

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AÇÃO DIRETA DA ALDOSTERONA EM CARDIOMIÓCITOS DE RATO

Carolina Moraes Araujo

Ouro Preto - MG

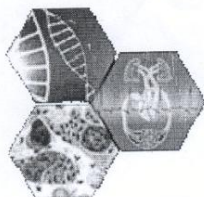
2011

Carolina Moraes Araujo

AÇÃO DIRETA DA ALDOSTERONA EM CARDIOMIÓCITOS DE RATO

Orientador: Mauro César Isoldi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular.



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

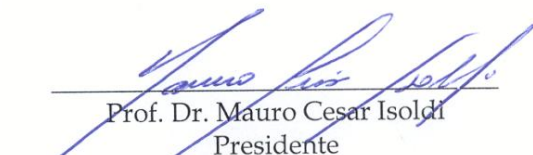


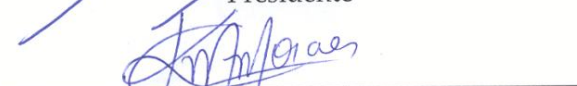
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

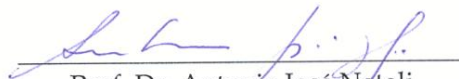
“Ação Direta do Aldosterona em Cardiomiócitos de Rato”

Aos 03 dias do mês de março de 2011, às 14:00h, na Sala de Seminários do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Carolina Morais Araújo. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por A PROVA R a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi
Presidente


Prof.ª Dr.ª. Karen Cristiane Martinez de Moraes
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Antonio José Natali
Examinador (UFV)

DATA DA DEFESA: 03/03/2011

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CNPq, PROPP-UFOP.

Dedico este trabalho à minha mãe Nelma, meu pai João, meu irmão Renato, meus avós Amelia e Waldemar. Tia Selma, tios Mauro, Maurício, Marcelo e ao Matheus. “*Porque família é tudo*”

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e à **Virgem Maria**, por nunca me abandonarem e sempre iluminarem minha vida, meus caminhos e meus sonhos.

À minha **família**, aos MORAIS e aos ARAUJO, pelo amor e apoio incondicionais. Vocês são o suporte, exemplo de vida, alegria e união, e me ensinaram que o mais importante na vida é amar!

Aos meus queridos avós, **Amelia** e **Waldemar**, por serem sempre presentes em minha vida! Sempre acreditando em mim, dando força e amor. Trazendo-me alegria e esperança nos momentos tristes. Por NUNCA me deixarem desistir!

À minha amada mãe **Nelma**, por sempre acreditar em mim, me apoiar, amar, ensinar, suportar e incentivar nos momentos de alegria e tristeza, e principalmente pelo exemplo de vida, força e fé. E por viver meus sonhos comigo! E claro, pela REFERÊNCIA!

Ao **Renato**, meu amado irmão, por fazer parte de minha vida, exemplo de força, perseverança, garra e por alegrá-la sempre.

Ao meu pai **João Alberto** por interceder por mim junto de DEUS.

À tia **Selma**, pelo amor, zelo, paciência, conversas, por me mostrar que sempre devemos buscar nossos sonhos, principalmente pelo exemplo de vida, força e fé.

Aos meus tios **Mauro, Maurício, Marcelo, Marina, Lili, Neucimar e Silvana** vocês são indispensáveis em minha vida! Obrigado por todo apoio!

Ao meu orientador **Prof. Dr. Mauro César Isoldi** pela oportunidade, por toda paciência, confiança, exemplo, amizade e ensinamentos. E por ser mais que um simples orientador, por ser um verdadeiro mestre!

Às **Prof^{as}. Dr^a. Andréia Carvalho Alzamora, Dr^a. Raquel do Pilar Machado, Dr^a. Lisandra Brandino** e a todo laboratório de Fisiologia da UFOP pelos ensinamentos e acolhidas.

Ao **Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso** e todo laboratório de Imunoparasitologia – UFOP pela paciência e empréstimos realizados.

Ao **Prof. Marcelo Eustáquio da Silva** e a todo seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro**, por todo ensinamento, disciplina e iniciação na carreira científica. E a todo LBCM pela vivência.

À **Prof^a. Maria Célia** e todo laboratório de Microbiologia – UFOP.

À **Prof^a. Dr^a. Renata Guerra Sá** e a todo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao **Prof. Dr. Robson Santos, Prof^a. Dra. Maria José Campagnole Santos** e a e todo laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, por investirem e acreditarem nesse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Eduardo M. Krieger** e toda sua **equipe** do InCor.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

À **Denise**, onde além do atributo de suas funções, se mostrou extremamente paciente, e acima de tudo verdadeira mestre e amiga.

A toda querida e divertida **equipe do Mauro (Maíra, Fabi, Tarciana, Davi, Deborah e Jamille)**, principalmente, à **Milla, Gabi, Gabi Juninha e Isadora**, pela amizade, convivência, companheirismo, força e dedicação, vocês foram pessoas fundamentais para o desenvolvimento e a concretização desse projeto. **Milla e Gabi** sem vocês esse trabalho não seria o mesmo, não tenho como agradecê-las!

Aos companheiros do Laboratório de Hipertensão – UFOP, pelos bons momentos de convivência e aprendizado! A luta continua!

Everton, Victor e Marco Túlio, não tenho como agradecer os reparos no meu PC!!!

Ao **Augusto** e a **Analina** pela amizade e pelo apoio constante no Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Minas Gerais.

À **Aleçandra**, pela atenção às incansáveis apresentações e revisão.

Mari, Ane, Maytê, Lelé, Jane, Livia, Bruna, Aninha, Maria Emília, Letícia, Milla, Gabi, Juninha, Cristiana e Kelly minhas amigas incondicionais, irmãs de coração, pelo carinho, incentivo e diversão. E por sempre me ouvirem, aconselhar, alegrar! Sem vocês minha vida não seria tão feliz!

Às amigas Kit, **Cíntia, Katmilene e Maíra**, não sei o que seria da minha vida sem esse povo barango e sem “crasse”!

Tico, pela amizade e pelos agradáveis cafés da tarde na cantina.

Cris, Ian e a todos os **Kaóticos** pela amizade.

À **Maxixe**, minha casa, e todas as **maxixeiras**, pelo aprendizado, amor, companheirismo e convivência.

À **Jujumi** pela ajuda inexplicável na correção deste trabalho!!! Valeu Japaaaaaa!

À **Cida**, pela simpatia, pelo sorriso diário, carinho, conselhos e dedicação.

Ao **Biotério da UFOP** e a todos os seus funcionários, em especial à **Érika** e **Lorena** pelo companheirismo, paciência e dedicação.

Ao **Ernani, Paulo, Bônia e Ilma** pela ajuda e cuidado com os animais.

Aos **colegas** e **professores** do **NUPEB**, pela amizade, colaboração, vivência e ensinamentos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho, me ajudando, apoiando, amparando, suportando meus momentos de “stress”, e dando conselhos e palavras de ânimo. MUITO OBRIGADO!!!

Aos **animais** que com inocência sacrificam suas vidas pela ciência.

*A coisa mais bela que podemos experimentar
é o mistério. “Essa é a fonte de toda a arte e
ciências verdadeiras.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Muitos estudos têm abordado a via conhecida como não genômica da aldosterona. Estes trabalhos mostram um grande número de atividades fisiológicas desse hormônio, que não envolvem o mecanismo clássico para receptores MR, no qual, ocorre a translocação do complexo hormônio-receptor ao núcleo. Ensaio realizado em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos, na presença do inibidor do receptor MR, demonstraram aumento de AMPc e Ca^{2+} nas células tratadas com aldosterona quando comparados aos seus respectivos controles. O AMPc demonstrou ser modulado também pela presença do Ca^{2+} intracelular, uma vez que seus níveis decaíram em relação ao controle quando as células foram tratadas com BAPTA-AM (quelante de Ca^{2+} intracelular). O Ca^{2+} liberado nesta via provavelmente ativa uma adenilil ciclase sensível ao Ca^{2+} (AC1 é uma isoforma expressa conhecida nesta linhagem celular) elevando os níveis de AMPc. Os referidos dados também apontam para a ativação de PKC, que diretamente estaria fosforilando ERK5. Outros trabalhos existentes na literatura relataram essa possibilidade apontando como autora uma PKC do tipo ϵ . Ativação de ERK5 já foi descrita como um dos passos necessários para induzir a célula à hipertrofia. Tais resultados demonstram também, pela primeira vez, a participação da mAKAP no processo hipertrófico gerado pela aldosterona, assim como de um possível “*cross talking*” entre seus diferentes receptores.

ABSTRACT

Many studies have explored the known as nongenomic pathway of aldosterone. These studies show a large number of physiological activities of this hormone, which doesn't involve the classical mechanism to MR receptor. This mechanism involves the translocation from hormone-receptor complex to the nucleus. Tests conducted in the presence of MR receptor's inhibitor in primary cell culture of cardiomyocytes of rats showed an increase of cAMP and Ca^{2+} in cells treated with aldosterone when compared to their respective controls. The cAMP was also supposed to be modulated by the presence of intracellular Ca^{2+} . Cells treated with BAPTA-AM (chelator of intracellular Ca^{2+}) released Ca^{2+} to the control level in this pathway showed, probably, a direct activation of calcium-sensitive adenylate cyclase, increasing the levels of cAMP (AC1 is a known isoform in this cells). Such data also indicate that PKC could activate directly ERK5 phosphorylating. Other studies reported in the literature point out this same possibility using PKCepsilon isoform, according to the author. ERK5 activation has been described as one of the steps to induce the cells to hypertrophy. These results also demonstrate, for the first time, the mAKAP role on the hypertrophic process generated by aldosterone, as well as a possible "cross talking" between its different receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula química da aldosterona. Fonte: NCBI/Pubchem.	2
Figura 2: Biossíntese de aldosterona e cortisol no córtex da adrenal humana. (ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticular. Connell e Davies (2005).....	5
Figura 3: Fórmula química ANP. Fonte: NCBI/Pubchem.	8
Figura 4: Rato neonato, idade 2 dias e peso 5g.	37
Figura 5: Organograma dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tratamento recebido.....	38
Figura 6: Foto de cardiomiócitos tiradas por máquina digital em microscópio invertido modelo Telaval 31, fabricante Carl Zeiss, em aumento de 100x.	43
Figura 7: Gráfico do ensaio de hipertrofia de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos, tratados com meio controle; meio com espironolactona [10^{-6} M]; meio com aldosterona (10^{-7} M); meio com aldosterona [10^{-7} M] e espironolactona [10^{-6} M]. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8	54
Figura 8: Gráfico de [ANP] intracelular por concentração de aldosterona, $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.....	55
Figura 9: Gráfico de [ANP] intracelular tratado com aldosterona e aldosterona [10^{-7} M] e espironolactona [10^{-6} M] comprovando o impedimento da hipertrofia, $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.....	55
Figura 10: Gráfico da concentração de AMPc (fmol) por tratamento sem espironolactona. Obtidos de cardiomiócitos pré-incubados com BAPTA-AM [10^{-5} M], estimulados com aldosterona [10^{-7} M]. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.....	57
Figura 11: Gráfico da concentração de AMPc (fmol) por tratamento na presença de espironolactona. Obtidos de cardiomiócitos pré-incubados com BAPTA-AM [10^{-5} M], estimulados com aldosterona [10^{-7} M].....	57
Figura 12: Gráfico de intensidade média de fluorescência (concentração de Ca^{+2}) por tratamento. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8. ...	59
Figura 13: Gráfico de [ANP] intracelular sem o tratamento com o inibidor do receptor MR. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.	60
Figura 14: Gráfico de [ANP] intracelular com o tratamento com o inibidor do receptor MR. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.	60

Figura 15: Análise por Western blotting e gráficos de densitometria ótica (OD) de proteínas extraídas de células primárias de cardiomiócitos e tratadas com os anticorpos contra substrato fosforilado por PKC (1A e 1B) e ERK5 fosforilada (2A e 2B). Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8. 1)Padrão de peso molecular; 2)Controle: somente as células; 3)Células tratadas com aldosterona [10^{-7} M]; 4)Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M];5)Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M] e aldosterona [10^{-7} M]. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes envolvidos na sinalização não genômica da aldosterona...	20
Tabela 2: Propriedades e localização das AKAPs..	31
Tabela 3: Composição da solução de ADS, pH = 7,35.	39
Tabela 4: Composição da solução de BRDU [10^{-2}M] (5-Bromo-2'-deoxyuridine)..	39
Tabela 5: Composição do meio de cultura celular.....	40
Tabela 6: Composição do meio de cultura com espironolactona.	40
Tabela 7: Composição do meio de cultura com aldosterona.	40
Tabela 8: Composição da gelatina usada para adesão das células na placa de cultura.....	41
Tabela 9: Composição da solução tampão de digestão.....	41
Tabela 10: Diluição do peptídeo padrão - ANP.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AC 1	Adenilil ciclase um
AC 2	Adenilil ciclase dois
AC 3	Adenilil ciclase três
AC 4	Adenilil ciclase quatro
AC 5	Adenilil ciclase cinco
AC 6	Adenilil ciclase seis
AC 7	Adenilil ciclase sete
AC 8	Adenilil ciclase oito
AC 9	Adenilil ciclase nove
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADS	Tampão de ensaio
AKAP	Proteína adaptadora de quinase A
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo atrial natriurético
APS	Selo de acetato
AT1	Receptores angiotensinérgicos do tipo 1
AT1A	Receptores angiotensinérgicos do tipo 1, subtipo A
AT1B	Receptores angiotensinérgicos do tipo 1, subtipo B
AT2	Receptores angiotensinérgicos do tipo 2
ATPase	Adenosina Trifosfatase
AVP	Hormônio arginina vasopressina
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid,tetraacetoxymethyl Ester
BRDU	5-Bromo-2'-deoxyuridine

BSA	Soro albumina bovino
Ca ²⁺	Íon cálcio
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAG	Diacilglicerol
DMEN	Dulbeco's Modified Eagle Medium
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAc	Ácido Desoxirribonucleico complementar
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EGFr	Fator de crescimento epidermal
EPM	Erro padrão da média
ERK5	Quinase regulada por sinais extracelulares
FLUO4-AM	2-{{2-(2-{{5-[[bis(carboxymethyl)amino]-2-methylphenoxy}ethoxy)-4-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenyl]}(carboxymethyl)amino}acetic acid
fmol	Ficomol
FLC	Fosfolipase C
g/mol	Gramas/mol
GDP	Guanosina difosfato
Gi	Proteína G inibitória
Gq	Proteína G tipo q
Gs	Proteína G estimulatória
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
HA	Hipertensão arterial
HCL	Cloreto de hidrogênio
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthina
IP3	Inositol trifosfato
JAK2	Janus quinase 2
JNK	c-Jun quinase
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltos
LIF	Fator inibidor de leucemia

mAKAP	Proteína adaptadora de proteína quinase A muscular
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells (células de rim de cão)
MEK 5	Quinase quinase regulada por sinais extracelulares
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol/ L	Milimol por litro
MR	Receptor mineralocorticóide
NHE	Trocador de sódio/hidrogênio
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus Celsius
PA	Pressão arterial
PDE4D3	Fosfodiesterase 4D3
pH	Potencial de Hidrogênio
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKCε	Proteína quinase C tipo épsilon
PLC	Fosfolipase C
pmol/mL	Picomol por mililitro
PP2A	Fosfatase
PP2B	Calcineurina
PRK	Novas PKCs
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Membrana de polivinilidina difluorido
R II	Subunidade regulatória II (PKA)
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RyR	Receptor de Rianodina
SD	Sprague Dawley (linhagem dos ratos usados)

St-Ht31	Forma esterificada do peptídeo humano Ht-31 AKAP da tireóide humana (fragmentos 493-515)
UI	Unidades internacionais
V1	Receptores vasopressina do tipo 1
V2	Receptores vasopressina do tipo 2
VSMC	Musculatura vascular lisa
w/v	Peso por volume
WB	Western blot
Δ	Delta, variação

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
1 – INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Problemas causados pelo excesso de aldosterona.....	11
1.2. Mecanismos de ação da aldosterona.....	13
1.2.1. Ação da genômica da aldosterona	13
1.2.2. Ação não genômica da aldosterona	16
1.3. Moléculas envolvidas na sinalização da aldosterona	24
1.4. AKAPs.....	29
1.5. mAKAP e hipertrofia.....	32
2 - OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Animais.....	37
3.2. Desenho experimental.....	38
3.3. Soluções utilizadas nos ensaios.....	39
3.4. Preparação de culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos	42
3.5. Determinação da hipertrofia dos cardiomiócitos	44
3.5.1. Análise de área superficial.....	44
3.5.2. Análise da concentração de ANP intracelular.....	44
3.6. Determinação da participação do segundo mensageiro AMPc.....	47
3.7. Protocolo para ensaio deAMPc.....	48
3.8. Determinação da participação da AKAP.....	49
3.9. Extração de proteína.....	50
3.10. Gel.....	50

3.11. Western Blot	51
3.11.1. Verificação da ativação de ERK5	51
3.11.2. Verificação da ativação de substratos fosforilados por PKC	51
3.11.3. Verificação da ativação da β -actina.....	51
3.12. Análise estatística	52
4 - RESULTADOS	54
4.1. Determinação da hipertrofia dos cardiomiócitos	54
4.1.1. Método de análise de área superficial	54
4.1.2. Método de análise de concentração de ANP intracelular.....	55
4.2. Determinação da participação do segundo mensageiro AMPc.....	57
4.3. Determinação da participação do segundo mensageiro Ca^{2+}	59
4.4. Determinação da participação de AKAP	60
4.5. Determinação da participação de Erk5 e substrato fosforilado por PKC	61
5- DISCUSSÃO	65
6- CONCLUSÃO.....	74
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8- ANEXOS	101

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

Aldosterona (Fig.1) foi isolada pela primeira vez em 1953 como o último dos hormônios esteróides a ser reconhecido, Simpson et al. (1954). A descoberta da aldosterona há mais de cinco décadas, levou às pesquisas que produziram uma análise extensiva das ações biológicas mediadas por esta molécula. A história da descoberta dos mecanismos de regulação e de ação da aldosterona, entre 1960 e 1970, ofereceu uma visão única do nascimento da biologia molecular e seu consequente impacto no campo de pesquisa genômica nas décadas de 1980 e 1990, e no século XXI, Williams et al. (2003).

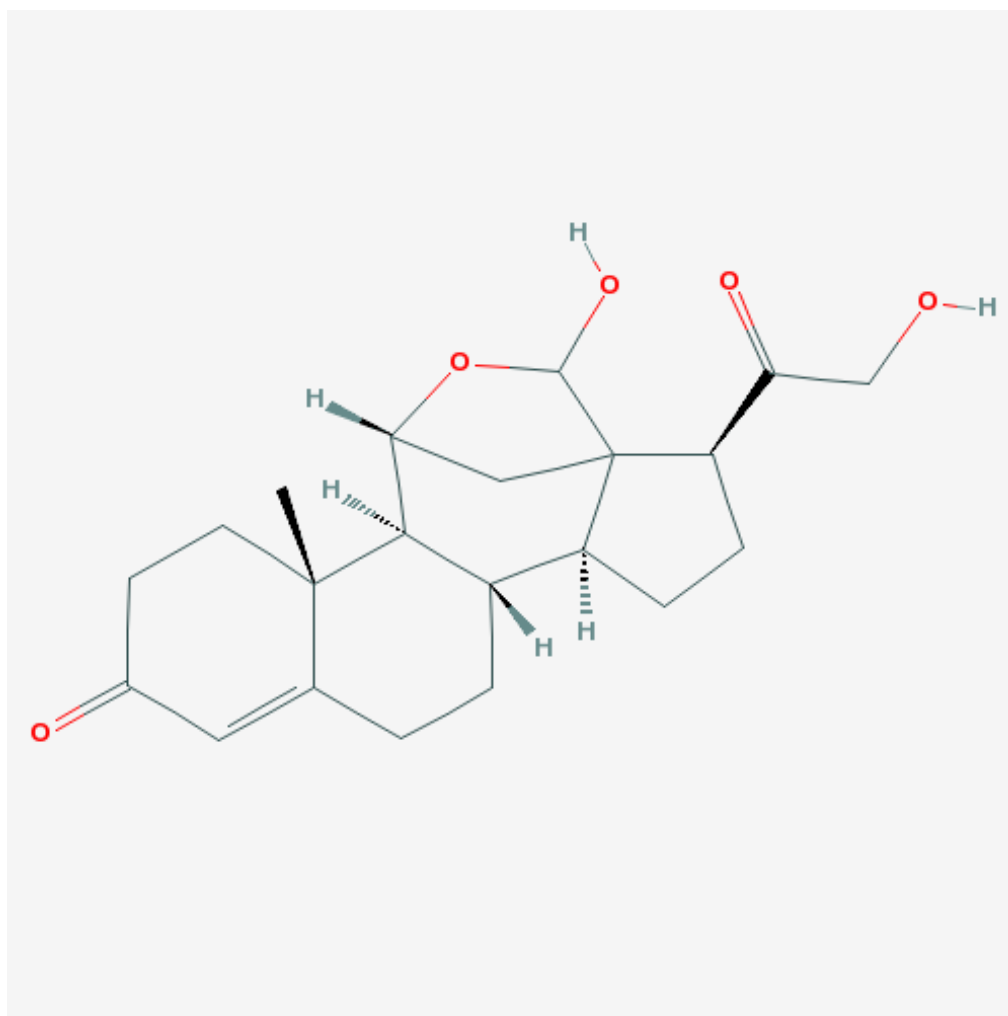


Figura 1: Fórmula química da aldosterona. Fonte: NCBI/Pubchem.

A aldosterona é o mais importante hormônio mineralocorticoide. Em mamíferos é sintetizado a partir do colesterol, Dooley et al. (2011) na zona glomerulosa do córtex da supra-renal e exerce papel essencial na homeostase de água e eletrólitos. Sua fórmula e peso molecular são $C_{21}H_{28}O_5$ e 360.4 [g/mol], respectivamente. Esse hormônio exerce os seus efeitos nos tecidos epiteliais dos rins, do cólon e em tecidos não-epiteliais, tais como o cérebro e o sistema cardiovascular, Dooley et al. (2011), regulando a reabsorção de solutos em epitélios, como no cólon distal e nos rins, Marver et al. (1983).

O precursor da aldosterona, o colesterol, é um lipídio que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, seja sob a forma livre ou combinada (com ácidos graxos), como o éster de colesterol, Brody (1993). Sua importância fisiológica reside no amplo papel que desempenha no organismo animal como precursor de sais biliares, de hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, na síntese de hormônios sexuais, na formação de vitamina D e principalmente, como elemento estrutural nas membranas celulares, Brody (1993). O colesterol está presente em diversos tipos de alimentos de origem animal, podendo ser ingerido na dieta, além de ser sintetizado no fígado a partir de moléculas mais simples, Nelson e Cox (2006).

No organismo, a aldosterona é sintetizada a partir do colesterol (Fig.2) por uma série de reações enzimáticas coordenadas e específicas. Primeiramente, o colesterol atravessa a membrana mitocondrial onde a primeira enzima da via esteroidogênica está situada. Após a translocação para a mitocôndria, o colesterol é convertido em aldosterona por uma série de reações enzimáticas catalisadas por desidrogenases e oxidases de função mista. Muitas dessas enzimas pertencentes à superfamília do citocromo P450, requerem um sistema de coenzima acoplado (adrenodoxina / adrenodoxina redutase), que transferem elétrons para a enzima P450, atuando como redutores equivalentes para a reação de hidroxilação, Lambeth et al. (1982).

A primeira reação é a conversão do colesterol em pregnenolona, catalisada pela clivagem da cadeia lateral P450 da enzima (CYP11A1), codificada pelo gene *CYP11A1* que se encontra no cromossomo humano 15. Esta enzima catalisa três reações, que antes da descoberta do gene STAR foram consideradas limitantes: a 20α -hidroxilação, 22-hidroxilação e quebra da ligação entre o C-20 e C-22 para produzir pregnenolona e ácido isocaproico, Lieberman e Lin (2001); Connell e Davies (2005).

A pregnenolona é liberada no citosol e é convertida em progesterona por desidrogenação do grupo 3 β -hidroxila e isomerização da ligação dupla em C5 para Δ 4 pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), que está localizada na membrana do retículo endoplasmático liso. Duas isoenzimas da 3 β -HSD foram identificadas em humanos, Mason (1993); Simard et al. (1993). HSD3B1 e HSD3B2 são codificados pelos genes 3 β -HSD1 e 3 β -HSD2, respectivamente, que se encontram em tandem no cromossomo 1 em humanos, Berube et al. (1989); Lachance et al. (1991) enzima conversora de angiotensina.

A progesterona sofre 21-hidroxilação pela CYP21A, enzima localizada na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático liso, produzindo 11-deoxicorticosterona, Shinzawa et al. (1988). O gene que codifica a enzima CYP21A foi mapeado no cromossomo humano 6 e é adjacente a um pseudogene, CYP21P, White et al. (1986). A conversão de 11-deoxicorticosterona para aldosterona envolve três reações consecutivas: 11 β -Hidroxilação da 11-deoxicorticosterona para formar corticosterona, 18-hidroxilação para produzir 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) e, finalmente, 18-methyloxidation à aldosterona. Estas reações são catalisadas pela aldosterona sintase, que se localiza no interior da membrana mitocondrial e é codificada pelo gene CYP11B2, gene este expresso na zona glomerulosa.

