

VANESSA GEROLDE CARDOSO

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

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza

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

São Paulo

2016

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

Os rins recebem cerca de 20% do débito cardíaco e são órgãos essenciais para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo. A organização da sua vasculatura é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e formação da urina (SEQUEIRA LOPEZ; GOMEZ, 2011). A ultrafiltração glomerular ocorre nos capilares glomerulares e é controlada pelas forças de Starling e por ajustes funcionais da barreira de ultrafiltração (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2010). Além de manter a homeostase, os rins também exercem um importante papel endócrino, pois sintetizam diversos hormônios e compostos vasoativos como: angiotensina II (Ang II), endotelinas, prostaglandinas e óxido nítrico (NO) (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004).

Diversas doenças sistêmicas associadas às doenças renais como a hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e insuficiência cardíaca, podem induzir a perda progressiva da função renal essencialmente por alterar a morfologia e a função de vasos renais, mesângio, barreira de ultrafiltração glomerular e células tubulares (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2010). Frequentemente, a injúria na barreira de ultrafiltração glomerular leva à proteinúria e perda da função renal. Assim, a disfunção glomerular é o fator etiológico mais comum para a falência renal e o estudo das bases moleculares da biologia glomerular é essencial para o seu entendimento (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2010).

1.1 Glomérulo

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

1.1.1 Células mesangiais

As células mesangiais estão em contato direto com células endoteliais dos capilares glomerulares, estes capilares, por sua vez, estão separadas dos podócitos pela membrana basal glomerular (MBG). Sakai e Kirtz em 1987, estudando a relação entre a célula mesangial e a MBG, descreveram que esta última não cobre totalmente a camada endotelial de revestimento do leito capilar, restando áreas onde os prolongamentos mesangiais entram em contato direto com o endotélio glomerular fenestrado, denominadas regiões justamesangiais do capilar glomerular (SAKAI; KRIZ, 1987). Nas áreas em que não se estabelece contato direto, a conexão entre a célula mesangial e a MBG é realizada por elementos de matriz extracelular, através de uma densa rede de microfibrilas que ancora a membrana celular à fibronectina presente nessa matriz (KRIZ et al., 1990). As células mesangiais produzem os componentes da matriz extracelular glomerular e mantêm a integridade do tufo glomerular, formando um arcabouço que suporta os capilares glomerulares. A sua capacidade contrátil permite que controlem a tensão e o fluxo intracapilar e assim, a ultrafiltração glomerular de cada néfron individualmente.

