitos resultantes do antagonismo ao MR (por exemplo: a elevação do K⁺ plasmático e a reversão do efeito da Aldo sobre as respostas apoptóticas) e ao GR (redução ou reversão do efeito da Aldo sobre as respostas fibróticas e apoptóticas) estão de acordo com a expressão desses receptores no córtex e na medula renal dos ratos.

8 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que a Aldo, após 21 dias, pode induzir respostas precoces sobre o remodelamento do tecido renal, relacionadas ao aumento da expressão dos genes moduladores da fibrose (através do receptor GR) e apoptose (através dos receptores GR e MR), mas que ainda não comprometeram o volume corporal, a pressão arterial e a função renal. Além disso, essas respostas foram independentes da sobrecarga de sal.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. Função tubular. In: __ **Fisiologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 710-729, 2012a.
- AIRES, M. M. Hemodinâmica renal. In: __ **Fisiologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 694-707, 2012b.
- BARRERA-CHAVES, J.; BOBADILLA, N.A. Are recently reported biomarkers helpful for early and accurate diagnosis of acute kidney injury? **Biomarkers**, v. 17, n. 5, p. 385-393, 2012.
- BASILE, D. P.; ANDERSON, M. D.; SUTTON, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1303-1353, 2012.
- BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.
- BLASI, E.R. et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. **Kidney International**, v. 63, n. 5, p. 1791-1800, 2003.
- BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.
- BOOTH, R.E.; JOHNSON, J.P.; STOCKAND, J.D. Aldosterone. **Advances in Physiology Education**, v. 26, n. 1, 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. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 128, n. 3, p. 89-97, 2012.
- BRIET, M.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular actions of aldosterone. **Journal of vascular research**, v. 50, n. 2, p. 89-99, 2013.
- BRILLA, C.G. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. **Cardiovascular research**, v. 47, n. 1, p. 1-3, 2000.
- CACHOFEIRO, V. et al. Aldosterone and the vascular system. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 109, n. 3, p. 331-335, 2008.
- CASTAGLIUOLO, I. et al. Endogenous corticosteroids modulate Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rats. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n.4, p. G539-G545, 2001.
- CAT, A. N. D.; JAISSER, F. Extrarenal effects of aldosterone. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 21, n. 2, p. 147-156, 2012.

CESARI, M.; PAHOR, M.; INCALZI, R.A. REVIEW: Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): A key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. **Cardiovascular therapeutics**, v. 28, n. 5, p. e72-e91, 2010.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. **Physiological reviews**, v. 93, n. 3, p. 1139-1206, 2013.

CHEN, C. et al. Aldosterone induces apoptosis in rat podocytes: role of PI3-K/Akt and p38MAPK signaling pathways. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 113, n. 1, p. e26-e34, 2009.

CHEN, F. et al. Aldosterone induces clonal β -cell failure through glucocorticoid receptor. **Scientific reports**, v. 5, n. 13215, p. 1-13, 2015.

CHUN, T. Y. et al. Aldosterone, but not angiotensin II, increased profibrotic factors in the kidney of adrenalectomized stroke prone spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 2, p. E305-E312, 2008.

DE, P. et al. Excess of glucocorticoid induces myocardial remodeling and alteration of calcium signaling in cardiomyocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 1, p. 105-114, 2011.

De TAEYE, B.; SMITH, L.H.; VAUGHAN, D.E. Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 149–154, 2005.

DOI, T. et al. 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, p. e93513, 2014.

DORSCHIED, D. R. et al. Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 10, p. 1939-1947, 2001.

ELIAS, L. L. K. et al. Glândula Adrenal. In: Mello-Aires M. **Fisiologia**, 4^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1080-1095, 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FAY, W.P.; GARG, N.; SUNKAR, M. Vascular functions of the plasminogen activation system. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 6, p. 1231-1237, 2007.

FEITEIRO, J. et al. Genomic and Nongenomic Effects of Mifepristone at the Cardiovascular Level A Review. **Reproductive Sciences**, p. 1-13, 2016.

FENG, X. et al. Cortisol stimulates proliferation and apoptosis in the late gestation fetal heart: differential effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 4, p. R343-R350, 2013.

FLECKNELL, P. Anaesthesia of common laboratory species: special considerations. In: ____ **Laboratory Animal Anesthesia**. 4th ed. Oxford: Elsevier. p.195-199, 2015.

GHOSH, A.K.; VAUGHAN, D.E. PAI-1 in tissue fibrosis. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 2, p. 493-507, 2012.

GOODWIN, J. E. et al. Endothelial glucocorticoid receptor is required for protection against sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 306-311, 2013.

GUICHAR, J. L. et al. Aldosterone receptor antagonists: current perspectives and therapies. **Vascular health and risk management**, v. 9, p. 321-331, 2013.

HAN, J. S. et al. Aldosterone-induced TGF- β 1 expression is regulated by mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in mesangial cells. **Journal of Korean medical science**, v. 24, n. Suppl 1, p. S195-S203, 2009.