A aldosterona sintase é altamente homóloga (cerca de 90%) para 11 β -hidroxilase (o produto do gene *CYP11B1*), que catalisa a conversão de 11-desoxicortisol para o glicocorticóide cortisol. Os dois genes estão localizados em tandem em cromossomo humano, Mornet et al. (1989); Connell e Davies (2005).

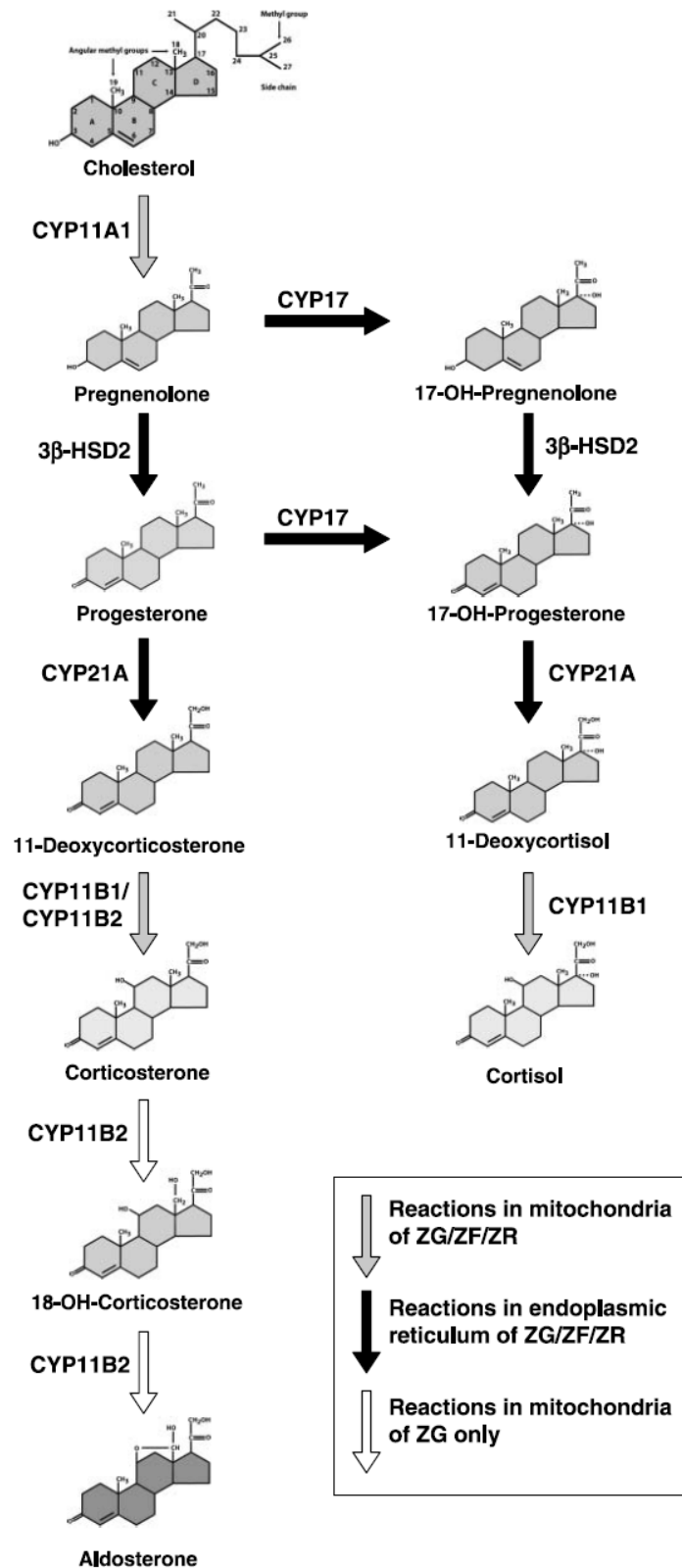


Figura 2: Biossíntese de aldosterona e cortisol no córtex da adrenal humana. (ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculada; ZR: zona reticular. Connell e Davies (2005).

O hormônio aldosterona está inserido em uma importante cascata de sinalização de proteção dos rins que se inicia com a queda de pressão arterial, conhecido por sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). RAAS é um sistema neuroendócrino complexo responsável pela modulação do equilíbrio hidroeletrolítico e regulação da pressão arterial. Através das suas múltiplas interações esse sistema contribui para a proteção do tecido endotelial, cardíaco, cerebral e renal. Adicionalmente, ele regula ainda a resposta do endotélio à inflamação e lesão. A sua ativação crônica induz hipertensão e perpetuação de uma cascata pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica, e é a base da lesão de vários órgãos-alvo (coração, cérebro, rim, endotélio). Dessa forma, o estudo do RAAS constitui um alvo terapêutico importante nestas situações, Giestas et al. (2010).

Em 1898, Robert Tigerstedt e Per Bergman publicaram um estudo no qual verificaram um aumento da pressão arterial ao injetar extratos de córtex renal em coelhos e, sugeriram que este aumento tensional era devido a uma proteína solúvel produzida pelos rins que designaram de renina. Levou mais meio século até que fossem identificados os demais elementos componentes deste complexo e articulado sistema. Este modelo tem servido de base à compreensão da fisiopatologia da hipertensão arterial.

Os principais elementos da cascata do RAAS englobam o angiotensinogênio, a renina, a angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a angiotensina II (Ang II). O angiotensinogênio consiste numa α -2 globulina de 411 aminoácidos segregada pelo fígado e cuja produção é estimulada em resposta aos glicocorticóides, estrógenos e citocinas inflamatórias (interleucina-1, fator de necrose tumoral), Morgan et al. (1996). O angiotensinogênio se encontra no plasma como um peptídeo biologicamente inativo, servindo de substrato à renina.

A renina regula a etapa limitante do RAAS ao clivar a porção N-terminal do angiotensinogênio para formar o decapeptídeo inativo Ang I, Argañaraz et al. (2008). Ela é sintetizada por células justaglomerulares como um pré-pró-hormônio. A renina ativa é formada a partir da remoção proteolítica de um segmento peptídico na região N-terminal da pró-renina, o precursor da renina.

A secreção da renina ativa é regulada principalmente por alterações na concentração de cloreto de sódio (NaCl) detectadas pela mácula densa do tubo distal

(que juntamente com as células justaglomerulares formam o aparelho justaglomerular); mecanismo baroreceptor renal na arteríola aferente sensível a alterações da pressão de perfusão renal; estimulação nervosa simpática via receptores adrenérgicos β -1; e feedback negativo por ação direta da Ang I nas células justaglomerulares, Brown (2006). Além disso, a secreção de renina também é estimulada por reduções da pressão de perfusão ou do conteúdo de NaCl e por aumento da atividade simpática.

A enzima conversora de angiotensina (ECA), descrita em 1956, é uma dipeptidil-carboxilase que ativa um vasoconstritor potente ao converter a Ang I (dez aminoácidos) em Ang II (oito aminoácidos). Ela exerce ainda, um efeito vasoconstritor ao inativar o sistema das cininas (bradicinina, substância P), Carey e Siragy (2003) e está presente no endotélio vascular sistêmico (60%), sendo mais abundante no endotélio vascular pulmonar (40%). A Ang II circula no plasma como um octapeptídeo [Ang. (1-8)] biologicamente ativo, Carey e Siragy (2003). A ECA originada principalmente no pulmão e localmente em vários tecidos (rins, coração, cérebro, adrenais e vasos). O seu tempo de semi vida é curto (2 min.) devido à rápida clivagem em Ang III e IV, através da remoção de aminoácidos da porção N-terminal pelas amino peptidases, Giestas (2010).

Existe ainda na cascata da RAAS um heptapeptídeo [Ang (1-7)] formado a partir da Ang I ou da clivagem da porção C-terminal da Ang II, por ação de carboxipeptidases, uma das quais, possui homologia estrutural com a ECA, designando-se ECA2. Ao contrário da ECA, a ECA2 leva à formação de peptídeos com efeitos predominantemente vasodilatadores, a Ang (1-7), a qual atua em receptores específicos (receptor *Mas*) que exercem uma ação vasodilatadora e cardioprotetora, Reudelhuber (2005).

Quando o RAAS entra em ação, estimula a secreção de renina, que é sintetizada pelas células justaglomerulares da arteríola aferente do rim, em resposta a uma diminuição no volume intravascular detectado pelos barorreceptores (mediado pela ativação de β -adrenoceptor) e por uma redução da concentração de sódio na mácula densa. A renina catalisa a hidrólise de angiotensinogênio em Ang I que depois é convertida em Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente nos pulmões e tecido vascular. Ang II atua no músculo liso vascular para causar vasoconstrição, e na zona glomerulosa adrenal para estimular a secreção de aldosterona.

A resposta adrenal à Ang II ocorre em poucos minutos, o que mostra que nenhuma síntese protéica é necessária, Alves (2007).

A aldosterona é a molécula efetora final do RAAS e atua nas células epiteliais do néfron distal, Alves (2007), e do cólon, promovendo a reabsorção de sódio e excreção de potássio. A água segue o movimento do sódio, via osmose, estabilizando o volume plasmático e consequentemente a pressão arterial, Fernandes-Rosa e Antonini (2006); Giestas et al. (2010). Entretanto, é importante para o equilíbrio da pressão arterial que exista uma molécula que controle negativamente os efeitos das ações da aldosterona. O peptídeo atrial natriurético (ANP) (Fig.3) é uma molécula que é um potente inibidor, *in vivo* e *in vitro* da secreção de aldosterona, através do efeito direto na adrenal, e indireto no rim, inibindo a secreção de renina, Vesely (2003), servindo, portanto, como *feedback* negativo para o RAAS.

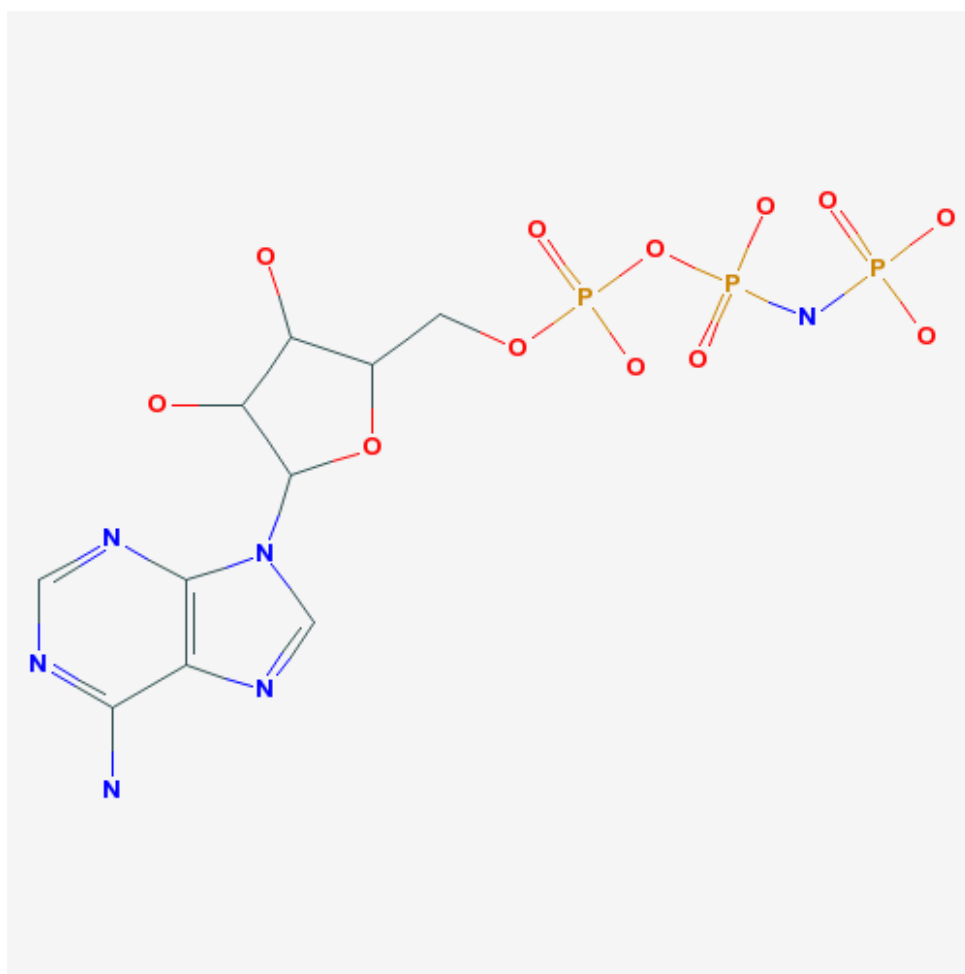


Figura 3: Fórmula química ANP. Fonte: NCBI/Pubchem.

Em 1981, Adolfo J. de Bold e colaboradores encontraram grânulos em células musculares cardíacas atriais que continham ANP. Eles descobriram que a injeção de homogenato de átrios, mas não ventrículos, em ratos induziram uma rápida diminuição da pressão arterial que foi acompanhada por aumento da excreção renal de sódio e água. Esta descoberta deu ao coração a importância endócrina, além de bomba propulsora de sangue. Dois anos depois, o peptídeo já estava purificado e sequenciado, Potter (2006).

O ANP, com fórmula e peso moleculares $C_{10}H_{17}N_6O_{12}P_3$ e 506.2 [g/mol], respectivamente, é membro de uma família de peptídeos que participa da regulação dos sistemas cardiovascular e renal, e especialmente do volume de sangue circulante efetivo, estando envolvido inclusive na resposta do organismo ao aumento deste volume, Liu et al. (2010). O ANP é um hormônio sintetizado principalmente por cardiomiócitos, cuja secreção é estimulada pela expansão do volume sanguíneo e aumento da osmolaridade do plasma. Este peptídeo desencadeia ações sobre o sistema circulatório como hipotensão, diurese, inibição da liberação e ação de vários hormônios, incluindo a aldosterona, angiotensina II, endotelinas, renina e vasopressina. O ANP prevê um mecanismo de defesa potente contra a sobrecarga de volume sanguíneo em mamíferos, Liu et al. (2010). Este peptídeo é amplamente distribuído em todo o coração, pele, trato gastrointestinal, genital, e os sistemas nervoso e imunológico, Chai et al. (2010).

O ANP é sintetizado como um pré-pró-hormônio. No homem o pré-pró-ANP possui 151 aminoácidos. A clivagem da sequência amino terminal resulta no pró-ANP com 126 aminoácidos, que é a forma predominante armazenada em grânulos atriais. Este pró-ANP é rapidamente clivado após sua secreção por uma protease cardíaca chamada Corin, para formar o peptídeo biologicamente ativo com 28 aminoácidos, Yan et al. (2000).

O ANP é expresso, primariamente, e armazenado em grânulos nos átrios, embora estejam presentes em concentrações mais baixas de outros tecidos, como os ventrículos e rim. O principal estimulante para a liberação da ANP é o estiramento da parede atrial resultante de aumento do volume intravascular, Edwards et al. (1988) Potter (2006). Uma vez secretados, o ANP perfunde no seio coronário, o que facilita a distribuição a vários de seus órgãos-alvo como uma verdadeira glândula endócrina. Além disso, hormônios como a endotelina, Stasch et al. (1989); Potter (2006), a angiotensina, e

arginina-vasopressina (AVP), Lachance et al. (1986), estimulam a liberação de ANP, assim como imersão em água, Ogihara et al. (1986), e inclinar a cabeça para baixo, Hollister et al. (1986). Os níveis plasmáticos de ANP em pacientes normais são aproximadamente de 10 fmol/ml. Porém, estes níveis estão elevados de 10 a 30 vezes em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, Cody et al. (1986); Mukoyama et al. (1991). O gene do ANP humano é encontrado no cromossomo 1, Potter (2006).

Apesar de trazer inúmeros benefícios ao organismo, a aldosterona em excesso pode causar muitos problemas, que envolvem hipertensão, a qual é conhecida por ter efeitos adversos no sistema cardiovascular, Balakumar et al. (2010), e ainda, existem evidências de que a aldosterona exerça efeitos diretos sobre o sistema cardiovascular, independentes do aumento de pressão sanguínea, Stowasser (2005).

1.1. Problemas causados pelo excesso de aldosterona

A ação do hormônio aldosterona sobre receptores mineralocorticóides nos rins causa retenção de sódio e subsequente aumento no volume sanguíneo.

Uma ativação anormal do sistema renina-angiotensina-aldosterona está diretamente correlacionada com a incidência e extensão de danos em órgãos-alvo como hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia vascular, remodelamento ventricular após infarto do miocárdio e doenças renais. Além do mais, foi demonstrado que o aumento crônico da concentração de aldosterona no plasma contribui para problemas fisiopatológicos do coração, Swedberg et al. (1990); Rossier et al. (2010). Além dos efeitos conhecidos da aldosterona na regulação da homeostase de sódio e água, ela também pode produzir mudanças estruturais deletérias nos tecidos por indução da hipertrofia e a desregulação da proliferação e apoptose, levando a fibrose e remodelamento do tecido, Dooley et al. (2011).

Os efeitos prejudiciais da aldosterona sobre o coração incluem a indução de inflamação vascular e lesão, hipertrofia e fibrose do miocárdio, arritmia ventricular e disfunção cardíaca, Rossier et al. (2010). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o bloqueio do RAAS com inibidores de enzimas conversoras de angiotensina (ACE), bloqueadores do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1) ou antagonistas de receptores mineralocorticóides (MR) promovem substancial proteção cardiovascular, Nagata et al. (2002). O eixo aldosterona receptor mineralocorticóide coloca-se, assim, como possível alvo terapêutico, independente do eixo renina-angiotensina-aldosterona. Estas observações têm implicações terapêuticas, dado o fato de que o MR se torna um dos principais alvos de medicamentos farmacológicos na prática clínica para prevenir a descompensação da função cardíaca e evolução para insuficiência cardíaca e arritmias letais, Rossier et al. (2010).

Pacientes que sofrem infarto do miocárdio são tratados com antagonistas de receptores mineralocorticóides da aldosterona (MR), Yang et al. (2010). Os altos níveis de aldosterona apresentados por esses pacientes são associados com o aumento de fibrose e morte do miocárdio. A aldosterona é reconhecida atualmente, como tendo

potencial cardiotóxico, embora seus efeitos locais no coração ainda sejam pouco compreendidos, Chun et al. (2003).

Células endoteliais respondem diretamente a mineralocorticóides com aumento de volume, Oberleithner et al. (2004) e enrijecimento, Oberleithner (2005). Células cardíacas também respondem à aldosterona. Pacientes com aldosteronismo primário têm um aumento de risco de hipertrofia do ventrículo esquerdo comparados a pacientes hipertensos de severidade semelhante, Rossi et al. (1996); Balakumar et al. (2010). O estudo realizado com pacientes normotensos e pacientes normotensos com aldosteronismo primário familiar tipo I (aldosteronismo supressível por glicocorticóides no qual, a enzima da aldosterona sintase é regulada por ACTH, ao invés de ser regulada por angiotensina II), demonstrou que o excesso de aldosterona está associado com aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo e redução da função diastólica, mesmo na ausência de hipertensão, Stowasser (2005).

1.2. Mecanismos de ação intracelular da aldosterona

1.2.1. Ação genômica da aldosterona

A aldosterona aumenta a biossíntese e/ou modula a atividade de inúmeros transportadores de membrana e outras proteínas em células renais, ação esta, também identificada em cardiomiócitos, Korichneva et al. (1995); Kuster et al. (2005).

Esse hormônio atua em seus órgãos-alvo através da ligação a seus receptores MR, localizados na região externa da membrana nuclear, Yang et al. (2010). Uma vez ativado, o então formado, complexo receptor-aldosterona transloca-se para o núcleo, ligando-se a regiões responsivas cognatas do DNA, são similares aos dos glicocorticóides, progesterona e hormônios andrógenos, Funder et al. (1988); Lombès e Binart (1993); Yang et al. (2010). Após a ligação ao DNA, o complexo receptor-hormônio estimula a transcrição de genes alvos que incluem os que codificam para os canais amilorida de sódio sensíveis ENaC, Na/K-ATPase, SGK e quinases. Todas as proteínas sintetizadas acima são fatores chave no controle da reabsorção de sódio no organismo, Bernard (2009). Este mecanismo é muito similar a outros hormônios esteróides, Bernard (2009).

Os principais trabalhos na área enfocam a ação da aldosterona nos rins, porém são crescentes os estudos sobre sua ação no coração, que mostram vários fatores de transcrição que funcionam como importantes mediadores da expressão gênica hipertrófica, Heineke et al. (2006). Talvez o que melhor caracterize a expressão gênica hipertrófica seja o fator GATA4 contendo a transcrição, que regulamenta desenvolvimento e diferenciação da expressão gênica específica cardíaca, Molkentin (2000). O GATA4 durante o estresse fisiopatológico medeia a indução de genes que estão envolvidos na hipertrofia cardíaca, Akazawa (2003).

Em células vasculares, alguns genes alvos foram identificados. Estes incluem no endotélio óxido nítrico (NO) sintase (NOS3), que é regulada pela aldosterona, Cachoeiro et al. (2008), nas células musculares lisas BKCa, um canal de potássio repolarizante, cuja expressão coronária é reduzida pela aldosterona. Este canal está

associado a uma diminuição da resposta celular de acetilcolina e, em última análise leva a uma diminuição da resposta coronária, Ambroisini et al. (2007).

No final dos anos 1960, evidências para a presença de determinados receptores de corticosteróides foram mostradas inicialmente por Porter e Edelman em 1964. Posteriormente, receptores tipo I, e tipo II de corticosteróides foram descritos e identificados como mineralocorticóide (MR) e receptor glicocorticóide (GR), Marver et al. (1974). O receptor mineralocorticóide (MR) é um membro da superfamília de receptores nucleares, Yang et al. (2010), e foi caracterizado como um dos principais reguladores da reabsorção de sódio no rim, Funder et al. (1972). Quinze anos mais tarde, o cDNA do MR em humanos foi clonado e foi construída uma biblioteca de cDNA de rim, Arriza et al. (1987). Posteriormente, o MR foi clonado e caracterizado em várias espécies, incluindo peixe-zebra, Greenwood et al. (2003), truta arco-íris, Sturm et al. (2005), ave, Hodgson et al. (2007); e de alguns mamíferos como: camundongo, rato, porco, vaca e macaco.

No final de 1990 foram identificados co-reguladores de transcrição do MR nos genes alvo da aldosterona. Este receptor é agora reconhecido como um fator de transcrição essencial envolvido em muitos processos fisiológicos e patológicos, O'Malley (2008).

O gene que codifica o MR humano é o *NR3C2* e está localizado no cromossomo 4, na região q31. 1 e abrange cerca de 450 Kb, Morrison et al. (1990); Zennaro (1995). Este gene é composto por dez éxons, sendo que os dois primeiros éxons, 1 α e 1 β , são traduzidos, e os oito éxons seguintes, codificam a proteína inteira do MR com 984 aminoácidos. Como todos os membros da superfamília de receptores nucleares, o MR tem três grandes domínios funcionais: um domínio N-terminal, seguido por um domínio central de ligação ao DNA, e uma região da dobradiça vinculando-os a um domínio ligante C-terminal, Pascual-Le Tallec et al. (2005).

A resposta à via genômica da aldosterona envolve dimerização do receptor mineralocorticóide, dissociação das proteínas de choque térmico (pertencentes a uma classe de chaperonas moleculares, que são proteínas responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação protéica. Elas são altamente conservadas sugerindo uma grande importância evolutiva) do MR,

Yang et al. (2010); Dooley et al. (2011), translocação do complexo aldosterona-MR para o núcleo e a concomitante regulação da expressão gênica.

Esta ação conhecida da aldosterona, após a ligação ao seu receptor clássico MR, leva algumas horas para se completar, uma vez que envolve mecanismos gênicos e subsequente síntese protéica. O receptor MR pertence à superfamília dos receptores nucleares (da qual fazem parte os outros receptores de hormônios esteróides). Esse receptor atua como fator de transcrição dependente da ligação ao hormônio (aldosterona), exercendo seus efeitos através da indução ou repressão de genes alvos específicos, Fernandes-Rosa e Antonini (2006). A ativação patológica do MR causa fibrose e insuficiência cardíaca, mas a utilização clínica de alguns antagonistas do MR é limitada pelos efeitos colaterais renais de hiperpotassemia, Yang et al. (2010).

Recentemente vêm surgindo novas descobertas sobre as ações da aldosterona, as quais não se mostram restritas aos alvos clássicos de sua ação. Órgãos como o coração, vasos e sistema nervoso central são apontados como novos alvos da ação da aldosterona. A localização dos receptores MR já foi descrita nos tecidos cardíacos, Funder et al. (1988); Lombès et al. (1992) e na vasculatura, Takeda et al. (1995). Isto indica uma gama de novos possíveis efeitos da aldosterona mediados pela ativação dos receptores mineralocorticóides nestes tecidos.

Além disso, nos rins a aldosterona age regulando e efetuando a manutenção do pH intracelular que é importante para as funções desempenhadas pela célula e para a sua proliferação. A regulação deste pH envolve mecanismos complexos e não uniformes, dependendo do tipo celular analisado, com a participação de vários transportadores iônicos presentes na membrana plasmática (Na^+/H^+ ATPase, H^+/K^+ ATPase, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$), assim funcionam como tampões intracelulares, Leite-Dellova (2007).