1.1.2 Matriz extracelular glomerular

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

1.1.3 Células endoteliais

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

1.1.4 Membrana Basal Glomerular

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

1.1.5 Podócitos

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

1.1.5.1 Processos podais

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

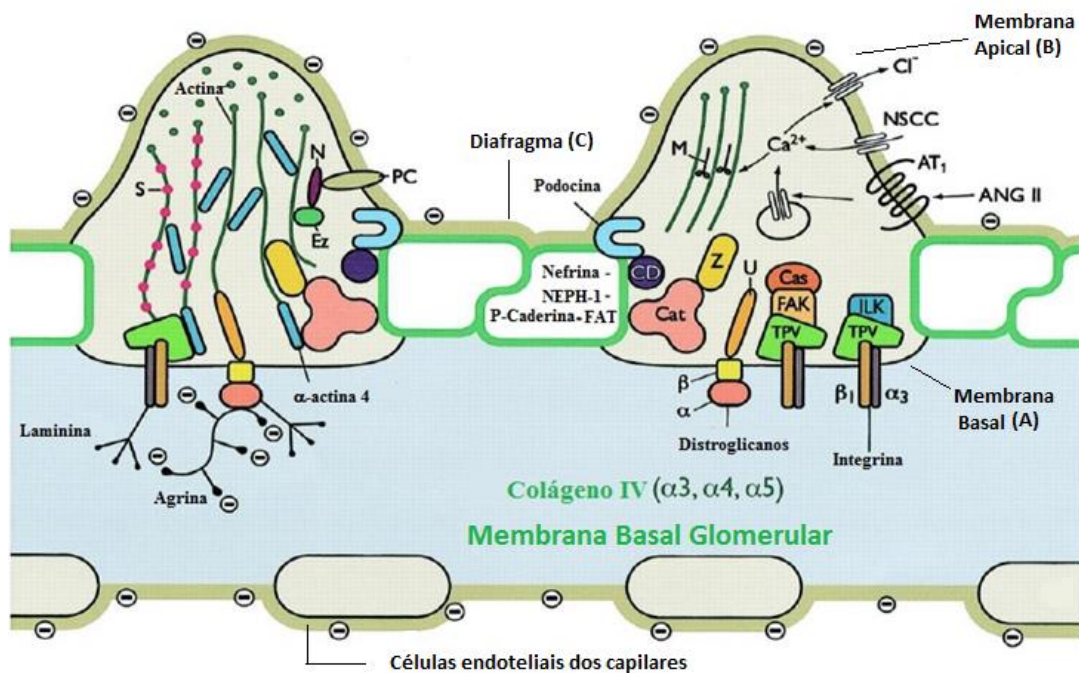


Figura 1- Esquema representativo da organização dos processos podais na membrana basal glomerular. (A) Membrana Basal, (B) Membrana Apical, (C) Diafragma. Modificado de Endlich K, 2001, *Curr Opin Nephrol Hypertens*10:331–340. PC, podocalixina; Ez, eezrina.

O lado basal (**Figura 1 A**) conecta o podócito à membrana basal glomerular através das integrinas e distroglicanos (proteínas que organizam a interação entre a laminina e a matriz extracelular). As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície que auxiliam na adesão da célula à matriz extracelular e transmitem sinais químicos e mecânicos (SCHWARTZ, 1997). A integrina $\alpha3\beta1$ é abundante na membrana basal dos processos podais e interage com o domínio carboxi-terminal da laminina 521 e com o colágeno do tipo IV presentes na MBG (CHEN; MINER, 2012).

A laminina $\alpha5\beta2\gamma1$ (ou 521) é sintetizada pelos podócitos e células endoteliais dos capilares glomerulares e em seguida, depositada na MBG (CHEN; MINER, 2012). O complexo protéico integrina/laminina auxilia a fusão dos processos podais na MBG (YURCHENCO et al., 2004).

O lado apical (**Figura 1 B**) contém proteínas carregadas negativamente como: podocalixina, sialoglicoproteína e podoplanina, que formam um glicocálix e contribuem para a seletividade por carga da barreira de ultrafiltração (MUNDEL; REISER, 2010; SHANKLAND, 2006).

O diafragma (**Figura 1 C**) é a camada mais complexa da barreira de ultrafiltração glomerular, com uma espessura constante de 40 nm (TRYGGVASON et al., 2006). Proteínas específicas do diafragma interagem com a actina do citoesqueleto, influenciando vias de sinalização e a função dos podócitos. As proteínas expressas no diafragma incluem: nefrina, podocina, Neph 1 e 2, FAT 1 e 2 e o canal de cálcio TRPC6 (*Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6*) (MUNDEL; SHANKLAND, 2002).

A nefrina, um membro da família das imunoglobulinas, é composta por um domínio intracelular e um extracelular e é capaz de traduzir sinais entre processos podais vizinhos (CHUANG; HE, 2009). A nefrina pode sofrer fosforilação, e juntamente com as proteínas associadas CD2AP e podocina, induzir vias de sinalização envolvidas na injúria de podócitos (HUBER et al., 2003). A nefrina fosforilada pode ser internalizada por interagir com a β -arrestina, contribuindo para os processos envolvidos na proteinúria (QUACK et al., 2006).

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

1.1.5.2 Apoptose Injúria de podócitos

Diversos estudos apontam para três tipos principais de injúria de podócitos: (1) perda de processos podais; (2) desdiferenciação acompanhada de proliferação e (3) apoptose (SHANKLAND, 2006). A perda dos processos podais é uma resposta importante destas células frente a qualquer tipo de injúria e envolve o rearranjo do citoesqueleto de actina e a sua interação com proteínas da membrana basal glomerular. A sua desdiferenciação resulta no decréscimo da sua função na barreira de ultrafiltração glomerular (SHANKLAND, 2006). Finalmente, a apoptose de podócitos e/ou seu desprendimento da membrana basal glomerular leva à diminuição do número de podócitos (podocitopenia) e as células remanescentes são incapazes de cobrir toda a membrana basal glomerular e manter a correta barreira de ultrafiltração. Como consequência, os podócitos vão sendo substituídos por tecido cicatricial e matriz extracelular (LEEuwIS et al., 2010).