HAN, S. Y. et al. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 5, p. 1362-1372, 2006.

HE, W. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is a transcriptional target of the canonical pathway of Wnt/ β -catenin signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24665-24675, 2010.

HILFINKER-KLEINER, D.; LANDMESSER, U. L. F.; DREXLER, H. Molecular mechanisms in heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 9s1, p. A56-A66, 2006.

HOSTETTER, T. H.; IBRAHIM, H. N. Aldosterone in chronic kidney and cardiac disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 9, p. 2395-2401, 2003.

HUANG, W. et al. Aldosterone and TGF- β 1 synergistically increase PAI-1 and decrease matrix degradation in rat renal mesangial and fibroblast cells. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 294, n. 6, p. F1287-F1295, 2008.

HUYNH, T. et al. The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency. **pathways**, v. 19, p. 20, 2009.

JIANG, H. et al. Aldosterone directly affects apelin expression and secretion in adipocytes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, p. 37-48, 2013.

KHALIL, N. et al. TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v.14, n. 2, p. 131-138, 1996.

KIM, S.; IWAIO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensina II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 11-34, 2000.

KIYOMOTO, H. et al. Possible underlying mechanisms responsible for aldosterona and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury. **Journal of pharmacological sciences**, v. 108, n. 4, p. 399-405, 2008.

LARINI, L. Fármacos diuréticos. In: _____, **Fármacos e medicamentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 204-206, 2009.

LEE, S. H. et al. Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 297, n. 5, p. F1381-F1390, 2009.

LEITE-DELLOVA, D.C.A. et al. Genomic and nongenomic effects of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchanger in proximal s3 segment: role of cytosolic Calcium. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 295, n. 5, p. F1342-F1352, 2008.

LEITE-DELLOVA, D. C. A.; MALNIC, G.; AIRES, M. M. Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H⁺-ATPase in proximal S3 segment. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 300, n. 3, p. F682-F691, 2011.

LEKAWANVIJIT, S.; KRUM, H. Cardiorenal syndrome: acute kidney injury secondary to cardiovascular disease and role of protein-bound uraemic toxins. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 18, p. 3969-3983, 2014.

LI, C. et al. Myeloid mineralocorticoid receptor deficiency inhibits aortic constriction-induced cardiac hypertrophy in mice. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. 1-9, 2014.

LI, J. J. et al. Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 297, n. 1, p. F200-F209, 2009.

LI, J.Y. et al. High-sodium intake aggravates myocardial injuries induced by aldosterone via oxidative stress in Sprague-Dawley rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 3, p. 393-400, 2012.

LIANG, W. et al. Disparate effects of eplerenone; amlodipine and telmisartan on podocyte injury in aldosterone infused rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 3, p. 789-99, 2011.

LIU, R.M.; PRAIVA, K.A.G. Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 1-15, 2010.

LU, Y.; KU, E.; CAMPESE, V.M. Aldosterone in the pathogenesis of chronic kidney disease and proteinuria. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 4, p. 303-306, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MA, L. J.; FOGO, A. B. PAI-1 and kidney fibrosis. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2028-2041, 2009.

MAKHLOUGH, A. et al. Effect of spironolactone on diabetic nephropathy compared to the combination of spironolactone and losartan. **Nephro-urology monthly**, v. 6, n. 1, p. e12148, 2014.

MATHEW, J. T. et al. Aldosterone Induces Mesangial Cell Apoptosis both *in vivo* and *in vitro*. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 295, n. 1, p. F73-F81, 2008.

MISHRA, R. et al. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. **Kidney International**, v. 67, n. 1, p. 82-93, 2005.

MIZUIRI, S.; OHASHI, Y. ACE and ACE2 in kidney disease. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 74-82, 2015.

NAGAI, Y. et al. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 1039-1045, 2005.

NAGASE, M.; FUJITA, T. Aldosterone and glomerular podocyte injury. **Clinical and experimental nephrology**, v. 12, n. 4, p. 233-242, 2008.

NAMSOLLECK, P.; UNGER, T. Aldosterone synthase inhibitors in cardiovascular and renal diseases. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, n. suppl 1, p. 62-68, 2014.

NIELSEN, J. et al. Maintained ENaC trafficking in aldosterone-infused rats during mineralocorticoid and glucocorticoid receptor blockade. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 1, p. F382-F394, 2007.

NISHIYAMA, A. et al. Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): pharmacological effects of mineralocorticoid-receptor blockers. **Journal of pharmacological sciences**, v. 109, n. 1, p. 1-6, 2009.

NISHIYAMA, A. et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. **Hypertension**, v. 43, n. 4, p. 841-848, 2004.

NISTALA, R.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Redox control of renal function and hypertension. **Antioxidantes& redox signaling**, v. 10, n. 12, p. 2047-2089, 2008.

OH, Y. T.; KIM, J.; YOUN, J. H. Role of pituitary in K⁺ homeostasis: impaired renal responses to altered K⁺ intake in hypophysectomized rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 12, p. R1166-R1174, 2013.