O transportador NHE, que é regulado pela aldosterona está descrito na membrana de uma variedade de células animais. Até hoje foram identificadas nove isoformas desse trocador em mamíferos (NHE1 a NHE9), Ammar et al. (2006).

A isoforma NHE1 pré expressa na membrana basolateral do epitélio renal exerce papel fundamental na regulação do pH e volume celular, enquanto as isoformas NHE2 a NHE9 apresentam distribuição tecidual mais limitada e funções especializadas, Leite-Dellova (2007).

A atividade do NHE é essencial para homeostase do pH, regulação do volume celular, transporte transepitelial de íons e água e também na proliferação e adesão celular, Harvey et al. (2002). Em todas as células o trocador é regulado por vários estímulos, incluindo alguns hormônios, Bidet et al. (1987).

Alguns estudos demonstram que a aldosterona, estimula NHE, ativando e inserindo este trocador na membrana luminal, Malnic et al. (1997). A aldosterona ativa NHE em inúmeros tecidos, incluindo epitélio, musculatura lisa vascular e linfócitos, sendo que a ativação deste trocador pode afetar a atividade de outros transportes iônicos, alterando o volume e o pH celular, Doolan e Harvey (1996).

Efeitos significativos na diferença de potencial transepitelial em segmentos distais do néfron são provocados pela aldosterona, causando uma estimulação do transporte de sódio pelas membranas apicais. Leclerc et al. (2004).

Turnamian e Binder (1989 e 1990) em estudos feitos com ratos evidenciaram o aumento na absorção de NaCl, no cólon proximal e distal nos rins, um dia após a administração de aldosterona. Através da utilização de inibidores específicos das variadas isoformas do NHE demonstrou-se que a aldosterona estimula o trocador aumentando a expressão da isoforma NHE3 e regulando o movimento transepitelial de Na^+ .

Gekle e Silbernagl (1998) analisaram os efeitos rápidos da aldosterona em células de néfrons distais de rim de cão (MDCK), demonstrando que ela inicialmente ativa a condutância de prótons na membrana plasmática e em seguida do trocador Na^+/H^+ . De acordo com estes autores a condutância do H^+ estimula o trocador Na^+/H^+ a promover um ambiente intracelular ácido.

1.2.2. Ação não genômica da aldosterona

Curiosamente, estudos recentes nesta área têm focado os efeitos diretos da aldosterona e sua participação na inflamação e fibrose em doenças cardiovasculares Williams et al. (2003); Giestas et al. (2010); Rao (2010).

Os efeitos não genômicos da aldosterona foram postulados pela primeira vez por Moura e Worcel em meados de 1984. Os primeiros estudos celulares demonstraram

maior troca de sódio em eritrócitos caninos, descartando um mecanismo genômico, pois este tipo celular não possui núcleo, Spach e Streeten (1964). Estes estudos foram seguidos de investigações sobre o transporte de eletrólitos mediados por aldosterona em leucócitos mononucleares humanos, Wehling et al. (1989); Christ et al. (1993). Os efeitos não genômicos da aldosterona são mediados por eventos de sinalização, descrito como elevação de Ca^{2+} intracelular, IP_3 , DAG e PKC, PLC e AMPc, Christ et al. (1993, 1995b, 1999); Wehling et al. (1995) (Tab.1). Estes efeitos podem ocorrer não só em células renais, mas também em células da musculatura vascular lisa e células endoteliais, Christ et al. (1995a); Wehling et al. (1994, 1995).

Estudos recentes demonstraram que a aldosterona possui um grande número de atividades fisiológicas mediadas por mecanismos que não envolvem a translocação de seu receptor ao núcleo. Estes efeitos não são explicados pelo mecanismo clássico descrito para receptores MR que atuam sobre o genoma e por isso são denominados também de não genômicos, Grossmann et al. (2008).

As respostas rápidas à aldosterona que devem ocorrer dentro de segundos a minutos, não envolvem a transcrição ou tradução e são capazes de modular, direta ou indiretamente as respostas depois da via genômica, Grossmann e Gekle (2009).

Estes efeitos se caracterizam por serem extremamente rápidos (no máximo minutos), insensíveis aos inibidores de transcrição (actinomicina D) e de síntese protéica (cicloexemida) e por apresentarem um perfil farmacológico diferenciado com relação ao agonismo e antagonismo, Losel et al. (2003).

No entanto, não se sabia se os sítios de ligação para aldosterona na via direta são modificações do receptor clássico de mineralocorticóides (MR) ou se eles representam um receptor ainda não conhecido. Estudos com camundongos nocautes para os receptores MR demonstraram que a ação rápida da aldosterona não apenas persiste nessas linhagens, como é ainda mais pronunciada quando comparada ao tipo selvagem, nas respostas medidas foram AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e Ca^{2+} intracelular, Haseroth et al. (1999). Este estudo mostrou claramente que estas respostas rápidas envolvem um receptor diferente dos clássicos MR, Haseroth et al. (1999). Porém, atualmente, há vários argumentos contra um receptor MR estruturalmente diferente responsável pelos efeitos não genômicos, Michea et al. (2005). Existem ainda dúvidas sobre o receptor dessa via direta. Estudos iniciais e evidências sugerem que os efeitos

diretos são mediados por um receptor distinto do clássico MR. Entre argumentos que defendem esta idéia incluem-se o aumento do Ca^{2+} e AMPc encontrados em células epiteliais cultivadas a partir de camundongos nocautes para o receptor MR, Haseroth et al. (1999).

Le Moellic (2004) utilizando a aldosterona acoplada a moléculas grandes como BSA, encontrou os mesmos efeitos rápidos e, portanto, favorecendo a idéia da atuação de um receptor de membrana, pois quando a aldosterona se encontra ligada a moléculas grandes ela é incapaz de atravessar a membrana rapidamente. Receptores semelhantes têm sido propostos para outros hormônios esteróides, Orshal e Khalil (2004); Zhu et al. (2003).

Os efeitos não genômicos mediados pela aldosterona estão associados à ativação da fosfolipase C (PLC) com subsequente hidrólise de fosfolipídios de membrana. Esta última reação libera DAG e IP_3 que por sua vez ativam a proteína quinase C (PKC) e liberam Ca^{2+} do retículo, respectivamente. O Ca^{2+} já é conhecido como um transmissor crucial na sinalização hipertrófica, Frey e Olson (2003). Esta ação foi demonstrada em células da musculatura lisa vascular e em células endoteliais, Falkenstein et al. (2000); Wehling et al. (1995). O aumento de Ca^{2+} leva à ativação de calcineurina, uma fosfatase também conhecida por PP2B, causando morte celular por apoptose, Mano et al. (2004).

A aldosterona também causa fosforilação de várias moléculas sinalizadoras intracelulares, incluindo c-Src, Callera et al. (2005), MAP quinase, quinase regulada por sinal externo 1/2 (ERK1/2), c-Jun quinase (JNK) e p38, Callera et al. (2005); Krug et al. (2003); Mazak et al. (2004); Nishiyama et al. (2005), além de receptores como o do fator de crescimento epidermal (EGFr), Krug et al. (2006). A ativação da MAP quinase parece estar envolvida na promoção da proliferação de células da musculatura lisa vascular (VSMC) e da hipertrofia relacionada com a remodelação vascular alterada pela hipertensão, Touyz (2003).

O trocador Na^+/H^+ representa um importante alvo da aldosterona durante a resposta rápida. A elevação do cálcio citosólico serve como um segundo mensageiro no sinal de transdução iniciado pela aldosterona, para ativação rápida do trocador Na^+/H^+ . A rápida ativação deste trocador estimula a entrada de sódio na célula e, como consequência, ocorre aumento do volume celular, servindo como um segundo mensageiro para a ação não genômica da aldosterona, Gekle e Silbermagl (1998).

A aldosterona precisa da PKC α (isoforma de PKC sensível a Ca²⁺) para ativar o trocador Na⁺/H⁺, pois a pré-incubação com um inibidor de PKC α bloqueia a ativação do trocador, induzida pelo hormônio, Good et al. (2002). Gekle et al. (2001) constataram, em células MDCK, que a ativação não genômica do trocador Na⁺/H⁺ pela aldosterona envolve a via MAPK. Dois inibidores específicos da ativação da ERK1/2 inibiram a estimulação do trocador nestas células. No entanto, os mecanismos relacionados entre trocador Na⁺/H⁺ e a ativação da ERK1/2 não estão determinados. Em células de ducto coletor cortical, a via direta da aldosterona mostrou um aumento na atividade da isoforma NHE1 do trocador Na⁺/H⁺, via PKC α /MAPK, independente do receptor clássico mineralocorticoide, Markos et al. (2005)

Tabela 1: Componentes envolvidos na sinalização não genômica da aldosterona

AMPC	VSMC suíno	Christ et al. (1999)
	Ducto coletor medular interno	Shedder et al. (2002)
IP3	HML	Christ et al. (1993)
	VSMC	Christ et al. (1995a,b)
	Células A6	Blazer-Yost et al. (1999)
	Células do músculo esquelético	Estrada et al. (2000)
Ca²⁺	VSMC, EC	Wehling et al. (1994)
	VSMC (aorta de rato e coelho)	Wehling et al. (1995)
	Células epiteliais do cólon T84	Doolan e Harvey (1996)
	EC suíno	Schneider et al. (1997)
	Fibroblastos de pele de camundongos MR-/-	Hasereth et al. (1999)
	Células do músculo esquelético	Estrada et al. (2000)
	Células M1	Harvey e Higgins (2000)
	células de vasos mesentéricos de baixa resistência de	Michea et al. (2005)
	HEK (MR)	Grossmann et al. (2005)
PKC	VSMC de rato	Estrada et al. (2000)
	MDCK	Gekle et al. (1997)
	VSMC de rato	Ebata et al. (1999)
	Células M1	Harvey e Higgins (2000)
	Cardiomiócitos de coelho	Mihailidou et al. (2004)
	Arteríola aferente pré-glomerular de coelho	Arima et al. (2004)
	OMCD	Winter et al. (2004)
	Artérias coronárias (LAD) de cachorro	Fujita et al. (2005)
	Cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos	Rude et al. (2005)
	Trabécula humana (coração)	Chai et al. (2005)
	<i>In vitro</i>	Alzamora et al. (2007)
	Células foliculares do cólon sigmóide humano	Bowley et al. (2007)
ERK1/2	Células MDCK C11	Gekle et al. (2002)
	Células M1	Rossol-Hasereth et al. (2004)
	HEK células, CHO: sistema heterólogo	Grossmann et al. (2005)
	VSMC AÓRTICO (rato)	Mazak et al. (2004)
	VSMC Aórtico (rato)	Min et al. (2005)
	Cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos	Rude et al. (2005)
	Células musculares lisas da aorta de rato	Ishizawa et al. (2005)
	Artérias coronárias humanas	Chai et al. (2005)
	Células M1	McEneaney et al. (2007)
	Rato MTAL	Watts et al. (2006)
	Células endoteliais aórticas bovinas, VSMC de rato	Liu et al. (2003)
	Fosforilação de ERK	Kobayashi et al. (2006)
	Células M1	Markos et al. (2005)

	Células mesangiais de rato	Terada et al. (2005)
	Células HK-2	Zhang et al. (2007)
	Pequenos vasos mesentéricos de resistência de rato	Michea et al. (2005)
	VSMC humano	Gros et al. (2007)
	Arteriola renal aferente de coelho	Uhrenholt et al. (2003)
PI3K	Células endoteliais aórticas bovinas	Liu et al. (2003)
	Ventrículo esquerdo do coração de rato	Kobayashi et al. (2006)
	EC aórtica bovina	Mutoh et al. (2008)
	Células M1	McEneaney et al. (2007)
	VSMC de rato	Callera et al. (2005)
c-src	VSMC de rato (SHR)	Callera et al. (2005)
	VSMC de rato	Montezano et al. (2008)
	Células HEK (MR)	Grossmann et al. (2005)
	VSMC aórtico de rato	Mazak et al. (2004)
	VSMC aórtico de rato	Min et al. (2005)
	Artérias coronárias humanas	Chai et al. (2005)
	VSMC de rato	Montezano et al. (2008)
	Trabécula de coração humano	Chai et al. (2005)
Interação Ang II	Células musculares lisas das artérias coronárias humanas	Jaffe e Mendelsohn (2005)
	Ratos dTGR, ventrículo esquerdo	Fiebeler et al. (2001)
	Ratos dTGR, coração, rim	Fiebeler et al. (2005)
	Pequenas artérias mesentéricas de rato, segmentos aórticos	Viridis et al. (2002)
	Superexpressão MR em cardiomiócitos (ratos)	Di Zhang et al. (2008)
	Células MDCK-C11	Gekle et al. (2002)
	VSMC de rato	Mazak et al. (2004)
Interaction EGFR	Células M11	McEneaney et al. (2007)
	HEK-MR, células CHO-MR	Grossmann et al. (2005)
	Rato VSMC	Min et al. (2005)
	RAEC	Iwashima et al. (2008)
	Células mesangiais de rato	Miyata et al. (2005a,b)
	Cardiomiócitos de rato neonato	Hayashi et al. (2008)
	Rato VSMC	Montezano et al. (2008)
NADPH oxidase/ROS	Miócitos ventriculares de rato	Rude et al. (2005)
	Aorta de rato	Viridis et al. (2002)
	VSMC rato	Mazak et al. (2004)
	Células HK-2	Zhang et al. (2007)
NOS		Nagata et al. (2006)

	HUVEC	Mutoh et al. (2008)
	EC aórtico bovino	Uhrenholt et al. (2003)
	Arteriola renal aferente de coelho	Liu et al. (2003)
	EC aorta bovina	Arima et al. (2004)
	Arteriola aferente renal de rato	Kobayashi et al. (2006)
	Miocárdio de rato	
	Células gigantes do néfron distal do sapo	Oberleithner et al. (1987)
	MDCK	Gekle et al. (1996)
	Pequenos vasos mesentéricos de resistência	Chai et al. (2005)
	Rato VSMC	Ebata et al. (1999)
NHE	VSMC	Miyata et al. (2005a,b)
	MTAL	Good et al. (2006)
	Células M1	Markos et al. (2005)
	Artérias uterinas crônico/radial	Alzamora et al. (2000)
	HML	Wehling et al. (1989)

Além disso, a aldosterona inibe a ação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que pode, virtualmente, contribuir com todos os efeitos cardíacos produzidos pela aldosterona, Chun et al. (2003).

Rodbell e colaboradores em 1971, apresentaram a primeira evidência da importância do nucleotídeo adenina na geração de AMPc, a partir do estímulo hormonal. Aproximadamente uma década após esta descoberta, a proteína heterotrimérica Gs, que se acopla aos receptores de membrana, estimulando o sistema efetor enzimático adenilil ciclase que culmina na produção de AMPc, foi purificada em membranas de tecido hepático.

Dados da literatura sugerem que possa haver um receptor de membrana acoplado a uma proteína G, e estudos relativos a esta proteína mostram que, de acordo com o grau de homologia de aminoácidos, a subunidade G é dividida em quatro subfamílias: Gs, Gq, Gi e Gi2. Os membros das subfamílias Gs e Gq em geral estão relacionados a eventos estimulatórios hormonais, enquanto os membros da família Gi inibem tais processos, Spiegel (1996). Este sistema pode ser ativado por inúmeros ligantes, entre eles íons e hormônios.

Se por um lado podemos dizer que foram estudados sobre o mecanismo de ação da aldosterona em relação aos efeitos conhecidos ao se ligar a seu receptor MR e os dependentes do eixo renina-angiotensina, o mesmo não se pode afirmar sobre sua ação

direta principalmente em células cardíacas.

Podemos dizer o mesmo da possibilidade de existência de um receptor, outro que não o clássico MR, atuando como transmissor do sinal da aldosterona. A existência de outro receptor, diferente do clássico MR, poderia ajudar a responder essa possível discrepância de resultados. Além disso, não sabemos se existe ou não uma comunicação entre esses dois tipos de receptores, envolvendo uma resposta rápida e outra mais lenta.

1.3. Moléculas envolvidas na sinalização da aldosterona

Outras moléculas também fazem parte da sinalização do hormônio aldosterona, como por exemplo, a arginina-vasopressina (AVP). A AVP que teve seus efeitos descritos, pela primeira vez em 1895, por Oliver e Schafer, que observaram atividade vasopressora em extratos hipofisários. Segundo Bruhn et al. (2009), posteriormente, Farmi e Von den Velden em 1913 e Starling e Verney em 1925, demonstraram que injeções subcutâneas de extratos de neurohipófise eram capazes de produzir um efeito antidiurético, Bruhn et al. (2009). Devido aos seus efeitos vasopressores, a substância ativa foi denominada vasopressina e pelos seus efeitos de reabsorção de água nos rins, recebeu o nome hormônio antidiurético.

A AVP é sintetizada nos neurônios magno celulares, na forma de um precursor denominado pré-pró-pessofisina, seguido pela vasopressina, sua neurofisina carreadora. Com a remoção do peptídeo sinalizador, a pré-pró-pessofisina é convertida em pró-pessofisina que é armazenada em grânulos pelo complexo de Golgi. Os grânulos de armazenamento migram ao longo do axônio em direção aos terminais nervosos localizados na hipófise posterior, onde o hormônio é liberado. Durante o transporte, a pró-pessofisina é clivada, resultando em três peptídeos: a vasopressina, uma neurofisina de peso molecular 10 kDa e uma glicoproteína Richter (1988); Reeves et al. (1998), Bruhn et al. 2009.

Como outros hormônios hidrofílicos, a AVP é liberada na circulação periférica, sendo encontrada no plasma não associada a proteínas carreadoras. Um aumento na osmolaridade plasmática, mesmo da ordem de 1 a 2%, é detectado pelos osmorreceptores, estimulando então a secreção da vasopressina, cuja concentração sérica varia de forma diretamente proporcional ao aumento da osmolaridade plasmática, diminuindo, significativamente, o volume urinário. Outro fator de regulação é o volume sanguíneo, monitorado por receptores vasculares, Bruhn et al. (2009). Além desses receptores, a regulação neural e a idade podem, também, ser considerados como fatores de regulação da liberação de vasopressina, Reeves et al. (1998); Bruhn et al. (2009).

A manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico é feita através da regulação do volume de água extracelular e da concentração plasmática do íon sódio. Os mecanismos

pelos quais esse controle é feito são vários e asseguram um desvio mínimo, menos de 1%, no volume sanguíneo e concentração de sódio em indivíduos adultos saudáveis. O total da água corpórea e, conseqüentemente a concentração total de sódio, é regulada primariamente, pela excreção renal de água livre, mediada pelas ações do hormônio antidiurético arginina-vasopressina (AVP), Richter (1988); Reeves et al. (1998); Bruhn et al. (2009).

Nos rins, a arginina-vasopressina (AVP) e a aldosterona contribuem para a homeostase de sal e água. AVP atua sobre dois tipos de receptores, V1 e V2, os quais são ligados a dois distintos segundos mensageiros, Ca^{2+} e AMPc, respectivamente. A aldosterona e AVP (através do seu receptor V2) exercem ação sinérgica sobre a reabsorção de sódio no néfron distal, Hawk e Schafer (1996) mais notadamente pela ação da Na^+/K^+ ATPase do ducto coletor, Husted et al. (1990); Laplace et al. (1992); Coutry et al. (1995); Djelidi et al. (1997).

No processo normal de antidiurese, Knepper et al. (1996), se estabelece um equilíbrio osmótico entre o líquido luminal hipotônico dos ductos coletores e o interstício medular hipertônico; em consequência, há reabsorção de água, diminuição do volume urinário, concentração da urina e conservação da água corporal.

A estimulação dos receptores do primeiro tipo (receptores V1) aumenta a concentração de cálcio no citosol, estimulando a quebra de fosfatidilinositol. Estes receptores são, portanto, análogos funcionais dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos e H1-histamínicos, Sharif (1992); Jans (1990); Bruhn et al. (2009). Os do segundo tipo (receptores V2) controlam a adenilil ciclase e são, portanto, análogos aos receptores β -adrenérgicos e H2-histamínicos.

Os receptores V2 estão presentes nas superfícies basolaterais do epitélio renal Reeves et al. (1998) e são responsáveis pela ação antidiurética do AVP nas células do ducto coletor e porção ascendente da alça de Henle, Sharif (1992); Jans (1990).

A análise teórica da proteína correspondente ao receptor mostrou um perfil característico dos receptores com sete segmentos trans-membrana. Esse dado, aliado à comparação com outras sequências de receptores já clonados, indicou que o AVPR2 é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G. É possível identificar duas outras regiões, idênticas nos receptores V1 e V2 de vasopressina e também nos receptores de oxitocina, que não estão presentes nos outros receptores da família. Essas

regiões, provavelmente, estão relacionadas com o reconhecimento do receptor pelo ligante, sendo locais de grande interesse para análises de mutação e estrutura-função, Sharif (1992); Bruhn et al. (2009). A proteína G acoplada ao receptor apresenta três subunidades denominadas *a*, *b* e *g*. A ligação ao receptor produz uma modificação conformacional que é transmitida à proteína G, causando a troca de uma molécula de GDP ligada à subunidade *a* por uma de GTP (forma ativa), Seibold (1992); Dohlman (1991).

Outra importante molécula envolvida na sinalização da aldosterona é a Ang II. No coração, um dos efeitos conhecidos da aldosterona é o aumento do número de receptores de Ang II (AT1) nas células cardíacas, Robert et al. (1999), e o estímulo da enzima conversora de angiotensina (ECA) nos cardiomiócitos, Wang et al. (2002). A Ang II, importante peptídeo do RAAS, tem um papel crucial na regulação da resposta inflamatória vascular por ativar o recrutamento de células inflamatórias, Kim et al. (1996) e Ferrario (2006). Além disso, esse peptídeo modula a contração, regula o crescimento celular, apoptose e diferenciação, influencia a migração celular e deposição de matriz, Touyz et al. (2002), além de aumentar o estresse oxidativo, Vaughan et al. (2000). Este conjunto de atividades faz da Ang II um peptídeo aterogênico.

A Ang II, exerce suas diversas atividades biológicas através da ligação em um dos dois tipos de receptores conhecidos, Keidar et al. (2007). Este peptídeo é biologicamente ativo e apresenta efeitos pleiotrópicos sobre os sistemas nervoso, cardiovascular e endócrino, os quais são iniciados pela ativação de receptores específicos acoplados à proteína G, pertencentes à família dos receptores de sete segmentos transmembrana, denominados AT1 e AT2, Baker e Aceto (1990); Timmermans et al. (1991). Embora AT1 e AT2 sejam igualmente distribuídos em cardiomiócitos, Sechi et al. (1992); Matsubara et al. (1994); Regitz-zagrosek et al. (1995a), vários estudos têm revelado que a maioria das respostas da Ang II é mediada pelo subtipo AT1, Dostal e Baker (1992); Regitz-zagrosek et al. (1994); Hanatani et al. (1995); Ito et al. (1995); Regitz-zagrosek et al. (1995b); Sadoshima e Izumo (1996).

Através do receptor AT1, a Ang II induz vasoconstrição, crescimento e migração celular, produção de componentes da matriz extracelular e inflamação, enquanto o AT2 promove apoptose, e inibe proliferação e hipertrofia celular, Allen et al. (2000); Siragy (2000). Como a Ang II liga-se a ambos receptores com similar afinidade, a resposta

celular é dependente do nível de expressão e/ou responsividade dos dois receptores independentemente.

No mínimo quatro vias de sinalização intracelular participam na transdução do sinal da Ang II em células alvo. A primeira via envolve a ativação da proteína Gq (proteína G estimulatória), levando a geração de inositol trifosfato (IP_3) e a um subsequente aumento na concentração do cálcio (Ca^{2+}) citosólico, o qual modula a contratilidade celular, o tráfego de vesículas, a transcrição de genes e a mitogênese, Sadoshima et al. (1995); Walsh et al. (1995). Por outro lado, a segunda via envolve a ativação da proteína Gi (proteína G inibitória), a qual causa inibição do AMPc, Peach (1981). A terceira via envolve a ativação da cascata da Ras/Raf/MAPK, Thomas et al. (1996), enquanto a quarta via leva a ativação da quinase intracelular JAK2 (*Janus quinase 2*), que rapidamente direciona o sinal para o núcleo através das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STAT), Darnell et al. (1994); Schindler e Darnell (1995).

É interessante verificar que, embora os receptores da Ang II não apresentem atividade tirosina quinase intrínseca, eles são capazes de ativar inúmeras proteínas tirosina quinase receptoras e não-receptoras, Ishida et al. (1995); Sadoshima e Izumo (1996); Eguchi et al. (1998); Heeneman et al. (2000). Muitas das proteínas ativadas pela Ang II agem como pontos de convergência para as cascatas de sinalização de um grande número de hormônios, fatores de crescimento e citocinas, apresentando importante papel em distintos *cross talking* moleculares.