Há diversas causas hereditárias de injúria glomerular, resultantes de mutações genéticas, como é o caso da glomeruloesclerose focal. No entanto, há também uma extensa literatura demonstrando a injúria glomerular adquirida, principalmente devido ao aumento da pressão intraglomerular, à via final comum de doenças como a hipertensão arterial, a nefropatia diabética e a síndrome metabólica. Essas doenças são associadas a múltiplos fatores como: Angiotensina II (Ang II), estresse oxidativo, Endotelina 1 (ET-1), processos inflamatórios e hipertensão glomerular (DO CARMO et al., 2009).

1.2 Apoptose

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

1.3 Sistema Renina-Angiotensina

Desde a sua descoberta em 1898 por Tigerstedt e Bergman (TIGERSTEDT et al., 1898), o sistema renina-angiotensina (SRA) é largamente estudado. Na cascata de sinalização sistêmica clássica, as células justaglomerulares secretam renina para a circulação, que cliva o angiotensinogênio proveniente principalmente do fígado, em angiotensina I (Ang I). Esta, por sua vez, é clivada pela enzima conversora da Ang I (ECA), formando a angiotensina II (Ang II). A Ang II atua via dois receptores, AT1 e AT2, expressos em vários tecidos. O receptor AT1 desencadeia as respostas mais clássicas da Ang II como: vasoconstrição, liberação de aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal, retenção de sódio por diversos segmentos do néfron,

estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais) e indução de estresse oxidativo (BADER; GANTEN, 2008).

1.4 SRA Intrarrenal

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

Diversos estudos demonstraram que assim como as células mesangiais e tubulares (ANDRADE et al., 2002; VIDOTTI et al., 2004), os podócitos também expressam os receptores AT1 e AT2 e os componentes do SRA. Liebau e colaboradores, em 2006, demonstraram que os podócitos humanos em cultura expressam RNAm para angiotensinogênio, renina e ECA (LIEBAU et al., 2006). Já Velez JCQ e colaboradores, em 2007, avaliaram a habilidade de podócitos de camundongos em cultura metabolizarem substratos do SRA (VELEZ et al., 2007). Os autores demonstraram, elegantemente, que os podócitos sintetizam Ang-(1-9) e Ang-(1-7), sendo a Ang-(1-7) o metabólito mais abundante. Nestes estudos verificou-se também que estas células são capazes de degradar Ang II exógena.

Em cultura de podócitos diferenciados oriundos de camundongos, há expressão predominante de receptores do tipo AT1 e menor expressão de receptores do tipo AT2 (WANG et al., 2003). Funções cruciais dos podócitos, como contração, autofagocitose, organização do citoesqueleto e apoptose são reguladas pela Ang II atuando sobre os receptores AT1 (WENNMANN et al., 2012). Além disso, um estudo recente demonstrou que a Ang II induz a geração de espécies reativas de oxigênio em podócitos, e que a participação do trocador Na^+/H^+ isoforma 1 parece ser importante nessa condição (LIU et al., 2013).

1.5 Ang II e o estresse oxidativo

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

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

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

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

Em mamíferos, a família de trocadores Na^+/H^+ consiste de 10 membros (NHE_{1-10}) (Lee et al., 2008). A isoforma 1 do trocador Na^+/H^+ (NHE1) é a principal responsável pela regulação do pH intracelular (pH_i). Essa isoforma corresponde a uma glicoproteína de 110 kDa (SARDET et al., 1989), cujo domínio N-terminal (denominado unidade de transporte) é altamente sensível ao amiloride e cujo domínio C-terminal (ou citoplasmático regulatório) apresenta grande sensibilidade à vários sinais extracelulares, como: fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas (WAKABAYASHI et al., 1992). Além da regulação do pH_i tem sido demonstrado que o NHE1 participa do arranjo do citoesqueleto (DENKER; BARBER, 2002) e do controle do volume celular (CALA; MALDONADO, 1994).