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. 67 f. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

PARK, J. B.; SCHIFFRIN, E. L. ETA receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. **Hypertension**, v. 37, n. 6, p. 1444-1449, 2001.

PARK, M. et al. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) suppresses apoptosis by transcriptionally downregulating BAX expression in immature rat granulosa cells. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.

PARVIZ, Y. et al. Emerging cardiovascular indications of mineralocorticoid receptor antagonists. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 201-211, 2015.

PATEL, B.M.; MEHTA, A.A. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. **European journal of pharmacology**, v. 697, n. 1, p. 1-12, 2012.

PATNI, H. et al. Aldosterone promotes proximal tubular cell apoptosis: role of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 293, n. 4, p. F1065-F1071, 2007.

PATTERSON,G.I.; PADGETT, R.W. TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. **Trends in genetics**, v.16, n. 1, p. 27-33, 2000.

PORZIONATO, A. et al. Natriuretic peptides in the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **International review of cell and molecular biology**, v. 280, p. 1-39, 2010.

RAFIQ, K. et al. Pathophysiological roles of aldosterone and mineralocorticoid receptor in the kidney. **Journal of pharmacological sciences**, v. 115, n. 1, p. 1-7, 2011.

REN, R. et al. Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. **Endocrinology**, v. 153, n. 11, p. 5346-5360, 2012.

REVELO, M. P. et al. Chronic allograft nephropathy: expression and localization of PAI-1 and PPAR- γ . **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 12, p. 2812-2819, 2005.

RIEPE, F. G. Mineralocorticoid disorders. **Revista Española Endocrinología Pediátrica**, v. 1, n. 1, p. 33-39, 2010.

ROSSIER, M.F.; PYTHON, M.; MATURANA, A.D. Contribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors to the chronotropic and hypertrophic actions of aldosterona in neonatal rat ventricular myocytes. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2777-2787, 2010.

SALYER, S. A. et al. Aldosterone regulates Na⁺, K⁺ ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 10, p. 2143-2152, 2013.

SCHNAPER, H.W. et al. TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 2448-2465, 2009.

SCHRIER, R.W. Aldosterone'escape'vs' breakthrough'. **Nature Reviews Nephrology**, v. 6, n. 2, p. 61-61, 2010.

SEGURO, A.C.; HELOU, C.M.B. Sódio, água e diurético. In: BARROS, Elvino. et al. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, p. 139-152, 2006.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v.113, n. 6, p. 685-700, 2003.

SHIBATA, S. et al. Podocyte as the target for aldosterona roles of oxidative stress and sgk1. **Hypertension**, v. 49, n. 2, p.355-364, 2007.

SINPHITUKKUL, K. et al. **Nongenomic effects of aldosterone on renal protein expressions of pEGFR and pERK1/2 in rat kidney**. American journal of nephrology, v. 33, n. 2, p. 111-120, 2010.

SOEIRO, E. M. D. et al. Aspectos clínicos, fisiopatológicos e genéticos das tubulopatias hereditárias na infância. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 3, p. 385-398, 2015.

STUDER, R. A. et al. Evolution of the epithelial sodium channel and the sodium pump as limiting factors of aldosterone action on sodium transport. **Physiological genomics**, v. 43, n. 13, p. 844-854, 2011.

SUGIYAMA, H. et al. Apoptosis in glomerular sclerosis. **Kidney International**, v. 49, n. 1, p. 103-111, 1996.

TRACHTMAN, H. et al. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. **The Journal of urology**, v.172, n. 4, p. 1590-1594, 2004.

VARGA, J. Systemic sclerosis: an update. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 66, n. 3, p. 198-202, 2008.

VERREY, F. et al. Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. **Kidney International**, v. 57, n. 4, p. 1277-1282, 2000.

WANG, B. et al. Rapamycin attenuates aldosterone-induced tubulointerstitial inflammation and fibrosis. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 116-125, 2015a.

WANG, D. et al. Transcription factor Egr1 is involved in high glucose-induced proliferation and fibrosis in rat glomerular mesangial cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 2093-2107, 2015b.

WANG, X.Y. et al. The renal thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as mediator of the aldosterone-escape phenomenon. **The Journal of clinical investigation**, v. 10, n. 2, p. 215-222, 2001.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 1, 2011.

YANG, B. et al. Caspase-3 and apoptosis in experimental chronic renal scarring. **Kidney international**, v. 60, n. 5, p. 1765-1776, 2001a.

YANG, B. et al. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 2, p. 275-288, 2001b.

YANG, M. et al. Connexin 43 is involved in aldosterone-induced podocyte injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1652-1662, 2014.

YE, L. et al. Blocking the mineralocorticoid receptor improves effectiveness of steroid treatment for low back pain in rats. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 121, n. 3p. 632-643, 2014.

ZHOU, L. et al. Angiotensin-(1–7) attenuates high glucose-induced proximal tubular epithelial-to-mesenchymal transition via inhibiting ERK1/2 and p38 phosphorylation. **Life sciences**, v. 90, n. 11, p. 454-462, 2012.