O receptor do tipo 1 (AT1) é altamente expresso em adultos e tem importante papel nas doenças cardiovasculares, Keidar et al. (2007). O receptor AT1 medeia a maior parte dos efeitos usualmente associados com a Ang II, tais como vasoconstrição, proliferação, inflamação, coagulação, deposição de matriz, estimulação da liberação de aldosterona e da atividade do sistema nervoso simpático. Além disso, segundo Robert et al. (1999), um efeito conhecido da aldosterona no coração, é o aumento do número de receptores de angiotensina II (AT1) nas células cardíacas. Entretanto, a ligação da Ang II ao receptor do tipo 2 (AT2) possui ações contrárias aos efeitos mediados pelo receptor AT1, tanto a curto como em longo prazo, provendo um papel protetor, Gasparo et al. (2000).

Além da Ang II, outros Ang-peptídeos, tais como angiotensina IV [Ang IV ou Ang-(3-8)] e angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)], também têm importantes atividades biológicas, Wessel et al. (2007). A Ang-(1-7), especialmente, tem se tornado uma angiotensina de interesse, e por ser considerada a mais pleiotrópica dos metabólitos derivados da Ang II. Por exercer efeitos que podem ser idênticos, opostos ou distintos ao da Ang II, Rocks et al. (1999) mostraram que a Ang-(1-7) é um antagonista das respostas vasculares da Ang II também em artérias humanas e um inibidor da ECA em plasma e tecidos cardíaco e vascular humanos.

1.4. Proteínas adaptadoras de quinase A (AKAPs)

A primeira AKAP foi descoberta em 1984 por Lohmann e colaboradores, entretanto, nesta data essas proteínas ainda não eram chamadas de AKAPs. A primeira AKAP foi caracterizada como uma proteína associada a microtúbulos, que foi inicialmente co-purificada com a subunidade RII de extrato cerebral. Atualmente, essa família cresceu bastante, com mais de 50 membros estruturalmente diferentes, porém, com funcionalidade semelhante. As AKAPs são classificadas pela sua capacidade de serem co-purificadas com PKA, a partir de tecidos, Wong e Scott (2004).

Onde e quando uma enzima torna-se ativa tem profundas implicações nos processos celulares controlados por ela. Consequentemente, sofisticados mecanismos moleculares são envolvidos na regulação da organização espacial e temporal das rotas de transdução de sinal, Wong e Scott (2004). Proteínas “adaptadoras” formam gigantes complexos com quinases e fosfatases, dirigindo essas enzimas a locais específicos dentro da célula, disponibilizando essas “operárias biológicas” aos seus específicos substratos. O movimento dessas enzimas para dentro ou fora desses complexos contribui também na regulação temporal desses eventos de sinalização. Um bom exemplo dessas moléculas organizadoras são as AKAPs, as quais compartimentalizam a quinase dependente de AMPc (PKA), além de outras enzimas, Wong e Scott (2004); Carnegie (2009).

Atualmente, mais de 50 tipos de AKAPs já foram descritas em mamíferos, Carnegie et al. (2009). Estas diferentes moléculas apresentam características em comum: possuem um domínio de ligação para PKA; um local específico de ligação na membrana, seja citoplasmática, seja do núcleo, onde o sinal celular efetivamente ocorrerá e possuem a capacidade de formação de complexos com outras moléculas envolvidas na sinalização que controlam, Wong e Scott (2004).

Todos os membros da família das AKAPs compartilham um domínio conservado de ancoragem para PKA, a ligação entre essas moléculas consiste em uma hélice anfipática de 14-18 resíduos da AKAP que interage com uma ranhura hidrofóbica do encaixe de dimerização localizada no domínio extremo N-terminal da porção regulatória

das subunidades do dímero (PKA). Os complexos AKAP-PKA surgem através da ligação especializada proteína-proteína, Diviani (2008), (Tab.2).

Em cardiomiócitos, foi identificada uma AKAP denominada mAKAP, com peso molecular de 255kDa, localizada no envelope nuclear dessas células segundo Kapiloff et al. (1999). Até o momento, sabemos que os complexos formados pela mAKAP consistem de PKA, da fosfodiesterase PDE4D3 (fosfodiesterase), de Ca^{2+} ativado, do receptor do canal de Ca^{2+} de rianodina (RyR), das fosfatases PP2A e calcineurina (PP2B), da MAP quinase de alto peso molecular ERK5, do ativador de ERK5/MEK5, e Epac, um nucleotídeo guanidínico trocador de proteína para Rap ativado por AMPc, Dodge et al. (2001); Dodge-Kafka et al. (2005); Kapiloff et al. (2001); Marx et al. (2000); Pare et al. (2005); Ruehr et al. (2003); Carnegie (2009). Em 2005, Dodge e colaboradores demonstraram que a ativação dessa ERK5, ancorada neste complexo coordenado pela mAKAP, em baixas concentrações de AMPc, induz hipertrofia em cardiomiócitos, Dodge et al. (2005).

Tabela 2: Propriedades e localização das AKAPs

Propriedades das AKAPs			
AKAP	Tecido/compartimento	Características	Refs.
AKAP15/18	Membrana plasmática	Marcação da membrana plasmática da via de modificação de ácido graxo	Fraser, <i>et al.</i> (1998)
		Modulação dos canais de Ca^{2+} do tipo L	Gray, P. C. <i>et al.</i> (1998)
			Gray, P. C. <i>et al.</i> (1997)
Ht31	Isolado da biblioteca citoplasmática da tireóide	Peptídeo correspondente a RII interrompe sítio de ligação de ancoragem de PKA nas células	Carr, D. W. <i>et al.</i> (1991)
			Lester, L. B., Langeberg, L. K. e Scott, Rosenmund, C. <i>et al.</i> (1994)
			Johnson, B. D., Scheuer, T. e Catterall, W. A. (1994)
AKAP75/79/150	Membrana plasmática Densidade pós-sináptica	Bovinos, humanos e ratos ortólogos, respectivamente Também se liga ao PKC e à calcineurina (PP2B) Domínios alvo polibásicos de membrana e dendritos.	Bergman, D. B., Bhattacharya, N. e Rubin, C. S. (1989)
			Dell'Acqua, M. L. <i>et al.</i> (1998)
			Coghlan, V. M. <i>et al.</i> (1995)
			Klauck, T. M. <i>et al.</i> (1996)
Ezrin	Citoesqueleto de Actina	Pode estar vinculado a CFTR via EBP50/NHERF	Dransfield, D. T. <i>et al.</i> (1997)
TAKAP80	Bainha fibrosa da cauda do espermatozóide	Testículo específica	Mei, X. <i>et al.</i> (1997)
AKAP82	Bainha fibrosa da cauda do espermatozóide	Papel potencial na capacitação espermática	Johnson, L. R. <i>et al.</i> (1997)
AKAP95	Matriz nuclear	Dedo Zinc	Coghlan, V. M. <i>et al.</i> (1994)
AKAP-KL	Rim e pulmão	Múltiplas variações de locais	Dong, F. <i>et al.</i> (1998)
	Citoesqueleto de Actina Ápice das células epiteliais		
AKAP220	Vesículas	Também se liga a PP1	Schillace, R. V. e Scott, J. D. (1999)
Gravin	Citoesqueleto de Actina	Também se liga ao PKC	Nauert, J. B. <i>et al.</i> (1997)
mAKAP	Músculos cardíaco, esquelético, cérebro e Membrana nuclear	Espectrina repete domínios envolvidos na segmentação subcelular Desenvolvimento regulado	Colledge e Scott, (1999)
Yotiao AKAP350	Densidade pós-sináptica	Múltiplas variações de Splice Marcador de Yotiao, PKA e PP1 ao receptor NMDA	Schmidt, P. H. <i>et al.</i> (1999)
	Junção neuromuscular Centrossomos		
S-AKAP84/D-AKAP1 AKAP121/AKA P149	Membrana mitocondrial externa	AKAP duplo-específica se liga ao RI e RII Múltiplas variações de Splice	Lin, R-Y., Moss, S. B. e Rubin, C. S. (1995)
			Huang, L. J. <i>et al.</i> (1997)
			Chen, Q., Reigh-Yi, L. e Rubin, C. (1997)
D-AKAP2	Ampla distribuição do tecido avaliado por Northern blot	AKAP duplo-específica se liga ao RI e RII	Trendelenburg, G. <i>et al.</i> (1996)
			Huang, L. J. <i>et al.</i> (1997)
AKAP _{CE}	Isolado da biblioteca de expressão de <i>Caenorhabditis elegans</i>	Se liga a subunidade do RI-like Proteína RING-finger	Angelo, R. e Rubin, C. S. (1998)
DAKAP550	Identificado por RII em sobreposição de embriões de <i>Drosophila</i>	Contém dois sítios de ligação de RII	Han, J. D. (1997)

Tabela com descrição das principais AKAPs, tecidos onde elas são encontradas, suas funções até o momento. Em destaque a mAKAP. Colledge e Scott, (1999)

1.5. mAKAP e hipertrofia

A hipertrofia dos miócitos é a resposta compensatória do coração ao estresse e é caracterizada por um crescimento não mitótico, organização miofibrilar, expressão, e alterações específicas nas propriedades do canal iônico, Molkenin (2004). A hipertrofia pode evoluir para insuficiência cardíaca congestiva, uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Infelizmente, a terapia atual para quem sofre de insuficiência cardíaca é geralmente paliativa. Uma melhor compreensão do sinal intracelular da rede de transdução, que controla o crescimento de miócitos, pode sugerir novas abordagens terapêuticas. Estas redes de transdução de sinal, são compostas de segundos mensageiros, enzimas e canais iônicos, que formam caminhos de retransmissão de sinais específicos da superfície celular para as organelas intracelulares, Papin et al. (2005).

Segundo Pare (2005), múltiplas vias de sinalização controlam a indução de hipertrofia dos miócitos. Estes percursos incluem vias de proteína quinase A dependente de AMPc (PKA), vias da proteína quinase mitógeno ativada (MAP kinase), da calcineurina (CAN) e via do fator de transcrição do fator nuclear de células T ativadas (NFATc), Molkenin e Dorn (2001). Um conceito emergente no campo da transdução de sinal, é a existência de pontos dentro de uma rede onde várias vias de sinalização que convergem e compartilham moléculas comuns, facilitando assim a comunicação entre as vias, Papin et al. (2005). Moléculas, que participam desses centros de integração são de grande interesse terapêutico, por causa do potencial para coordenar e modular múltiplas vias de sinalização.

Uma proteína que é uma candidata atraente para coordenar sinais hipertróficos suscitados a partir de múltiplos caminhos é a proteína adaptadora mAKAP, Kapiloff (2002). Esta proteína possui 255 kDa, está localizada no envelope nuclear e está ligada à membrana pela proteína integral de membrana nesprin-1 α através de uma ligação direta de espectrina, Pare et al. (2005).

Vista sua capacidade de vincular a holoenzima tipo II da PKA (RII), Kapiloff et al. (1999); Zakhary et al. (2000), a mAKAP também vincula fosfodiesterases específicas cardíacas como a PDE4D3, receptores de canais de rianodina tipo II (RyR2)

e calcineurina, Dodge et al. (2001); Dodge-Kafka et al. (2005); Kapiloff et al. (2001); Marx et al. (2000); Ruehr et al. (2003).

Segundo Dodge-Kafka et al. (2005) MAP quinases, MEK5 e ERK5, Rap1 e Epac1 também são ancorados pela mAKAP. MEK5/ERK5 são conhecidos por mediar a indução da hipertrofia dos miócitos pelo receptor do fator inibitório da leucemia/gp130, Nicol et al. (2001).

Dodge-Kafka et al. (2005), também relataram que a mAKAP é importante para a indução da hipertrofia dos miócitos por sinalização de receptores adrenérgicos. Os receptores β -adrenérgicos estimulam a adenilil ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMPc e, posteriormente, a atividade da PKA. O complexo PKA mAKAP pode fosforilar canais de rianodina associados (RyR2), Kapiloff (2001); Marx et al. (2000); Ruehr et al. (2003).

Geralmente, esses canais de rianodina (RyR2) medeiam a liberação de Ca^{2+} dos retículos sarcoplasmáticos, durante o acoplamento excitação-contração, Fill e Copello (2002). No entanto, canais de rianodina tipo II (RyR2) associados a mAKAP podem também regular a liberação de Ca^{2+} de retículos sarcoplasmáticos adjacentes e perinucleares, Abrenica e Gilchrist (2000).

Neste ponto, podemos dizer que a resposta rápida promovida pela aldosterona, em células cardíacas apresenta substanciais elementos para que possamos sugerir que há uma resposta mediada por um receptor diverso do clássico MR e que intracelularmente, essa resposta pode estar sendo gerenciada pela mAKAP.

Finalizando, temos muitos elementos teóricos que nos permitem visualizar uma possível comunicação entre as vias clássica e direta da aldosterona, gerenciadas pela mAKAP e que podem levar a célula à hipertrofia.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os mecanismos bioquímicos responsáveis pela hipertrofia de cardiomiócitos de ratos mediada pelo hormônio aldosterona.

2.2. Objetivos específicos

1 - Verificar a ação hipertrófica induzida pelo hormônio aldosterona em cardiomiócitos tratados ou não com espironolactona (antagonista do receptor MR da aldosterona), através da medida da área superficial e concentração de ANP intracelular.

2 - Determinar a participação dos segundos mensageiros AMPc e Ca^{+2} induzidos pela aldosterona em células primárias de cardiomiócitos tratadas ou não previamente com espironolactona na presença ou ausência de BAPTA-AM (quelante de cálcio intracelular);

3 - Determinar a participação da AKAP no processo hipertrófico dos cardiomiócitos pela aldosterona.

4 - Constatar a ocorrência de um *cross talking* entre as vias direta e genômica da aldosterona.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. Animais

Para obtenção de cardiomiócitos, foram utilizados filhotes neonatos de ratos da linhagem *Sprague Dawley* (SD), de dois dias de idade, albinos, de ambos os sexos e pesando em média 5g (Fig.4). Estes permaneceram juntamente com a mãe até o dia do experimento.

Os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Minas Gerais. As progenitoras foram acomodadas uma por gaiola, com seus respectivos filhotes, mantidas em ambiente silencioso, com temperatura controlada, em ciclos de 12 horas de período diurno (das 07:00 às 19:00 horas) e 12 horas de período noturno (das 19:00 às 07:00 horas) mantidos artificialmente. Receberam água e ração Purina “*ad libitum*”. Todas as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa Animal foram seguidas. Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética (CEUA-UFOP), protocolo número 2010/33. (Em anexo).



Figura 4: Rato neonato, idade 2 dias e peso 5g.

3.2. Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento ou não com espironolactona [10^{-6} M] e aldosterona [10^{-7} M].

- 1- Controle: somente as células
- 2- Células tratadas com aldosterona [10^{-7} M]
- 3- Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M]
- 4- Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M] e aldosterona [10^{-7} M]

Os tratamentos (Fig.5) relativos a cada ensaio foram ministrados sempre seguindo as condições acima citadas.

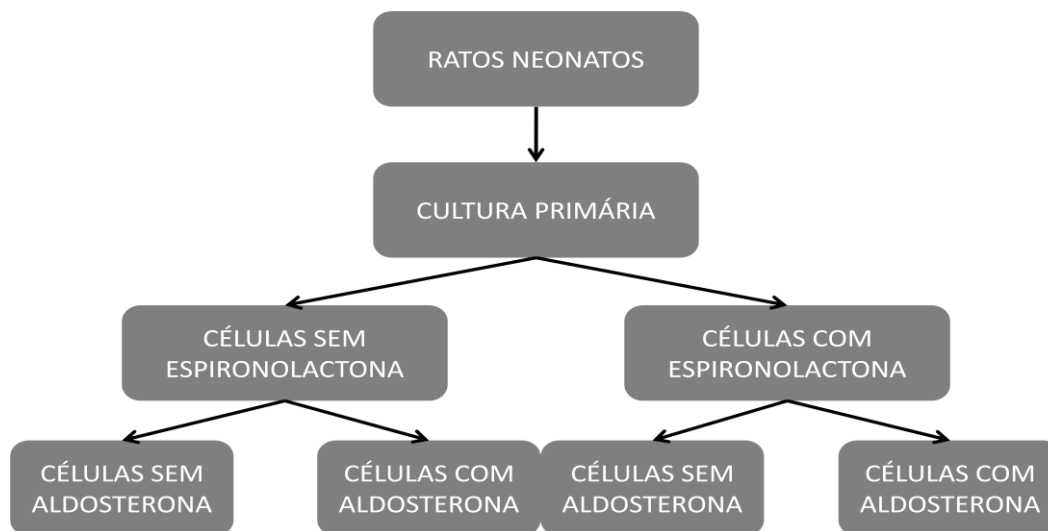


Figura 5: Organograma dos grupos experimentais de acordo com o tipo de tratamento recebido.

3.3. Soluções utilizadas nos ensaios

Tabela 3: Composição da solução de ADS, pH = 7,35

Componentes	Quantidade
Água Milli-q	q.s.p 1 L
NaCl	6,8 g
HEPES	4,76 g
Na ₂ HPO ₄ ,	0,138 g
D-glucose	1,0 g
KCl	0,4 g
MgSO ₄	0,195 g

Tabela 4: Composição da solução de BRDU [10^{-2} M] (5-Bromo-2'-deoxyuridine)

Componentes	Quantidade
Água Milli-q	165 ml
BRDU	0,5 g

Tabela 5: Composição do meio de cultura celular

Componentes	Quantidade
DEMEN	42,5 ml
Soro de cavalo	5,0 ml
Soro fetal bovino	2,5 ml
Penicilina-estreptomicina	0,5 ml
Solução de BRDU [10^{-2} M]	50 μ l

Tabela 6: Composição do meio de cultura com espironolactona

Componentes	Quantidade
Meio de cultura normal	50 ml
Solução de espironolactona [10^{-5} M] *	5 μ l

* = para obtenção de [10^{-6} M] final.

Tabela 7: Composição do meio de cultura com aldosterona

Componentes	Quantidade
Meio de cultura normal	100 ml
Solução de aldosterona [10^{-6} M] **	10 μ l

**= para obtenção de [10^{-7} M] final.

Tabela 8: Composição da gelatina usada para adesão das células na placa de cultura

Componentes	Quantidade
Água Milli-q	250 ml
Gelatina incolor	25 g

***= para obtenção de 0,1%.

Tabela 9: Composição da solução tampão de digestão

Componentes	Quantidade
ADS	50 ml
Colagenase tipo II	10 mg
Pancreatina	30 mg

Todas as soluções utilizadas para cultivo e manutenção das culturas de cardiomiócitos foram esterilizadas em membrana Millipore 0,22 μm .

3.4. Preparação de culturas primárias de cardiomiócitos de ratos neonatos

O protocolo de extração dos cardiomiócitos foi cedido pelo Prof. Dr. Eduardo M. Krieger (InCor – HC. FMUSP).

A metodologia utilizada para preparação de culturas primárias de cardiomiócitos (Fig.6) foi reformulada para aperfeiçoar o processo de extração e obtenção.

Foram usados ratos neonatos de dois dias de idade da linhagem *Sprague Dawley* (SD) (Fig.4).

Os ratos neonatos foram esterilizados com algodão embebido em álcool 70%, decapitados e, em seguida, foram extraídos os ventrículos. Imediatamente após foram dispostos em solução tampão ADS 1X (Tab.3) e divididos em dois ou três fragmentos que foram colocados em um tubo para centrífuga de 50 mL contendo 6 mL de tampão de digestão.

A primeira digestão foi usada para lavar o restante de sangue da amostra, por isso a mesma teve a duração de apenas 10 minutos em banho maria à 37°C sob agitação de aproximadamente 200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e em seguida foram adicionados outros 6 mL do tampão de digestão (Tab.9). O tubo foi agitado por 20 minutos em banho maria à 37° sob agitação. O sobrenadante foi transferido para outro tubo para centrífuga de 15 mL contendo 1 mL de soro fetal bovino, este, usado para bloquear a reação de digestão.

A cada ciclo de digestão foi realizada a transferência do sobrenadante para um novo tubo com soro fetal bovino, este procedimento de digestão foi realizado por quatro vezes após a lavagem da amostra.

Após os ciclos de digestão centrifugaram-se os tubos que continham o sobrenadante e o soro fetal bovino a 1020 rpm por 10 minutos para precipitação. Em seguida, descartou-se o sobrenadante da centrifugação e ao precipitado foi adicionado 2 mL de meio de cultura (Tab.5) para homogeneização, e cada poço da placa foi preenchido com 2 mL da mistura. Esse homogenato foi transferido para uma placa de cultura e incubado.

As células foram utilizadas para experimentos após 48 horas de incubação em estufa 5% de CO₂ a 37°C.

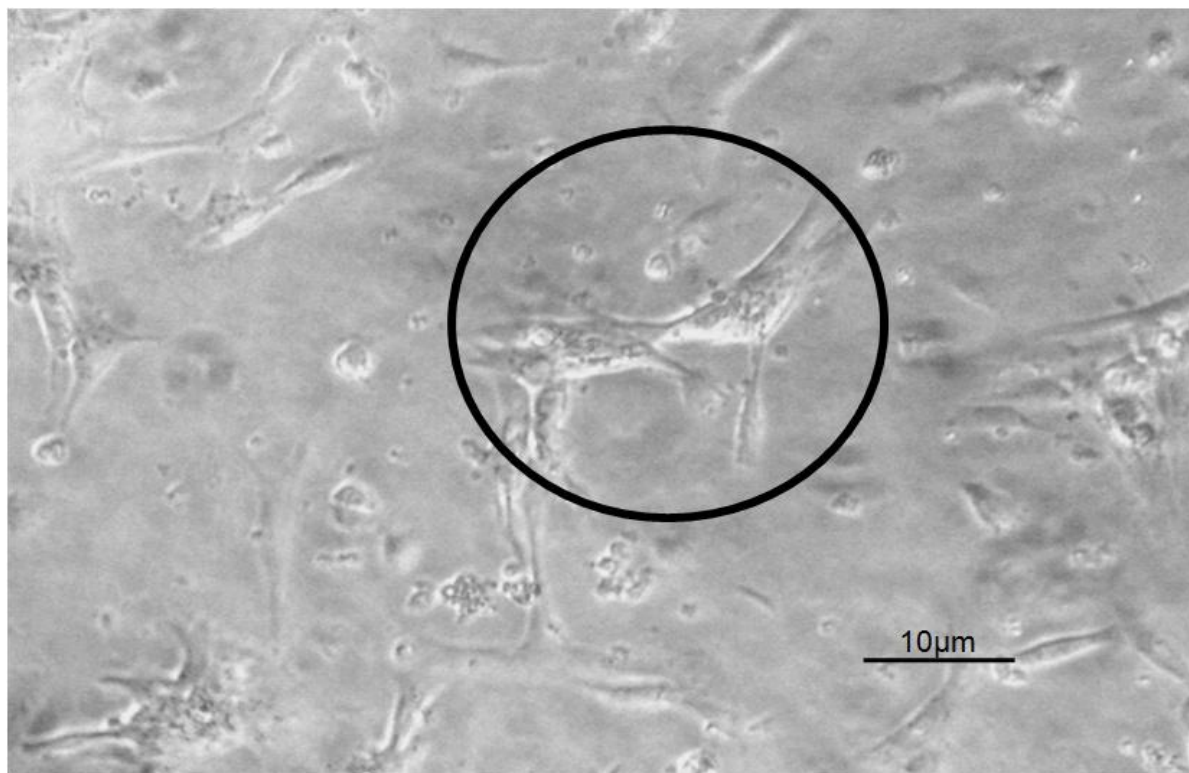


Figura 6: Foto de cardiomiócitos tiradas por máquina digital em microscópio invertido modelo Telaval 31, fabricante Carl Zeiss, em aumento de 100x.

3.5. Determinação da hipertrofia dos cardiomiócitos

3.5.1. Análise de área superficial

Inicialmente utilizamos o método por análise de área celular superficial para calcular a hipertrofia, adaptado de Oberleithner et al. (2004). Os ensaios eram realizados a partir de células ressuspendidas em meio normal, com aldosterona (Sigma aldrich, cat. A9477), com espironolactona (Sigma aldrich, cat. S3378) e com aldosterona e espironolactona. Antes da ressuspensão, o meio era colocado em câmara Neubauer e as células eram contadas. Foi usado o equivalente a $2,4 \times 10^5$ células por mL. Após contagem e ressuspensão, distribuíram-se 2 mL de cada meio, contendo as células, em lamínulas que foram previamente autoclavadas em placas de petri e tratadas com gelatina, para uma melhor adesão das células. Após incubação de 48 horas, que foi o tempo ótimo determinado por diversas observações, as lamínulas foram transferidas para lâminas e coradas com o kit de Panótico Rápido.

Após a obtenção das células, foram realizados ensaios para determinação da hipertrofia, com o uso de aldosterona. As concentrações ótimas para esse ensaio foram estabelecidas como sendo as de 10^{-7} M para a aldosterona e 10^{-6} M para espironolactona, de acordo com Pitt e colaboradores (1999). Posteriormente, as lâminas foram fotografadas por câmara acoplada a microscópio e computador e as células tiveram sua área medida e calculada pelo programa gratuito Scion Image (www.scioncorp.com).

3.5.2. Análise da concentração de ANP intracelular

Posteriormente, foi realizado um ensaio de análise da concentração de ANP (Peptídeo Atrial Natriurético) intracelular. Este ensaio foi realizado com o uso de Kits por ELISA (ANP- Rat, Mouse - EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals EK-005-24) onde, após o preparo das culturas, por métodos mencionados anteriormente, as células foram soltas da placa com o uso de triple Express (Invitrogen) que é um tipo de tripsina sintética, e ressuspendidas em meio de cultura normal.