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

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

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

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

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

2 CONCLUSÕES

Portanto, nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II 1µM por 24 horas induz estresse oxidativo e apoptose em podócitos, porém, a geração de espécies reativas de oxigênio e a ativação da via pró-apoptótica da Bax, são eventos prematuros na apoptose induzida pelo tratamento com Ang II por 24 horas, estes eventos são observados com apenas 4 horas de tratamento. O NHE1 pode estar envolvido tanto com a manutenção do equilíbrio ácido-base quanto com a indução de apoptose alcalina em podócitos. Na situação fisiológica o NHE1 protege estas células contra possíveis

acidificações intracelulares, e na presença de Ang II há uma ativação da via de sinalização intracelular p38 MAPK que aumenta a atividade do NHE1, de forma que ocorre a alcalinização do citosol ativação da Bax e, conseqüentemente, apoptose.

REFERÊNCIAS*

ANDRADE, A. Q. et al. Characterization of renin mRNA expression and enzyme activity in rat and mouse mesangial cells. **Braz J Med Biol Res.**, v. 35, n. 1, p. 17-24, Jan 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743610>>.

ANTONSSON, B. et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. **Science.**, v. 277, n. 5324, p. 370-372, Jul 18 1997. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J Mol Med (Berl).**, v. 86, n. 6, p. 615-621, Jun 2008. ISSN 0946-2716 (Print)0946-2716 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0> >.

BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. **Biochimie.**, v. 89, n. 9, p. 1107-1112 Sep 2007. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400358> >.

BOUTE, N. et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. **Nat Genet.**, v. 24, n. 4, p. 349-354, Apr 2000. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742096> >.

CALA, P. M.; MALDONADO, H. M. pH regulatory Na/H exchange by *Amphiuma* red blood cells. **J Gen Physiol.**, v. 103, n. 6, p. 1035-1053, Jun 1994. ISSN 0022-1295. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931136> >.

CHEN, Y. M.; MINER, J. H. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. **Transl Res.**, v. 160, n. 4, p. 291-297, Oct 2012. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683419> >.

CHUANG, P. Y.; HE, J. C. **Signaling in regulation of podocyte phenotypes. Nephron Physiol.**, 111: p.9-15 p. 2009.

COAXUM, S. D. et al. Epidermal growth factor activates Na(+)/H(+) exchanger in podocytes through a mechanism that involves Janus kinase and calmodulin. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1793, n. 7, p. 1174-1181, Jul 2009. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.03.006> >.

DATLA, S. R.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. **Hypertension.**, v. 56, n. 3, p. 325-330, Sep 2010. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644010> >.

* De acordo com:

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

<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200208050> >.

DO CARMO, J. M. et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 297, n. 3, p. R803-812, Sep 2009. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605765> >.

FUNABIKI, K. et al. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. **Clin Nephrol.**, v. 34, n. 6, p. 239-246, Dec 1990. ISSN 0301-0430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2073766> >.

GRENIER, A. L. et al. Apoptosis-induced alkalization by the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 is mediated through phosphorylation of amino acids Ser726 and Ser729. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 295, n. 4, p. C883-896, 2008. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701649> >.

HAWORTH, R. S. et al. Stimulation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 34, p. 31676-31684, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12791686> >.

HUBER, T. B. et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. **Mol Cell Biol.**, v. 23, n. 14, p. 4917-4928, 2003. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.**, v. 26, n. 4, p. 239-257, Aug 1972. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >.

KHALED, A. R. et al. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 96, n. 25, p. 14476-14481, Dec 7 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalization. **Mol Cell Biol.**, v. 21, n. 22, p. 7545-7557, 2001. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.21.22.7545-7557.2001> >.

KONSTANTINIDIS, D. et al. Inhibition of the Na⁺-H⁺ exchanger isoform-1 and the extracellular signal-regulated kinase induces apoptosis: a time course of events. **Cell Physiol Biochem.**, v. 18, n. 4-5, p. 211-222, 2006. ISSN 1015-8987 (Print)1015-8987. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000097668> >.

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

LAI, K. N. et al. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-alpha: glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 294, n. 4, p. F945-955, Apr 2008. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256312> >.

LEE, S. H. et al. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 369, n. 2, p. 320-326, May 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269914> >.

LEEuwIS, J. W. et al. Targeting podocyte-associated diseases. In: (Ed.). **Adv Drug Deliv Rev.**, v.62, 2010. p.1325-1336. ISBN 1872-8294 (Electronic)

0169-409X (Linking).

LIEBAU, M. C. et al. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 290, n. 3, p. F710-719, Mar 2006. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189286> >.