Utilizamos este tipo de ensaio ao invés de continuarmos com a metodologia de medida celular, por ser mais sensível, ter maior acurácia e ser mais simples de ser executado. Na placa de ensaio, foi adicionado às células a aldosterona em diferentes concentrações (10^{-5}M , 10^{-6}M , 10^{-7}M), para saber se a concentração ótima de aldosterona usada para promover a maior hipertrofia dos cardiomiócitos nessas condições era realmente a de 10^{-7}M .

Como o ANP é um peptídeo liberado pelas células musculares atriais quando estas sofrem algum tipo de estiramento, pôde-se determinar exatamente qual a concentração de aldosterona que promoveu a melhor resposta hipertrófica dos cardiomiócitos, pois onde houve maior concentração de ANP intracelular corresponde também à maior resposta hipertrófica gerada pela aldosterona. O ensaio foi realizado seguindo o protocolo do kit.

Os componentes do kit foram mantidos em temperatura ambiente (25-45 minutos) antes de iniciar o ensaio. Todos os reagentes, dentre eles soluções, anticorpos e peptídeos foram preparados imediatamente antes do uso, como sugerido pelo fabricante do kit. O peptídeo padrão (Tab.10) foi preparado para obtermos a curva padrão nas seguintes concentrações:

Tabela 10: Diluição do peptídeo padrão - ANP.

Concentrações do peptídeo padrão:			
Padrão	Volume do padrão	Tampão de ensaio (1X)	Concentração
	Estoque 1000µl	----	1,000ng/ml
#1	100µl of stock	900µl	100ng/ml
#2	100µl of #1	900µl	10ng/ml
#3	100µl of #2	900µl	1ng/ml
#4	100µl of #3	900µl	0.1ng/ml
#5	100µl of #4	900µl	0.01ng/ml

Para a montagem na placa os poços A-1 e A-2 permaneceram vazios, correspondendo ao branco. Foram adicionados 50 µL de tampão de ensaio 1x nos poços B-1 e B-2, total *binding*. Foram adicionados também 50µL dos peptídeos padrão preparados a partir de # 5 para # 1 (em sentido inverso de diluição seriada), (Tab.10) nos poços de C-1 e C-2 ao G-1 e G-2, respectivamente. Sempre em duplicata, e 50µL do controle positivo reidratado nos poços H-1 e H-2. Os controles positivos também foram aplicados em duplicata. Em triplicata, 50µL das amostras preparadas foram distribuídas de acordo com o ensaio em seus poços designados. Em seguida, 25µL do anticorpo primário reidratado foi administrado em todos os poços, exceto no branco. Imediatamente após foram adicionados 25 µL do peptídeo biotinilado reidratado em todos os poços, exceto no branco. É importante ressaltar que nenhuma das soluções foi pipetada com pipeta multicanal.

A imunoplaca foi selada com selo de acetato (APS) e incubada por 2 horas em temperatura ambiente (20-23 °C), sob agitação 300-400 rpm durante toda a incubação. Após o tempo de incubação o selo de APS foi removido da imunoplaca. O conteúdo dos poços foi descartado virando a placa firmemente. Cada poço foi lavado com 350µL de tampão de ensaio 1X, sendo o tampão foi eliminado em seguida. Este processo foi repetido por 4 vezes. Após a lavagem da placa foram adicionados 100 µL de solução SA-HRP em cada poço. A imunoplaca foi selada novamente com APS. E incubada durante 1 hora em temperatura ambiente (20-23 °C), sob agitação orbital, 300-400 rpm. O selo de APS foi removido da imunoplaca. O procedimento de lavagem foi realizado como descrito anteriormente, também por quatro vezes. Logo após foram adicionados 100 µL da solução do substrato TMB fornecidos pelo kit em cada poço. A imunoplaca foi selada com selo APS e coberta com papel alumínio para evitar contato com a luz. Imediatamente após, colocado no agitador orbital 300-400 rpm por uma hora, o selo de APS foi removido da imunoplaca e foi adicionado 100 µL HCl 2M em todos os poços para paralisar a reação. A cor do poço mudou de azul para amarelo. Para que a mudança fosse uniforme, batemos suavemente na placa para assegurar uma mistura completa. A leitura foi realizada imediatamente e foi procedida em leitor ELISA com absorbância O.D. a 450nm.

3.6. Determinação da participação do segundo mensageiro AMPc

As culturas primárias de cardiomiócitos foram mantidas na presença ou não de espironolactona [10^{-6} M], pré-incubadas ou não com o bloqueador de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM (MOLECULAR PROBE) [10^{-5} M] e estimuladas pela presença de aldosterona [10^{-7} M].

Usamos o quelante de Ca^{2+} intracelular, BAPTA-AM, para bloquear o Ca^{2+} oriundo da via dependente de proteína Gq e analisarmos se o AMPc liberado pela via dependente de proteína Gs está sendo gerado por uma adenilil ciclase ativada por esse íon.

A concentração de AMPc foi determinada com o uso de kits AMERSHAM (ensaio imunoenzimático de competição AMPc Biotrak EIA System, code: RPN225). As soluções usadas, a composição e organização da placa foram realizadas segundo o manual do kit, assim como os cálculos realizados para se chegar às concentrações de AMPc.

Antes do uso do kit foram preparados oito tratamentos, aos quais os cardiomiócitos seriam submetidos. São eles: controle, aldosterona [10^{-7} M], BAPTA-AM [10^{-5} M] e BAPTA-AM + Aldosterona, todos na ausência e na presença de espironolactona [10^{-6} M].

Em cada tratamento foi adicionado IBMX [10^{-4} M], um inibidor de fosfodiesterase, o qual degrada AMPc.

Os componentes do kit foram mantidos em temperatura ambiente (25-45 minutos) antes de iniciar o ensaio. Todos os reagentes, dentre eles soluções, anticorpos e peptídeos foram preparados imediatamente antes do uso, como sugerido pelo fabricante do kit.

3.7. Determinação do segundo mensageiro Ca^{2+}

Após o cultivo das células, metade da placa de cultura era mantida na presença de espironolactona [10^{-6}M] por 48 horas.

As células eram então soltas com triplex e transferidas para dois tubos para centrífuga de 15 mL. Logo em seguida, a placa era lavada três vezes com ADS 1X. Os tubos de 15 mL eram, então, centrifugados a 1020 rpm por dois minutos. As células eram ressuspensas em ADS 1X e transferidas para seis tubos para microcentrífuga:

- 1- Controle negativo: somente as células
- 2- Controle positivo: células e sonda
- 3- Células tratadas com espironolactona [10^{-6}M]
- 4- Células tratadas com aldosterona [10^{-7}M]
- 5- Células tratadas com espironolactona [10^{-6}M] e aldosterona [10^{-7}M]
- 6- Células tratadas com tapsigargina [10^{-6}M]

A sonda usada foi o FLUO4-AM (Indicador de alta afinidade de cálcio, Sigma Aldrich cat. F-14201), cujo volume de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ era colocado nos tubos para microcentrífuga, com exceção do controle negativo. Esses tubos eram colocados no banho Maria por 30 minutos e em seguida, centrifugados a 1000 rpm/2'. As células eram então ressuspensas em 1,5mL de ADS 1x e transferidas para tubos de leitura.

A aldosterona foi adicionada somente no momento da leitura.

Para controle da quantidade de cálcio intracelular foi usado Tapsigargina [10^{-6}M], por ser responsável pela depleção dos estoques de cálcio intracelulares.

3.8. Determinação da participação da AKAP

Com o objetivo de determinar a presença de AKAP no processo hipertrófico foi realizado um ensaio de hipertrofia por concentração de ANP intracelular.

Para tanto as células receberam os seguintes tratamentos:

- 1- Controle
- 2- Aldosterona [10^{-7} M]
- 3- Aldosterona [10^{-7} M] e inibidor de AKAP (ST-Ht31) [10^{-6} M]
- 4- Espironolactona [10^{-6} M]
- 5- Espironolactona [10^{-6} M] e aldosterona [10^{-7} M]
- 6- Espironolactona [10^{-6} M], aldosterona [10^{-7} M] e inibidor de AKAP (ST-Ht31) [10^{-6} M]

Logo em seguida, foram submetidas ao ensaio de concentração de ANP intracelular. A organização e a composição da placa foram feitas de acordo com o manual do kit.

3.9. Extração de proteína

Após a realização da cultura, com 48h de crescimento, o meio de cultura foi sugado da placa e foram colocados novos meios com os tratamentos desejados.

- 1- Controle: somente as células
- 2- Células tratadas com aldosterona [10^{-7} M]
- 3- Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M]
- 4- Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M] e aldosterona [10^{-7} M]

O tratamento com espironolactona foi de 24 horas, o tratamento com aldosterona foi de 1 hora.

Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina de ADS. Os lisados celulares foram preparados com PhosphoSafe Extraction Buffer (NOVAGEN), um tampão de lise específico para *Western Blot* (WB) de proteínas fosforiladas. No momento do ensaio foi adicionada uma mistura de inibidores de protease (ROCHE APPLIED SCIENCE) a este tampão de lise. As amostras foram estocadas a -80°C .

3.10. Gel

Utilizamos o mini gel NUPAGE NOVEX 10% BIS-TRIS GEL 1.0 MM (NP0303B), e todos os tampões do kit necessários ao processo, da marca Invitrogen.

3.11. Western blot

Para os ensaios de *Western blot* utilizamos o kit *Western Breeze* (INVITROGEN, catálogo número WB7103) que detecta as proteínas imobilizadas em uma membrana de polivinilidina difluoridro (PVDF) através de reação colorimétrica com a fosfatase alcalina acoplada ao anticorpo secundário. As análises de *OD* das membranas foram realizadas dividindo a densitometria da banda em questão pela densitometria da β -actina.

3.11.1. Verificação da ativação de ERK5

Utilizando-se o anticorpo na concentração de 1:1000 contra *ERK5 fosforilada de rato Phospho-ERK5 ([Thr218/Tyr220] Antibody #3371 [CELL SIGNALING TECHNOLOGY])* *Western blots* foram executados em células mantidas ou não na presença de espironolactona, tratadas ou não por períodos de 1 hora com aldosterona.

3.11.2. Verificação da ativação de substratos fosforilados por PKC

Utilizando-se o anticorpo na concentração de 1:1000 contra *Phospho-(Ser) PKC Substrate Antibody [CELL SIGNALING TECHNOLOGY]* os *western blots* foram executados em células mantidas ou não na presença de espironolactona, tratadas ou não com aldosterona por períodos de 1 hora.

3.11.3. Verificação da ativação de β -Actin

Utilizando-se o anticorpo na concentração de 1:1000 contra β -Actin [CELL SIGNALING TECHNOLOGY] como normalizador, os *western blots* foram executados em células mantidas ou não na presença de espironolactona, tratadas ou não com aldosterona por períodos de 1 hora.

3.12. Análises estatísticas

A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se ANOVA “One-way” seguido do teste de Kruska-Wallis. Estas análises foram realizadas no *software* Graphpad Prism Project (versão 5.0). Foram consideradas diferenças significativas para $p \leq 0.05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da hipertrofia dos cardiomiócitos

4.1.1. Método de análise de área superficial

Determinação de hipertrofia por área celular

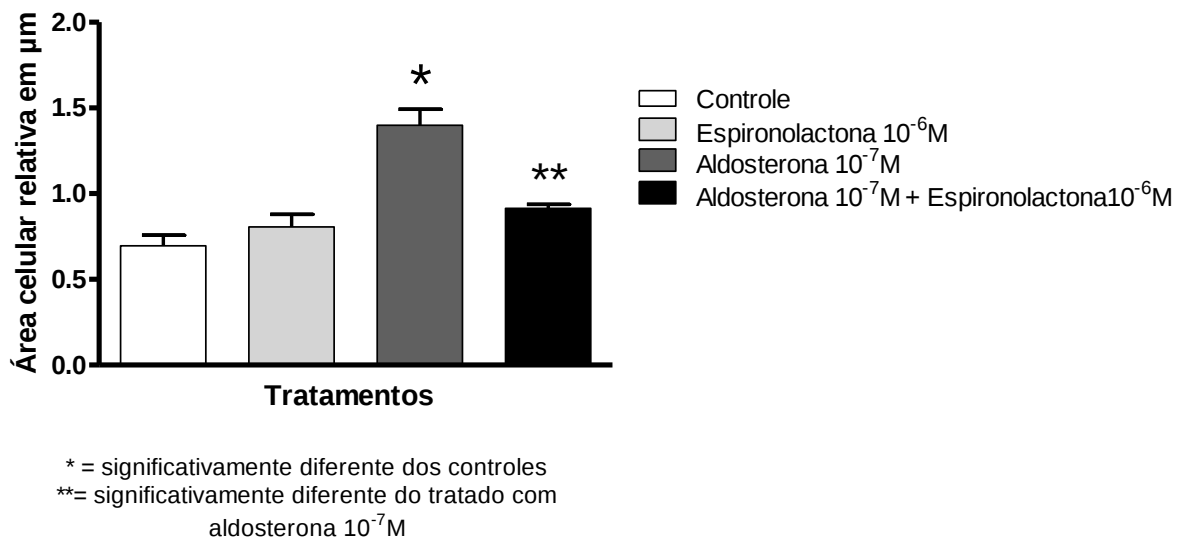


Figura 7: Gráfico do ensaio de hipertrofia de cardiomiócitos ventriculares de ratos neonatos, tratados com meio controle; meio com espironolactona [10^{-6}M]; meio com aldosterona [10^{-7}M]; meio com aldosterona [10^{-7}M] e espironolactona [10^{-6}M]. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

Através da medida da área superficial dos cardiomiócitos (Fig.7) nos diversos tratamentos, foi possível perceber diferenças significativas das áreas das células tratadas com aldosterona e aldosterona + espironolactona. As células tratadas com aldosterona mostraram um aumento de aproximadamente 95% em relação ao grupo controle. As células tratadas com aldosterona + espironolactona, também tiveram suas áreas aumentadas, porém em índices menores e significativamente diferentes dos tratados somente com aldosterona.

4.1.2. Método de análise de concentração de ANP intracelular

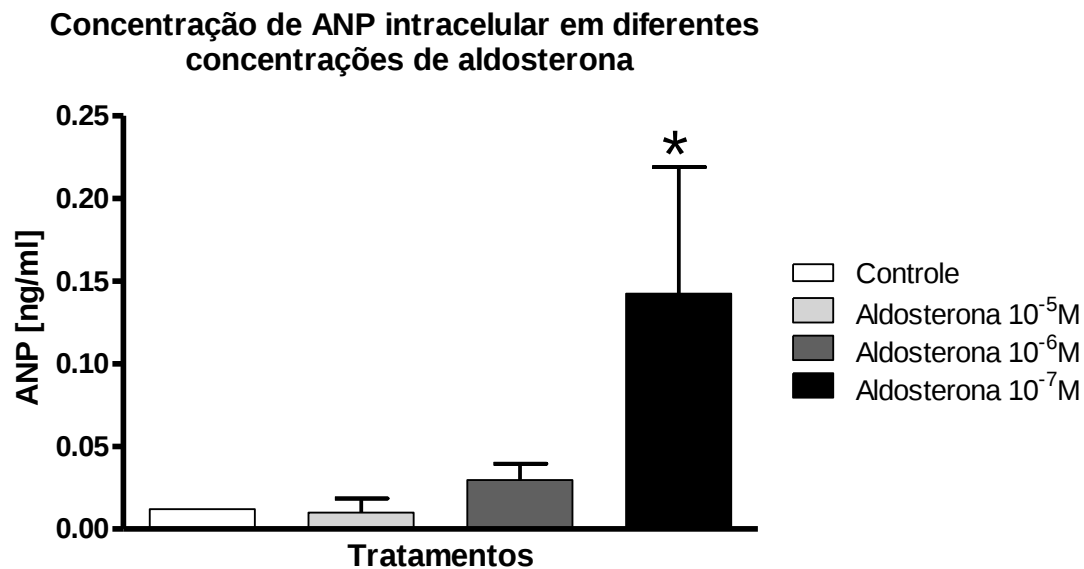


Figura 8: Gráfico de [ANP] intracelular por concentração de aldosterona, $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

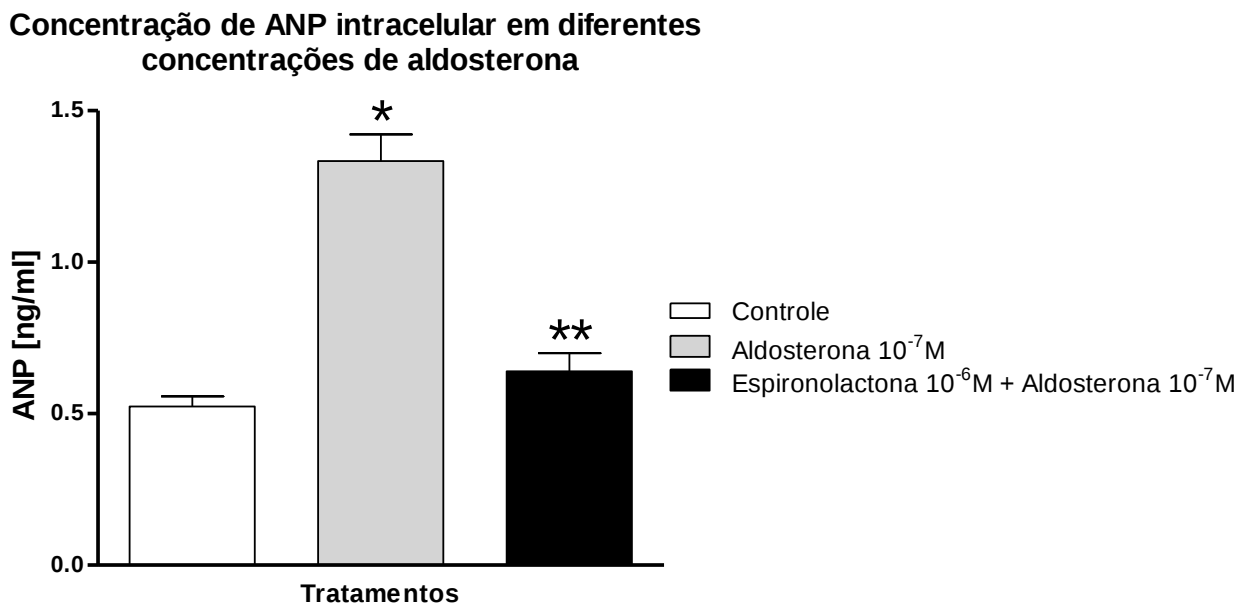


Figura 9: Gráfico de [ANP] intracelular tratado com aldosterona e aldosterona [10^{-7} M] e espironolactona [10^{-6} M] comprovando o impedimento da hipertrofia, $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

Realizamos o ensaio de ANP (Fig.8) com diferentes concentrações de aldosterona, para verificar se o teste era sensível nestas condições e a este hormônio, e qual seria a concentração de aldosterona que levaria as células à maior resposta hipertrófica nessas condições. Através do resultado desse ensaio foi possível perceber que a concentração ótima de ação da aldosterona (Fig.9) para promover uma resposta hipertrófica máxima nos cardiomiócitos nesse tipo de cultura e nessas condições foi a concentração 10^{-7} M, onde podemos verificar maior liberação de ANP pelas células cardíacas, devido à distensão das mesmas.

4.2. Determinação da participação do segundo mensageiro AMPc

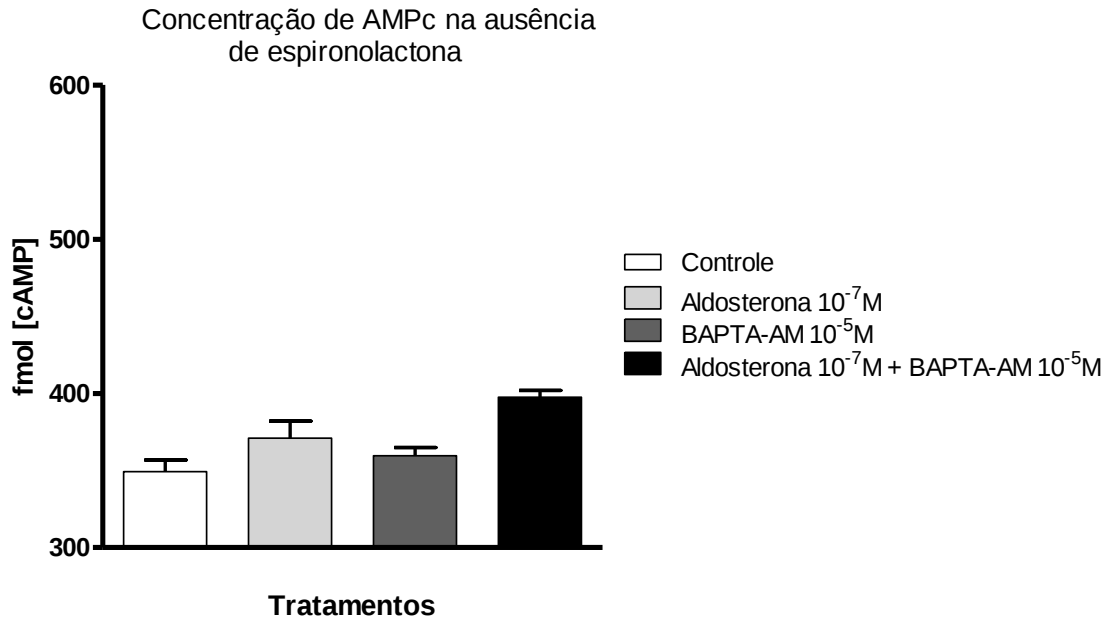
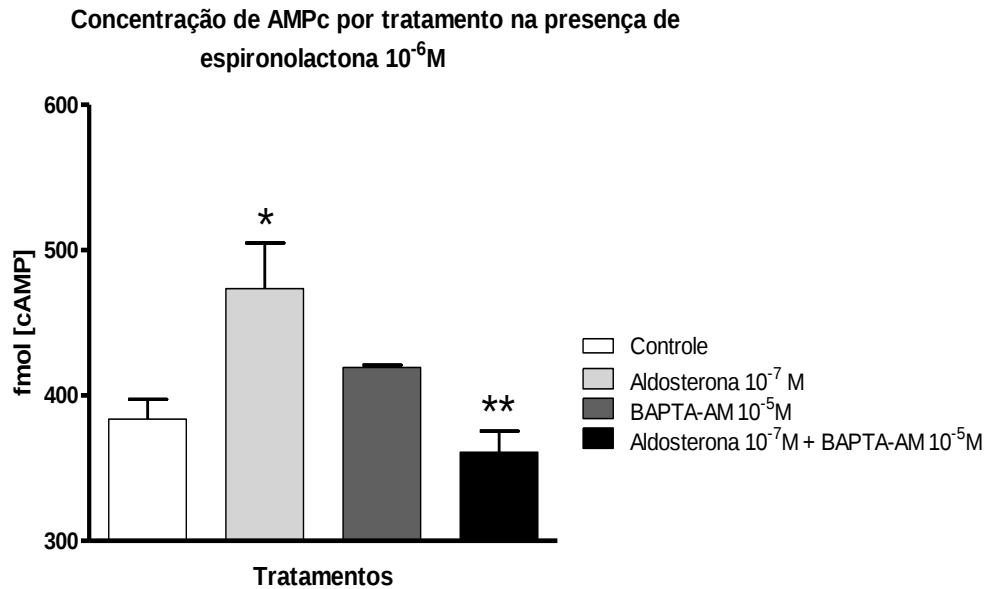


Figura 10: Gráfico da concentração de AMPc (fmol) por tratamento sem espironolactona. Obtidos de cardiomiócitos pré-incubados com BAPTA-AM [10^{-5} M], estimulados com aldosterona [10^{-7} M]. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.



* = significativamente diferente do controle, $p < 0,05$.

** = significativamente do tratado com aldosterona, $p < 0,05$.

Figura 11: Gráfico da concentração de AMPc (fmol) por tratamento na presença de espironolactona. Obtidos de cardiomiócitos pré-incubados com BAPTA-AM [10^{-5} M], estimulados com aldosterona [10^{-7} M].

Através da comparação entre os grupos controle tratados (Fig.11) ou não espironolactona (Fig.10), é possível perceber que os níveis basais de AMPc são maiores quando essa substância está presente. As concentrações de AMPc nos ensaios foi maior nas culturas onde não havia o receptor, devido à ação antagonista da espironolactona (fig.11). Cardiomiócitos tratados com o antagonista do receptor clássico da aldosterona tornam-se mais responsivos à via direta da aldosterona.

4.3. Determinação da participação do segundo mensageiro Ca^{2+}

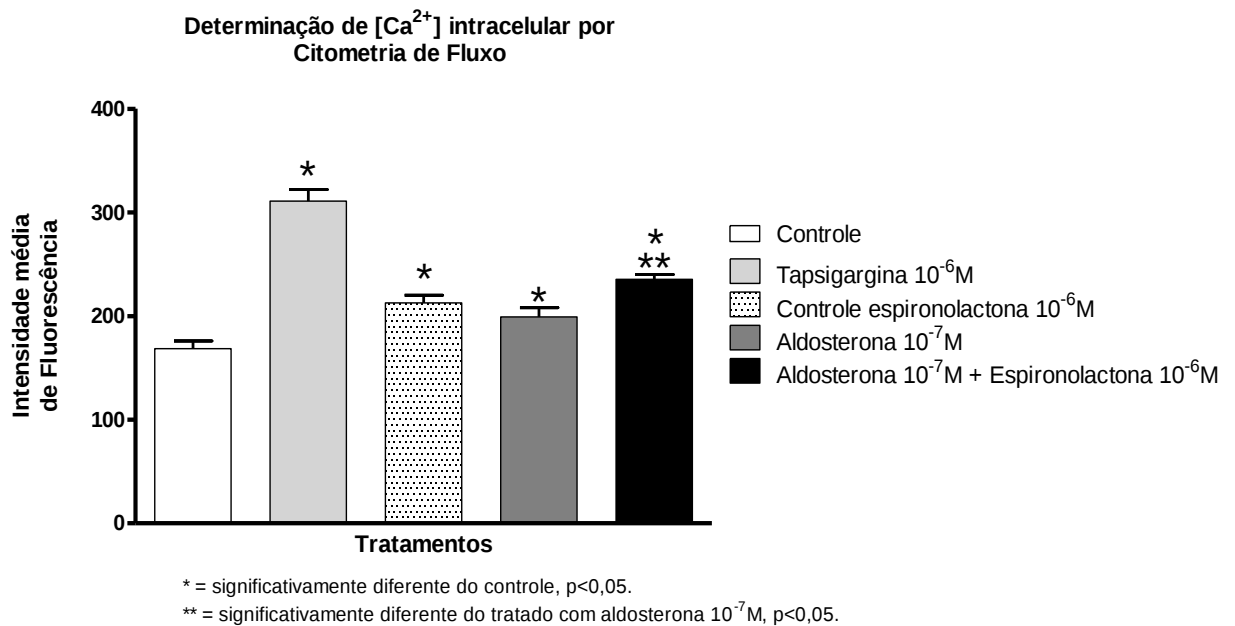


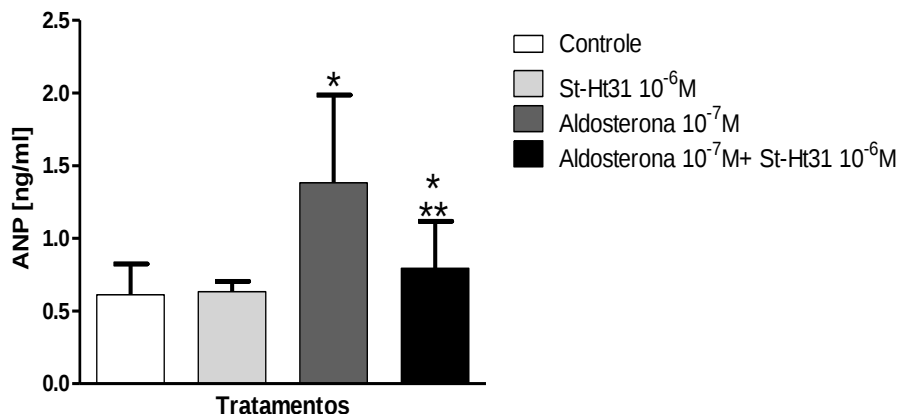
Figura 12: Gráfico de intensidade média de fluorescência (concentração de Ca^{2+}) por tratamento. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

A concentração intracelular de Ca^{2+} é maior na presença do antagonista do receptor mineralocorticoide (Fig12). Onde o receptor está presente e é estimulado com o hormônio aldosterona, a concentração intracelular de Ca^{2+} é maior que controle.

O grupo tratado com tapsigargina foi usado como controle positivo para a presença de cálcio, pois essa substância é responsável por promover a depleção dos estoques intracelulares de cálcio.

4.4. Determinação da participação de AKAP

[ANP] em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos SD na ausência de espironolactona 10^{-6} M



* = significativamente diferente do controle, $p < 0,05$.

** = significativamente diferente do tratado com aldosterona 10^{-7} M, $p < 0,05$.

Figura 13: Gráfico de [ANP] intracelular sem o tratamento com o inibidor do receptor MR. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

[ANP] em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos SD na presença de espironolactona 10^{-6} M

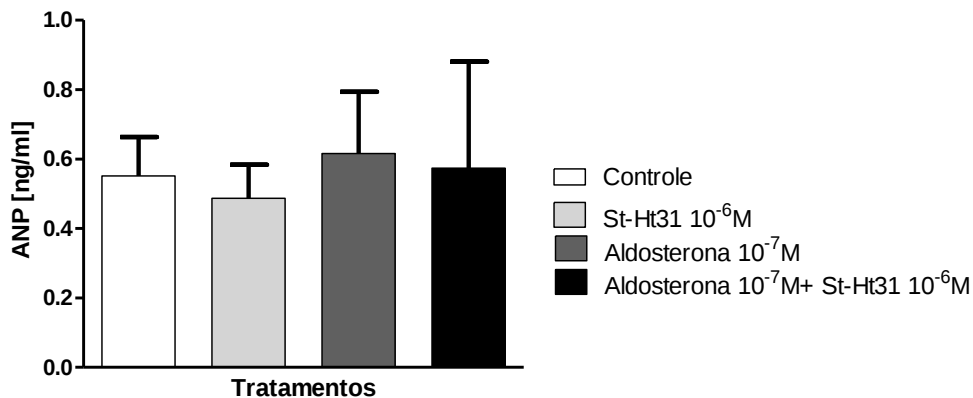


Figura 14: Gráfico de [ANP] intracelular com o tratamento com o inibidor do receptor MR. $p \leq 0,05$. Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8.

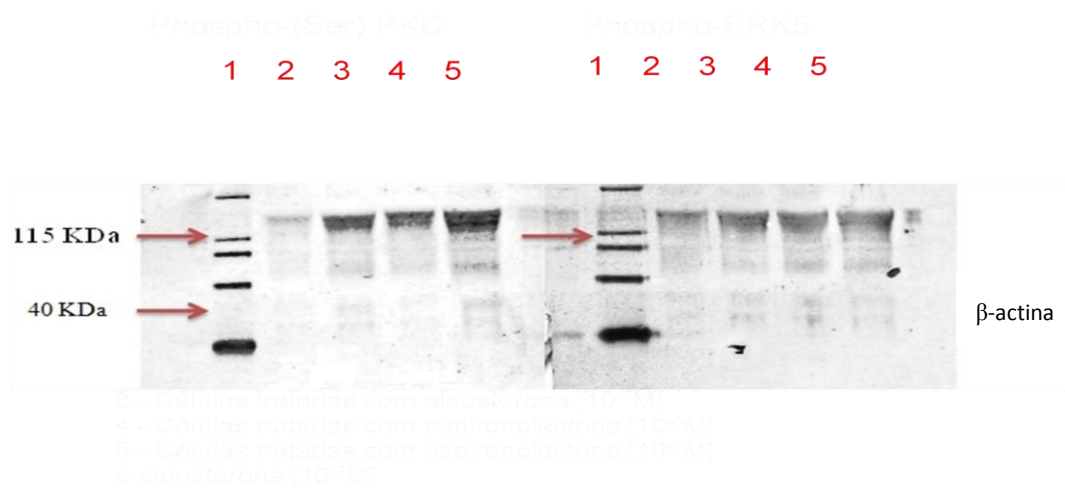
As concentrações de ANP são maiores em células tratadas somente com aldosterona em relação ao controle (Fig13), mostrando que há um processo hipertrófico. Nas células tratadas com aldosterona e inibidor de AKAP (Fig14) a concentração de ANP é menor que a encontrada nas células tratadas somente com aldosterona.

4.5. Determinação da participação de ERK5 e substrato fosforilado por PKC

O resultado obtido no *western blotting* foi muito claro, quando utilizamos o anticorpo contra Phospho-ERK5 ([Thr218/Tyr220], percebemos uma banda de 115KDa (Fig.15.1B), e quando utilizamos o anticorpo contra substrato fosforilado por PKC (Fig.15.1A), encontramos a mesma banda de 115KDa, o que nos mostra que ERK5 foi fosforilada por PKC.

1A)

1B)



2A)

2B)

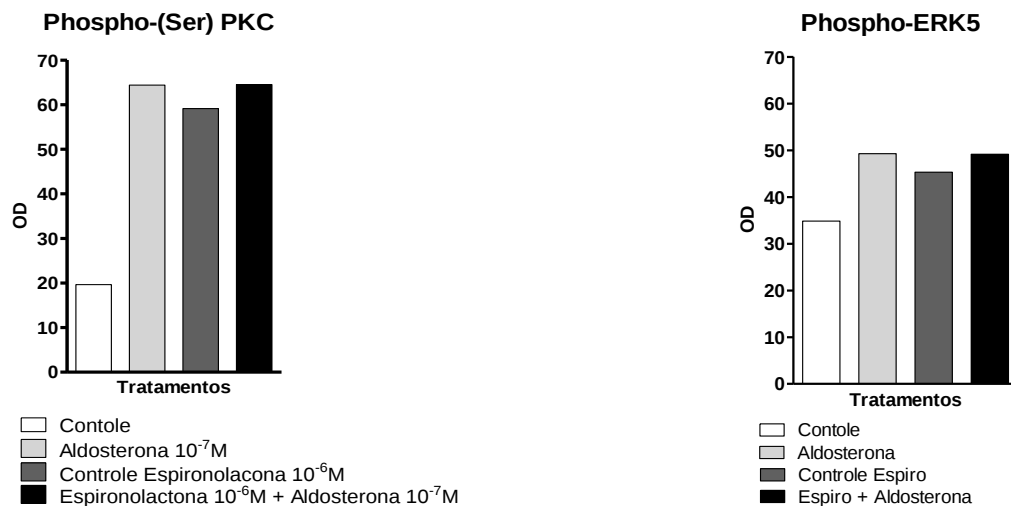


Figura 15: Análise por Western blotting e gráficos de densitometria ótica (OD) de proteínas extraídas de células primárias de cardiomiócitos e tratadas com os anticorpos contra substrato fosforilado por PKC (1A e 2A) e ERK5 fosforilada (1B e 2B). Todos os ensaios possuem número amostral igual a 8. 1) Padrão de peso molecular; 2) Controle: somente as células; 3) Células tratadas com aldosterona [10^{-7} M]; 4) Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M]; 5) Células tratadas com espironolactona [10^{-6} M] e aldosterona [10^{-7} M].

Ficou evidenciado que o tratamento dos cardiomiócitos com aldosterona leva a fosforilação da ERK5 que passa então para a forma ativa (ERK5 fosforilada). Uma forte evidência de que esta fosforilação ocorre de forma direta por uma PKC encontra-se no fato de que em nosso *WB* onde foi utilizado um anticorpo contra substratos fosforilados por PKC encontrou-se uma banda com o exato peso molecular encontrado no ensaio feito para a Phospho-ERK5 (115KDa). Outro indício que nos leva a crer que realmente a hipertrofia causada pela via direta da aldosterona é orquestrada pela mAKAP, e envolve a ERK5 que está intimamente ligada a este complexo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A hipótese de que possa haver uma conversa cruzada entre as vias não genômica e genômica promovidas pela aldosterona tornou-se relevante a partir de 2009, com a publicação do artigo “*New aspects of rapid aldosterone signaling*” de Grossmann e Gekle, onde os autores demonstraram haver indícios de um “*cross talking*” entre essas vias.

Apesar disso, Grossmann e Gekle (2009) defenderam a idéia de que haja um sinergismo entre as vias. Nossos dados discutidos aqui, no entanto, apontam para um *feedback* negativo entre as vias.

A resposta à via genômica da aldosterona envolve dimerização do receptor mineralocorticoide (MR), dissociação das proteínas de choque térmico (pertencentes a uma classe de chaperonas moleculares, as quais são proteínas responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação protéica) do MR, Yang et al. (2010); Dooley et al. (2011) e a translocação do complexo aldosterona-MR para o núcleo e a concomitante regulação da expressão gênica.

As respostas rápidas à aldosterona, por outro lado, ocorrem em menor tempo e não envolvem transcrição ou tradução, porém, estão associadas à ativação da fosfolipase C (PLC) e subsequente hidrólise de fosfolípidios de membrana. Esta hidrólise de fosfolípidios libera DAG e IP₃ que, por sua vez, ativam a proteína quinase C (PKC) e liberam Ca²⁺ do retículo, respectivamente, Grossmann e Gekle (2009), também temos indícios da participação do AMPc nessa via Haseroth et al. (1999).

Partindo da premissa de que ambas as vias se comunicam e tentando entender esse “*cross talking*” capaz de levar os cardiomiócitos a hipertrofia, decidimos verificar a participação do AMPc neste modelo. Tratando as células em condições que levam as mesmas a hipertrofia e mimetizar a ausência do receptor MR pela presença de espironolactona.

Em condições normais, sem antagonista, verificamos que a aldosterona é incapaz de modular a produção de AMPc (Fig.10). No entanto, na presença de espironolactona, aldosterona promoveu aumento deste segundo mensageiro, quando comparado ao seu

respectivo controle (Fig.11). Além disso, os níveis basais de AMPc nas células tratadas com esse antagonista apresentavam-se maiores.

Segundo Dodge-Kafka (2005), uma das situações que podem induzir uma resposta hipertrófica nos cardiomiócitos, são as baixas concentrações de AMPc. Sendo assim, podemos inferir que um dos mecanismos de proteção da espironolactona pode ser também, o aumento dos níveis de AMPc e consequentemente, menor resposta hipertrófica gerada pela aldosterona nas células que receberam o tratamento com o antagonista, considerando a responsividade fornecida pela espironolactona e conhecendo-se as características cardioprotetoras desse antagonista (aumento da sobrevida e retardamento da progressão da insuficiência cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca sintomática, retardamento do desenvolvimento de insuficiência cardíaca sintomática em pacientes assintomáticos com disfunção ventricular esquerda e na prevenção de eventos isquêmicos coronarianos em pacientes com disfunção ventricular esquerda, especificamente na redução da incidência de infarto do miocárdio e de hospitalização por angina instável), Nagata (2002); Kuster, (2005).

Outro segundo mensageiro estudado em respostas hipertróficas é o Ca^{2+} , que já é conhecido como um transmissor crucial nessa sinalização, Frey e Olson (2003); Bauman et al. (2007) via acoplamento-excitação-contração, Bers (2002) com a estimulação da transcrição de genes responsáveis pela hipertrofia, Heineke et al. (2006). Embora os maiores fluxos de Ca^{2+} facilitem uma maior contração do miócito durante a hipertrofia adaptativa, esses fluxos são diminuídos durante a insuficiência cardíaca e, assim, contribuindo para diminuição do débito cardíaco, Heineke et al. (2006).

Os níveis aumentados de Ca^{2+} intracelular encontrados nos ensaios, em células que receberam tratamento com o antagonista da aldosterona, somados a outros dados já obtidos por nosso laboratório, onde se tem um aumento do segundo mensageiro AMPc nessas mesmas condições, confirmam o que foi descrito por Haseroth et al. (1999), onde os níveis destes segundos mensageiros mostraram-se elevados em camundongos nocautes para o receptor MR, estimulados com aldosterona 10^{-7}M e comprovando, assim, que os efeitos rápidos da aldosterona envolvem um receptor distinto do clássico MR (Fig.12).

Adicionalmente, um estudo realizado em células de rim de macaco (MDCK) mostrou que o efeito rápido da aldosterona é responsável por causar uma acidificação

transiente seguida por uma alcalinização significativa nessas células, Gekle et al. (1996); Markos et al. (2005). Isto nos fornece evidências de que a elevação do pH é causada por um rápido aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} pela ativação do trocador de prótons de sódio (NHE), Doolan e Harvey (1996); Oberleithner et al. (1987); Gekle et al. (2001); Markos et al. (2005). Em células MDCK, os pré-requisitos para este processo são dois pontos entrada líquida de Ca^{2+} , a partir do exterior da célula e uma condutância de prótons da membrana plasmática para estimular o NHE, Gekle et al. (1996).

Levando-se em consideração a participação desses segundos mensageiros na via direta da aldosterona, muito se especulou sobre a existência de um receptor diverso para essa via, levantando muitas dúvidas em relação a esse receptor, Grossmann e Gekle (2009).

Estudos iniciais sugerem que os efeitos não genômicos são mediados por um receptor de membrana distintos do clássico MR. Os argumentos a favor deste conceito incluem o aumento do Ca^{2+} e AMPc encontrados em células epiteliais cultivadas a partir de camundongos nocautes MR, Haseroth et al. (1999). Alguns estudos apontam para uma proteína Gq mediando a resposta rápida da aldosterona, Grossmann e Gekle (2009).

Nossos resultados favorecem a idéia de que o mecanismo de ação não genômico da aldosterona seria mediado por um possível receptor de membrana, corroborando com Grossmann e Gekle (2009), apesar de não termos encontrado uma resposta direta da aldosterona com relação ao AMPc, que só aparece na presença de seu antagonista. Segundo esses pesquisadores, esse receptor funcional seria de membrana, o que promoveria uma conversa cruzada entre as vias da proteína G, e as famílias de receptores nucleares de sinalização.

Segundo Le Moellic et al. (2004), a aldosterona, mesmo acoplada a moléculas grandes como BSA e, portanto, incapaz de atravessar a membrana rapidamente, e com o receptor MR bloqueado, suscitou os mesmos efeitos rápidos, favorecendo a hipótese de que o receptor em questão seria um receptor de membrana, visto que a aldosterona não conseguiria atravessar a membrana rapidamente ligada ao BSA. Receptores semelhantes têm sido propostos para outros hormônios esteróides Orshal e Khalil (2004); Zhu et al. (2003). Além disso, ainda existem vários argumentos contra um receptor MR

estruturalmente diferente responsável pelos efeitos não genômicos, Michea et al. (2005), o que fortalece ainda mais, a hipótese de um possível receptor de membrana.

Entretanto, ainda permanece a dúvida de como esse receptor atuaria sobre acoplamentos as proteínas G diferentes, no caso Gs e Gq. Tentando desvendar essa questão, partimos para um ensaio na tentativa de mostrar a participação ou não de uma adenilil ciclase responsiva ao Ca^{2+} , uma vez que este segundo mensageiro era mobilizado na presença de aldosterona.

No presente estudo, células de cardiomiócitos submetidas ao tratamento com BAPTA-AM (éster que sofre esterificação dentro da célula tornando-se um quelante de cálcio intracelular) e estimuladas com aldosterona apresentaram baixas concentrações de AMPc em relação ao controle, confirmando nossa hipótese de que o aumento de Ca^{2+} promovido pela hormônio estimularia uma adenilil ciclase responsiva ao mesmo.

Segundo Wang (2002), há expressão diferencial dos subtipos de adenilil ciclase no sistema cardiovascular humano. Gottle, em 2009, encontrou sete tipos de adenilil ciclase (AC1, AC3, AC4, AC5, AC6, AC7 e AC9) expressas em cardiomiócitos de camundongos. Sabendo-se que algumas dessas isoformas de adenilil ciclase (AC1) são moduladas positivamente pelo Ca^{2+} , Gros et al. (2006) e portanto, sujeitas à modulação pela aldosterona, uma possível explicação para os altos níveis de AMPc encontrados seria de que o Ca^{2+} oriundo da via Gq, ativaria diretamente uma adenilil ciclase e esta estimularia a produção de AMPc.

Outra justificativa que reforça os níveis maiores de AMPc em células tratadas com aldosterona, é que também encontramos níveis robustos de fosforilação da ERK5 em células tratadas com aldosterona, pois a ERK5 fosforilada é responsável por inibir fosfodiesterase que, por sua vez, degrada AMPc, Carnegie (2009).

A regulação da resposta hipertrófica cardíaca pelo complexo da mAKAP, pode ocorrer quando a PKA ancorada pela mAKAP fosforila e ativa a PDE4D3, que também é ancorada pela mAKAP. A estimulação dos receptores promotores gp130/fator inibidor da leucemia (LIF) ativam a via da MEK5 e ERK5 ancoradas a mAKAP regulando negativamente a PDE4D3 através de um caminho ainda desconhecido. Na via não genômica, a ERK5 fosforilada pode inibir PDE4D3, que é sinergicamente aumentada pela PKA na presença de AMPc. Na via genômica, a ERK5 poderia ativar uma cascata de transdução, que induz a transcrição de genes hipertróficos. Finalmente, as altas

concentrações de AMPc irão estimular Epac1 que por sua vez, ativa a GTPase Rap1, que exercem uma efeito inibitório sobre a via ERK5/MEK5, Diviani (2008).

Em 2005, Dodge-Kafka e colaboradores demonstraram que a ativação dessa ERK5, ancorada no complexo coordenado pela mAKAP, induz hipertrofia promovida pela aldosterona em cardiomiócitos. A molécula mAKAP possui sítios de ligação para PKA, fosfodiesterase PDE4D3, Ca^{2+} ativado, receptor do canal rianodina de Ca^{2+} (RyR), fosfatases PP2A e calcineurina (PP2B), MAP quinase de alto peso molecular ERK5, ativador de ERK5/ MEK5, e Epac, um nucleotídeo guanidínico trocador de proteína para Rap ativado por AMPc, Dodge et al. (2001); Dodge-Kafka et al. (2005); Kapiloff et al. (2001); Marx et al. (2000); Pare et al. (2005); Ruehr et al. (2003); Carnegie (2009).

De acordo com Kapiloff (2009), proteínas adaptadoras de quinases A (AKAPs) desempenham um papel importante na compartimentalização da sinalização e ancoragem da proteína quinase A (PKA) específicas de organelas celulares e servindo de estruturas que montam e localizam uma cascata de sinalização. Em miócitos cardíacos, a proteína quinase A AMPc-dependente, coordena cálcio e MAP quinases e é importante para a hipertrofia celular.

Esses complexos de proteínas adaptadoras são mecanismos chave através do qual uma via de sinalização comum pode servir a muitas funções diferentes, como o sequestro de uma enzima de sinalização para um ambiente específico intracelular não só garante que a enzima estará perto de seu respectivo alvo, mas também segrega esta atividade para evitar a fosforilação indiscriminada de outros substratos, Carnegie et al. (2009), o que reforça a nossa hipótese desta molécula ser responsável pela geração da resposta hipertrófica em cardiomiócitos.

Segundo Bauman et al. (2007); Timmermans et al. (1991) e Pare (2005), os níveis elevados de Ca^{2+} são responsáveis pela manutenção dos níveis locais de mAKAP e aumento da atividade de fatores de transcrição promovendo a translocação nuclear e a expressão de genes de hipertrofia. Pare et al. (2005) e Bauman et al. (2007) sugerem que essa identificação da mAKAP como molécula central na sinalização hipertrófica, pode ser um alvo atraente para a invenção terapêutica no tratamento de hipertrofia cardíaca patológica.

Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, a participação da mAKAP no processo hipertrófico gerado pela aldosterona (Fig.13 e 14). Essa AKAP é conhecida por estar localizada no envelope nuclear dos cardiomiócitos, Kapiloff (2009); Bauman et al. (2007). Sua participação ficou comprovada pelo desacoplamento da PKA – mAKAP, em seu sítio específico, através do uso de um inibidor desse acoplamento (St-Ht31), o que levou a uma diminuição da resposta hipertrófica gerada pela célula.

Ficou evidenciado, que o tratamento dos cardiomiócitos com aldosterona leva a fosforilação da ERK5 que passa então para a forma ativa (ERK5 fosforilada). Uma forte evidência de que esta fosforilação ocorre de forma direta por uma PKC, Geng et al. (2009); Zhao et al. (2010); Nigro et al. (2010) encontra-se no fato de que em nosso WB onde foi utilizado um anticorpo contra substratos fosforilados por PKC encontrou-se uma banda com o exato peso molecular encontrado no ensaio feito para a Phospho-ERK5 (115KDa), (Fig.15). Outro indício que nos leva a crer que realmente a hipertrofia causada pela via direta da aldosterona é orquestrada pela mAKAP, e envolve a ERK5 que está intimamente ligada a este complexo, segundo Dodge-Kafka et al. (2005).

Estudos revelaram que há pelo menos doze isoformas diferentes de PKC e que elas produzem uma variedade de respostas celulares dependendo da atividade da isoforma e do contexto fisiológico, Zhao (2010). No tecido cardíaco, as isoformas expressas de PKC variam de acordo com a espécie, tipo celular e estágio de desenvolvimento, sendo que em miocárdio de mamíferos adultos estão expressas PKC α , β 1, β 2, δ , ϵ , e λ/ζ , Bowling (1999); Sabri (2003). A isoforma que é mais bem caracterizada em hipertrofia cardíaca é a PKC ϵ , que é ativada em resposta a estímulos hipertróficos em miócitos e *in vivo*, Chen et al. (2001), a super expressão e ativação da PKC ϵ é resultado da hipertrofia miocárdica, Takeishi et al. (2000), o que nos leva a sugerir que a fosforilação da ERK5 ocorre mais precisamente pela PKC ϵ .

A família PKC tem sido classificada, atualmente, em quatro grupos sendo eles: *Clássicas* – α , β 1, β 2 e γ que são ativadas por Ca^{2+} , fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) ou éster de forbol; *não clássicas* – δ , ϵ , η , μ , Θ , as quais são ativadas por PS e DAG ou éster de forbol, mas são independentes de Ca^{2+} ; *atípicas* – ι , ξ e λ que são Ca^{2+} independentes e insensíveis a DAG e a éster de forbol, mas são ativadas por PS; e *PRKs* – semelhantes às atípicas, são insensíveis a Ca^{2+} , DAG e a éster de forbol, sendo ativadas pelas proteínas G monoméricas, Rho, Isoldi et al. (2003).