LIU, Y. et al. Roles of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger type 1 and intracellular pH in angiotensin II-induced reactive oxygen species generation and podocyte apoptosis. **J Pharmacol Sci.**, v. 122, n. 3, p. 176-183, 2013. ISSN 1347-8613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MATSUYAMA, S. et al. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. **Nat Cell Biol.**, v. 2, n. 6, p. 318-325, Jun 2000. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854321> >.

MUNDEL, P.; REISER, J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? In: (Ed.). **Kidney Int.**, v.77, 2010. p.571-580.

MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol.**, v. 13, n. 12, p. 3005-3015, 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221> >.

NAVAR, L. G. et al. Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 2, p. S176-S184, Mar 2001. ISSN 1752-

8976 (Electronic)1470-3203 (Linking). Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1177/14703203010020013001>>.

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

PATRAKKA, J.; TRYGGVASON, K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 396, n. 1, p. 164-169, May 21 2010. ISSN 0006-291x. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.069>>.

QUACK, I. et al. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 103, n. 38, p. 14110-14115, Sep 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968782>>.

SAKAI, T.; KRIZ, W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. **Anat Embryol (Berl).**, v. 176, n. 3, p. 373-386, 1987. ISSN 0340-2061. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3631536>>.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res.**, v. 45, n. 3, p. 528-537, Feb 2000. ISSN 0008-6363. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728374>>.

SARDET, C.; FRANCHI, A.; POUYSSEGUR, J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. **Cell.**, v. 56, n. 2, p. 271-280, Jan 27 1989. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

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

SCHWARTZ, M. A. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. **J Cell Biol.**, v. 139, n. 3, p. 575-578, 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348275>>.

SEDEEK, M. et al. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 299, n. 6, p. F1348-1358, Dec 2010. ISSN 1522-1466. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00028.2010>>.

_____. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. **J Am Soc Nephrol.**, v. 24, n. 10, p. 1512-1518, Oct 2013. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970124> >.

SEQUEIRA LOPEZ, M. L.; GOMEZ, R. A. Development of the renal arterioles. **J Am Soc Nephrol.**, v. 22, n. 12, p. 2156-2165, 2011. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1681/asn.2011080818> >.

SHANKLAND, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney Int.**, v.69, 2006. p.2131-2147.

SUN, J. et al. Substance P enhances NF-kappaB transactivation and chemokine response in murine macrophages via ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 294, n. 6, p. C1586-C1596, Jun 2008. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434625> >.

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

TAKAHASHI, E. et al. p90(RSK) is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 29, p. 20206-20214, Jul 16 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

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

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol.**, v. 122, n. 4, p. 339-352, Oct 2004. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15338229> >.

TRYGGVASON, K.; PATRAKKA, J.; WARTIOVAARA, J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. **N Engl J Med.**, v.354, 2006. p.1387-1401. ISBN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking).

VELEZ, J. C. et al. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 293, n. 1, p. F398-F407, Jul 2007. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429035> >.

VIDOTTI, D. B. et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 286, n. 6, p. F1039-F1045, Jun 2004. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722017> >.

VON THUN, A. M. et al. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. **Am J Physiol.**, v. 266, n. 1 Pt 2, p. F120-F128, Jan 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304477> >.

WAKABAYASHI, S. et al. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 89, n. 6, p. 2424-2428, Mar 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WANG, L.; FLANNERY, P. J.; SPURNEY, R. F. Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. **J Lab Clin Med.**, v. 142, n. 5, p. 313-321, Nov 2003. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647035> >.

WENNMANN, D. O.; HSU, H. H.; PAVENSTADT, H. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes. **Semin Nephrol.**, v. 32, n. 4, p. 377-384, Jul 2012. ISSN 0270-9295. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.06.009> >.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol.**, v. 22, n. 7, p. 521-538, Jan 2004. ISSN 0945-053X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996432> >.

ZHANG, G. X. et al. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. **Cardiovasc Res.**, v. 76, n. 2, p. 204-212, Nov 2007. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698051> >.

ZHUO, J. L. et al. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT(1) receptor. **Hypertension.**, v. 39, n. 1, p. 116-121, Jan 2002. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11799089> >.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci.**, v. 19, p. 124-128, Jun 2004. ISSN 0886-1714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143207> >.