Considerando-se esses grupos da família PKC, as PKC ϵ são caracterizadas como sendo não clássicas, podendo ser ativada por DAG. Mais recentemente, Zhao et al. (2010), demonstraram que a fosforilação da PKC ϵ também é estimulada pela via de sinalização dependente do receptor AT1 da angiotensina II levando a ERK5 também a seu estado fosforilado. Somando isso ao fato de que, segundo Robert et al. (1999), um efeito conhecido da aldosterona no coração, é o aumento do número de receptores de angiotensina II (AT1) nas células cardíacas, podemos suportar a evidência de que essa fosforilação da ERK5 é fornecida de forma direta pela PKC ϵ .

Em resumo, a via de sinalização não genômica da aldosterona consiste em uma intrínseca rede de cascatas de sinalização que, geralmente, envolvem componentes semelhantes aos componentes da cascata da via genômica, Grossmann e Gekle (2009). Em órgãos-alvos clássicos, como rim e cólon, efeitos rápidos da aldosterona tem demonstrado ter influência sobre homeostase de eletrólitos, pH e volume da célula. Além disso, efeitos fisiopatológicos, incluindo a inflamação, o processo de remodelamento e a disfunção endotelial têm sido descritos e bem documentados em células do sistema renocardiovascular, Blasi et al. (2003); Brilla e Weber (1992); Rocha et al. (2002); Young e Funder, (2003). Ações da via não genômica da aldosterona apoiam estes efeitos através da modulação do tônus vascular, a produção de ROS, o processo de remodelamento e proliferação das células, tornando os tecidos mais vulneráveis ao estresse adicional.

Como mecanismos de ação, uma combinação de efeitos não genômicos e moleculares que interagem uns com os outros foram identificados. No entanto, a aldosterona não só possui uma comunicação entre os seus próprios caminhos de sinalização, mas também modula as vias de sinalização de outras moléculas, fisiopatologicamente relevantes, como a angiotensina II, Zhao et al. (2010) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Grossmann e Gekle (2009).

Assim, podemos sugerir que a resposta à via não genômica da aldosterona envolve um receptor diverso do clássico MR e que, possivelmente, esse receptor se encontra na membrana plasmática dos cardiomiócitos. Porém, mais estudos são necessários para o isolamento desse receptor. Além disso, esse receptor estaria ligado a uma proteína Gq, que ativaria PLC e promoveria quebra de fosfolipídeos de membrana liberando DAG e IP₃. O Ca²⁺ gerado pela ação do IP₃ nos canais de rianodina

demonstrou ativar diretamente uma adenilil ciclase. O DAG, porém, demonstrou ativar uma PKC ϵ que fosforila ERK5 acoplada em uma mAKAP que, por sua vez, também está ligada a PKA, gerando uma resposta hipertrófica.

O bloqueio desse receptor, no entanto, demonstrou elevar os níveis de Ca²⁺ e AMPc, protegendo a célula da hipertrofia. Contrastando com a situação onde o receptor clássico se encontra desimpedido e por isso, não se verifica aumento de AMPc. Em células tratadas com aldosterona essa condição é considerada como fundamental para levar a célula à hipertrofia Dodge-Kafka (2005).

Considerando todas essas situações, podemos fornecer duas possibilidades para a ocorrência da hipertrofia. Na primeira, há a fosforilação de PDE4D3 ligada à mAKAP que seria responsável por degradar AMPc. Na segunda, haveria nova síntese de PDEs pela aldosterona em sua via genômica. Esse quadro demonstra um *cross talking* entre os dois diferentes receptores da aldosterona, abrindo, assim, muitas possibilidades para estudos futuros.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Em síntese, os resultados do presente estudo mostraram:

- Nossos dados demonstram, pela primeira vez, que a resposta hipertrófica em cardiomiócitos é controlada pela mAKAP.
- Podemos sugerir que a via direta da aldosterona envolve uma adenilil ciclase tipo um, estimulada pelo Ca^{2+} , liberado pela via do receptor ligado a proteína Gq, o que, consequentemente, aumenta os níveis de AMPc na célula.
- O tratamento dos cardiomiócitos com aldosterona leva a fosforilação da ERK5 que passa, então, para a forma ativa (ERK5 fosforilada).
- Sugerimos que a ERK5 está sendo fosforilada diretamente por uma PKC, e que essa PKC seria, possivelmente do tipo ϵ .
- Esses elementos descritos combinados (ERK5 ativada e modulação na concentração do segundo mensageiro AMPc, principalmente) levariam ou não a célula à hipertrofia o que caracteriza uma resposta cruzada (*cross talking*) entre as possíveis vias orquestradas pela aldosterona (receptor MR e de membrana ainda desconhecido).

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrenica, B.; Gilchrist, J. S. (2000). NucleoplasmicCa(2+)loading is regulated by , p. mobilization of perinuclearCa(2+).Cell Calcium, v. 28, n. 2, p. 127-36.
- Akazawa, H.; Komuro, I. (2003). Roles of cardiactranscriptionfactors in cardiachypertrophy. Circ. Res., v. 92, n. 10, p. 1079-88.
- Allen, A. M.; Zhuo, J.; Mendelsohn, F. A. (2000).Localization and function of angiotensin AT1 receptors. Am J Hypertens, v.13, p. 31S-8S.
- Alves, G. B. (2007). Influence of angiotensinogen and ACE polymorphisms on myocardial hypertrophy and gain of aerobic capacity by exercise training in young individuals. Thesis (PhD), p.123, São Paulo
- Alzamora, R.; Brown, L. R.; Harvey, B. J. (2007).Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17 β -estradiol.Mol. Endocrinol., v. 21, p. 2637-2650.
- Ambroisine, M. L.; Favre, J.; Oliviero, P.; Rodriguez, C.; Gao. J.;Thuillez, C; Samuel, J. L. et al. (2007). Aldosterone-inducedcoronary dysfunction in transgenic mice involves thecalcium-activated potassium (BKCa) channels of vascularsmooth muscle cells. Circulation, v. 116, p. 2435–2443.
- Ammar, Y. B.; Takeda, S.; Hisamitsu, T. et al. (2006).Crystal structure of CHP2 complexed with NHE1-cytosolic regionand an implication for pH regulation.EMBO J, v. 7, n. 11, p. 2315-2325.
- Argañaraz, G. A.;Konno, A. C.; Perosa, S. R.; Santiago, J. F.;Boim, M. A. et al. (2008). The renin-angiotensin system is upregulated in the cortex and hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy related to mesial temporal sclerosis. Epilepsia, v. 49, n. 8, p. 1348-57.
- Arima, S.; Kohagura, K.;Xu, H. L. et al. (2004). Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterona in renal arteriole. Hypertension, v. 43, p.352-357.

- Arriza, J. L.; Weinberger, C.; Cerelli, G.; Glaser, T. M.; Handelin, B. L.; Housman, D. E.; Evans, R. M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, v. 237, p. 268–275
- Baker, K. M.; Aceto, J. F. (1990). Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol*, v. 259, p. H610-8.
- Balakumar, P.; Jagadeesh, G. (2010). Cardiovascular and renal pathologic implications of prorenin, renin, and the (pro)renin receptor: promising young players from the old renin-angiotensin-aldosterone system. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 56, n. 5, p. 570-579.
- Bauman, A. L.; Michel, J. J.; Henson, E. et al. (2007). The AKAP signal some and cardiac myocyte hypertrophy. *IUBMB Life*, v. 59, n. 3, p. 163-169.
- Bernard, K.; Wang, W.; Narlawar, R.; Schmidt, B.; Kirk, K. L. (2009). Curcumin cross-links cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) polypeptides and potentiates CFTR channel activity by distinct mechanisms. *J Biol Chem*, v. 284, n. 45, p. 30754-65.
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 415, p. 198-205.
- Berube, D.; Luu, V.; Lachance, Y.; Gagne, R.; Labrie, F. (1989). Assignment of the human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3B) to the p13 band of chromosome 1. *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 52, n. 3–4, p. 199–200.
- Bidet, M.; Merot, J.; Tauc, M. et al. (1987). Na^+/H^+ exchanger in proximal cells isolated from kidney II. Short-term regulation by glucocorticoids. *Am. Physiol*, v. 253, n. 5, p. 945-951.
- Blasi, E. R.; Rocha, R.; Rudolph, A. E.; Blomme, E. A.; Polly, M. L.; McMahon, E. G. (2003). Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int.*, v. 63, p. 1791–1800.
- Blazer-Yost, B. L.; Helman, S. I.; Lee, K. D. et al. (1999). Phosphoinositide 3-kinase is required for aldosterone-regulated sodium reabsorption. *AJP: Cell Physiol.*, v. 277, p. 531-536.

Bowley, K. A.; Linley, J. E.; Robins, G. G. et al. (2007). Role of protein kinase C in aldosterone-induced non-genomic inhibition of basolateral potassium channels in human colonic crypts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 104, p. 45-52.

Bowling, N., Walsh, R.A., Song, G.; Estridge T.; Sandusky, G. E.; Fouts, R. L.; Mintze, K.; Pickard, T.; Roden, R.; Bristow, M. R.; Sabbah, H. N.; Mizrahi, J. L.; Gromo, G.; King, G. L.; Vlahos, C. J. (1999). Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*, v. 99, n.3, p. 384-91.

Brilla, C. G.; Weber, K. T. (1992). Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 120, p. 893–901.

Brody, T. (1993). *Nutricional Biochemistry*. Academic Press, p. 658, Londres.

Brown, M..J. Direct renin inhibition – a new way of targeting the renin system. (2006). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 7 (suppl 2):S7-S11.

Bruhn, F. H. P.; Correa, P. B. C.; Oliveira-Pelegrin, G. R. et al. (2009). Blocking systemic nitric production alters neuronal activations in brain structures involved in cardiovascular regulation during polymicrobial sepsis. *Neurosci Lett*, v. 453, n. 3, p. 141-146.

Cachofeiro, V.; Miana, M.; De Las Heras, N.; Martin- Fernández, B.; Ballesteros, S.; Fernández-Tresguerres, J.; Lahera, V. (2008). Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 109, p. 331–335.

Callera, G. E.; Touyz, R. M.; Tostes, R. C. et al. (2005). Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension*, Montreal, v. 45, n. 4, p. 773-779.

Carey, R.M.; Siragy, H. M. (2003). The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab*, v. 14, p. 274–281.

Carnegie, G. K.; Means, C. K.; Scott, J. D. (2009). Critical Review A-kinase Anchoring Proteins: From Protein Complexes to Physiology and Disease. Howard Hughes Medical Institute, Department of Pharmacology, University of Washington, School of Medicine, Seattle, Washington, USA. *IUBMB Life*, v. 61, n. 4, p. 394–406.

- Chai, O. H.; Han, E. H.; Choi, Y. H. et al. (2010). The role of mast cells in atrial natriuretic peptide-induced cutaneous inflammation. *RegulPept*, Republic of Korea.
- Chai, W.; Garrelds, I. M.; Vries, R. D. et al. (2005). Nongenomic effects of aldosterone in the human heart. Interaction with angiotensin II. *Hypertension*, v. 46, p. 701-706.
- Chen, Y.; Zhao, M.; Liu, X.; Yao, W.; Yang, J.; Zhang, Z.; Tang, C. (2001). Urotensin II receptor in the rat airway smooth muscle and its effect on the rat airway smooth muscle cells proliferation. *Chin Med Sci J*, v. 16, n. 4, p. 231-5.
- Christ, M.; Douwes, K.; Eisen, C. et al. (1995a). Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, v. 25, p. 117-123.
- Christ, M.; Eisen, C.; Aktas, J. et al. (1993). The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes. *J. Clin. Endocr.Metab.*, v. 77, p. 1452-1457.
- Christ, M.; Günther, A.; Heck, M. et al. (1999). Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, v. 99, p. 1485-1491.
- Christ, M.; Meyer, C.; Sippel, K. et al. (1995b). Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 213, p. 123-129.
- Chun, T. Y.; Bloem, L. J.; Pratt, J. H. (2003). Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*, Indianapolis, v. 144, n. 5, p. 1712-1717.
- Cody, R. J.; Kubo, S. H.; Covit, A. B.; Muller, F. B.; Lopez-Ovejero, J.; Laragh, J. H. (1986). Exercise hemodynamics and oxygen delivery in human hypertension: Response to verapamil. *Hypertension*, v. 8, p. 3-10
- Colledge, M.; Scott, J. D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Cell Biology*, v. 9, p. 216-221.
- Connell, J. M.; Davies, E. (2005). The new biology of aldosterone. *Journal of Endocrinology*, v. 186, n.1, p. 1-20.

- Coutry, N.; Farman, N.; Blot-Chabaud, M. (1995). Synergistic action of vasopressin and aldosterone on basolateral Na⁺-K⁺-ATPase in the cortical collecting duct. *J Membrane Biol*, v. 145, n. 1, p. 99-106.
- Darnell Jr, J. E.; Kerr, I. M.; Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, v. 264, p. 1415–21.
- De Bold, A. J. (1981). Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific granules. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 60, p. 324-30.
- Di Zhang, A.; Cat, A. N. D.; Soukaseum, C. et al. (2008). Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension*, v. 52, p. 1060-1067.
- Diviani, D. (2008). Modulation of cardiac function by A-kinase anchoring proteins. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 8, p. 166–173.
- Djelidi, S.; Fay, M.; Cluzeaud, F. et al. (1997). Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells. *J Biol Chem*, v. 272, n. 52, p. 32919-32924.
- Dodge, K. L.; Khouangsathiene, S.; Kapiloff, M. S. et al. (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase/cAMP signaling module. *The EMBO Journal*, v. 20, n. 8, p. 1921-1930.
- Dodge-Kafka, K. L.; Soughayer, J.; Pare, G. C. et al. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*, v. 437, p. 574-578.
- Dohlman, H. G.; Thorner, J.; Caron, M. G. et al. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane segment receptors. *Annu Rev Biochem*, v. 60, p. 653-688.
- Doolan, C.; Harvey, B. J. (1996). Modulation of cytosolic protein kinase and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon. *J. Biol. Chem*, v. 271, n. 4, p. 8763-8767.
- Dooley, R.; Harvey, B. J.; Thomas, W. (2011). The regulation of cell growth and survival by aldosterone. *Frontiers in Bioscience.*, v. 16, p. 440-457.

- Dostal, D. E.; Baker, K. M. (1992). Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens*, v. 5, p. 276-80.
- Ebata, S.; Muto, S.; Okada, K. et al. (1999). Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int.*, v. 56, p. 1400-1412.
- Edwards, F. R.; Hirst, G. D.; Silverberg, G. D. (1988). Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol*, v. 404, p. 455-466.
- Eguchi, S.; Numaguchi, K.; Iwasaki, H.; Matsumoto, T.; Yamakawa, T.; Utsunomiya, H. et al. (1998). Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, v. 273, p. 8890-6.
- Estrada, M.; Liberona, J. L.; Miranda, M. et al. (2000). Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Santiago, v. 279, n. 1, p. 132-139.
- Falkenstein, E.; Tilmann, H. C.; Christ, M. et al. (2000). Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 513-556.
- Fernandes-Rosa, L. F.; Antonini, R. R. S. (2006). Resistência aos Mineralocorticóides: Pseudo-hipoaldosteronismo tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 51, n. 3, p. 373-381.
- Ferrario, C. M. (2006). Role of angiotensin II in cardiovascular disease: Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 7, p. 3-14.
- Fiebeler, A.; Nussberger, J.; Shagdarsuren, E. et al. (2005). Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation*, v. 111, p. 3087-3094.
- Fiebeler, A.; Schmidt, F.; Muller, D. N. et al. (2001). Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension*, v. 37, p. 787-793.

- Frey, N.; Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual Review of Physiology*, Dallas, v. 65, p. 45-79.
- Fujita, M.; Minamino, T.; Asanuma, H. et al. (2005). Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase C-dependent pathways in hypoperfused canine hearts. *Hypertension*, v. 46, p. 113-117.
- Funder, J. W.; Feldman, D.; Edelman, I. S. (1972). Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J Steroid Biochem.*, v. 3, n. 2, p. 209-18.
- Funder, J. W.; Pearce, P. T.; Smith, R. et al. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor. *Science*, v. 242, n. 4878, p. 583-585.
- Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.*, v. 52, p. 415-72.
- Gekle, M.; Freudinger, R.; Mildenerberger, S. et al. (2001). Rapid activation of Na^+/H^+ - exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinase ERK1/2. *Pflugers Arch.*, v. 441, n. 6, p. 781-786.
- Gekle, M.; Freudinger, R.; Mildenerberger, S. et al. (2002). Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 282, p. 669-679.
- Gekle, M.; Golenhofen, N.; Oberleithner, H. et al. (1996). Rapid activation of Na^+/H^+ - exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca^{2+} and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, p. 10500-10504.
- Gekle, M.; Silbernagl, S.; Oberleithner, H. (1997). The mineralocorticoid aldosterone activates a proton conductance in cultured kidney cells. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. 1673-1678.
- Gekle, M.; Silbernagl, S.; Wünsch, S. (1998). Non-genomic actions of the mineralocorticoid aldosterone on cytosolic sodium in culture kidney cells. *J Physiol*, v. 511, n. 1, p. 255-263.
- Geng, J.; Zhao, Z.; Kang, W. (2009). Hypertrophic response to angiotensin II is mediated by protein kinase D-extracellular signal-regulated kinase 5 pathway in human

aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 388, p. 517-522.

Giestas, A.; Palma, I.; Ramos, M. H. (2010). Sistema renina-angiotensina-aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Med. Port*, v. 23, n. 4, p. 677-688.

Good, D. W.; George, T.; Watts III, B. A. (2002). Aldosterone inhibits HCO₃⁻ absorption via a nongenomic pathway in medullary thick ascending limb. *Am.J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 283, p. 699-706.

Good, D. W.; George, T.; Watts III, B. A. (2006). Nongenomic regulation by aldosterone of the epithelial NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *AJP: Cell Physiol.*, v. 290, p. 757-763.

Göttle, M.; Geduhn, J.; König, B.; Gille, A.; Höcherl, K.; Seifert, R. (2009). Characterization of mouse heart adenylyl cyclase. *J PharmacolExpTher*, v. 329, n.3, p. 1156-65.

Greenwood, A. K.; Butler, P. C.; White, R. B.; DeMarco, U.; Pearce, D.; Fernald, R. D. (2003). Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology*, v. 144, 4226– 4234.

Gros, R. (2006). Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization. *Circulation Research*, v. 99, n. 8, p. 845-852.

Gros, R.; Ding, Q.; Armstrong, S.; O’Neil, C.; Pickering, J. G.; Feldman, R. D. (2007). Rapid effects of aldosterone on clonal human vascular smooth muscle cells. *AJP: Cell Physiol*, 292, C788–C794.

Grossmann, C.; Benesic, A.; Krug, A. W. et al. (2005). Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol. Endocrinol.*, v. 19, p. 1697-1710.

Grossmann, C.; Gekle, M. (2008). New aspects of rapid aldosterone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 308, p. 53-62.

Grossmann, C.; Gekle, M. (2009). Review : New aspects of rapid aldosterone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 308, p. 53–62.

- Hanatani, A.; Yoshiyama, M.; Kim, S.; Omura, T.; Toda, I.; Akioka, K. et al. (1995). Inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist of cardiac phenotypic modulation after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, v. 27, p. 1905-14.
- Harvey, B. J.; Alzamora, R.; Healy, V. et al. (2002). Rapid responses to steroid hormones: from frog skin human colon. A homage to Hans Ussing, v.1566, n. 1-2, p.116-128.
- Harvey, B. J.; Higgins, M.(2000). Nongenomic effects of aldosterone on Ca^{2+} in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int.*, v. 57, n. 4, p. 1395-1403.
- Haseroth, K.; Gerdes, D.; Berger, S. et al. (1999). Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *BiochemBiophys Res Commun*, v. 266, n .1, p. 257-261.
- Hawk, C.; Schafer, J. (1996). AVP and aldosterone at physiological concentrations have synergistic effects on Na transport in CCD. *Kidney International*, v. 57, p. 35-41.
- Hayashi, H.; Kobara, M.; Abe, M. K. et al. (2008). Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens. Res.*, v. 31, p. 363-375.
- Heeneman, S.; Haendeler, J.; Saito Y.; Ishida, M.; Berk, B. C. (2000). Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor β receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J BiolChem*, v. 275, p.15926-32.
- Heineke, J.; Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, London, v. 7, n. 8, p. 589-600.
- Hodgson, A. J.; Marsh, H.; Delean, S.; Marcus, L. (2007). Is attempting to change marine mammal behaviour a generic solution to the bycatch problem? A dugong case study. *Anim Conserv.* v. 10, p. 263-27.
- Hollister, A. S.; Tanaka, I.; Imada, T.; Onrot, J.; Biaggioni, I.; Robertson, D.; Inagami, T. (1986). Sodium loading and posture modulate human atrial natriuretic factor plasma levels. *Hypertension*, v. 8, p. II106 –II111.

- Husted, R. F.; Laplace, J. R.; Stokes, J. B. (1990). Enhancement of electrogenic Na^+ transport across rat inner medullary collecting duct by glucocorticoid and by mineralocorticoid hormones. *J Clin Invest*, v. 86, n. 2, p. 498-506.
- Ishida, M.; Marrero, M. B.; Schieffer, B.; Ishida, T.; Bernstein, K. E.; Berk, B. C. (1995). Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, v. 77, p. 1053-9.
- Ishizawa, K.; Izawa, Y.; Ito, H.; Miki, C.; Miyata, K.; Fujita, Y.; Kanematsu, Y.; Tsuchiya, K.; Tamaki, T.; Nishiyama, A.; et al. (2005). Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension*, v. 46, p. 1046–1052.
- Isoldi, M. C.; Mantioli, S. R.; Castrucci, A. M. L.; Lima, L. H. R. G.; Visconti, M. A.; Rebouças, N. A. (2003). Identification of Protein Kinase C (PKC) Isoforms in Teleostean, Amphibian and Avian Pigment Cells. *Pigment Cell Research*, v. 16, p. 639-643.
- Ito, M.; Oliverio, M. I.; Mannon, P. J.; Best, C. F.; Maeda, N.; Smithies, O.; Coffman, T. M. (1995). Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 3521-5.
- Iwashima, F.; Yoshimoto, T.; Minami, I. et al. (2008). Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology*, v. 149, p. 1009-1014.
- Jaffe, I. Z.; Mendelsohn, M. E. (2005). Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.*, v. 96, p. 643-650.
- Jans, D. A.; Van Oost, B. A.; Ropers, H. H. et al. (1990). Derivatives of somatic cell hybrids which carry the human gene locus for nephrogenic diabetes insipidus (NDI) express functional vasopressin renal V2-type receptors. *J Biol Chem*, v. 265, p. 15379-15382.
- Kapiloff, M. S. (1999). mAKAP: an A-kinase anchoring protein targeted to the nuclear membrane of differentiated myocytes. *J Cell Sci*, v. 112, n. 16, p. 2725-2736.

- Kapiloff, M. S.; Jackson, N.; Airhart, N. (2001). mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J. Cell Sci*, v. 114, n. 17, p. 3167-3176.
- Kapiloff, M. S.; Piggott, L.A.; Sadana, R. Li. J.; Heredia, L. A.; Henson, E.; Efendiev, R.; Dessauer, C. W. (2009). An adenylyl cyclase-mAKAP β signaling complex regulates cAMP levels in cardiac myocytes. *J BiolChem*, v. 284, n. 35, p. 23540-6.
- Keidar, S.; Kaplan, M.; Gamliel-Lazarovich, A. (2007). ACE2 of the heart: from angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovascular Research*, v. 73, n. 3, p. 463-469.
- Kim, J. A.; Berliner, J. A.; Nadler, J. L. (1996). Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 226, p. 862-868.
- Knepper, M. A.; Rector, F. C. Jr. (1996). Urine concentration and dilution. In: Brenner BM, ed. *The Kidney*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 532-570.
- Kobayashi, N.; Yoshida, K.; Nakano, S.; Ohno, T.; Honda, T.; Tsubokou, Y.; Matsuoka, H. (2006). Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Hypertension*, v. 47, p. 671–679.
- Korichneva, I.; Puc  at, M.; Millanvove-Van Brussel, E. et al. (1995). Aldosterone modulates both the Na/H antiport and Cl/HCO₃ exchanger in cultured neonatal rat cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol*, v. 27, n. 11, p. 2521-2528.
- Krug, A. W. (2003). Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem*, v. 278, n. 44, p. 43060-43066.
- Krug, A.W.; Grossmann, C.; Schuster, C.; Freudinger, R.; Mildemberger, S.; Govindan, M. V.; Gekle, M. (2006). Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem.*, v. 278, p. 43060–43066.
- Kuster, G. M.; Kotlyar, E.; Rude, M. K. et al. (2005). Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation*, v. 111, n. 4, p. 420-427.

- Lachance, D.; Garcia, R.; Gutkowska, J.; Cantin, M.; Thibault, G. (1986). Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.135, n.3, p. 1090-8.
- Lachance, Y.; Luu, V.; Verreault, H.; Dumont, M.; Rheume, É.; Leblanc, G. et al. (1991). Structure of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β -HSD) gene: Adrenal and gonadal specificity. *DNA and Cell Biology*, v. 10, n. 10, p. 701–711.
- Lambeth, J. D.; Seybert, D. W.; Lancaster, J. R. Jr.; Salerno, J. C.; Kamin, H. (1982). Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 45, p. 13–31.
- Laplace, J. R.; Husted, R. F.; Stokes, J. B. (1992). Cellular responses to steroids in the enhancement of Na⁺ transport by rat collecting duct cells in culture: differences between glucocorticoid and mineralocorticoid hormones. *J Clin Invest*, v. 90, n. 4, p. 1370-1378.
- Le Moellic, C.; Ouvrard-Pascaud, A.; Capurro, C.; Cluzeaud, F.; Fay, M.; Jaisser, F.; Farman, N.; Blot-Chabaud, M. (2004). Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *J. Am. Soc. Nephrol*, v. 15, p.1145–1160.
- Leclerc, M.; Brunette, M. G.; Couchorel, D. (2004). Aldosterone enhances renal calcium reabsorption by two types of channel. *Kidney Int.*, v. 66, n. 1, p. 242-250.
- Leite-Dellova, D. C. A. (2007). Efeito Genômico e Não- Genômico da Aldosterona o Trocador Na⁺/H⁺-ATPase no Túbulo Proximal(S3):Papel do Cálcio Citosólico. 165 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lieberman, S.; Lin, Y. Y. (2001). Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 78, p. 1–14.

- Liu, C.; Guan, J.; Kang, Y. et al. (2010). Inhibition of dehydration-induced water intake by glucocorticoids is associated with activation of hypothalamic natriuretic Peptide receptor-a in rat. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. 15607.
- Liu, S. L.; Schmuck, S.; Chorazczyewski, J. Z.; Gros, R.; Feldman, R. D. (2003). Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation*, v. 108, p. 2400–2406.
- Lohmann, S. M.; DeCamilli, P.; Einig, I.; Walter, U. (1984). High-affinity binding of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase to microtubule-associated and other cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.81, n.21, p. 6723-7.
- Lombès, M.; Binart, N.; Oblin, M. E. et al. (1993). Characterization of the interaction of the human mineralocorticoid receptor with hormone response elements. *Biochem J*, v. 292, n. 2, p. 577-583.
- Lombès, M.; Oblin, M. E.; Gasc, J. M.; Baulieu, E. E.; Farman, N.; Bonvalet, J. P. (1992). Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res.*, v. 71, n. 3, p. 503-10.
- Losel, R. M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, v. 83, n. 3, p. 965-1016.
- Malnic, G.; Ansado, M.; Lantos, C. et al. (1997). Regulation of nephron acidification by corticosteroids. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 30, n. 4. p. 479-486.
- Mano, A.; Tatsumi, T.; Shiraishi, J. et al. (2004). Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation*, v. 110, n. 3, p. 317-323.
- Markos, F.; Healy, V.; Harvey, B. J. (2005). Aldosterone rapidly activates Na^+/H^+ exchange in M-1 cortical collecting duct cells via PKC-MAPK pathway. *Nephron Physiology*, v. 99, n. 1, p. 1-9.
- Marver, D.; Kokko, J. P. (1983). Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone. *Miner. Electrolyte Metab.*, v.9, n. 1, p. 1-18.

- Marver, D.; Stewart, J.; Funder, J. W.; Feldman, D.; Edelman, I. S. (1974). Renal aldosterone receptors: studies with (3H) aldosterone and the anti-mineralocorticoid (3H) spiro lactone (SC-26304). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 71, n. 4, p. 1431-5.
- Marx, S. O.; Reiken, S.; Hisamatsu, Y. et al. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, v. 101, n. 4, p. 365-376.
- Mason, J. I. (1993). The 3-hydroxysteroid dehydrogenase gene family of enzymes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 4, p. 199–203.
- Matsubara, H.; Kanasaki, M.; Murasawa, S.; Tsukaguchi, Y.; Nio, Y.; Inada M. (1994). Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest.*, v. 93, p. 1592-601.
- Mazak, I.; Fiebeler, A.; Muller, D. N. et al. (2004). Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, v. 109, p. 2792-2800.
- McEneaney, V.; Harvey, B. J.; Thomas, W. (2007). Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 107, p. 180-190.
- Michea, L.; Delpiano, A. M.; Hitschfeld, C. et al. (2005). Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na^+/H^+ exchanger, intracellular Ca^{2+} levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology*, v. 146, p. 973-980.
- Mihailidou, A. S.; Mardini, M.; Funder, J. W. (2004). Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology*, v. 145, p. 773-780.
- Min, L. J.; Mogi, M.; Li, J. M. et al. (2005). Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, v. 97, p. 434-442.
- Miyata, K.; Rahman, M.; Shokoji, T. et al. (2005b). Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 16, p. 2906-2912.

- Miyata, Y.; Muto, S.; Kusano, E. (2005a). Mechanisms for nongenomic and genomic effects of aldosterone on Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertension*, v. 12, p. 2237-2250.
- Molkentin, J. D. (2000). The MEK1- ERK1/2 signaling pathway promotes compensates cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO Journal*, v. 19, n. 23, p. 6341-50.
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*, v. 63, p. 467 – 475.
- Molkentin, J. D.; Dorn, G. W. (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 63, p. 391-426.
- Montezano, A. C.; Callera, G. E.; Yogi, A. et al. (2008). Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 28, p. 1511-1518.
- Morgan, L.; Pipkin, F. B; Kalsheker, N. (1996). Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int. Journal Biochemistry Cell Biology*, v. 28, n. 11, p. 1211-1222.
- Mornet, E.; Dupont, J.; Vitek, A.; White, P. C. (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11-beta-hydroxylase (P-450(11) β). *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 20961–20967.
- Morrison, D. K. (1990). The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signals. *Cancer Cells*, v. 2, n.12, p. 377-82.
- Moura, A. M.; Worcel, M. (1984). Direct action of aldosterone on transmembrane ^{22}Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension*, v. 6, p. 425–430.
- Mukoyama, M. et al. (1991). Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *The J Clin Invest*, New Haven, v. 87, n. 4, p. 1402–1412.
- Mutoh, A.; Isshiki, M.; Fujita, T. (2008). Aldosterone enhances ligand-stimulated nitric oxide production in endothelial cells. *Hypertens. Res.*, v. 31, p. 1811–1820.

Nagata, K.;Obata, K.; Xu, J. et al. (2006). Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension*, v. 47, n. 4, p. 634-635.

Nagata, K.;Somura, F.; Obata, K. et al. (2002). AT1 receptor blockade reduces cardiac calcineurin activity in hypertensive rats. *Hypertension*, v. 40, n. 2, p. 168-174.

NCBI Pubchemcompound. Fórmula química da aldosterona. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=201562> Acesso em: 15 de dezembro de 2010.

NCBI Pubchemcompound. Fórmula química do ANP. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=81059160&loc=es_rss#Subinfo. Acesso em: 15 de dezembro de 2010.

Nelson D. L.; Cox, M. M. (2006) *Lehninger princípios de bioquímica*. Tr. Simões AA, Lodi WRN. 4 ed, São Paulo: Sarvier.

Nicol, R. L.; Frey, N.; Pearson, G.; Cobb, M.; Richardson, J.; Olson, E.N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J*, v. 20, p. 2757-2767.

Nigro, P.; Abe, J.; Woo, C. H. et al. (2010). PKC ζ decrease e NOS protein stability via inhibitory phosphorylation of ERK5. *Blood*, v. 116, n. 11, p. 1971-1979.

Nishiyama, A.;Yao, L.;Fan. Y.;Kyaw, M,Kataoka, N.;Hashimoto, K.;Nagai, Y.;Nakamura, E.;Yoshizumi, M.;Shokoji, T.;Kimura, S.;Kiyomoto, H.;Tsujioka, K.;Kohno, M.; Tamaki, T.;Kajiya, F.;Abe, Y. (2005). Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability.*Hypertension*, v. 45, n.4, p. 710-6.

Oberleithner, H. (2005). Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable. *Kidney Int*, v. 67, n. 5, p. 1680-1682.

Oberleithner, H.; Ludwig, T.; Riethmüller, C. et al. (2004). Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension*, v. 43, n.5, p. 952-956.

Oberleithner, H.; Weigt, M.; Westphale, H. J. et al. (1987). Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange and raises cytoplasmic pH in target cells of the amphibian kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 84, p. 1464-1468.

Ogihara, T.; Shima, J.; Hara, H.; Kumahara, Y.; Kangawa, K.; Matsuo, H. (1986). Changes in human plasma atrial natriuretic polypeptide concentration in normal subjects during passive leg raising and whole body tilting. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 147-150.

Oliver, G.; Schäfer, E. A. (1895). On the Physiological Action of Extracts of Pituitary Body and certain other Glandular Organs: Preliminary Communication. *J Physiol.*, v. 18, n. 3, p. 277-9.

O'Malley, B. (2008). The Year in Basic Science: nuclear receptors and coregulators. *MolEndocrinol.* V. 22, n.12, p. 2751-8.

Orshal, J. M.; Khalil, R. A. (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *AJP: Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 286, p. R233–R249.

Papin, J. A.; Hunter, T.; Palsson, B. O.; Subramaniam, S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol.* v. 6, n.2, p. 99-111.

Papin, J. A.; Hunter, T.; Palsson, B. O; (2005). Subramaniam S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 6, n. 2, p. 99 -111.

Pare, G. C.; Bauman, A. L.; McHenry, M. et al. (2005). The AKAP complex participates in the induction of cardiac hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *J. Cell Sci.* v.118, n. 23, p. 5637-5646.

Pascual-Le Tallec, L.; Lombès, M. (2005). The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *MolEndocrinol.* v. 19, n.9, p. 2211-21.

Pascual-Le Tallec, L.; Lombès, M. (2005). The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *MolEndocrinol.* v. 19, n.9, p. 2211-21.

Peach, M. J. (1981). Molecular actions of angiotensin. *Biochem Pharmacol.* v. 30, p. 2745-51.

- Pitt, B.; Zannad, F.; Remme, W. J. et al. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, v. 341, n.10, p. 709-717.
- Porter, G. A.; Bogoroch, R.; Edelman, I. S. (1964). On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 52, p. 1326-33.
- Potter, L. R.; Abbey-Hosch, S.; Dickey, D. M. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Ver.*, v. 27, n.1, p. 47-72.
- Rao, M. S. (2010). Inhibition of the renin angiotensin aldosterone system: focus on aliskiren. *J. Assoc. Physicians. India.*, v. 58, p. 102-108.
- Reeves, W. B.; Bichet, D. G.; Andreoli, T. E. (1998). Posterior pituitary and water metabolism. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 341-388.
- Regitz-Zagrosek, V.; Auch-Schwelk, W.; Neuss, M.; Fleck, E. (1994). Regulation of the angiotensin receptor subtypes in cell cultures, animal models and human diseases. *Eur Heart J*, v. 15, p. 92-7.
- Regitz-Zagrosek, V.; Friedel, N.; Heymann, A.; Bauer, P.; Neuss, M.; Rolfs, A. et al. (1995a). Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation*, v. 91, p. 1461-71.
- Regitz-Zagrosek, V.; Neuss, M.; Fleck, E. (1995b). Effects of angiotensin receptor antagonists in heart failure: clinical and experimental aspects. *Eur Heart J*, v. 16, p. 86-91.
- Reudelhuber, T. L. (2005). The continuing saga of the AT₂ receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension*, v. 46, n. 6, p. 1261–1262.
- Richter, D. (1988). Molecular events in expression of vasopressin and oxytocin and their cognate receptors. *Am J Physiol*, v. 255, n. 2, p. 207-219.
- Robert, V.; Heymes, C.; Silvestre, J. S. et.al. (1999). Angiotensin AT₁ receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*, v. 33, n. 4, p. 981-986.

- Rocha, R.; Rudolph, A. E.; Frierdich, G. E. et al. (2002). Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart CircPhysiol*, v. 283, n. 5, p. 1802-1810.
- Rocks, A. J. M.; van Geel, P. P.; Pinto, Y. M.; Buikema, H.; Henning, R. H.; Zeeuw, D.; van Gilst, W. H. (1999). Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. *Hypertension*, v. 34, p. 296-30.
- Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S. L.(1971). Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylatecyclase system.*Biochem J*, v. 125, n. 3, p. 58P-59P.
- Rossi, G. P.; Sacchetto, A.; Visentin, P. et al. (1996).Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension*, v. 27, n. 5, p. 1039-1045.
- Rossier, M. F.; Python, M.; Maturana, A. D. (2010).Contribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors to the chronotropic and hypertrophic actions of aldosterone in neonatal rat ventricular myocytes.*Endocrinology*, v. 151, n. 6, p. 2777-2787.
- Rossol-Haseroth, K.; Zhou, Q.; Braun, S.; Boldyreff, B.; Falkenstein, E.; Wehling, M.; Losel, R. M.; (2004). Mineralocorticoid receptor antagonists do not block rapid ERK activation by aldosterone. *Biochem.Biophys. Res Commun.*, 318, 281–288.
- Rude, M. K.; Duhnaney, T. A.; Kuster, G. M. et al. (2005). Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension*, v. 46, n.3, p. 555-561.
- Ruehr, M. L.; Russell, M. A.; Ferguson, D. G. et al. (2003). Targeting of protein kinase A by muscle A kinase-anchoring protein (mAKAP) regulates phosphorylation and function of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J BiolChem*, v. 278, n. 27, p. 24831-24836.
- Sabri. A.; Hughie, H. H.; Lucchesi, P.A. (2003). Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes.*Antioxid Redox Signal*, v. 5, n. 6, p. 731-40.
- Sadoshima, J.;Izumo, S. (1996). The heterotrimeric G q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *Embo J*, v. 15, p. 775-87.

- Sadoshima, J.; Qiu, Z.; Morgan, J. P.; Izumo, S. (1995). Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G-protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca^{2+} - dependent signaling. *Circ Res.*, v. 76, p. 1-15.
- Schindler, C.; Darnell Jr, J. E. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, v. 64, p. 621– 51.
- Schneider, M.; Ulsenhimer, A.; Christ, M. et al. (1997). Nongenomic effects of aldosterone on intracellular calcium in porcine endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 272, p. 616-620.
- Sechi, L. A.; Griffin, C. A.; Grady, E. F.; Kalinyak, J. E.; Schambelan, M. (1992). Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res.*, v. 71, p. 1482-9.
- Seibold, A.; Brabet, P.; Rosenthal, W. et al. (1992). Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene. *Am J Hum Genet*, v. 51, n. 5, p. 1078-1083.
- Sharif, M.; Hanley, M. R. (1992). Peptide receptors. Stepping up the pressure. *Nature*, v. 357, p. 279-280.
- Shedden, E. A.; Wargent, E. T.; Ashton, N. et al. (2002). Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collecting ducts. *J. Endocrinol.*, v. 175, p. 343-347.
- Shinzawa, K.; Ishibashi, S.; Murakoshi, M.; Watanabe, K.; Kominami, S.; Kawahara, A.; Takemori, S. (1988) Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P450s (P450_{17 α} , lyase and P450_{c21}) and steroidogenic activities in guinea pig adrenal cortex. *J Endocrinol*, v. 119, p. 191–200.
- Simard, J.; Rhéaume, E.; Sanchez, R.; Laflamme, N.; Launoit, Y.; Luu-The, V. et al. (1993). Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol Endocrinol*, v. 7, p. 716-28.
- Simpson, S. A.; Tait, J. F.; Wettstein, A. et al. (1954). Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid. *Experientia*, v. 10, n. 3, p. 132-133.

- Siragy, H. M. (2000). The role of the AT₂ receptor in hypertension. *Am J Hypertens*, v. 13, p. 62S-7S.
- Spach, C.; Streeten, D. H. (1964). Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. *J. Clin. Invest.*, v. 43, p. 217–227.
- Spiegel, A. M. (1996). Genetic Basis of Endocrine Disease. Mutations in G Proteins and G Protein-Coupled Receptors in Endocrine Disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 81, n. 7, p. 2434-2442.
- Stasch, J. P.; Hirth-Dietrich, C.; Kazda, S.; Neuser, D. (1989) Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo. *Life Sci*, v. 45, p. 869-875.
- Stowasser, M.; Sharman, J.; Leano, R.; Gordon, R.D.; Ward, G.; Cowley, D.; Marwick, T.H. (2005). Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism Type I. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 90, n. 9, p. 5070-5076.
- Sturm, A.; Bury, N.; Dengreville, L.; Fagart, J.; Flouriot, G.; Rafestion-Oblin, M. E.; Prunet, P. (2005). 11-Deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*, v. 146, p. 47–55.
- Swedberg, K.; Eneroth, P.; Kjeksbus, J. et al. (1990). Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. *Circulation*, v. 82, n. 5, p. 1730-1736.
- Takeda, Y.; Miyamori, I.; Yoneda, T. et al. (1995). Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension*, v. 25, n. 2, p. 170-173.
- Takeishi, Y.; Ping, P.; Bolli, R.; Kirkpatrick, D. L.; Hoit, B. D.; Walsh, R. A. (2000). Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ Res*, v. 86, n. 12, p. 1218-23.
- Terada, Y.; Kobayashi, T.; Kuwana, H.; Tanaka, H.; Inoshita, S.; Kuwahara, M.; Sasaki, S.; (2005). Aldosterone stimulates proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2, cyclin D1, and cyclin A. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 16, p. 2296–2305.

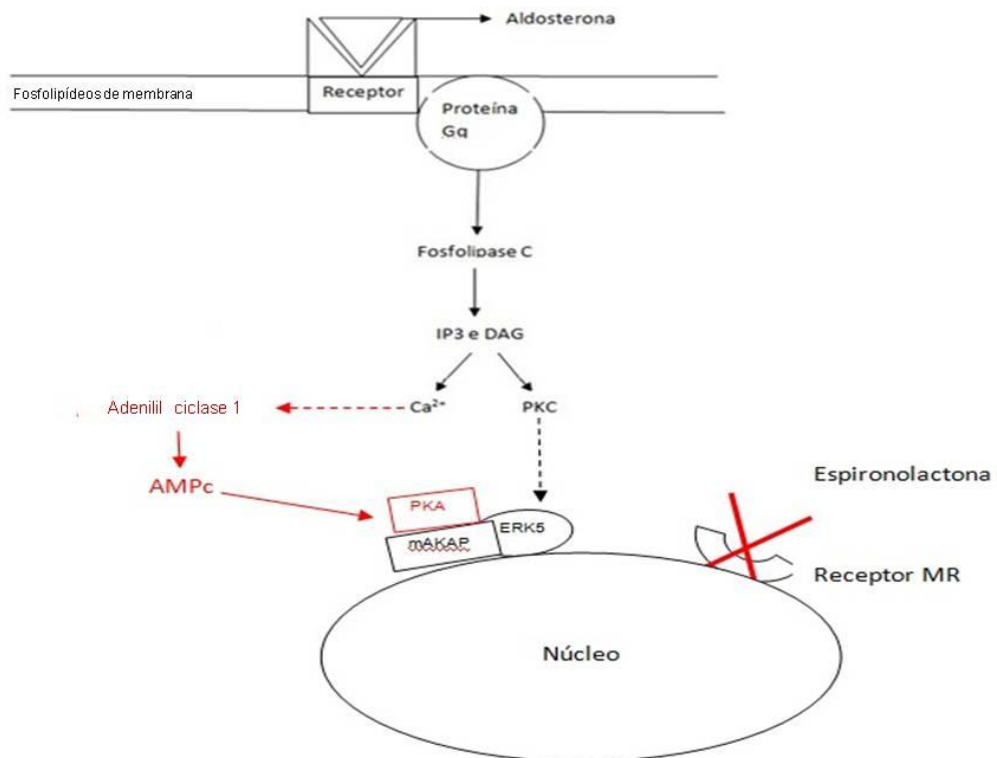
- Thomas, W. G.; Thekkumkara, T. J.; Baker, K. M. (1996). Cardiac effects of AII. AT1A receptor signaling, desensitization, and internalization. *AdvExp Med Biol*, v. 396, p. 59 – 69.
- Tigerstedt, R.; Bergman, P. G. (1898). The kidneys and the circulation. *Arch. Physiol*, n.8, p. 223–271.
- Timmermans, P. B.; Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F. (1991). Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends PharmacolSci*, v.12, p. 55-62.
- Touyz, R. M. (2003). Recent advances in intracellular signaling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 12, n. 2, p. 165-174.
- Touyz, R. M.; Pu, Q.; He, G.; Chen, X.; Yao, G.; Neves, M. F.; Viel, E. (2002). Effects of low dietary magnesium intake on development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of reactive oxygen species. *J Hypertens*. V. 20, n. 11, p. 2221-32.
- Turnamian, S. G.; Binder, H. J. (1989). Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *J. Clin. Invest.*, v. 84, n. 6, p.1924-1929.
- Turnamian, S. G.; Binder, H. J. (1990). Aldosterone and glucocorticoid receptor-specific agonist regulate ion transport in rat proximal colon. *Am. J. Physiol.*, v. 258, n. 3, p. 492-498.
- Uhrenholt, T. R.; Schjerning, J.; Hansen, P. B.; Norregaard, R.; Jensen, B. L.; Sorensen, G. L.; Skott, O. (2003). Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ. Res.*, v. 93, p. 1258–1266.
- Vaughan, C. J.; Basson, C. T. (2000). Molecular determinants of atrial and ventricular septal defects and patent ductus arteriosus. *Am J Med Genet*, v. 97, n.4, p. 304-9.
- Vesely, D. L. (2003). Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 285, p. 167-177.
- Virdis, A.; Neves, M. F.; Amiri, F. et al. (2002). Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*, v. 40, p. 504-510.

- Walsh, M. P.; Kargacin, G. J.; Kendrick-Jones, J.; Lincoln, T. M. (1995). Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J PhysiolPharmacol*, v. 73, p .565-73.
- Wang, J.; Yu, L.; Solenberg, P. J. et al. (2002). Aldosterone stimulates angiotensin-converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes. *J Card Fail*, v. 8, n. 3, p. 167-174.
- Watts III, B. A.; George, T.; Good, D. W.; (2006). Aldosterone inhibits apical NHE3 and HCO₃⁻ absorption via a nongenomic ERK-dependent pathway in medullary thick ascending limb. *AJP: Renal Physiol*, v. 291, F1005–F1013.
- Wehling, M.; Kuhls, S.; Armanini, D. (1989). Volume regulation of human lymphocytes by aldosterone in isotonic media. *Am. J. Physiol.*, v. 257, p. 170-174.
- Wehling, M.; Neylon, C. B.; Fullerton, M. et al. (1995). Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, v. 76, n. 6, p. 973-979.
- Wehling, M.; Ulsenheimer, A.; Schneider, M. et al. (1994). Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, v. 204, p. 475-481.
- Wessel, N.; Malberg, H.; Heringer-Walther, S.; Shultheiss, H. P.; Walther, T. (2007). The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE 0991 dominates the circadian rhythm and baroreflex in spontaneously hypertensive rats. *J CardiovascPharmacol*, v. 49, n. 2, p. 67-73.
- White, P.C. (1986) New MI and Dupont B Structure of the human steroid 21-hydroxylase genes. *ProcNatlAcadSci USA*.
- Williams, J. S.; Williams, G. H. (2003). 50th anniversary of aldosterone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 88, n. 6, p. 2364-2372.
- Winter, C.; Schulz, N.; Giebisch, G. et al. (2004). Nongenomic stimulation of Acad. Sci., v. 101, p. 2636-2641.

- Wong, W.; Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, n. 12, p. 959-970.
- Yan, W.; Wu, F.; Morser, J.; Wu, Q. (2000). Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 15, p. 8525–8529.
- Yang, J.; Chang, C. Y.; Safi, R. et al. (2010). Identification of Ligand-Selective Peptide Antagonists of the Mineralocorticoid Receptor Using Phage Display. *Mol Endocrinol*, v. 24, p. 32-43.
- Young, M.; Funder, J. (2003). Mineralocorticoid action and sodium–hydrogen exchange: studies in experimental cardiac fibrosis. *Endocrinology*, v. 144, p. 3848–3851.
- Zakhary, D. R.; Moravec, C. S.; Bond, M. (2000). Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart: alterations in human heart failure. *Circulation*, v. 101, p. 1459–1464.
- Zennaro, R. G. (1995). Extracardiovascular toxic effects of drugs used in cardiology. *Cardiologia*, v. 40 (12 Suppl1), p. 99-104.
- Zhang, A.; Jia, Z.; Guo, X. et al. (2007). Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *AJP: Renal Physiol.*, v. 293, p. 723-731.
- Zhao, Z.; Wang, W.; Geng, J. (2010). Protein kinase C epsilon-dependent extracellular signal-regulated kinase 5 phosphorylation and nuclear translocation involved in cardiomyocyte hypertrophy with angiotensin II stimulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 109, p. 653-662.
- Zhu, Y.; Rice, C. D.; Pang, Y.; Pace, M.; Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 100, 2231–2236.

ANEXOS

8 - ANEXOS



Esquema ilustrando a suposta via dependente de proteína Gq acoplada ao receptor de membrana ainda desconhecido para a via direta da aldosterona.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2010/33, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Ação direta da aldosterona em cardiomiócitos de ratos*" e que tem como responsável o Prof. Dr. Mauro César Isoldi foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 29/06/2013.

Ouro Preto, 30 de junho de 2010.

Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP