

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO CARDIOPROTETOR**  
**DA ESPIRONOLACTONA E EPLERENONA EM**  
**CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS CARDÍACAS DE**  
**RATO**

**Ouro Preto - MG**  
**2013**

MILLA MARQUES HERMIDORFF

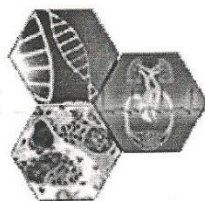
**ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO CARDIOPROTETOR  
DA ESPIRONOLACTONA E EPLERENONA EM  
CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS CARDÍACAS DE  
RATO**

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 Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi.

Ouro Preto - MG

2013



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



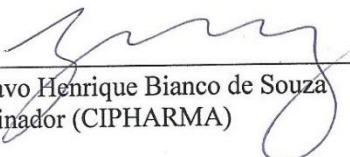
**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**


**“Estudo “in vitro” do efeito cardio protetor da espirolactona e eplerenona em culturas primárias de células cardíacas de rato”**

Aos quinze dias do mês de Março de 2013, às 09:00, no Bloco de Salas de Aula da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Milla Marques Hermidorff**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... APROVAR ..... 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 César Isoldi  
Presidente

  
Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza  
Examinador (CIPHARMA)

  
Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa  
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 15/03/2013

H554e Hermidorff, Milla Marques.  
Estudo *in vitro* do efeito cardioprotetor da espirolactona e eplerenona em culturas primárias de células cardíacas de rato [manuscrito] / Milla Marques Hermidorff. - 2013.  
97f.: il. color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Isoldi

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Sistema cardiovascular - Teses. 2. Miocárdio - Teses. 3. Fibroblasto - Teses. 4. Diuréticos - Teses. 5. Hormônios - Aldosterona - Teses. I Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 577.11:616.12

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

*Dedico este trabalho à **minha mãe**  
Elizete e **meu pai** Ademir por  
permitirem que meus sonhos se  
tornassem realidade, **minha irmã** Klícia  
pela amizade e ao **Higor** pelo amor sem  
cobranças, pelo companherismo e  
cumplicidade ímpar nessa jornada,  
**Equipe do Mauro** pela ajuda e  
solidariedade e **Professor Mauro** pelos  
ensinamentos e pela paciência.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus pelo dom da vida e pela saúde.*

*Ao meu pai pelo amor, dedicação e por ser a força que me impulsiona a chegar cada vez mais longe. E por não medir esforços para que eu conquiste meus objetivos.*

*A minha mãe por ter se tornado a maior incentivadora deste projeto e por ter sido o exemplo que precisei, por sempre acreditar em mim e, principalmente, pelo exemplo de vida, força e fé. E por viver meus sonhos comigo!*

*A minha irmã Klícia pelo apoio constante, pela amizade incondicional, pelas palavras de incentivo em todas as horas difíceis.*

*Ao Higor pela dedicação e paciência nos momentos conturbados da pós e por sempre demonstrar muito mais do que as palavras podem expressar!!! Por ser meu melhor amigo nos momentos de ansiedade e angústia. Te amo!!!*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro César Isoldi pelo incentivo. Obrigada por abrir as portas do Laboratório de Fisiologia e Hipertensão, me direcionar na carreira científica e me proporcionar a oportunidade de trilhar novos caminhos. Serei eternamente grata por tudo!!!*

*Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Hipertensão, Andréa, Rosana, Rodrigo, Everton, Gabi Hermon e Thalisson pela paciência e amizade!*

*A Prof. Andréia Alzamora, pela confiança, paciência e ensinamentos. Exemplo de profissional a ser seguido!!!*

*A toda e maravilhosa equipe do Mauro que tanto deu suporte para que esse trabalho fosse concluído!!!*

*Gabí, Gabí Juníinha, Karíne, Ana e Déborah que foram peças fundamentais para esse sonho e pela amizade e companhia constante. Tenho a certeza de que construímos juntas uma importante parte de nossas estórias. Obrigada por tudo!!!*

*Aníinha e Carol, por sempre serem um ombro amigo-irmão em todos os momentos mais difíceis dessa caminhada, e por também compartilhar comigo várias vitórias e alegrias!!!*

*A todos os **professores do NUPEB** pela disposição em ajudar e por proporcionar um intercâmbio sadio entre os laboratórios da pós-graduação.*

*A **Denise e Maurício** por todas as citometrias, sempre interessados e dispostos a ajudar!!!*

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

*À **FAPEMIG** pelo apoio financeiro.*

*À **Eclipse**, família que eu escolhi e que me escolheu, e todas as **eclipsianas**, pelo aprendizado, amor, companheirismo e convivência.*

*Ao **Centro de Ciência Animal da UFOP** e a todos os seus funcionários, em especial à **Lorena** pela paciência e por fazer com que esse trabalho fosse realizado de forma correta pelo bom trato com os animais.*

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

*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!!!*



“AS COISAS QUE QUEREMOS E PARECEM  
IMPOSSÍVEIS SÓ PODEM SER  
CONSEGUIDAS COM UMA TEIMOSIA  
PACÍFICA”.

MAHATMA GANDHI

## RESUMO

Antagonistas de receptores mineralocorticoides (MR) da aldosterona (espironolactona e eplerenona) possuem efeitos benéficos no tratamento de pacientes com doenças cardíacas.

Porém, muitas dessas respostas se mostraram independentes do antagonismo de MR. Nosso objetivo foi estudar os mecanismos de ação dessas drogas que levam às respostas cardioprotetoras e avaliar comparativamente seus efeitos *in vitro*. Os ensaios foram realizados em culturas primárias de células cardíacas de ratos neonatos. Avaliamos o efeito proliferativo da espironolactona e eplerenona em cardiomiócitos e fibroblastos, na presença e na ausência de mifepristona e aldosterona, para avaliar o efeito *per se* dessas drogas. Espironolactona e eplerenona promoveram proliferação em cardiomiócitos, mesmo na ausência de aldosterona. Porém, em fibroblastos, somente espironolactona apresentou efeito anti-proliferativo e reverteu o efeito mitogênico da aldosterona, enquanto a eplerenona somente reverteu o efeito da aldosterona. Para elucidar as vias bioquímicas evocadas por essas drogas nos focamos na análise dos segundos mensageiros  $Ca^{2+}$ , AMPc e GMPc e na atividade de PKC e ERK1/2, devido à importância dessas vias no processo cardioprotetor. Espironolactona é capaz de aumentar os níveis de  $Ca^{+2}$ , AMPc, GMPc e atividade de ERK 1/2, e reverte a ação de aldosterona na atividade de PKC e ERK1/2. Eplerenona aumenta apenas os níveis de  $Ca^{+2}$ , GMPc e atividade de ERK1/2, e também reverte a ação de aldosterona na atividade de PKC e ERK1/2. Nossos dados sobre segundos mensageiros apoiam o fato que, além da aldosterona, a espironolactona e a eplerenona também apresentam respostas rápidas, independente de MR, como aumento de AMPc,  $Ca^{2+}$  e GMPc pela espironolactona e  $Ca^{2+}$  e GMPc pela eplerenona. As diferenças encontradas entre a ação dessas drogas apontam para uma cardioproteção mais consistente promovida pela espironolactona, porém esses efeitos ainda precisam ser testados clinicamente.

**Palavras-chave:** Cardioproteção. Cardiomiócitos. Fibroblastos. Espironolactona. Eplerenona

## ABSTRACT

Mineralocorticoid receptor (MR) antagonists of aldosterone (spironolactone and eplerenone) have beneficial effects in the treatment of patients with heart disease. However, most of these responses are independent of MR antagonistic pathway. Our objective was to study the mechanisms of action of these drugs that lead to cardioprotection and further compare their effects in vitro. Assays were performed in primary cultures of neonatal rat cardiac cells. We assessed the proliferative effects of spironolactone and eplerenone cardiomyocytes and fibroblasts in the presence and absence of mifepristone and aldosterone in order to evaluate the effect of these drugs per se. Spironolactone and eplerenone promoted cardiomyocyte proliferation, even in the absence of aldosterone. However, in fibroblasts, spironolactone alone showed anti-proliferative effect and reversed the mitogenic effect of aldosterone. While only eplerenone reversed the effect of aldosterone. To elucidate the biochemical pathways evoked by these drugs we focused on the analysis of second messengers,  $Ca^{2+}$ , cAMP and cGMP and activity of PKC and ERK1/2 because of their importance in the process cardioprotective pathways. We observed that spironolactone is able to increase the levels of  $Ca^{2+}$ , cAMP, cGMP and activity of ERK1/2, and reverse the action of aldosterone on the activity of PKC and ERK1/2. Eplerenone showed increases levels of  $Ca^{2+}$ , cGMP and activity of ERK1/2, and also reversed the action of aldosterone on the activity of PKC and ERK1/2. Our second messengers data support the fact that in addition to aldosterone, spironolactone and eplerenone also feature fast response, independent of MR, as show by increased cAMP, cGMP and  $Ca^{2+}$  by spironolactone and eplerenone by  $Ca^{2+}$  and cGMP. The differences found between the action of these drugs show a more consistent cardioprotection promoted by spironolactone, but these effects have yet to be tested clinically.

**Keywords:** Cardioprotection. Cardiomyocytes. Fibroblasts. Spironolactone. Eplerenone.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Estrutura química da espironolactona (17-Hidroxi-7- $\alpha$ -mercaptana-3-oxo-17- $\alpha$ -pregn-4-eno-21-ácido carboxílico- $\gamma$ -lactona-7-acetato). ..... 25
- Figura 2:** Estrutura química da eplerenona (9,11 $\alpha$ -epoxi-17-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-7 $\alpha$ ,21-ácido dicarboxílico- $\gamma$ -lactona metil este). ..... 28
- Figura 3:** Estruturas químicas da espironolactona e da eplerenona. Fonte: Adaptado de Lucía ..... 29
- Figura 4:** Biossíntese da Aldosterona. CYP: isoformas de citocromo P450; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ hidroxiesteroide-deshidrogenase. Fonte: Lucía Núñez e Tamargo (2006, p. 32B)..... 30
- Figura 5:** Representação esquemática da estrutura do MR humano (hMR) e receptor glicocorticóide (hGR) com a porcentagem de aminoácidos idênticos que aparecem em cada domínio (A-E). Fonte: Farman e Rafestin-Oblin (2001, p. F182)..... 37
- Figura 6:** Rato neonato com 2 dias de idade e peso aproximado de 5g. .... 44
- Figura 7:** Organograma das etapas do trabalho ..... 46
- Figura 8:** Foto de cardiomiócitos tiradas por máquina digital (zoom 2,9) em microscópio invertido modelo Telaval 31, fabricante Carl Zeiss, em aumento de 30x. .... 49
- Figura 9:** Foto de fibroblastos tirada por máquina digital (zoom 2,9) em microscópio invertido modelo Telaval 31, fabricante Carl Zeiss, em aumento de 30x. .... 50
- Figura 10:** Estrutura química da Tapsigargina (sequisterpeno de lactona). ..... 53
- Figura 11:** Esquema de um possível mecanismo das vias de ação de espironolactona e eplerenona. Em destaque (vermelho) as vias que são coincidentes para as duas drogas e em preto as vias ativadas somente por espironolactona. .... 84



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Análise de proliferação celular de fibroblastos cardíacos por tratamento, nos tempos de 0h, 24h e 48h. Células tratadas com espironolactona e eplerenona, na presença e ausência de mifepristona e aldosterona (A), Células tratadas com mifepristona e estimuladas com espironolactona ou eplerenona (B). Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ..... 59
- Gráfico 2:** Análise de proliferação celular de cardiomiócitos por tratamento, nos tempos de 0h, 24h e 48h. Células tratadas com espironolactona e eplerenona, na presença e ausência de mifepristona e aldosterona (A), Células tratadas com mifepristona e estimuladas com espironolactona ou eplerenona (B). Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ..... 61
- Gráfico 3:** Análise de viabilidade celular de cardiomiócitos após 48 horas, frente a diferentes tratamentos. A análise foi realizada através de incorporação de iodeto de propídio e leitura em citômetro de fluxo. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ . ..... 62
- Gráfico 4:** Análise de concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida a tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de aldosterona. As células foram incubadas com marcador de cálcio intracelular, Fluo-4, e lidas em citômetro de fluxo. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ..... 64
- Gráfico 5:** Análise de concentração intracelular de AMPc (fmol) em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida ao tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de aldosterona. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ . ..... 66

**Gráfico 6:** Análise de concentração intracelular de GMPc (fmol) em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida ao tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de aldosterona. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM, p < 0,05. .... 68

**Gráfico 7:** Gráfico de análise de atividade relativa de PKC em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida ao tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de mifepristona e aldosterona. A atividade relativa baseia-se nos controles de atividade (1,33ng/ $\mu$ l e 5,33 ng/ $\mu$ l) fornecidos pelo kit usado para essa análise. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM, p < 0,05..... 69

**Gráfico 8:** Análise de atividade de ERK1/2 por *Western Blot*. (A) Membrana de *western blot* corrida com 50 $\mu$ g de proteína, bandas de 37 kDa (GAPDH) e 44 kDa (ERK1/2 fosforilada Thr202/Tyr204), por tratamento 1-12. (B) Gráfico de atividade relativa de ERK1/2 em diferentes tratamentos. Os dados foram expressos como diferença relativa em relação ao controle após normalização para expressão de GAPDH. Resultado de três experimentos independentes, n = 3, p < 0,05..... 71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Comparação da afinidade da espironolactona e eplerenona por diversos receptores esteróides .....	27
<b>Tabela 2:</b> Composição da solução de ADS 1x, pH = 7,35 .....	47
<b>Tabela 3:</b> Composição da solução de BRDU [ $10^{-2}$ M] (5-Bromo-2'-deoxyuridine) .....	47
<b>Tabela 4:</b> Composição do meio de cultura celular .....	47
<b>Tabela 5:</b> Composição da solução tampão de digestão .....	47



## LISTA DE ABEREVEATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
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 quinase A
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AngI	Angiotensina I
AngII	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial ou peptídeo natriurético tipo A
ANOVA	Análise de variância
AP1	Ativador de proteína 1
AT1	Receptores angiotensinérgicos do tipo 1
AT2	Receptores angiotensinérgicos do tipo 2
ATPase	Adenosina Trifosfatase
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid,tetraacetoxymethyl Ester
BNP	Peptídeo natriurético cerebral ou peptídeo natriurético tipo B
BRDU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
$\text{Ca}^{2+}$	Íon cálcio
CCA	Centro de ciência animal
CEUA	Comitê de ética de uso animal

CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DAG	Diacilglicerol
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EGFr	Fator de crescimento epidermal
EGRs	Elementos responsivos do receptor glicocorticóide
ENac	Canal epitelial de sódio
Epac	Proteína ativadora ativada diretamente por AMPc
EPHESUS	<i>Eplerenone Heart failure na Survival study</i> – Pricipal estudo clinic sobre eplerenona
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
FLUO4-AM	2-([2-(2-(5-[bis(carboximetil)amino]-2-metilfenoxi)ethoxi)-4-(2,7-difluoro-6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)fenil](carboximetil)amino)ácido acético
fmol	Ficomol
FLC	Fosfolipase C
g/mol	Gramas/mol
GAPDH	Gliceraldeíno-3-fosfato-desidrogenase
GATA4	Fator de transcrição que se liga à sequência “GATA” do DNA
GC	Guanilato ciclase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GDP	Guanosina difosfato
Gi	Proteína G inibitória
GMPc	Guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico
GR	Receptor glicocorticoide
GR $\alpha$	Isoforma de receptor glicocorticoide
GR $\beta$	Isoforma de receptor glicocorticoide
Gq	Proteína G tipo q
Gs	Proteína G estimulatória
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Guanosina trifosfatase
HA	Hipertensão arterial
HCl	Cloreto de hidrogênio
HPA	Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal
HSPs	<i>Heat shock protein</i> – Proteínas de choque térmico

IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthina
IC	Insuficiência cardíaca
IP	Iodeto de propídio
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
JNK	c-Jun quinase
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
mAKAP	Proteína adaptadora de proteína quinase A muscular
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPK1/2	Proteína quinase ativada por mitógeno tipo 1/2
MEK 5	Quinase quinase regulada por sinais extracelulares
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol/ L	Milimol por litro
MR	Receptor mineralocorticoide
NFkB	NF-kappaB - Fator de transcrição
NHE	Trocador de sódio/hidrogênio
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NR3C2	Gene que codifica receptor mineralocorticoide humano
°C	Graus Celsius
PA	Pressão arterial
PDE2	Fosfodiesterase 2
PDE3	Fosfodiesterase 3
PDE4D3	Fosfodiesterase 4D3
PDE5	Fosfodiesterase 5
pH	Potencial de Hidrogênio
PI3K	Inositol tri-fosfato quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKCε	Proteína quinase C tipo épsilon

PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
pmol/mL	Picomol por mililitro
PVDF	Membrana de polivinilidina difluorido
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona
Rap1	Proteína vital para eficácia da transdução de sinal
Ras	Membro da família de proteína Rap fundamental na proliferação celular
RALES	<i>Randomized Aldosterone Evaluation Study</i> – Principal estudo clinic sobre espironolactona
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão da média
SGK	Quinase sérica induzida por glicocorticóide
UI	Unidades internacionais
VSMC	Musculatura vascular lisa
w/v	Peso por volume
WB	Western blot
WST-1	Sal de tetrazólio solúvel em água
$\Delta$	Delta, variação
11 $\beta$ HSD2	Enzima 11 $\beta$ -hydroxiesteroide desidrogenase tipo 2

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 - ANTAGONISTAS DO RECEPTOR MINERALOCORTICÓIDE .....	23
1.1.1 – Espironolactona .....	25
1.1.2 – Eplerenona .....	28
1.2 – ALDOSTERONA.....	30
1.3 - RECEPTOR MINERALOCORTICÓIDE .....	33
1.4 – RECEPTORES GLICOCORTICÓIDES .....	35
1.5 – RESPOSTA DIRETA DE AGONISTA E ANTAGONISTAS DE MR.....	39
<b>2 – OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>3 – MATERIAS &amp; MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.1 – ANIMAIS .....	44
3.2 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	45
3.3 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS.....	47
3.4 – PREPARO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CARDIOMIÓCITOS E FIBROBLASTOS.....	48
3.5 – AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS E FIBROBLASTOS.....	50
3.6 – ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR .....	51
3.7 – DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS EM CARDIOMIÓCITOS .....	52
3.7.1 – Cálcio ( $Ca^{2+}$ ).....	52
3.7.2 – Adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) .....	53
3.7.3 – Guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (GMPc).....	54
3.8 – ATIVIDADE DE PKC .....	54
3.9 – ATIVIDADE DE P-ERK1/2 ATRAVÉS DE <i>WESTERN BLOT</i> .....	55
3.9.1 – Gel .....	56
3.9.2 – Verificação da ativação de ERK1/2.....	56

3.9.3 – Verificação da expressão de GAPDH como normalizador do ensaio .....	56
3.14 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	56
<b>4 – RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
4.1 – DETERMINAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	58
4.1.1 – Fibroblastos .....	58
4.1.2 – Cardiomiócitos .....	60
4.2 – ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR .....	62
4.3 – ANÁLISE DE SEGUNDOS MENSAGEIROS .....	63
4.3.1 - Cálcio bivalente (Ca <sup>2+</sup> ).....	63
4.3.2 – Adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) .....	65
4.3.3 - Guanosina 3',5' - monofosfato cíclico (GMPc).....	67
4.4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PKC .....	69
4.5 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ERK1/2.....	70
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>6 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>8 - ANEXOS .....</b>	<b>100</b>
8.1 – Certificado de aprovação do comitê de ética de uso animal.....	100

# *INTRODUÇÃO*

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 - ANTAGONISTAS DO RECEPTOR MINERALOCORTICÓIDE

Dois importantes estudos clínicos, o *Randomized ALdosterone Evaluation Study* (RALES) (Pitt, Zannad *et al.*, 1999) e o *EPlerenone HEart failure and SURvival Study* (EPHESUS) (Pitt, Remme *et al.*, 2003), indicaram que os antagonistas de receptor mineralocorticoide (MR) reduzem a mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca e disfunção ventricular esquerda pós-infarto. O mecanismo responsável por essa diminuição da mortalidade promovida pelos antagonistas de MR pode envolver mudanças na excreção renal de eletrólitos e inibição da fibrose miocárdica (Danser, 2006). Adicionalmente, a superexpressão condicional de MR em corações de camundongos, na ausência de aldosteronemia, têm resultado em arritmias ventriculares severas (Ouvrard-Pascaud, Sainte-Marie *et al.*, 2005). Aparentemente, o MR cardíaco é responsável por desencadear arritmias, proporcionando assim um mecanismo adicional, através do qual, antagonistas do MR são responsáveis por reduzirem a mortalidade desses pacientes (Danser, 2006).

Um número crescente de estudos suporta algumas funções específicas do MR como um mediador do estresse oxidativo e subsequente inflamação, fibrose e aterosclerose. Elevações na aldosterona circulante são acompanhadas por um fenótipo vascular pró-inflamatório e fibrogênico e uma vez que este fenômeno pode ser bloqueado por antagonistas de MR e anti-oxidantes, a aldosterona (via MR) parece também estar envolvida nesses efeitos (Danser, 2006).

Em relação à promoção de estresse oxidativo, em estudo anterior, a aldosterona demonstrou, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, promover aumento do estresse oxidativo através da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, devido à redução da atividade dessa enzima pelo aumento das concentrações de aldosterona reduzindo, portanto, a capacidade antioxidante e aumentando esse estresse. Esse mesmo estudo demonstrou que a espironolactona, através do bloqueio de receptor mineralocorticoide, é capaz de melhorar a nefropatia em ratos diabéticos e hipertensos por restaurar a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, diminuindo o estresse oxidativo sem afetar a pressão arterial e a glicemia (Pessôa, 2010).

Órgãos como coração, vasos e sistema nervoso central são apontados como novos alvos da ação da aldosterona. A localização dos receptores de mineralocorticóides já foi



descrito, nos tecidos cardíacos (Funder, Pearce *et al.*, 1988; Lombes, Binart *et al.*, 1993) e na vasculatura (Funder, Pearce *et al.*, 1988; Takeda, Miyamori *et al.*, 1995; Weber, 2001; Funder, 2002). Isto indica uma gama de outros possíveis efeitos da aldosterona, mediados pela ativação dos receptores de mineralocorticóides nestes tecidos.

Tais efeitos envolvem aumento da pressão sanguínea, hipertrofia do ventrículo esquerdo e fibrose cardíaca (Nappi e Sieg, 2011). No sistema vascular a aldosterona apresenta efeitos nocivos no endotélio, reduzindo a produção de óxido nítrico (Farquharson e Struthers, 2000), além de aumento da resistência vascular sistêmica e aumento da atividade vasoconstritora da angiotensina II nas artérias coronárias (Nappi e Sieg, 2011).

Adicionalmente, no cérebro, a aldosterona pode exercer um papel fisiopatológico sobre a isquemia, através de remodelamento vascular, prova disso é que doses pequenas de espironolactona são capazes de prevenir acidente vascular cerebral de ratos hipertensos suscetíveis ao infarto (Dorrance, Osborn *et al.*, 2001).

Dentre os antagonistas de receptor mineralocorticoide usados em pesquisas científicas, estão alguns componentes da série RU (sintetizados pela empresa farmacêutica francesa Roussel-Uclaf), como o RU26752 e o RU28318 (Alzamora, Michea *et al.*, 2000).

Por também ser expresso no trato reprodutivo, inclusive nas células granulosas do ovário, alguns estudos sugerem que o receptor mineralocorticoide pode estar envolvido na regulação da síntese de progesterona. Nesse contexto, a progesterona por si só é um antagonista de MR e, curiosamente, também é a molécula progenitora para os antagonistas de MR em uso clínico, espironolactona e eplerenona (Fuller, Yao *et al.*, 2012)

Dessa forma, os principais antagonistas do MR disponíveis comercialmente até o presente momento são a espironolactona e a eplerenona, que têm demonstrado possuir excelentes efeitos no tratamento de pacientes com disfunção ventricular esquerda e evidência clínica de insuficiência cardíaca (IC) após infarto do miocárdio (Pitt, Zannad *et al.*, 1999; Pitt, Remme *et al.*, 2003).

Embora a espironolactona e a eplerenona sejam usadas para melhorar o prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca grave, elas possuem diferenças estruturais significantes. A espironolactona é um anti-mineralocorticóide com efeitos progesterogênicos e anti-androgênicos, enquanto a eplerenona é um derivado produzido para aumentar a seletividade ao receptor mineralocorticoide enquanto minimiza esses efeitos agonistas da espironolactona (McMahon, 2001).

Grande parte dos efeitos citados para a aldosterona pode ser, pelo menos parcialmente, revertidos por seus antagonistas. No entanto, muitos efeitos atribuídos a este antagonismo

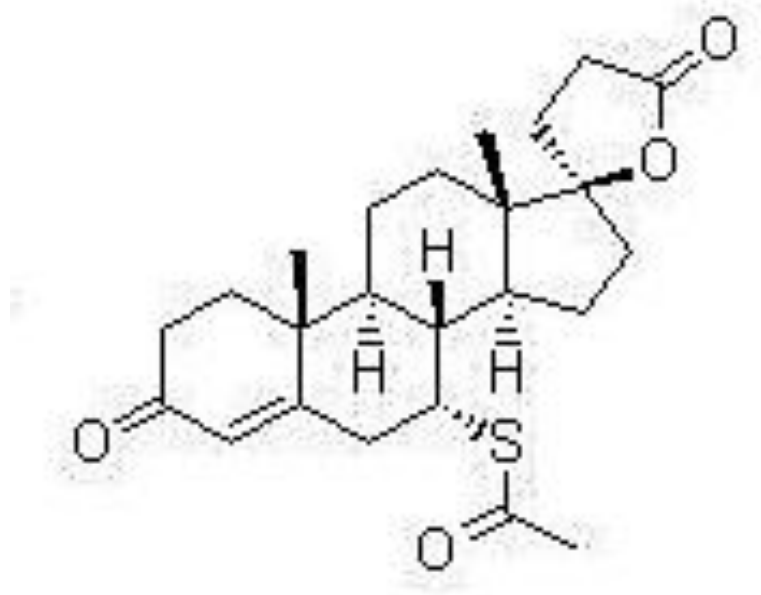
ocorrem mesmo na ausência de níveis elevados de aldosterona, demonstrando que ainda falta muito conhecimento sobre o mecanismo desses fármacos nos diferentes tecidos e, principalmente no tecido cardíaco.

Dessa forma, conhecendo-se os efeitos benéficos desses antagonistas (principalmente espironolactona e eplerenona) no tratamento de doenças cardíacas, um de nossos objetivos no presente trabalho é avaliar comparativamente o efeito *per se* dessas drogas na cardioproteção.

### 1.1.1 – Espironolactona

A Espironolactona (17-Hidroxi-7- $\alpha$ -mercaptana-3-oxo-17- $\alpha$ -pregn-4-eno-21-ácido carboxílico- $\gamma$ -lactona-7-acetato) é o nome genérico e o princípio ativo do medicamento Aldactone®. É praticamente insolúvel em água e acetato de etila, livremente solúvel em clorofórmio, levemente solúvel em éter, álcool metílico e óleos fixos. Possui peso molecular igual a 416,57 e fórmula química de  $C_{24}H_{32}O_4S$  (Fig. 1).

Ela e outros antagonistas do receptor da aldosterona foram desenvolvidos, originalmente, na tentativa de neutralizar os efeitos desse hormônio, principalmente os efeitos relacionados à excreção de potássio. A espironolactona, foi usada por décadas na administração de excesso de volume sanguíneo, embora geralmente exerça um papel secundário em relação aos diuréticos mais potentes (Nappi e Sieg, 2011).



**Figura 1:** Estrutura química da espironolactona (17-Hidroxi-7- $\alpha$ -mercaptana-3-oxo-17- $\alpha$ -pregn-4-eno-21-ácido carboxílico- $\gamma$ -lactona-7-acetato).

A espironolactona foi isolada pela primeira vez no início dos anos 60 (Funder, 2003) e tem sido usada para reverter efeitos adversos no sistema cardiovascular em muitos pacientes com doença cardíaca crônica como insuficiência cardíaca congênita e hipertrofia do miocárdio (Sohn, Yoo *et al.*, 2010). No mesmo estudo foi demonstrado que, em corações de filhotes de rato da linhagem *Spregue Dawley* tratados com espironolactona 200mg/kg, a expressão da proteína p38 (subfamília de proteína quinase ativada por mitógeno que regula vários processos celulares, como inibição de crescimento celular e diferenciação celular, indução de apoptose e respostas celulares à inflamação) foi significativamente diminuída pelo antagonista, diminuindo, também, a apoptose dos miócitos de miocárdio nos ratos tratados.

Adicionalmente, em ratos que sofreram uninefrectomia (extração da massa renal) e receberam tratamento com aldosterona e sal, a espironolactona foi capaz de prevenir a fibrose cardíaca, mesmo quando administrada em doses que não previnem a hipertensão e a hipertrofia ventricular esquerda (Weber, 2001).

Altas doses de espironolactona também promoveram redução sérica na concentração de marcadores de síntese de colágeno (propeptídeo N-terminal de procolágeno tipo III) em pacientes com insuficiência cardíaca sintomática, devido à doença isquêmica do coração (Macfadyen, Barr *et al.*, 1997). Hayashi e colaboradores também demonstraram os efeitos benéficos da administração imediata (nas primeiras 24 horas) de espironolactona em pacientes após o infarto agudo do miocárdio (Hayashi, Tsutamoto *et al.*, 2003). Esses estudos, portanto, sugerem uma atenuação na remodelagem estrutural cardíaca pela espironolactona.

A espironolactona também é capaz de prevenir efeitos deletérios, não apenas da aldosterona, mas também de cortisol, dexametasona, RU486 (mifepristona - antagonista de Receptor Glicorticóide) e outros esteróides, diminuindo o tamanho da área infartada e a apoptose a níveis inferiores aos do controle (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009). Esse antagonista possui meia vida menor ( $T_{1/2} = 1.3-1.4$  horas) que a eplerenona ( $T_{1/2} = 4-6$  horas), porém é metabolizado em três metabólitos (7- $\alpha$ -(tiometil) espironolactona; 6- $\beta$ -hidroxi-7- $\alpha$ -(tiometil) espironolactona e carenona) com atividade prolongada e que são excretados pelos rins, sendo, então, necessário um estreito monitoramento caso a espironolactona seja administrada a pacientes com insuficiência renal, pois doses inapropriadas podem gerar uma não eliminação do antagonista, promovendo um acúmulo da droga e uma acumulação sérica de potássio (Nappi e Sieg, 2011).

Estudos realizados através da incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina em fibroblastos cardíacos demonstraram uma inibição do efeito mitogênico da aldosterona (10 nM) pela espironolactona (0,1 μM) nesse tipo celular. A proliferação de fibroblastos cardíacos ativos, seguida de excesso de deposição de matriz, são as duas principais causas de desenvolvimento de estados patológicos e subsequente fibrose cardíaca (Stockand e Meszaros, 2003). Dessa forma, a espironolactona pode prevenir a fibrose miocárdica, por bloquear os efeitos da aldosterona na formação de colágeno.

Doses diárias de 12.5 a 25 mg de espironolactona têm efeitos farmacológicos no bloqueio de receptores da aldosterona e promovem diminuição da concentração de peptídeo natriurético atrial e hipercalcemia (Pitt, Zannad *et al.*, 1999).

Uma limitação ao uso da espironolactona está associada com sua ação sobre os receptores de andrógenos e progesterona que permitem que ela tenha efeitos sexuais secundários tanto dose-dependente, como duração-dependente, que são responsáveis por sua tolerabilidade (Nappi e Sieg, 2011). De acordo com o RALES, esse antagonista está associado com 10% de incidência de ginecomastia ou mastodinia em homens (Pitt, Zannad *et al.*, 1999).

A aldosterona é um hormônio esteróide com uma estrutura química muito similar à progesterona e aos andrógenos. Todos estes hormônios são sintetizados a partir do colesterol. Assim, esse antagonista dos receptores mineralocorticóides também pode apresentar afinidade pelos receptores androgênicos, estrogênicos e progesterogênicos (Núñez e Tamargo, 2006). A Tabela 1, a seguir, mostra as diferenças de afinidades dos antagonistas da aldosterona e os diversos receptores.

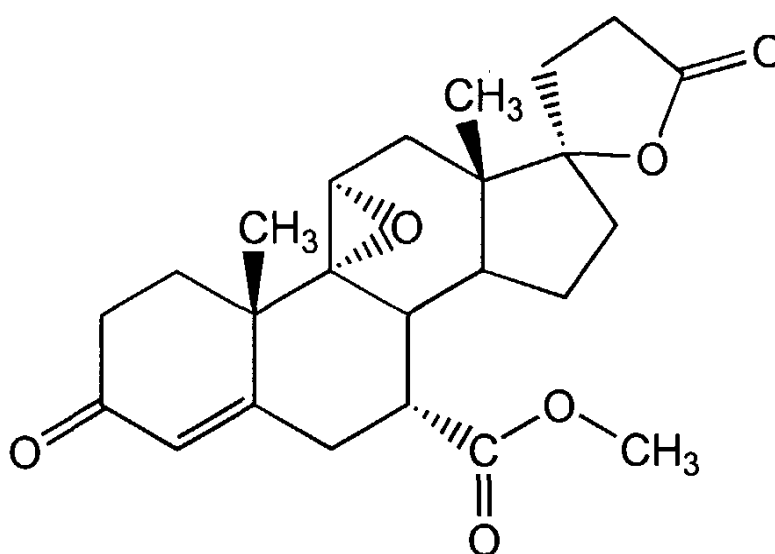
**Tabela 1: Comparação da afinidade da espironolactona e eplerenona por diversos receptores esteróides**

Receptor	RO <sub>50</sub> espironolactona (μmol/l)	RO <sub>50</sub> eplerenona (μmol/l)
Mineralocorticóide	0,002	0,081
Glicocorticóide	2,899	>100
Andrógeno	0,013	4,827
Progesterona	2,619	>100

Os valores expressam a concentração de fármaco necessária para inibir 50% da resposta obtida (RO<sub>50</sub>) com 0,5 nmol/l de aldosterona (receptor mineralocorticóide), 5 nmol/l de dexametasona (receptor glicocorticóide) e 10 nmol/l de dihidrotestosterona (receptor de andrógenos) e a concentração de fármaco que produz uma ativação de 50% dos receptores de progesterona. Fonte: Adaptado de Lucía Núñez e Tamargo (2006, p. 37B) (Núñez e Tamargo, 2006)

### 1.1.2 – Eplerenona

A eplerenona (9,11 $\alpha$ -epoxi-17-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-7 $\alpha$ ,21-ácido dicarboxílico- $\gamma$ -lactona metil este) é o nome genérico e o princípio ativo do medicamento Inspra®. Possui peso molecular igual a 414,50 e fórmula química de C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub> (Fig.2). Além de ser um antagonista competitivo da aldosterona, derivado da espironolactona, ela possui seus efeitos progesterônicos e anti-androgênicos minimizados, o que potencializa sua seletividade ao receptor de aldosterona (Núñez e Tamargo, 2006).

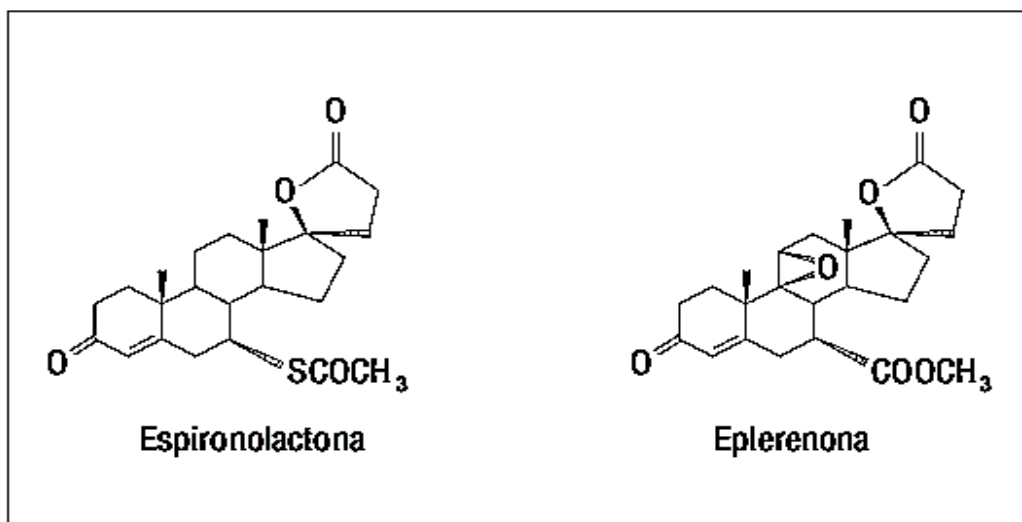


**Figura 2:** Estrutura química da eplerenona (9,11 $\alpha$ -epoxi-17-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-7 $\alpha$ ,21-ácido dicarboxílico- $\gamma$ -lactona metil este).

Atualmente, a eplerenona vem sendo muito usada por não possuir os efeitos colaterais gerados pela espironolactona em tratamentos crônicos. Como visto na Tabela 1, a eplerenona possui baixíssima afinidade pelos receptores de glicocorticóides e de progesterona, já que são necessárias concentrações superiores a 100  $\mu$ mol/l para ativar os receptores de progesterona e para inibir os receptores glicocorticóides. Porém, quando se compara a afinidade da espironolactona e da eplerenona pelos receptores mineralocorticóides, se observa que a eplerenona também apresenta uma afinidade 40 vezes menor.

Entretanto, estudos *in vivo* têm demonstrado que ambos os fármacos possuem uma potência similar no bloqueio de MR. Uma possível explicação para essa discrepância pode ser a diferença na proporção da união de proteínas plasmáticas dos dois fármacos, já que a proporção de ligação da espironolactona é de 90%, enquanto a de eplerenona é de 49% (Núñez e Tamargo, 2006; Nappi e Sieg, 2011). A principal diferença estrutural entre a

espirolactona e a eplerenona é a substituição do grupo  $\alpha$ -tio acetil por um grupo carbometoxi no carbono 17 e a introdução de uma ponte  $9\alpha$  e  $11\alpha$  (Fig.3) (Pitt, Remme *et al.*, 2003). Essa diferença estrutural é responsável por conferir à eplerenona uma maior seletividade para o MR.



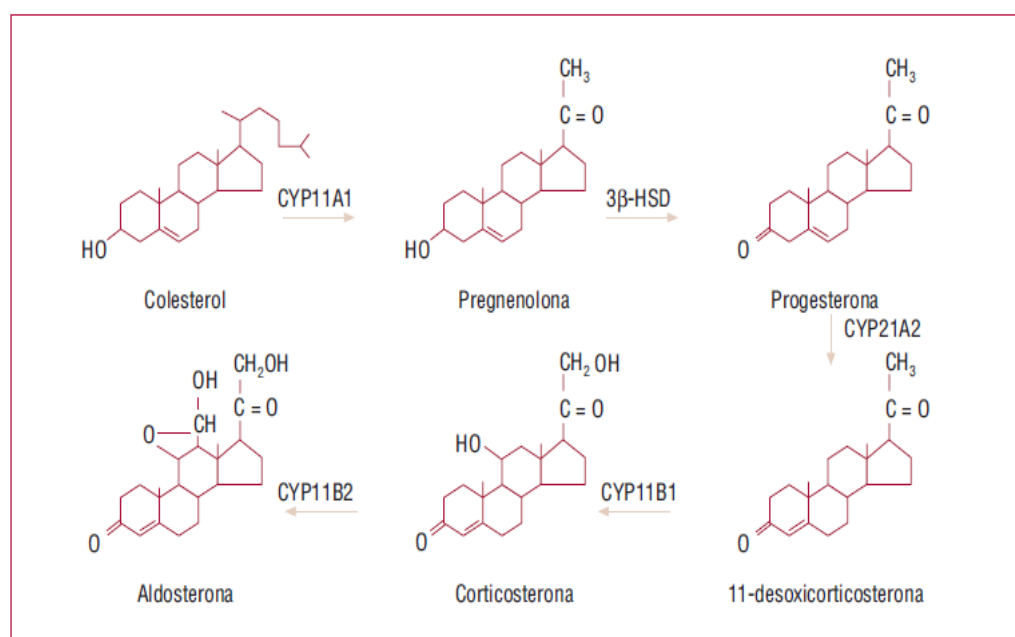
**Figura 3:** Estruturas químicas da espirolactona e da eplerenona. Fonte: Adaptado de Lucía Núñez e Tamargo (2006, p. 36B) (Núñez e Tamargo, 2006).

O EPHEUS demonstrou que adição diária de eplerenona (50mg) no tratamento de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio resultou na redução da mortalidade e na hospitalização desses pacientes por motivos cardiovasculares (Alzamora, Marusic *et al.*, 2003; Michea, Delpiano *et al.*, 2005).

Esse antagonista, além de ser capaz de antagonizar algumas ações não genômicas da aldosterona na atividade vascular, que se produzem pela ativação de diversas vias de sinalização como, por exemplo, MAPK, PKC e PI3K (Núñez e Tamargo, 2006), também produz um efeito anti-hipertensivo, como consequência do bloqueio do MR, tanto em tecidos epiteliais, como nos não epiteliais. Assim, a eplerenona antagoniza o aumento da reabsorção de Na<sup>+</sup> e água nos túbulos distal e coletor provocado pela aldosterona e aumenta a excreção de K<sup>+</sup> (Faiez Zannad, Karl Swedberg *et al.*, 2011).

## 1.2 – ALDOSTERONA

A aldosterona é o mais importante hormônio mineralocorticoide, e em mamíferos é sintetizada a partir do colesterol (Fig. 4) na zona granulosa do córtex da supra-renal. Ela exerce papel essencial na homeostase de água e eletrólitos (retenção de sódio e aumento de volume sanguíneo). Sua fórmula e peso molecular são  $C_{21}H_{28}O_5$  e 360.4 [g/mol], respectivamente. Esse hormônio exerce os seus efeitos de regulação e reabsorção de solutos nos tecidos epiteliais dos rins, do cólon e em tecidos não-epiteliais, tais como o cérebro e o sistema cardiovascular (Dooley, Harvey *et al.*, 2011b).



**Figura 4:** Biossíntese da Aldosterona. CYP: isoformas de citocromo P450; 3β-HSD: 3βhidroxiesteroide-deshidrogenase. Fonte: Lucía Núñez e Tamargo (2006, p. 32B)

Esse hormônio está inserido em uma importante cascata de sinalização de proteção dos rins que se inicia com a queda de pressão arterial, conhecida por sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). O RAAS é um sistema neuroendócrino complexo, responsável pela modulação do equilíbrio hidroeletrólítico 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 a

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, Palma *et al.*, 2010).

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 e por uma redução da concentração de sódio na mácula densa. A renina catalisa a hidrólise de angiotensinogênio em AngI que depois é convertida em AngII pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente nos pulmões e tecido vascular. A AngII atua no músculo liso vascular para causar vasoconstrição, e na zona granular da adrenal para estimular a secreção de aldosterona. A resposta adrenal a AngII ocorre em poucos minutos, o que mostra que nenhuma síntese proteica é necessária (Alves, 2007).

A ação da aldosterona sobre receptores mineralocorticóides nos rins causa retenção de sódio e subsequente aumento no volume sanguíneo. Esse hormônio atua promovendo a reabsorção de sódio e excreção de potássio (Alves, 2007). A água segue o movimento do sódio, via osmose, estabilizando o volume plasmático e, conseqüentemente, a pressão arterial (Balakumar e Jagadeesh, 2010). Conseqüentemente, o excesso de aldosterona causa hipertensão, que é conhecida por apresentar efeitos adversos no sistema cardiovascular (Takeda, 2004). Entretanto, existem também evidências de que a aldosterona exerça efeitos diretos sobre o sistema cardiovascular, independentes do aumento de pressão sanguínea, pois o excesso de aldosterona parece promover conseqüências adversas, não só em pacientes com hipertensão, mas também em pacientes com diabetes mellitus e doença renal crônica (Swedberg, 1990; Rossier, Python *et al.*, 2010).

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 disso, foi demonstrado que o aumento crônico da concentração de aldosterona no plasma contribui para problemas fisiopatológicos do coração (Dooley, Harvey *et al.*, 2011b). 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 (Oberleithner, Ludwig *et al.*, 2004).



Células endoteliais respondem diretamente a mineralocorticóides com aumento de volume, (Oberleithner, 2005) e enrijecimento (Rossi, Sacchetto *et al.*, 1996; Balakumar e Jagadeesh, 2010). As células cardíacas também são capazes de responderem à aldosterona. Isso é comprovado por estudos que demonstraram que pacientes com aldosteronismo primário têm um aumento de risco de hipertrofia do ventrículo esquerdo, comparados a pacientes hipertensos de severidade semelhante (Stowasser, 2005).

Estudos realizados 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) demonstraram 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 (Pitt, Zannad *et al.*, 1999; Lemarie, Simeone *et al.*, 2009; Xue, Beltz *et al.*, 2011).

O *Randomized ALdactone Evaluation Study (RALES)* demonstrou que a aldosterona desempenha papel fundamental em doenças cardíacas (Stockand e Meszaros, 2003). Estudos adicionais realizados *in vitro* e *in vivo* suportaram os resultados do RALES por demonstrarem que a aldosterona altera a remodelagem cardíaca e promove fibrose (Brilla, Zhou *et al.*, 1994; Fullerton e Funder, 1994; Kohler, Bertschin *et al.*, 1996). Além disso, a aldosterona, em alguns modelos *in vitro*, promove a produção de colágeno em fibroblastos cardíacos (Brilla, Matsubara *et al.*, 1993) e *in vivo* aumenta a deposição de colágeno, fibrose e necrose (Rossier, Python *et al.*, 2010)

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 (Nagata, Somura *et al.*, 2002). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o bloqueio do RAAS com inibidores de enzimas conversoras de angiotensina, bloqueadores do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1) ou antagonistas de receptores mineralocorticóides (MR) promovem substancial proteção cardiovascular (Rossier, Python *et al.*, 2010). O eixo, aldosterona receptor mineralocorticoide, 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 (Chun, Bloem *et al.*, 2003).

Pacientes que sofrem infarto do miocárdio são tratados com antagonistas de receptores mineralocorticoides da aldosterona. Os altos níveis de aldosterona apresentados por esses pacientes são associados com o aumento de fibrose e morte do miocárdio. Aldosterona é, atualmente, reconhecida como potencialmente cardioprotóxica, embora seus efeitos locais no coração ainda sejam pouco compreendidos (Grossmann e Gekle, 2009).

### 1.3 - RECEPTOR MINERALOCORTICÓIDE

A aldosterona é conhecida por possuir dois mecanismos de ação. O mecanismo de ação direto da aldosterona foi descrito mais recentemente, e ao contrário do mecanismo genômico, as respostas rápidas da aldosterona ocorrem dentro de segundos a minutos, não envolvendo a transcrição ou tradução e são capazes de modular, direta ou indiretamente as respostas depois da via genômica (Losel, Falkenstein *et al.*, 2003). Estes efeitos se caracterizam por serem extremamente rápidos (no máximo minutos), insensíveis aos inibidores de transcrição (actinomicina D) e de síntese proteica (cicloexemida) e por apresentarem um perfil farmacológico diferenciado com relação ao agonismo e antagonismo (Yang, Chang *et al.*, 2010). A ação direta da aldosterona será melhor discutido no item 1.5.

O mecanismo de ação genômica desse hormônio está presente em seus órgãos-alvo através da ligação a seus receptores MR, localizados na região externa da membrana nuclear (Funder, Pearce *et al.*, 1988; Lombes, Binart *et al.*, 1993; Yang, Chang *et al.*, 2010). Uma vez ativado, o então formado, complexo receptor-aldosterona transloca-se para o núcleo, ligando-se a regiões específicas do DNA, que são similares aos dos glicocorticóides, progesterona e hormônios andrógenos (Bernard, Wang *et al.*, 2009). Após a ligação ao DNA, o complexo receptor-hormônio estimula a transcrição de genes alvos que incluem os genes responsáveis por codificar proteínas para os canais amilorida de sódio sensíveis ENaC, Na/K-ATPase, SGK e quinases. Todas essas proteínas são fatores chave no controle da reabsorção de sódio no organismo (Heineke e Molkenin, 2006).

Existem vários estudos que 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 (Bueno, De Windt *et al.*, 2000). Estudos demonstram que o melhor candidato para caracterizar essa expressão talvez seja o fator GATA4 (fator de transcrição com habilidade para se ligar à sequência “GATA” do DNA). contendo a transcrição que regulamenta o desenvolvimento e

diferenciação da expressão gênica específica cardíaca (Akazawa e Komuro, 2003). O GATA4 durante o estresse fisiopatológico medeia a indução de genes que estão envolvidos na hipertrofia cardíaca (Marver, Stewart *et al.*, 1974).

No final dos anos 1960, evidências para a presença de determinados receptores de corticosteróides foram mostrados inicialmente por Porter e Edelman (Porter e Edelman, 1964). Posteriormente, receptores tipo I, e tipo II de corticosteróides foram descritos e identificados como mineralocorticóide (MR) e receptor glicocorticóide (GR) (Yang, Chang *et al.*, 2010).

O receptor mineralocorticóide é um membro da superfamília de receptores nucleares (Funder, Feldman *et al.*, 1972), e foi caracterizado como um dos principais reguladores da reabsorção de sódio nos rins, (Greenwood, Butler *et al.*, 2003). Posteriormente, o MR foi clonado e caracterizado em várias espécies, incluindo peixe-zebra, (Sturm, Bury *et al.*, 2005) e truta arco-íris, (O'malley, 2008).

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 (Fuller, Yao *et al.*, 2012).

Receptores mineralocorticoides podem ser encontrados tanto em tecidos epiteliais como em não epiteliais. Em alguns tecidos epiteliais como o pulmão, ainda não é bem estabelecida a função do MR no transporte de eletrólitos. No tecido adiposo, este receptor parece ter papel fundamental na diferenciação de adipócitos. Já no sistema cardiovascular, o MR é expresso não somente em cardiomiócitos, como também no endotélio, nas células da musculatura lisa vascular (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009) e em fibroblastos (Stockand e Meszaros, 2003).

Na vasculatura existe uma coexpressão do receptor com a enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ HSD2). A 11 $\beta$ HSD2, quando presente, é responsável pela ativação seletiva do MR pela aldosterona, já que eles podem ser ativados tanto pela aldosterona como pelo cortisol e corticosterona (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009). Como em cardiomiócitos essa enzima é expressa em baixíssimos níveis (Rossier, Python *et al.*, 2010), o MR cardíaco *in vivo* será continuamente ocupado por glicocorticoides, porém, de acordo com Funder (Funder, 2009) não será ativado na ausência de danos do tecido ou estresse oxidativo.

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 (Pascual-Le Tallec e Lombes, 2005). Este gene é composto por dez éxons, sendo que os dois primeiros éxons, 1 $\alpha$  e 1 $\beta$ , 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 (Yang, Chang *et al.*, 2010; Dooley, Harvey *et al.*, 2011b; a).

Recentemente, Latouche e colaboradores conseguiram demonstrar que a maioria dos genes regulados pela ação do MR difere dos genes regulados por GR, possuindo uma sobreposição limitada, sugerindo um papel específico da ativação do MR no coração (Latouche, Sainte-Marie *et al.*, 2010).

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) do MR (Funder, Pearce *et al.*, 1988; Lombes, Oblin *et al.*, 1992), translocação do complexo aldosterona-MR para o núcleo e a concomitante regulação da expressão gênica.

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 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ATPase,  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPase,  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ), funcionando, assim, como tampões intracelulares (Fernandes-Rosa, 2006).

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. 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 (Yang, Chang *et al.*, 2010). 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 (Sanchez-Mas, Turpin *et al.*, 2010).

#### 1.4 – RECEPTORES GLICOCORTICÓIDES

Hormônios corticosteróides são divididos em glicocorticóides e mineralocorticóides, os quais são secretados pelo córtex adrenal. Os níveis dos corticosteróides são regulados por mecanismos de “feedback” envolvendo o eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA). Mudanças ambientais ativam o eixo HPA elevando os corticosteróides (Peter, Beato *et al.*,

1989). O cortisol é o glicocorticóide fisiológico dos humanos enquanto nos roedores é a corticosterona. Glicocorticóides atuam via receptor GR e influenciam o metabolismo celular e processos inflamatórios. Aldosterona atua via receptores mineralocorticóides e controla o transporte através de membranas. GR e MR são fatores de transcrição com especificidade de ligação, que ao se ligarem às proteínas “heat shock” em seu estado inativado são translocados para o núcleo. Elementos específicos responsivos a glicocorticóides estão presentes nos genes, intermediando efeitos sobre a transcrição gênica (Farman e Rafestin-Oblin, 2001).

Os receptores glicocorticóides, assim como, os mineralocorticóides pertencem à família dos receptores nucleares que incluem os receptores para os hormônios esteroides, da tireóide, vitamina D<sub>3</sub>, ácido retinóico e outros numerosos receptores órfãos para os quais ainda não se tem ligantes conhecidos (Ju, Wang *et al.*, 2009). Estes receptores foram identificados nos anos 1980 (Yamamoto, 1985; Miesfeld, Rusconi *et al.*, 1986) e são moléculas importantes na sinalização endócrina, no controle de reprodução, desenvolvimento, metabolismo e nas respostas celulares especializadas como inflamação e imunidade. GRs estão presentes no citoplasma como complexo multiproteico contendo (co) chaperonas semelhantes às proteínas de choque térmico (HSPs) e imunofilinas (Franchimont, 2004).

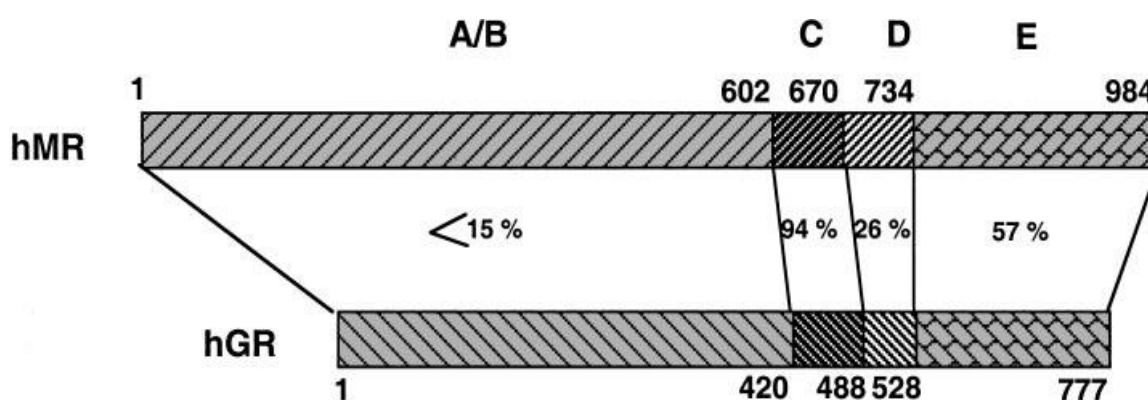
Após sua ligação com o glicocorticóide no citoplasma, o receptor ativado é translocado para o interior do núcleo e, subsequentemente ligado à elementos responsivos do GR (EGRs) nas regiões promotoras dos genes alvos (Lowenberg, Tuynman *et al.*, 2005) resultando na ativação ou inibição do RNAm e síntese protéica como, ativador de proteína 1 (AP1) e fator nuclear K $\beta$  (NF $\kappa$ B) (Hafezi-Moghadam, Simoncini *et al.*, 2002). Porém, recentemente, alguns estudos vêm demonstrando alguns efeitos de glicocorticóides mediados por mecanismos não genômicos como, por exemplo, a ativação não-transcricional de eNOS por corticosteróides (Ju, Wang *et al.*, 2009).

Além de seus efeitos genômicos, estudos recentes têm noticiado efeitos não genômicos de receptores glicocorticóides, que podem ser mediados via GR ligado à membrana ou citosólico (Song e Buttgerit, 2006). Adicionalmente, pesquisas indicam que os efeitos não genômicos de glicocorticóides podem ser parcialmente responsáveis pelos seus efeitos benéficos em doenças cardiovasculares (Pitzalis, Pipitone *et al.*, 2002).

O gene que expressa o receptor glicocorticóide está localizado no cromossomo 18 e é formado por 8 éxons e 7 íntrons, abrangendo mais de 60 kb do genoma de rato, com a codificação de proteínas a partir do éxon 1 (Patrick W.F. Hadoke, 2009). Duas isoformas diferentes de GR, GR $\alpha$  e GR $\beta$ , foram identificadas em humanos. O GR $\alpha$  desempenha papel importante no efeito genômico de glicocorticóides. Ele tem alta afinidade para esses

hormônios e está presente em praticamente todos os organismos (Oakley, Webster *et al.*, 1997), enquanto o GR $\beta$  tem papel negativo sobre o GR $\alpha$  através de formação de heterodímeros GR $\beta$  /GR $\alpha$  (Patrick W.F. Hadoke, 2009) e é expresso somente em humanos (Farman e Rafestin-Oblin, 2001).

Esses receptores possuem estruturas que compreendem de cinco a seis regiões (Fig. 5). A região NH<sub>2</sub>-terminal A/B abriga uma função de ativação autônoma. O domínio central C funciona como domínio de ligação do DNA e é altamente conservado. E a região hidrofílica D forma uma articulação entre o domínio de ligação do DNA e o COOH-terminal de ligação do ligante (E) (Latouche, Sainte-Marie *et al.*, 2010).



**Figura 5:** Representação esquemática da estrutura do MR humano (hMR) e receptor glicocorticóide (hGR) com a porcentagem de aminoácidos idênticos que aparecem em cada domínio (A-E). Fonte: Farman e Rafestin-Oblin (2001, p. F182).

Como visto na Figura 3, embora exista uma homologia menor que 15% entre a região NH<sub>2</sub>-terminal do MR e do GR, o domínio de ligação do ligante e o domínio de ligação do DNA são muito homólogos, 57% e 94% respectivamente.

O receptor mineralocorticóide é sempre co-expresso de forma íntima com o receptor glicocorticóide em células epiteliais do néfron distal, cardiomiócitos, neurônios e outros alvos não-clássicos como queratinócitos e adipócitos (Farman e Rafestin-Oblin, 2001). A definição de eventos celulares mediados separadamente por MR *vs.* mediados por GR ainda não é bem compreendida, pois esses receptores compartilham ligantes comuns e parecem atuar de forma complementar (Latouche, Sainte-Marie *et al.*, 2010). Em particular, o MR se liga de forma similar com alta afinidade (constante de dissociação 0.5-1.0 nM) tanto à aldosterona como a glicocorticóides, que são de 100 a 1000 vezes mais abundantes no plasma que esse hormônio

mineralocorticóide. Entretanto, o GR tem afinidade inferior para ambos os hormônios (constante de dissociação 10-30nm) (Patrick W.F. Hadoke, 2009).

Assim, a capacidade de glicocorticóides de estimular tanto GR e MR, para mediar ações contrárias dependendo da concentração de esteróides, e para regular fatores sistêmicos de risco cardiovascular, bem como propriedades funcionais e estruturais de células cardíacas, vasculares e inflamatórias, torna difícil determinar quais mecanismos contribuem para patogênese cardiovasculares (Rafiq, Nakano *et al.*, 2011).

Apesar dos altos níveis de glicocorticóides circulantes, a ativação seletiva do MR pela aldosterona em tecido epitelial e células da musculatura lisa é adquirida pela co-expressão da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ HSD2), que é responsável por transformar glicocorticóides em metabólitos inativos (cortisona em humanos e 11-desidrocorticosterona em roedores) (Anastasia S. Mihailidou, 2009). Porém, essa enzima é expressa em baixíssimas concentrações em cardiomiócitos. Dessa forma, o MR dessas células são ocupados, mas não ativados, por altos níveis de glicocorticóides circulantes. Esses glicocorticóides não mimetizam a aldosterona, mas atuam como antagonistas de MR, só ativando-o na presença de estresse celular (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009).

Os antagonistas de receptor glicocorticóide mais usados atualmente são o RU28362 (Alzamora, Michea *et al.*, 2000) e a mifepristona (RU486) (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009; Rossier, Python *et al.*, 2010). Além desses, antagonistas clássicos de MRs como a espironolactona, curiosamente, também podem bloquear GRs quando usada em altas doses, devido à sua baixa especificidade para MRs (Couette, Marsaud *et al.*, 1992).

O papel do GR na função cardíaca ainda é bem controverso. Anastasia e colaboradores, em 2009, demonstraram que altas concentrações de cortisol, em um modelo de isquemia-reperfusão, pode produzir apoptose de cardiomiócitos (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009) via ativação de MR e GR (Rossier, Python *et al.*, 2010). Da mesma forma, outros estudos também demonstraram efeitos deletérios produzidos por níveis alterados de cortisol (Patrick W.F. Hadoke, 2009), assim como efeitos no aumento de risco cardiovascular causado por excesso de glicocorticóide sistêmico, devido ao aumento da secreção de esteróides endógenos ou tratamento exógeno crônico (Pearl Jm e Jy., 2002). Porém, os glicocorticóides são geralmente considerados como hormônios cardioprotetores. Alguns estudos têm demonstrado atenuação de apoptose miocárdica em porcos neonatos (Chen Qm e S., 2005) e cardiomiócitos de ratos neonatos (Hadoke, 2001). Alguns outros estudos também vêm mostrando propriedades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e anti-migratórias bem estabelecidas dos glicocorticóides que

podem vir a servir como um possível inibidor terapêutico para aterosclerose e restenose após intervenção coronariana percutânea (Gustafsson e Brunton, 2000).

Diante destes dados, não se sabe se os efeitos cardioprotetores da espironolactona e eplerenona são promovidos de forma independente da via clássica (antagonismo de receptor MR), pela ativação de GR ou ambas já que os antagonistas de MR também possuem afinidade por receptores glicocorticóides, e os próprios hormônios glicocorticóides possuem histórico de cardioproteção.

### 1.5 – RESPOSTA DIRETA DE AGONISTA E ANTAGONISTAS DE MR

Inibidores de transcrição e tradução não interferem na ação rápida da aldosterona, demonstrando que esse hormônio mineralocorticoide possui efeitos não genômicos mediados por vias de transdução de sinal adicionais (Losel, Falkenstein *et al.*, 2003).

A ação rápida da aldosterona em células da musculatura lisa vascular, artérias humanas e cardiomiócitos, sugere que a aldosterona desenvolve papel fundamental na regulação das funções cardiovasculares.

Efeitos a curto prazo da aldosterona também incluem mudanças nas concentrações de cálcio intracelular, inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e ativação de proteína quinase C (PKC) (Mihailidou, Bundgaard *et al.*, 2000). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que a aldosterona também possui efeito rápido, mas transitório, sobre as bombas de Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup> em artérias de ratos (Alzamora, Marusic *et al.*, 2003).

Esse mesmo estudo demonstrou, interessantemente, que a eplerenona foi capaz de bloquear o efeito não genômico da aldosterona em Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase em tecido vascular de rato. Da mesma forma, outros estudos também vêm demonstrando a capacidade da eplerenona de bloquear outros efeitos da ação rápida da aldosterona, como por exemplo, a vasoconstrição nos vasos de resistência mesentéricos, promovida por esse hormônio, e efeitos não genômicos na variação de Ca<sup>2+</sup> intracelular e em níveis de pH (Michea, Delpiano *et al.*, 2005). Além disso, a eplerenona foi capaz de reverter alguns efeitos diretos da aldosterona na reatividade vascular, que são produzidos pela ativação de diversas vias de sinalização, como MAPK, PKC e IP3K (Alzamora, Marusic *et al.*, 2003; Callera, Touyz *et al.*, 2005; Michea, Delpiano *et al.*, 2005)

Neste ponto, podemos dizer que os dados mostrados, até o momento, somados ao fato de que a espironolactona e eplerenona possuem excelentes efeitos no tratamento de pacientes



com disfunção ventricular esquerda e evidência clínica de insuficiência cardíaca (IC), após infarto do miocárdio, (Nunez, Valero *et al.*, 2006) e que, além disso, baixas doses de espironolactona reduzem a área infartada e apoptose celular em ratos, adrenalectomizados ou não, submetidos a isquemia e reperfusão cardíaca (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009), fornecem indícios de que a espironolactona e a eplerenona possam proteger o coração independente do seu efeito antagonista sobre a aldosterona.

Finalmente, temos elementos teóricos que nos permitem sugerir que tanto a espironolactona como a eplerenona são capazes de promover uma proteção substancial ao sistema cardiovascular, independente de sua via clássica que baseia-se no antagonismo competitivo com a aldosterona. Dessa forma, tendo-se em vista as importantes consequências da ação da aldosterona sobre o coração e somando-se a ação benéfica da espironolactona e eplerenona sobre este órgão, nossa proposta será descobrir os mecanismos de ação celular da espironolactona e da eplerenona, de forma comparativa, que levam às respostas cardioprotetoras, independente de sua via clássica ou de uma possível ligação aos receptores glicocorticoides.

*Objetivos*

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi compreender os mecanismos de ação celular da espironolactona e da eplerenona que levam a diferentes respostas cardioprotetoras, independente de sua via clássica (antagonismo do MR) e realizar um estudo comparativo entre os efeitos dessas drogas, através das vias de sinalização evocadas por elas, em cardiomiócitos primários de ratos neonatos. Em fibroblastos, foram avaliados somente os efeitos dessas drogas na proliferação celular.

### 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Produzir de culturas primárias de cardiomiócitos e fibroblastos;
- 2 - Avaliar a proliferação celular de cardiomiócitos e fibroblastos induzida por espironolactona e eplerenona na presença e ausência de mifepristona e aldosterona;
- 3 - Avaliar a viabilidade celular das culturas primárias através de incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo;
- 4 – Determinar a participação dos segundos mensageiros  $Ca^{2+}$ , AMPc e GMPc em células primárias de cardiomiócitos tratadas com espironolactona e eplerenona na presença e ausência de aldosterona;
- 5 – Determinar a atividade de PKC em cardiomiócitos primários tratados com espironolactona e eplerenona na presença e ausência de mifepristona e aldosterona;
- 6 – Determinar a atividade ERK1/2 através de *western blot* em cardiomiócitos primários tratados com espironolactona e eplerenona na presença e ausência de mifepristona e aldosterona;

**Observação:** Os segundos mensageiros  $Ca^{2+}$ , AMPc e GMPc, assim como a atividade de PKC e ERK1/2 foram escolhidos em função da importância de suas vias no processo cardioprotetor.

# *Materiais & Métodos*

---

### 3 – MATERIAS & MÉTODOS

#### 3.1 – ANIMAIS

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

Os animais foram provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto. 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 2011/83. (Anexo 1).



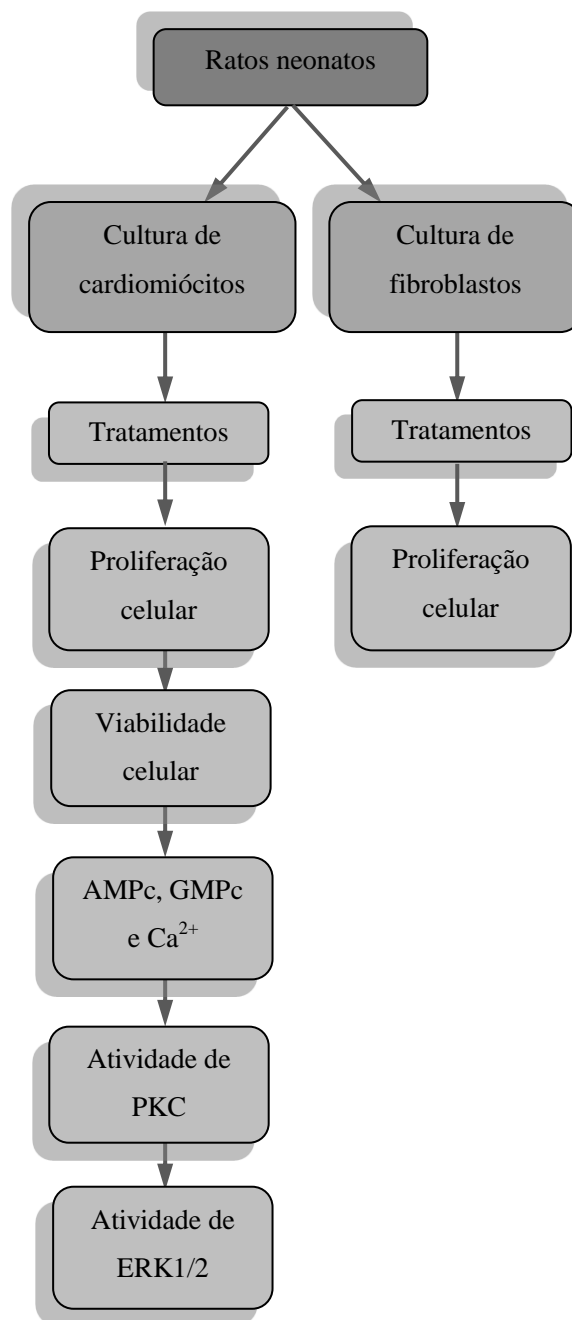
**Figura 6:** Rato neonato com 2 dias de idade e peso aproximado de 5g.

### 3.2 – DESENHO EXPERIMENTAL

As culturas foram divididas de acordo com os seguintes tratamentos recebidos:

- 1- Controle: somente as células
- 2- Células tratadas com espironolactona [ $10^{-6}$ M] (Stockand e Meszaros, 2003)
- 3- Células tratadas com eplerenona [ $10^{-6}$ M] (Zhang, Jia *et al.*, 2007)
- 4- Células tratadas com mifepristona [ $10^{-5}$ M] (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009)
- 5- Células tratadas com espironolactona [ $10^{-6}$ M] e mifepristona [ $10^{-5}$ M]
- 6- Células tratadas com eplerenona [ $10^{-6}$ M] e mifepristona [ $10^{-5}$ M]
- 7- Células tratadas com aldosterona [ $10^{-7}$ M] (Walczak, Gaignier *et al.*, 2011; Morais. C, 2013)
- 8- Células tratadas com espironolactona [ $10^{-6}$ M] e aldosterona [ $10^{-7}$ M]
- 9- Células tratadas com eplerenona [ $10^{-6}$ M] e aldosterona [ $10^{-7}$ M]
- 10- Células tratadas com mifepristona [ $10^{-5}$ M] e aldosterona [ $10^{-7}$ M]
- 11- Células tratadas com espironolactona [ $10^{-6}$ M], mifepristona [ $10^{-5}$ M] e aldosterona [ $10^{-7}$ M]
- 12- Células tratadas com eplerenona [ $10^{-6}$ M], mifepristona [ $10^{-5}$ M] e aldosterona [ $10^{-7}$ M]

Os tratamentos relativos a cada ensaio foram ministrados sempre seguindo a ordem e as concentrações acima citadas.



**Figura 7:** Organograma das etapas do trabalho

## 3.3 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS

**Tabela 2: Composição da solução de ADS 1x, pH = 7,35**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Água Milli-q	1 L
NaCl	6,8 g
HEPES	4,76 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,138 g
D-glucose	1,0 g
KCl	0,4 g
MgSO <sub>4</sub>	0,195 g

**Tabela 3: Composição da solução de BRDU [10<sup>-2</sup>M] (5-Bromo-2'-deoxyuridine)**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Água Milli-q	165 mL
BRDU	0,5 g

**Tabela 4: Composição do meio de cultura celular**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
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 <sup>-2</sup> M]	50 µL

**Tabela 5: Composição da solução tampão de digestão**

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
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 – PREPARO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CARDIOMIÓCITOS E FIBROBLASTOS

O protocolo de extração dos cardiomiócitos foi cedido pelo Prof. Dr. Eduardo M. Krieger (InCor – HC. FMUSP) (Barreto-Chaves, Heimann *et al.*, 2000).

Para cada cultura de células preparada foram utilizados cerca de 15 ratos neonatos de dois dias de idade da linhagem *Wistar* (Fig.4).

Os ratos neonatos foram desinfetados com algodão embebido em álcool 70% e decapitados para extração do coração. Em seguida, os corações foram colocados em solução tampão ADS 1x (Tab. 2) e seccionados em dois ou três pedaços que foram colocados em um tubo para centrífuga de 50 mL contendo 6 mL de tampão digestão (Tab. 5).

A primeira digestão tem o intuito de lavar o restante de sangue da amostra, por isso a mesma tem a duração de apenas 10 minutos, em banho maria à 37°C sob agitação de aproximadamente 200 rpm. Após a lavagem, o tampão foi desprezado e em seguida foram adicionados outros 6 mL do tampão de digestão. O tubo foi agitado por 20 minutos em banho maria à 37°. O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 1 mL de soro fetal bovino, usado para interromper a reação de digestão.

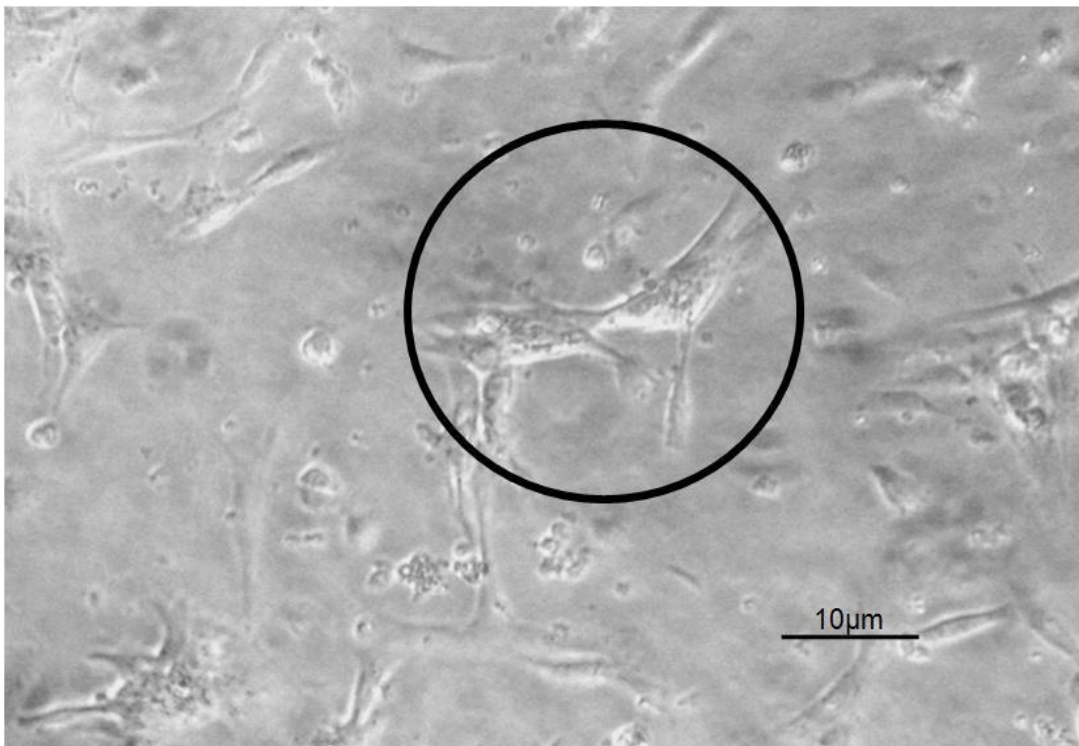
A cada ciclo de digestão foi realizada a transferência do sobrenadante para um novo tubo com soro fetal bovino. Este procedimento de digestão foi realizado por quatro vezes após a lavagem da amostra.

Após os ciclos de digestão os tubos que continham o sobrenadante e o soro fetal bovino foram centrifugados a 1020 rpm/minuto, 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.4) sem solução de BRDU (inibidor de crescimento de fibroblasto) para homogeneização. O volume final foi ajustado para 48 mL através da adição de meio de cultura e cada poço da placa de 24 *wells* foi preenchido com 2 mL da mistura de células e meio de cultura.

Esse homogenato foi pré-plaqueado e incubado por 30 minutos em estufa de cultivo celular 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, para que ocorresse adesão preferencial dos fibroblastos (Gustafsson e Brunton, 2000; Cheng, Hong *et al.*, 2003). Após o pré-plaqueamento, o meio de cultura foi retirado, da placa, onde os fibroblastos se aderiram, e transferido para uma nova placa, onde foi acrescentado 0,5 mL de meio de cultura com BRDU por poço.

Essa nova placa continha a cultura primária de cardiomiócitos. Já na placa de pré-plaqueamento foi adicionado meio de cultura sem o BRDU, para dar continuidade ao crescimento dos fibroblastos (Figura 7).

As culturas primárias de cardiomiócitos (Figura 6) foram caracterizadas através da morfologia típica das células *in vitro*, associada à observação da capacidade contrátil que apresentam em cultura (Diniz, 2009).



**Figura 8:** Foto de cardiomiócitos tiradas por máquina digital (zoom 2,9) em microscópio invertido modelo Telaval 31, fabricante Carl Zeiss, em aumento de 30x.



**Figura 9:** Foto de fibroblastos tirada por máquina digital (zoom 2,9) em microscópio invertido modelo Telaval 31, fabricante Carl Zeiss, em aumento de 30x.

### 3.5 – AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS E FIBROBLASTOS

Após o preparo das culturas de cardiomiócitos e fibroblastos as duas placas foram incubadas por aproximadamente 36 horas em estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37°C para que houvesse adesão completa das células.

Posteriormente, as células eram soltas com TrypLE™ Express (tríplex - tripsina sintética), onde após a retirada de todo o meio de cultura da placa acrescentou-se 350µL de triplex em cada poço para que as células perdessem a adesão com a placa. Esse triplex foi, então, retirado e centrifugado por 10 minutos/1020rpm, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura normal (cardiomiócitos) e em meio de cultura sem BRDU (fibroblastos).

As células foram contadas em câmara Neubauer e replaqueadas em placas de 96 wells juntamente com os tratamentos. Foi plaqueado o equivalente à 10<sup>4</sup> células em cada poço.

Foram preparadas três placas para cada tipo celular (cardiomiócitos e fibroblastos), para serem lidas nos momentos 0 horas, 24 horas e 48 horas de tratamento com os antagonistas.

A aldosterona só foi adicionada às células nos dias das leituras.

Para avaliar a proliferação celular foi usado o WST-1, que consiste em um reagente de proliferação celular capaz de medir a atividade de desidrogenase mitocondrial, baseando-se na redução metabólica de sal tetrazólio em um produto final pigmentado chamado formazan (Michael V. Berridge, 1996).

Para cada poço da placa contendo 100µL de meio de cultura foi adicionado 10µL de sal de tetrazólio solúvel em água (WST-1). As culturas de cardiomiócitos e fibroblastos foram, então, incubadas por 60 minutos com o marcador. Antes da leitura elas foram agitada por 1 minuto em agitador orbital, para, então, serem lidas no leitor de Elisa, no qual a absorbância foi medida com comprimento de onda de 450nm.

A análise de proliferação celular relativa foi realizada dividindo-se o valor de cada grupo pelo controle, de forma que a proliferação do grupo controle no tempo de 0 horas fosse igual a 1,0.

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5.

### 3.6 – ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi analisada no ultimo dia de ensaio de proliferação celular (48h). Como as culturas de fibroblasto não demonstraram aumento significativo da proliferação celular os ensaios subsequentes de viabilidade, análises dos segundos mensageiros e atividade de PKC e ERK1/2, só foram realizados com as culturas de cardiomiócitos.

Dessa forma após a produção das culturas de cardiomiócitos, como descrito anteriormente (Item 3.4), as células receberam os tratamentos mencionados na sessão 3.2 (exceto a aldosterona, que só era acrescentada às células no momento da leitura) e foram incubadas em estufa de cultivo celular 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48h.

Após atingir o tempo de incubação, o meio de cultura foi removido da placa e foi adicionado 500 µL de triplex em cada poço, para soltar as células. A placa foi, então, agitada por 5 minutos em agitador orbital. Posteriormente, o triplex foi removido e

colocado em tubos folcon de 15 mL (um tubo para cada tratamento) e centrifugado por 1500 rpm/10'.

O sobrenadante foi então removido e descartado e as células ressuspendidas em ADS1x (Tabela 2) e contadas em câmara Neubauer. Utilizou-se o equivalente a  $10^6$  células por tubo de leitura.

Na preparação dos tubos para leitura foi adicionado 5  $\mu$ l de iodeto de propídio (2 mg/ml), um fluóroforo hidrofílico que se incorpora ao DNA, por 500  $\mu$ L de solução de ADS1x e células (Yang, Wang *et al.*, 2012). Os tubos foram incubados por 20 minutos no escuro e em temperatura ambiente (Nijmeijer, Willemsen *et al.*, 2003).

Os tubos foram lidos em citômetro de fluxo FACScalibur e os dados analisados pelo programa FlowJo 7.6.3 e GraphPad Prism 5

### 3.7 – DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE SEGUNDOS MENSAGEIROS EM CARDIOMIÓCITOS

#### 3.7.1 – Cálcio ( $Ca^{2+}$ )

Após 24h de cultivo das células, o meio de cultura foi aspirado e aos poços da placa foi adicionado triplex. A placa foi então agitada por 5 minutos, em um agitado orbital, e em seguida, o triplex foi retirado dos poços e colocado em tubo de centrífuga de 15 mL e centrifugado por 1500 rpm/minuto, por 20 minutos.

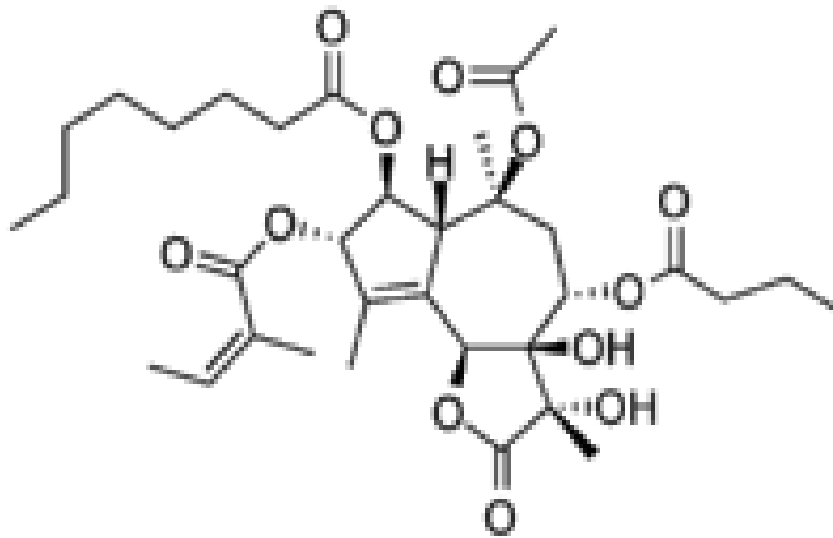
Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL ADS 1x para cada tratamento.

Separou-se 1 mL da solução de ADS 1x com as células para ser usado como controle negativo (somente células sem marcação com sonda). Ao restante, foi acrescentado 5  $\mu$ L/mL de sonda Fluo 4 – AM (Indicador de alta afinidade de cálcio, Sigma Aldrich) e o tubo foi incubado em banho Maria a 37°C por 30 minutos.

Em seguida, as células foram lavadas com ADS 1x duas vezes para que o excesso de sonda fosse removido. Separou-se então, 1 mL da solução para cada tubo de leitura contendo os respectivos tratamentos.

Espironolactona e eplerenona foram acrescentados aos tubos, 30 minutos antes da leitura, enquanto a aldosterona só foi colocada no momento da leitura no citômetro de fluxo FACScalibur.

O controle positivo para avaliação da quantidade de cálcio intracelular dos grupos foi composto por células tratadas com tapsigargina (Fig. 10) a  $[10^{-6}\text{M}]$ , um sesquiterpeno de lactona que promove a depleção das reservas intracelulares de cálcio, pela inibição específica da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático. Os tubos foram lidos em citômetro de fluxo FACScalibur e os dados analisados pelo programa FlowJo 7.6.3 e GraphPad Prism 5.



**Figura 10:** Estrutura química da Tapsigargina (sesquiterpeno de lactona).

### 3.7.2 – Adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPC)

As culturas de cardiomiócitos foram preparadas como descrito anteriormente no item 3.4 e incubadas em estufa 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 36 horas.

Após a incubação, as células foram soltas da placa de 24 *wells* com triplex e ressuspensas em meio de cultura (Tabela 4), para que se realizasse a contagem das mesmas, em câmara Neubauer.

Em seguida, plaqueou-se o equivalente a  $4,5 \times 10^4$  células/poço em placa de 96 *wells* para que permanecesse incubada durante a noite, em estufa 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , para realização do ensaio de determinação de concentração de AMPC intracelular.

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

Em cada poço foram adicionados 2 µL de IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) [ $10^{-4}$ M], um inibidor de fosfodiesterase, para que o AMPc não fosse degradado por essa enzima. Em seguida os tratamentos foram adicionados às células, de tal forma que os antagonistas (espironolactona, eplerenona) foram adicionados 30 minutos antes da aldosterona. As células foram incubadas por mais 10 minutos.

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

### 3.7.3 – Guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (GMPc)

As culturas de cardiomiócitos foram preparadas como descrito anteriormente (Item 3.4), e incubadas em estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 36 horas.

Após a incubação, as células foram soltas da placa de 24 wells com triplex e ressuspensas em meio de cultura para que se realizasse a contagem das mesmas em câmara Neubauer.

Em seguida, plaqueou-se o equivalente a  $1,0 \times 10^6$  células/poço em placa de 96 wells para que permanecessem incubadas durante a noite em estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37°C para realização do experimento de determinação de concentração de GMPc intracelular.

Em cada poço foi adicionado 2 µl de IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) [ $10^{-4}$ M], um inibidor de fosfodiesterase, para que o GMPc não fosse degradado por essa enzima. As células foram incubadas por 30 minutos. Em seguida, os tratamentos foram adicionados aos poços e as células incubadas por mais 15 minutos.

A concentração de GMPc foi determinada com o uso de kits *Enzo Life Science (cGMP complete EIA kit)*. As soluções usadas, a composição e organização da placa foram feitas segundo o manual do kit, assim como os cálculos realizados para se chegar às concentrações de GMPc intracelular.

## 3.8 – ATIVIDADE DE PKC

Depois de 24 horas da realização da cultura o meio de cultura foi retirado da placa, as células foram soltas com tríplice, e em seguida foram contadas em câmara Neubauer e replaqueadas em placas de 96 poços,  $10^4$  células por poço.

Após 24 horas de adesão em nova placa, os tratamentos foram adicionados às culturas. Primeiro foram adicionados os antagonistas, que foram incubados junto com as células, por 30 minutos em estufa 37°C. Em seguida, a aldosterona foi adicionada e as células incubadas por mais 30 minutos em estufa 37°C.

Posteriormente, o meio de cultura foi removido. Os lisados celulares foram preparados com 300 µL/poço de *PhosphoSafe Extraction Buffer* (NOVAGEN). 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.

A dosagem de proteínas foi realizada com o Kit Quantipro para ensaio de BCA.

O ensaio de análise de atividade de PKC foi realizado a partir das proteínas extraídas de lisados celulares. A concentração de proteínas usada em cada ensaio foi o equivalente a 0,5µg/µL.

O ensaio e as análises foram feitas de acordo com o manual do kit *PKC kinase activity kit* (Enzo Life sciences).

### 3.9 – ATIVIDADE DE P-ERK1/2 ATRAVÉS DE *WESTERN BLOT*

Para os ensaios de *Western blot*, as proteínas foram dosadas como descrito no item anterior e utilizou-se 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 densidade óptica das membranas foram normalizadas dividindo a densitometria da banda em questão pela densitometria do GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) com peso molecular de aproximadamente 37 Kda. Posteriormente, a atividade relativa de ERK1/2 foi realizada dividindo-se os resultados pelo controle, de forma que o controle ficasse igual a 1,0.

A atividade de ERK1/2 foi avaliada através da técnica de *Western Blot* seguida pela análise por densitometria óptica das bandas, correspondentes às amostras proteicas (50 µg) das células tratadas conforme item 3.2, através do programa ImageJ (disponível gratuitamente no endereço eletrônico <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)



### 3.9.1 – Gel

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

### 3.9.2 – Verificação da ativação de ERK1/2

Utilizou-se o anticorpo na concentração, recomendada pelo fabricante, de 1:2000 contra ERK1/2 fosforilada de rato Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) [CELL SIGNALING TECHNOLOGY]. Os *western blots* foram executados em células tratadas com espironolactona e eplerenona, na ausência e na presença de mifepristona e aldosterona como descrito no item 3.2.

### 3.9.3 – Verificação da expressão de GAPDH como normalizador do ensaio

Utilizou-se o anticorpo na concentração, recomendada pelo fabricante, de 1:1000 contra GAPDH (D16H11) [CELL SIGNALING TECHNOLOGY] como normalizador constitutivo. Os *western blots* foram executados em células tratadas com espironolactona e eplerenona, na ausência e na presença de mifepristona e aldosterona.

## 3.14 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram avaliados para verificação de normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A comparação entre os grupos nos ensaios de proliferação celular foi realizada usando-se ANOVA “Two-way” seguido do pós teste de Bonferroni. Nas demais análises sobre viabilidade celular, concentração dos segundos mensageiros (AMPc, GMPc, Ca<sup>+2</sup>), atividade de PKC e ERK1/2 utilizou-se ANOVA “One-way” seguido do pós teste de Tukey. Estas análises foram realizadas no *software* Graphpad Prism Project (versão 5.0). O nível de significância estatística foi  $p < 0.05$ . Todos os resultados são originados de três experimentos independentes realizados em triplicatas.

*Resultados*

## 4 – RESULTADOS

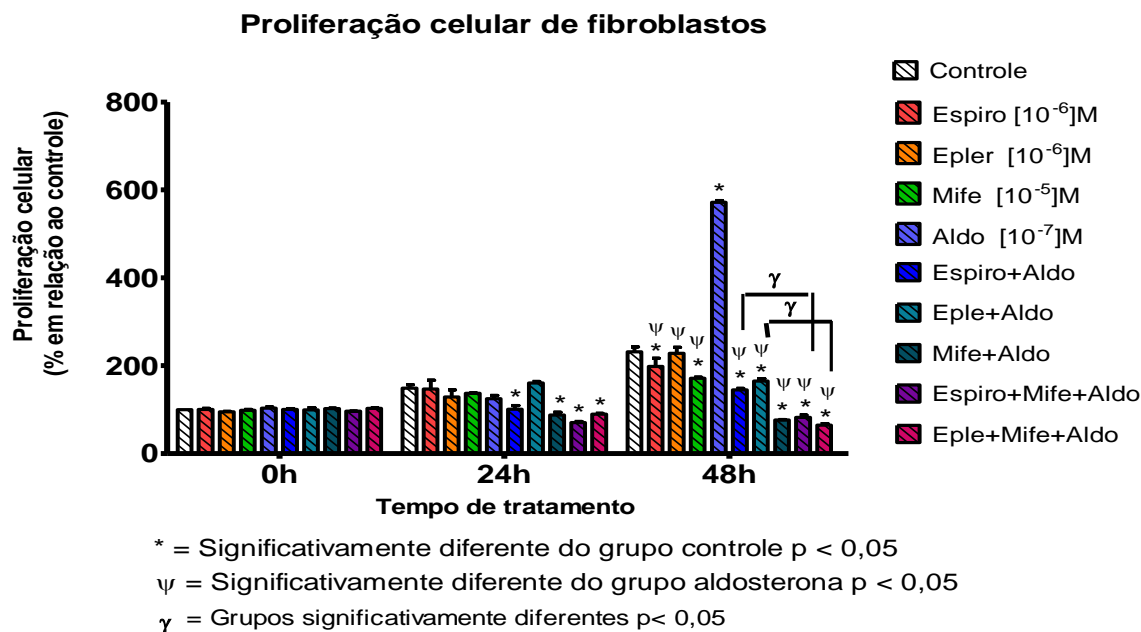
### 4.1 – DETERMINAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

#### 4.1.1 – Fibroblastos

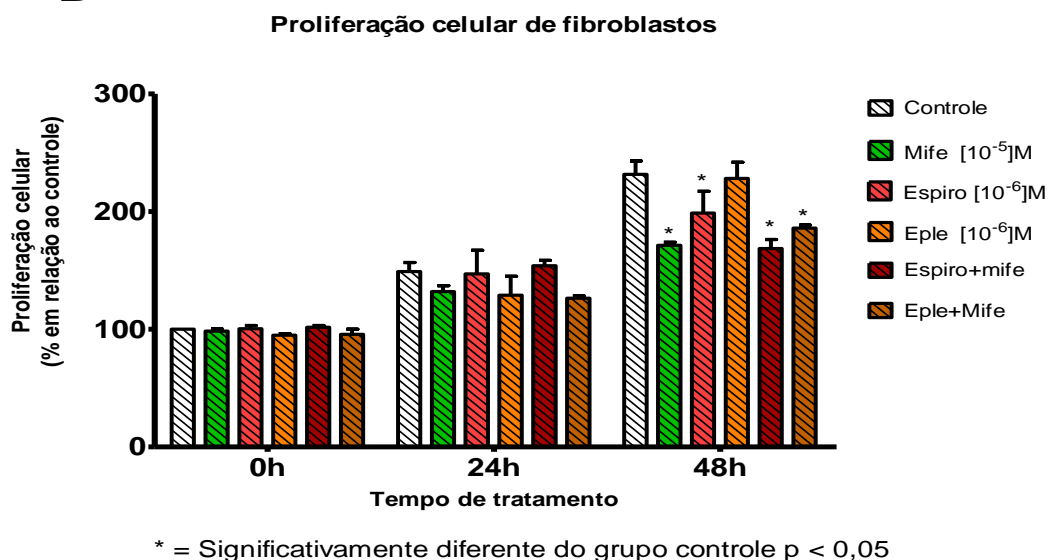
Nos ensaio sobre proliferação de fibroblastos foi observado que em 48 horas de tratamento a aldosterona foi capaz de aumentar a proliferação dos fibroblastos em aproximadamente três vezes em relação ao controle, mostrando um efeito mitogênico nessas células. Entretanto, na presença de espironolactona, eplerenona e mifepristona o efeito mitogênico da aldosterona foi revertido para níveis abaixo do controle (Gráfico 1A). Além disso, as combinações dos antagonistas de MR (espironolactona e eplerenona) com mifepristona e aldosterona reduziram ainda mais a proliferação se comparada com as células tratadas somente com antagonistas de MR e aldosterona.

Para tentar desvendar se o efeito anti-proliferativo da espironolactona e da eplerenona ocorre via receptor GR ou MR, devido à afinidade dessas drogas a esses receptores, as células foram tratadas com o antagonista de GR (mifepristona) e induzimos a proliferação tanto com espironolactona como com eplerenona (Gráfico 1B). Além disso, o antagonista de GR manteve a ação anti-proliferativa da espironolactona e diminuiu a proliferação (em relação ao controle) mesmo na presença de eplerenona (eplerenona + mifepristona).

A



B

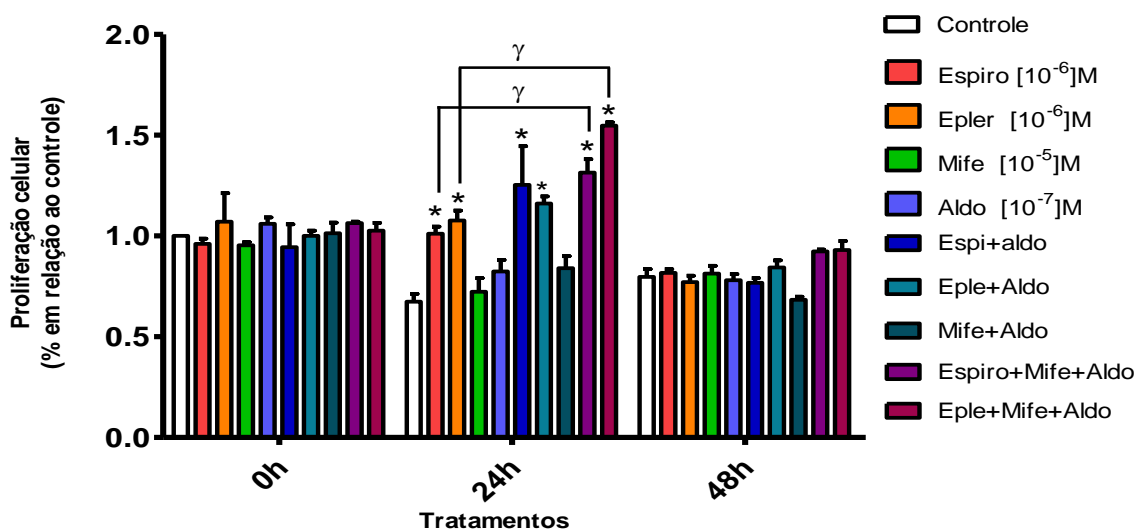


**Gráfico 1:** Análise de proliferação celular de fibroblastos cardíacos por tratamento, nos tempos de 0h, 24h e 48h. Células tratadas com espironolactona e eplerenona, na presença e ausência de mifepristona e aldosterona (A), Células tratadas com mifepristona e estimuladas com espironolactona ou eplerenona (B). Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas,  $n = 3$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2 – Cardiomiócitos

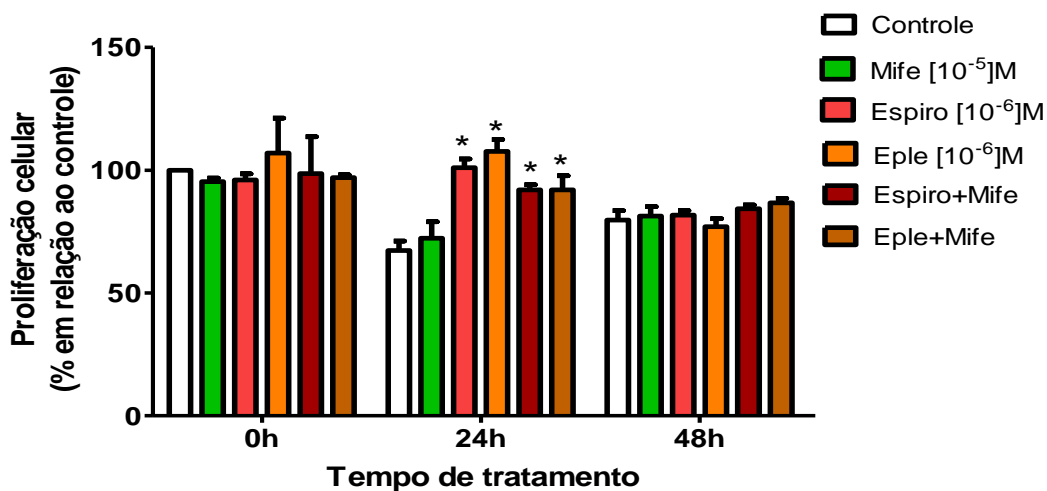
No ensaio de análise de proliferação de cardiomiócitos verificou-se que após 24 horas de tratamento a espironolactona foi capaz de promover a proliferação de cardiomiócitos na ausência e na presença de aldosterona, assim, como a eplerenona (Gráfico 2A). Porém, quando as células foram tratadas com espironolactona + mifepristona + aldosterona ou eplerenona + mifepristona + aldosterona a proliferação celular foi acentuada, quando comparada às células tratadas somente com espironolactona ou eplerenona, sugerindo que haja um sinergismo entre as vias dessas drogas.

Na tentativa de verificar se o efeito proliferativo da espironolactona e da eplerenona em cardiomiócitos ocorre via GR, as células foram tratadas com o antagonista desse receptor e induzimos a proliferação tanto com espironolactona como com eplerenona. Quando o receptor glicocorticoide foi antagonizado pela mifepristona não houve proliferação, porém quando a espironolactona ou a eplerenona foram adicionadas foi observado aumento na proliferação dos cardiomiócitos. O mesmo ocorreu na ausência do antagonista de GR (Gráfico 2B).

**A****Proliferação celular de cardiomiócitos**

\* = Significativamente diferente do grupo controle p &lt; 0,05

γ = Grupos significativamente diferentes p &lt; 0, 05

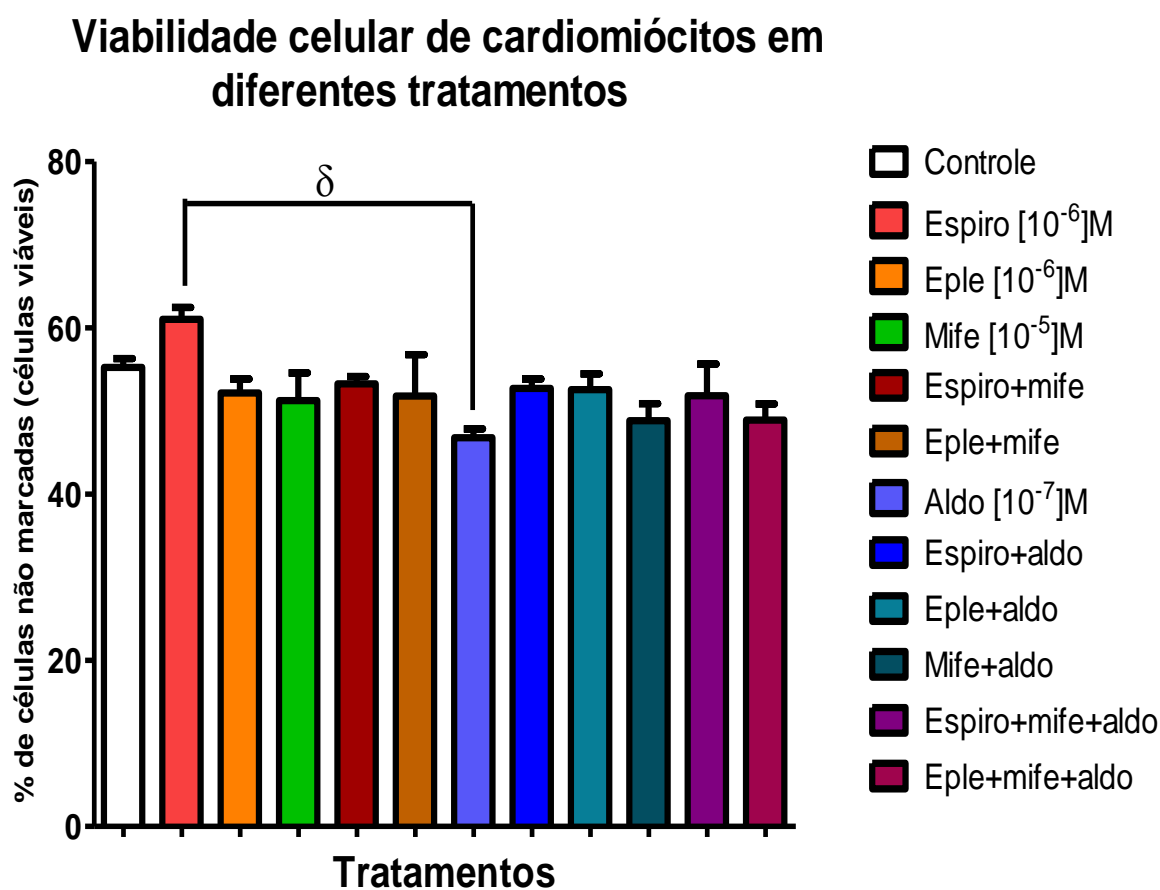
**B****Proliferação celular de cardiomiócitos**

\* = Significativamente diferente do grupo controle p &lt; 0,05

**Gráfico 2:** Análise de proliferação celular de cardiomiócitos por tratamento, nos tempos de 0h, 24h e 48h. Células tratadas com espironolactona e eplerenona, na presença e ausência de mifepristona e aldosterona (A), Células tratadas com mifepristona e estimuladas com espironolactona ou eplerenona (B). Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média ± SEM, p < 0,05.

## 4.2 – ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Para verificar se os cardiomiócitos continuavam viáveis, após as 48 horas de tratamento em que foram submetidos na análise de proliferação celular, e após sofrerem aumento de proliferação, como mostrado nos Gráficos 2A e 2B, analisamos a viabilidade dessas células através de marcação com iodeto de propídio (IP) e leitura em citômetro de fluxo. Como mostrado no Gráfico 3, verificamos que mesmo após 48 horas de tratamento não há diferença na viabilidade dos cardiomiócitos em relação ao controle. Porém as células tratadas com aldosterona se mostraram menos viáveis em relação as células tratadas com espironolactona.



**Gráfico 3:** Análise de viabilidade celular de cardiomiócitos após 48 horas, frente a diferentes tratamentos. A análise foi realizada através de incorporação de iodeto de propídio e leitura em citômetro de fluxo. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média ± SEM, p < 0,05.

## 4.3 – ANÁLISE DE SEGUNDOS MENSAGEIROS

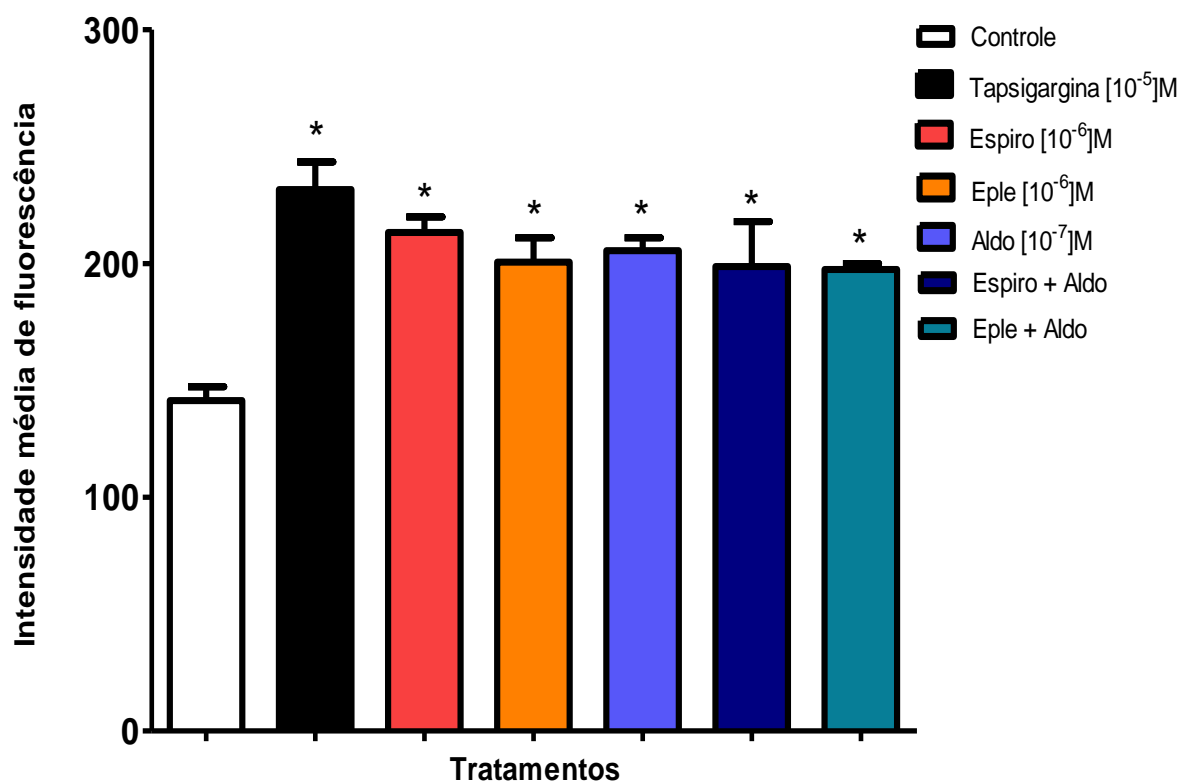
### 4.3.1 - Cálcio bivalente ( $\text{Ca}^{2+}$ )

Para determinar se o  $\text{Ca}^{+2}$  está envolvido na via de sinalização direta (efeito de membrana) evocada pela espironolactona e pela eplerenona na cardioproteção, avaliou-se as concentrações desse segundo mensageiro, por citometria de fluxo, nas células tratadas com essas drogas, na ausência e na presença de aldosterona. Para certificar que o cálcio está presente nessas células usamos tapsigargina [ $10^{-6}\text{M}$ ], um sesquiterpeno de lactona (Fig. 10) que promove a depleção das reservas intracelulares de cálcio pela inibição específica da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endoplasmático, como controle positivo.

Pela análise do Gráfico 4 nós demonstramos que a aldosterona é capaz de aumentar os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  e tanto a espironolactona como a eplerenona também aumentam esses níveis quando sozinhas ou na presença de aldosterona.



## Variação da $[Ca^{2+}]_i$ em diferentes tratamentos



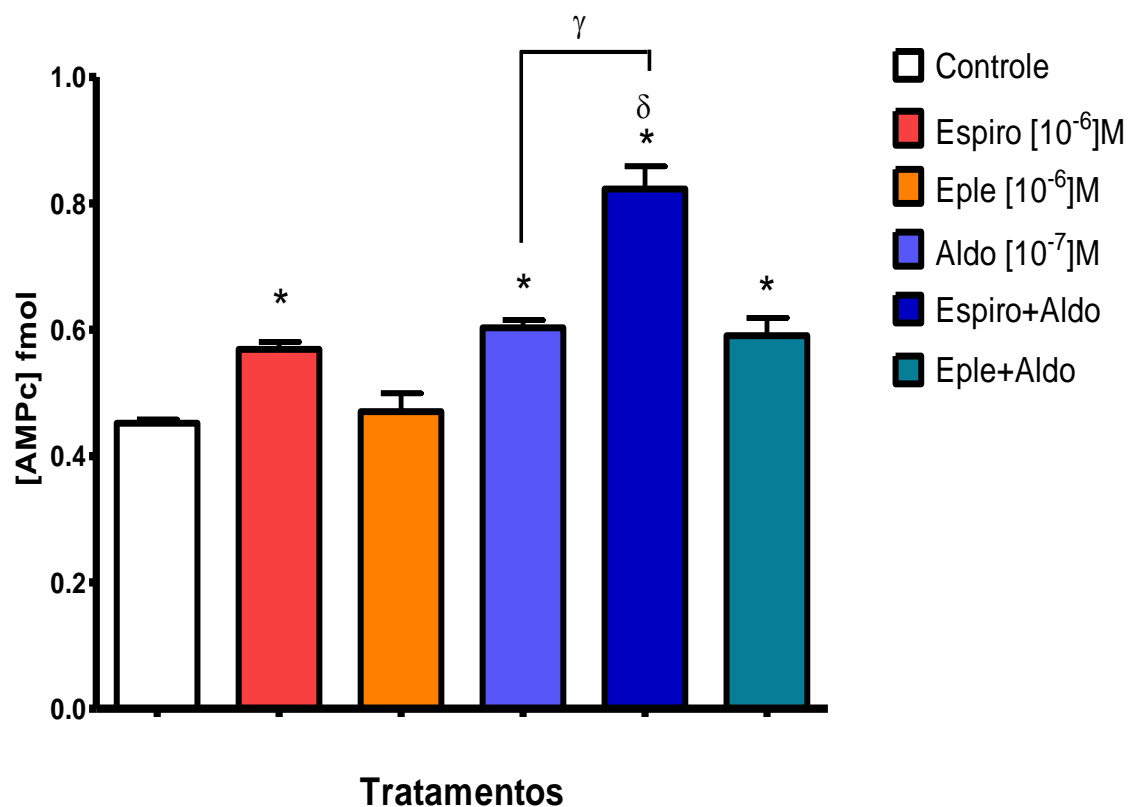
\* = Significativamente diferente do grupo controle  $p < 0,05$

**Gráfico 4:** Análise de concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida a tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de aldosterona. As células foram incubadas com marcador de cálcio intracelular, Fluo-4, e lidas em citômetro de fluxo. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas,  $n = 3$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2 – Adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPC)

Para determinar a participação do segundo mensageiro AMPC na cardioproteção promovida pela espironolactona e pela eplerenona mensuramos a concentração desse segundo mensageiro nas células tratadas por essas drogas, na ausência e na presença de aldosterona. Além disso, também usamos IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) [ $10^{-4}$ M], um inibidor de fosfodiesterases, para que o AMPC não fosse degradado por essas enzimas. Verificamos, como visto no Gráfico 5, que a eplerenona só é capaz de aumentar os níveis de AMPC na presença de aldosterona. Entretanto, a espironolactona elevou as concentrações de AMPC tanto na presença como na ausência do hormônio mineralocorticoide, sugerindo mais uma vez que a via evocada em sua cardioproteção pode ser independente de sua via clássica (antagonismo ao receptor mineralocorticoide da aldosterona). No entanto, na presença de aldosterona (espironolactona + aldosterona), a concentração de AMPC foi maior, se comparado com o tratamento somente de espironolactona, sugerindo assim, que há um sinergismo entre as vias de sinalização direta da aldosterona e da espironolactona.

### Variação da $[AMPc]_i$ em diferentes tratamentos



\* = Significativamente diferente do grupo controle  $p < 0,05$

$\delta$  = Significativamente diferente do grupo espironolactona  $p < 0,05$

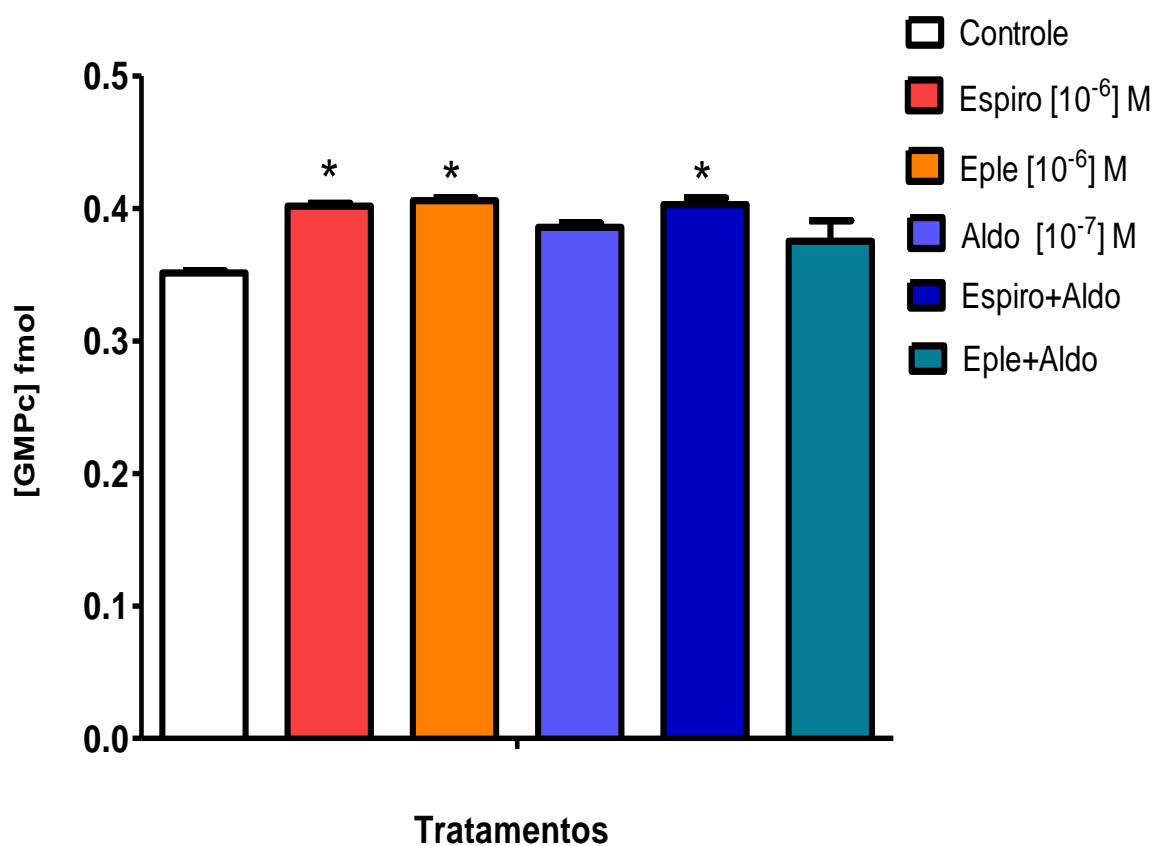
$\gamma$  = Grupos significativamente diferentes  $p < 0,05$

**Gráfico 5:** Análise de concentração intracelular de AMPc (fmol) em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida ao tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de aldosterona. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas,  $n = 3$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ .

#### 4.3.3 - Guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (GMPc)

Para determinar a participação de GMPc na cardioproteção promovida pela espironolactona e pela eplerenona, avaliamos a concentração desse segundo mensageiro nas células tratadas por essas drogas, na ausência e na presença de aldosterona (Gráfico 6). Além disso, também utilizou-se IBMX [ $10^{-4}$ M], um inibidor de fosfodiesterases, para que o GMPc não fosse degradado por essas enzimas. Através do Gráfico 6 conseguimos verificar que tanto a espironolactona como a eplerenona foram capazes de elevar os níveis de GMPc na ausência de aldosterona, em relação ao controle, sugerindo mais uma vez que a via evocada por elas na cardioproteção pode ser independente de sua via antagônica à aldosterona. Porém, a espironolactona também aumentou a concentração de GMPc na presença do hormônio mineralocorticoide, o que não ocorreu com a eplerenona.

## Varição da $[GMPc]_i$ em diferentes tratamentos

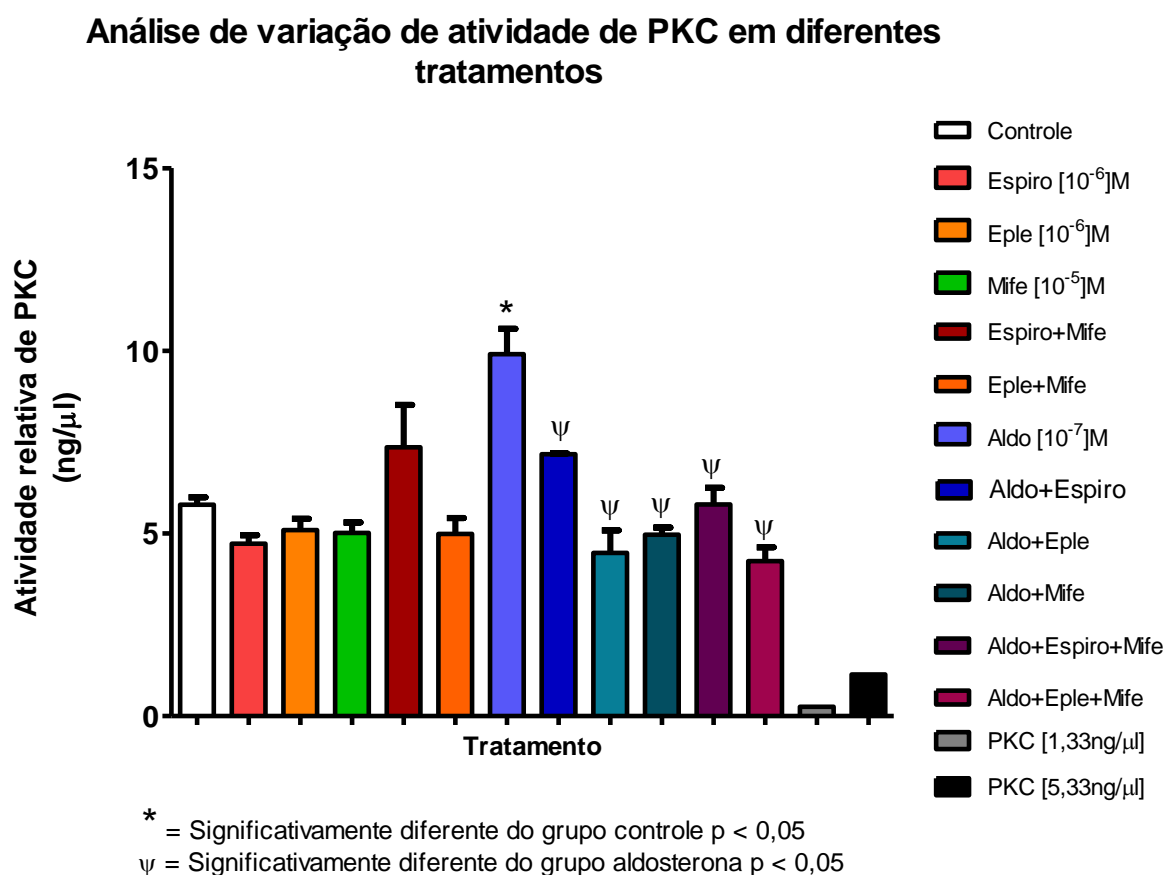


\* = Significativamente diferente do grupo controle  $p < 0,05$

**Gráfico 6:** Análise de concentração intracelular de GMPc (fmol) em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida ao tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de aldosterona. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas,  $n = 3$ . Resultados expressos em média  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ .

#### 4.4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PKC

Para determinar se há variação de atividade de PKC na cardioproteção promovida pela espironolactona e pela eplerenona, avaliou-se a atividade dessa quinase através de ensaio específico e comparamos essa atividade com controles exógenos de atividade de PKC (1,33ng/μl e 5,33 ng/μl) fornecidos pelo Kit. Encontrou-se que, em cardiomiócitos, a atividade de PKC é superior, em aproximadamente cinco vezes, o equivalente à [5,33ng/μl] dessa quinase. Além disso, tanto a espironolactona como a eplerenona não foram capazes de aumentar a atividade de PKC. Porém, a eplerenona e espironolactona conseguiram reverter o aumento de atividade promovido pela aldosterona. De forma semelhante, quando o GR estava bloqueado, as duas drogas reverteram o aumento da atividade da quinase induzido pela aldosterona (Gráfico 7).

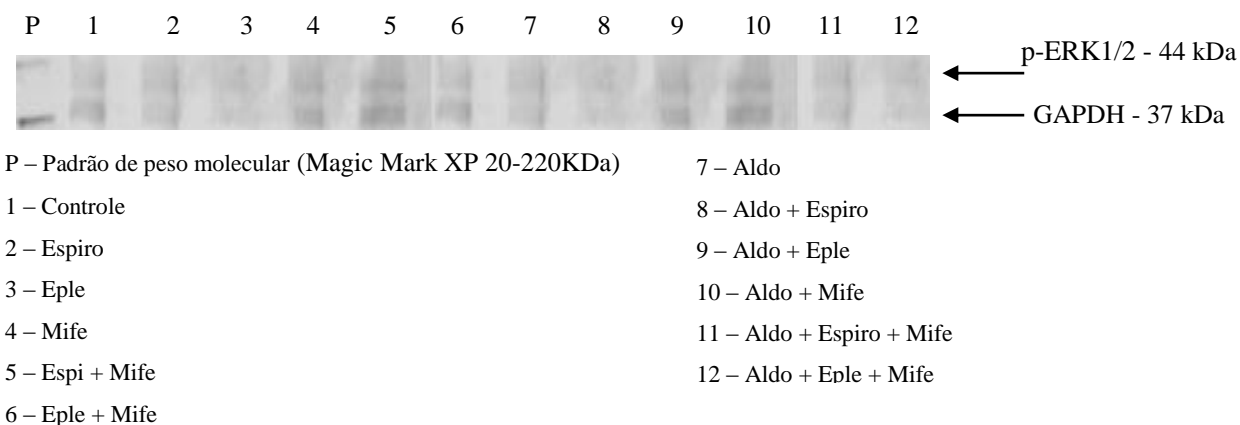


**Gráfico 7:** Gráfico de análise de atividade relativa de PKC em cardiomiócitos, frente a diferentes tratamentos. Cultura de cardiomiócitos submetida ao tratamento com espironolactona e eplerenona na ausência e na presença de mifepristona e aldosterona. A atividade relativa baseia-se nos controles de atividade (1,33ng/μl e 5,33 ng/μl) fornecidos pelo kit usado para essa análise. Resultado de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n = 3. Resultados expressos em média ± SEM, p < 0,05

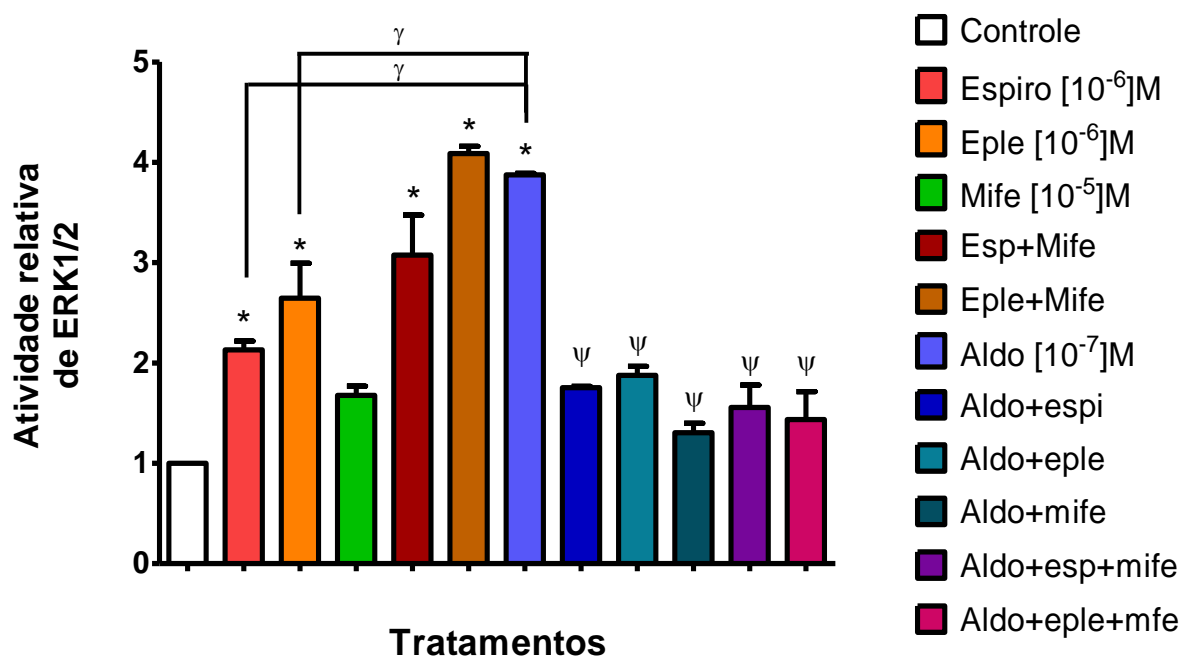
#### 4.5 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ERK1/2

Na análise de atividade de ERK1/2 ficou evidenciado que tanto a espironolactona como a eplerenona, quando sozinhas, aumentaram a atividade de ERK1/2 fosforilada (Gráfico 8), assim como a aldosterona. Porém, esse aumento não ocorreu quando as células foram tratadas somente com mifepristona. Adicionalmente, a atividade dessa quinase foi maior nas células tratadas com aldosterona quando comparadas às células tratadas somente com espironolactona ou eplerenona. Porém, quando as células foram previamente tratadas com espironolactona ou com eplerenona, a adição de aldosterona não aumentou a atividade de ERK1/2 tanto na ausência como na presença de mifepristona.

A



### Atividade relativa de p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) em diferentes tratamentos



\* = Significativamente diferente do grupo controle,  $p < 0,05$

ψ = Significativamente diferente do grupo aldosterona,  $p < 0,05$

γ = Grupos significativamente diferentes,  $p < 0,05$

**Gráfico 8:** Análise de atividade de ERK1/2 por *Western Blot*. (A) Membrana de *western blot* corrida com 50µg de proteína, bandas de 37 kDa (GAPDH) e 44 kDa (ERK1/2 fosforilada Thr202/Tyr204), por tratamento 1-12. (B) Gráfico de atividade relativa de ERK1/2 em diferentes tratamentos. Os dados foram expressos como diferença relativa em relação ao controle após normalização para expressão de GAPDH. Resultado de três experimentos independentes,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$



*Discussão*

## 5 – DISCUSSÃO

A hipótese de que antagonistas do receptor mineralocorticóide da aldosterona são capazes de promover substancial proteção ao sistema cardiovascular independente, ou não, de sua via clássica de ação, que tem como base o antagonismo competitivo sobre o MR, vem chamando a atenção de pesquisadores há alguns anos. Por exemplo, baixas doses de espironolactona reduzem a área infartada e apoptose celular em ratos, adrenalectomizados (sem a principal fonte produtora de aldosterona) ou não, submetidos a isquemia e reperfusão cardíaca (Mihailidou, Loan Le *et al.*, 2009). Além disso, Nagata e colaboradores deixaram a seguinte pergunta ao terminarem seu trabalho: Por que antagonistas de receptores MR possuem a capacidade de reduzir riscos de problemas cardíacos, mesmo em condições de reduzida atividade de RAAS (ou seja, mesmo na ausência de níveis elevados de aldosterona)? (Nagata, Obata *et al.*, 2006).

Dessa forma, este trabalho, pela primeira vez, procurou estudar, de forma sistemática, os mecanismos de ação promovidos por esses antagonistas de MR (espironolactona e eplerenona), de forma comparativa, na presença e na ausência de aldosterona.

Primeiramente, realizou-se ensaios de proliferação celular tanto de cardiomiócitos como de fibroblastos, para verificarmos se as drogas em estudo são capazes de influenciar o estado proliferativo desses dois tipos celulares.

No ensaio sobre análise de proliferação celular foi demonstrado que ao tratar os fibroblastos cardíacos com aldosterona houve uma elevada proliferação de fibroblastos, após 48 horas de cultivo celular (Gráfico 1A). Corroborando com estudos que vêm demonstrando que esse hormônio pode mediar fibrose vascular de arteríolas cardíacas e grandes artérias (Rocha, Stier *et al.*, 2000; Young e Funder, 2002).

Da mesma forma, Stockand e colaboradores também demonstraram que, após 48 horas de tratamento, além da aldosterona apresentar alto efeito mitogênico em fibroblastos cardíacos, esse efeito ocorre através da indução de Ki-RasA e modulação positiva da cascata de MAPK1/2 via MR (Stockand e Meszaros, 2003). O efeito proliferativo da aldosterona em fibroblastos também foi explicado por Wilson e colaboradores, já que a ativação de MR pode ser capaz de aumentar a expressão de marcadores para estresse oxidativo e inflamação vascular coronária, o que promoveria esse aumento de fibroblastos cardíacos (Wilson, Morgan *et al.*, 2009). No presente trabalho observamos que a aldosterona é capaz de causar proliferação em fibroblastos, mesmo na ausência de inflamação, resultado este que pode ser

dependente ou não do receptor MR, uma vez que não se sabe a real participação de uma via direta no processo.

Por outro lado, o tratamento de 48 horas somente com espironolactona foi capaz de diminuir a proliferação de fibroblastos a níveis menores que o das células do grupo controle. Somando com um estudo que também mostrou, através da incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina em fibroblastos cardíacos, uma inibição do efeito mitogênico da aldosterona pela espironolactona nesse tipo celular. Isso seria explicado pelo fato da espironolactona ser capaz de atenuar a indução de Ki-RasA e MAPK1/2 induzida por aldosterona (Stockand e Meszaros, 2003).

Além disso, nossos dados demonstram que o tratamento com espironolactona e aldosterona foi capaz de reverter o efeito mitogênico desse hormônio em fibroblastos, após 48 horas de tratamento, (Gráfico 1A). Estes dados estão de acordo com um outro estudo realizado em ratos que sofreram uninefrectomia e receberam tratamento com aldosterona e sal, onde a administração de espironolactona foi capaz de prevenir a fibrose cardíaca estimulada pela aldosterona (Weber, 2001).

Nossos resultados também mostram que a eplerenona não é capaz de diminuir a proliferação de fibroblastos. Porém, ela conseguiu reverter o efeito mitogênico da aldosterona nessas células (Gráfico 1A). Este dado soma-se ao estudo que demonstrou que a eplerenona *per se* não foi capaz de reverter o quadro de fibrose perivascular em miocárdio de camundongos, entretanto ela foi capaz de inibir a fibrose perivascular induzida por aldosterona nesses animais. Esse estudo também sugere que essa ação da eplerenona pode ser explicada pelo fato dela conseguir inibir a expressão de tenascina-C (proteína extracelular descrita como principal reguladora do processo fibrótico em diversos tecidos e importante na remodelagem cardíaca) induzida por aldosterona e angiotensina II (Nishioka, Hiroyasu Inada *et al.*, 2007).

A inibição da proliferação de fibroblastos ocorreu tanto quando as células eram tratadas (48 horas) apenas com mifepristona, como no tratamento com espironolactona + mifepristona e eplerenona + mifepristona (Gráfico 1B). Sugerindo que um dos mecanismos de cardioproteção dessas duas drogas, que baseia-se na diminuição de proliferação de fibroblastos cardíacos, seja dependente da via de sinalização de GR, corroborando o que já foi sugerido por alguns estudos (Latouche, Sainte-Marie *et al.*, 2010).

A principal discussão nesse ponto leva em consideração o fato da mifepristona e da espironolactona, sozinhas, serem capazes de diminuir a proliferação de fibroblastos, o que ocorre também quando elas estão juntas. Dessa forma, não teria como afirmarmos se o efeito anti-proliferativo ocorre, somente via GR (mifepristona) como sugerido por Latouche e

colaboradores (Latouche, Sainte-Marie *et al.*, 2010) ou somente via MR (espironolactona). Porém, é sabido que a espironolactona tem afinidade tanto para MR como para GR, por isso não é considerada um bloqueador específico de MR (Núñez e Tamargo, 2006).

Nossos dados sobre proliferação de fibroblastos demonstraram que tanto MR quanto GR participam da resposta proliferativa. Quando as células foram tratadas somente com eplerenona (altamente específica para MR) não houve diferença significativa de proliferação em relação ao controle. Porém, em células tratadas com eplerenona + aldosterona, a eplerenona foi capaz de reverter a proliferação celular induzida por esse hormônio (Gráfico 1A). Além disso, células tratadas com mifepristona (antagonista de GR) apresentaram redução de proliferação em relação ao controle e ela também reverteu a proliferação induzida pela aldosterona. Podemos observar também que as combinações dos antagonistas de MR e mifepristona na presença de aldosterona (espironolactona + mifepristona + aldosterona ou eplerenona + mifepristona + aldosterona) diminuiriam ainda mais a proliferação em relação as células tratadas somente com antagonistas de MR e aldosterona.

Adicionalmente, pesquisas anteriores demonstraram que a aldosterona é capaz de aumentar a remodelagem cardíaca, fibrose e a secreção de colágeno de fibroblastos cardíacos (Rude, Duhaney *et al.*, 2005). Além disso, a proliferação de fibroblastos cardíacos ativos, seguida de excesso de deposição de matriz são as duas principais causas de desenvolvimento de estados patológicos e subsequente fibrose cardíaca. Dessa forma, a ação da espironolactona em fibroblastos cardíacos, reforça nossa hipótese sobre o efeito cardioprotetor exercido por essa droga.

Por outro lado, a proliferação de cardiomiócitos (Gráfico 2A e 2B) apresentou um aumento acentuado em 24 horas de tratamento com espironolactona e eplerenona. Esse aumento na proliferação de cardiomiócitos promovido pela espironolactona e pela eplerenona pode ser um dos principais mecanismos (juntamente com a diminuição de proliferação de fibroblastos) envolvidos na cardioproteção promovida por essas drogas, já que os cardiomiócitos poderiam auxiliar na recuperação do coração lesado. Esse evento poderia justificar o fato de que em casos de hiperaldosteronismo primário ou secundário a espironolactona é capaz de induzir a melhora na sobrevida dos pacientes, embora os mecanismos celulares envolvidos com tal resposta ainda não sejam compreendidos (Pitt, Zannad *et al.*, 1999).

O aumento da proliferação de cardiomiócitos pela espironolactona e pela eplerenona ocorreu mesmo quando o receptor glicocorticoide estava bloqueado (células tratadas com espironolactona + mifepristona e eplerenona + mifepristona) (Gráfico 2B). Sugerindo que um

dos mecanismos de cardioproteção dessas duas drogas, que baseia-se no aumento da proliferação de miócitos cardíacos, seja independente da via de sinalização desencadeada por GR, apesar da co-expressão dos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides em cardiomiócitos descrita em alguns estudos (Farman e Rafestin-Oblin, 2001).

Os dados sobre proliferação de cardiomiócitos apoiam a hipótese que a inibição de MR estaria envolvida na proliferação destas células. Nossa idéia é que quando o MR está ativado na célula promoveria síntese de uma ou mais proteínas que impediriam a proliferação celular. Essa hipótese é baseada no fato de que a mifepristona não foi capaz de modular a proliferação em relação ao controle, assim como não reverteu a proliferação promovida pelos antagonistas de MR.

Apesar de, aparentemente, o GR não participar no processo de proliferação de cardiomiócitos, o bloqueio deste receptor promoveu uma resposta mais robusta (na presença de aldosterona) que a resposta fornecida pela espironolactona e pela eplerenona, quando se encontravam sozinhas (Gráfico 2A). Demonstrando uma possível comunicação entre essas vias.

Aqui não podemos esquecer que, apesar de nossas conclusões sobre proliferação tanto de fibroblastos quanto de cardiomiócitos envolvendo os receptores GR e MR, não podemos descartar a participação de vias diretas evocadas por estes fármacos, que com certeza, também contribuíram para as respostas observadas.

Para verificar se nas culturas de cardiomiócitos as células continuavam viáveis, mesmo após as 48 horas de tratamento em que foram submetidas nos ensaios de proliferação celular, nós realizamos ensaios de verificação de viabilidade através da incorporação de iodeto de propídio e leitura em citômetro de fluxo. Através da análise do gráfico 3 podemos notar que não houve diferença na viabilidade das células tratadas em relação ao controle, validando o ensaio de proliferação de cardiomiócitos. Entretanto, as células tratadas com aldosterona se apresentaram menos viáveis que as células tratadas com espironolactona, demonstrando, mais uma vez, o efeito cardioprotetor dessa droga.

Utilizamos as culturas de fibroblastos apenas como controle e para confirmar o que se sabia a respeito da proliferação dessas células frente ao tratamento com os antagonistas de MR e de aldosterona, pois já existem alguns estudos sobre as vias evocadas nesse processo. Dessa forma, na tentativa de entender os mecanismos de ação ou as rotas bioquímicas evocadas na cardioproteção promovida pela espironolactona e pela eplerenona, nós também estudamos os principais segundos mensageiros ( $\text{Ca}^{+2}$ , AMPc e GMPc) envolvidos na sinalização celular de cardiomiócitos. Essas vias foram escolhidas em função de sua

importância no mecanismo cardioprotetor evocado pelas dorgas em estudo. Nesses ensaios, nós avaliamos os efeitos de uma possível via direta, ou seja, efeitos de membrana (não envolvendo receptores nucleares MR e GR). Portanto, não usamos mifepristona, uma vez que os efeitos esperados da espironolactona e da eplerenona estariam relacionados a uma via distinta de sua via clássica (antagonismo de MR).

Estudos anteriores demonstraram que a espironolactona e a eplerenona também são capazes de antagonizar algumas ações da via direta da aldosterona, como por exemplo, efeitos que se originam da ativação de vias de sinalização de MAPK, PKC e IP3K (Núñez e Tamargo, 2006). Além disso, a eplerenona consegue antagonizar o aumento da reabsorção de  $\text{Na}^+$  e água nos túbulos distal e coletor produzido pela aldosterona, aumentar a excreção de  $\text{K}^+$  (Faiez Zannad, Karl Swedberg *et al.*, 2011) e bloquear efeitos de vasoconstrição em vasos de resistência (Michea, Delpiano *et al.*, 2005).

Nos ensaios sobre a participação do  $\text{Ca}^{2+}$  na cardioproteção promovida pela espironolactona e pela eplerenona nossos dados mostram que a espironolactona e a eplerenona foram capazes de aumentar as concentrações intracelulares desse segundo mensageiro (Gráfico 4). O que colabora com estudos que demonstraram que mesmo em células que não são capazes de expressar o receptor MR da aldosterona, a espironolactona é capaz de promover um aumento nas concentrações desse segundo mensageiro (Haseroth, Gerdes *et al.*, 1999; Grossmann, Benesic *et al.*, 2005). Sugerindo, dessa forma, que as respostas de  $\text{Ca}^{2+}$  são independentes da via clássica da espironolactona (antagonista de receptor MR).

Dessa forma, assim como nossos resultados, outro estudo do nosso laboratório também demonstrou níveis aumentados de  $\text{Ca}^{2+}$  em células tratadas com espironolactona. Esse mesmo estudo também mostrou que a aldosterona promoveu baixas concentrações de AMPc, quando os cardiomiócitos eram tratados também com BAPTA-AM (éster que sofre esterificação dentro da célula tornando-se um quelante de cálcio intracelular), sugerindo que o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  promovido pelo hormônio estimularia uma adenilil ciclase responsiva ao mesmo (Morais. C, 2013).

De acordo com estudos anteriores, existe uma expressão diferencial dos subtipos de adenilil ciclase no sistema cardiovascular humano (Wang, 2002). 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  $\text{Ca}^{2+}$  (Gros, 2006) e, portanto, sujeitas à modulação pela espironolactona, uma possível explicação para os altos níveis de AMPc encontrados seria

de que o  $\text{Ca}^{2+}$  oriundo da via de proteína Gq, ativaria diretamente uma adenilil ciclase e esta estimularia a produção de AMPc, oriundo da via de proteína Gs. Pois, o AMPc é gerado por adenilil ciclase na ativação de receptores acoplados a proteínas G em resposta a uma variedade de hormônios e neurotransmissores (Stangherlin, Gesellchen *et al.*, 2011).

Adicionalmente, os resultados sobre participação de AMPc no processo de cardioproteção, evocado pelas drogas em estudo, demonstram que a espironolactona foi capaz de aumentar os níveis intracelulares desse segundo mensageiro tanto na ausência como na presença de aldosterona (Gráfico 5). Estudos anteriores do nosso laboratório, também demonstraram que os níveis basais de AMPc intracelular são maiores quando as células são tratadas com espironolactona (Morais. C, 2013). Portanto, como os níveis de AMPc são aumentados de forma similar pela espironolactona e pela aldosterona, e quando essas duas drogas estão juntas (Espiro + aldo) esse aumento é acentuado, nós sugerimos um sinergismo entre suas vias.

Adicionalmente, canais de mitocondriais de  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), e ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  (mito $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), estão presentes em miócitos cardíacos e desempenham papel chave na cardioproteção. Estudos relataram que o influxo de  $\text{K}^+$  através de canais mito $\text{K}_{\text{ATP}}$  ou mito $\text{K}_{\text{Ca}}$  ocorrem independentemente um do outro. Além disso, a ativação de mito $\text{K}_{\text{ATP}}$  é aumentada pela PKC, ao passo que o canal mito $\text{K}_{\text{Ca}}$  é ativado por PKA (Isoldi, Pereira *et al.*, 2004; Nishida, Sato *et al.*, 2009). Além disso, vários estudos têm demonstrado que uma breve exposição pré-isquêmica a  $\beta$ -agonistas, inibidores de PDE3 e a um análogo de AMPc celular, é capaz de produzir ativação rápida de PKA e também proteger o miocárdio *in vivo*, independentemente da PKC (Fukasawa, Nishida *et al.*, 2008). Esse fato também poderia ser suportado por nossos resultados sobre aumento de concentração de AMPc (Gráfico 4) e cálcio (Gráfico 3) por espironolactona, onde o AMPc poderia estar ativando uma PKA que, juntamente, com o cálcio ativaria mito $\text{K}_{\text{Ca}}$  e aumentaria o influxo de  $\text{K}^+$  levando a um quadro de cardioproteção. Infelizmente não foram feitas medidas de  $\text{K}^+$ , que comprovam essa idéia. Porém ensaios complementares já estão sendo planejados para confirmar essa hipótese.

De forma complementar, a regulação da resposta hipertrófica cardíaca pode ocorrer pelo complexo de proteína adaptadora de quinase A, presente em cardiomiócitos (mAKAP) (Kapiloff, Schillace *et al.*, 1999), quando a proteína quinase tipo A dependente de AMPc (PKA) ancorada pela mAKAP, fosforila e ativa fosfodiesterase (PDEs). A estimulação dos receptores promotores gp130/fator inibidor da leucemia (LIF) ativa a via de MEK5 e ERK5 regulando negativamente a PDE4D3 através de um caminho ainda desconhecido. Na via não genômica, a ERK5 fosforilada pode inibir PDEs. 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).

De acordo com Kapiloff e colaboradores, proteínas adaptadoras de quinases A (AKAPs) desempenham um papel importante na compartimentalização da sinalização e ancoragem de PKA, servindo de estruturas que montam e localizam uma cascata de sinalização. Em miócitos cardíacos, a PKA, coordena cálcio e MAP quinases e é importante para a prevenção de hipertrofia celular (Kapiloff, Piggott *et al.*, 2009). De forma semelhante, estudos de nosso laboratório também conseguiram demonstrar que uma AKAP está relacionada com o processo hipertrófico de miócitos cardíacos (Morais. C, 2013).

Além disso, alguns estudos sugerem que uma das principais situações responsáveis por promoverem a hipertrofia cardíaca são os baixos níveis de AMPc intracelular (Dodge-Kafka, 2005 ). Assim, pode-se inferir que um dos mecanismos de cardioproteção da espirolactona é o aumento das concentrações desse segundo mensageiro.

Assim como o AMPc, o GMPc também está diretamente envolvido na função cardíaca tanto em condições normais como patológicas, desse modo nós também avaliamos a participação desse segundo mensageiro nas culturas de cardiomiócitos após tratamento com as drogas em estudo.

Nossos dados demonstram que tanto a espirolactona, como a eplerenona são capazes de aumentar os níveis de GMPc intracelular em cardiomiócitos (Gráfico 6). Adicionalmente, sabe-se que o GMPc é responsável por mediar alguns efeitos cardíacos de óxido nítrico e peptídeos natriuréticos além de estar envolvido com efeitos inotrópicos (força de contração do coração) e mecanismos cardioprotetores (Stangherlin, Gesellchen *et al.*, 2011), o que nos auxilia a sugerir que a cardioproteção promovida pela espirolactona e pela eplerenona envolvem também a participação de GMPc.

Porém, ainda falta uma completa compreensão dessas vias. O que se sabe é que GMPc está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos do sistema cardiovascular, incluindo contratilidade cardíaca, tônus vascular além de remodelagem cardíaca. Além disso, o GMPc é capaz de modular o relaxamento funcionando como regulador negativo nos processos de hipertrofia e remodelagem cardíaca (Kass e Takimoto, 2010), melhorando os danos causados por isquemia e cardiomiopatia (Takimoto, 2012), além de promover vasodilatação (via NO-GCs-GMPc-PKG) (Pereira, Paulo *et al.*, 2011).

Este segundo mensageiro é formado, principalmente, por NO (óxido nítrico), que ativa guanilato ciclase solúvel (GCs), e peptídeos natriuréticos (ANP e BNP) que ativam GC ligadas à membrana. cGMP exerce sua ação fisiológica através de PKG (proteína quinase



dependente de GMPc), PDEs e canais de cGMP, de forma que PKG, normalmente, é o mediador primário (Takimoto, 2012).

Adicionalmente, as três isoenzimas de NO sintase, incluindo óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) são expressas em cardiomiócitos (Heo, Fujiwara *et al.*, 2011). Sabe-se ainda que nNOS e eNOS são ativadas por  $Ca^{+2}$ /calmodulina (Takimoto, 2012), o que também explicaria nossos dados, já que tanto a espironolactona como a eplerenona foram capazes de aumentar tanto os níveis de cálcio (Gráfico 4) como de GMPc (Gráfico 6).

GMPc também é descrito como regulador negativo de PDEs, principalmente, PDE2, PDE3 e PDE5, que já foram descritas no coração (Mujoo, Krumenacker *et al.*, 2011) e estão relacionadas com a degradação de AMPc. Sendo assim, a via de sinalização de AMPc também pode ser modulada por GMPc (Takimoto, 2012), auxiliando na explicação de nossos resultados, já que a espironolactona foi capaz de aumentar tanto os níveis intracelulares de AMPc (Gráfico 5) como os de GMPc (Gráfico 6). Nossos dados também demonstram que os níveis aumentados de GMPc pela espironolactona se mantiveram mesmo na presença de aldosterona (em casos de cardiopatia e através da ativação da RAAS esse hormônio se encontra em níveis elevados no organismo) diferentemente ao ocorrido com a eplerenona. Como visto, o aumento das concentrações de GMPc está associado a uma série de ações cardioprotetoras. Aqui, também cabe uma melhor elucidção clínica relacionada a essa ação exercida pelos dois fármacos.

Além do estudo dos segundos mensageiros, nós também realizamos análises sobre a atividade de proteína quinase C (PKC) e demonstramos que o tratamento com aldosterona foi capaz de aumentar a atividade dessa enzima em relação ao grupo controle (Gráfico 7). Corroborando com alguns estudos anteriores que demonstraram que a aldosterona é capaz de induzir a fosforilação de moléculas de sinalização, incluindo PKC, c-Src e MAP quinase em cardiomiócitos (Mihailidou e Funder, 2005; Kobayashi, Yoshida *et al.*, 2006).

As células tratadas com espironolactona e eplerenona não sofreram alteração nos níveis de atividade de PKC quando comparadas com as células controle (Gráfico 7). Porém, as células que foram tratadas com espironolactona + aldosterona e eplerenona + aldosterona tiveram a atividade de PKC diminuída em relação às células tratadas somente com aldosterona. Indo de encontro com o estudo de Kobayashi e colaboradores de 2006, que conseguiram demonstrar que em cardiomiócitos de ratos resistentes a sal e com insuficiência cardíaca, a terapia crônica com eplerenona apresentou efeito cardioprotetor, independente da pressão sanguínea, através da diminuição de fosforilação de diversas quinases entre elas a

PKC (Kobayashi, Yoshida *et al.*, 2006). PKC está envolvida na via de sinalização intracelular da aldosterona na indução da constrição de artérias de resistência (Michea, Delpiano *et al.*, 2005). Esse efeito indica que na presença de espironolactona e eplerenona as artérias tendem a se apresentar menos contraídas, portanto com o fluxo sanguíneo aumentado.

Além disso, o aumento de atividade de PKC também está relacionado com o aparecimento de fenótipos como hipertrofia e insuficiência cardíaca e proliferação de fibroblastos (Nishida, Sato *et al.*, 2009).

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, Wang *et al.*, 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 $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , e  $\lambda/\delta$  (Bowling, Walsh *et al.*, 1999).

A família PKC tem sido classificada, atualmente, em quatro grupos sendo eles: *Clássicas* –  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\gamma$  que são ativadas por  $Ca^{2+}$ , fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) ou éster de forbol; *não clássicas* –  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\Theta$ , as quais são ativadas por PS e DAG ou éster de forbol, mas são independentes de  $Ca^{2+}$ ; *atípicas* –  $\iota$ ,  $\xi$  e  $\lambda$  que são independentes  $Ca^{2+}$  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 (Isoldi, 2003).

Além das análises de atividade de PKC, nós também estudamos a atividade de ERK1/2 e encontramos que a aldosterona foi capaz de aumentar a atividade dessa quinase (Gráfico 8). Colaborando com alguns estudos que demonstraram que esse hormônio é capaz de mediar alguns efeitos não genômicos como, por exemplo, ativação de ERK1/2 (Touyz, 2004; Ishizawa, Izawa *et al.*, 2005; Mceneaney, Dooley *et al.*, 2010; Walczak, Gaignier *et al.*, 2011) e MAPK, através da ativação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e via c-Src. Da mesma forma, Grossmann e colaboradores em um trabalho de 2005, mostraram que a aldosterona foi capaz de induzir respostas sinalizadoras para estímulos extracelulares regulados por quinase ERK1/2 e JNK1/2 (Grossmann, Benesic *et al.*, 2005).

Adicionalmente, estudos em cardiomiócitos de ratos adultos demonstraram que além da aldosterona ser capaz de aumentar a atividade de ERK1/2, esse aumento pode ser via PKC, já que o pré tratamento das células com cloreto de queleritrina (inibidor seletivo de PKC) é capaz de inibir a atividade de ERK1/2 induzida por aldosterona (Rude, Duhaney *et al.*, 2005). Além disso, podemos ainda sugerir a participação de PKC  $\epsilon$  (não clássica) nessa via, pois

estudos demonstraram que essa PKC está relacionada com a ativação de ERK1/2 (Zhang S, 2011) e subsequente apoptose de cardiomiócitos e proliferação de fibroblastos (Vivar, Soto *et al.*, 2008). O que também explicaria parte de nossos resultados, pois a aldosterona foi capaz de aumentar tanto a atividade dessa proteína quinase como de ERK1/2 em cardiomiócitos de ratos neonatos.

Além disso, tanto a espironolactona como a eplerenona quando sozinhas ou mesmo na presença de mifepristona (GR antagonizado) aumentaram a atividade de ERK1/2 (Gráfico 8). Esse fato também foi demonstrado por Grossmann e colaboradores em estudos anteriores (Grossmann, Benesic *et al.*, 2005). Porém, assim como eles, nós também esperávamos que a espironolactona fosse capaz de diminuir a atividade dessa quinase, pois quando as células foram tratadas com aldosterona essa atividade também foi aumentada, não explicando a diminuição de atividade de ERK1/2 quando as células foram tratadas com espironolactona + aldosterona. Ou seja, a espironolactona *per se* é capaz de aumentar a atividade de ERK1/2, porém, o motivo desse aumento ainda não é compreendido (Grossmann, Benesic *et al.*, 2005). Entretanto, nós sugerimos que a via de ativação de ERK1/2 não é a mesma para espironolactona e para aldosterona. Da mesma forma, a eplerenona *per se* também foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK1/2 em coração isolado de rato (Schmidt, Tissier *et al.*, 2010).

Entretanto, quando as células eram tratadas com espironolactona e estimuladas com aldosterona houve uma reversão do aumento da atividade de ERK1/2 promovida por esse hormônio, esse fato também foi demonstrado em alguns estudos anteriores (Rude, Duhaney *et al.*, 2005). O mesmo ocorreu com a eplerenona, quando tratamos as células com essa droga e estimulamos com aldosterona a atividade de ERK1/2 foi reduzida se comparada com as células tratadas somente com o hormônio mineralocorticoide, isso também foi demonstrado em diversos estudos anteriores (Ishizawa, Izawa *et al.*, 2005; Nagai, Miyata *et al.*, 2005; Zhang, Jia *et al.*, 2007; Schmidt, Tissier *et al.*, 2010).

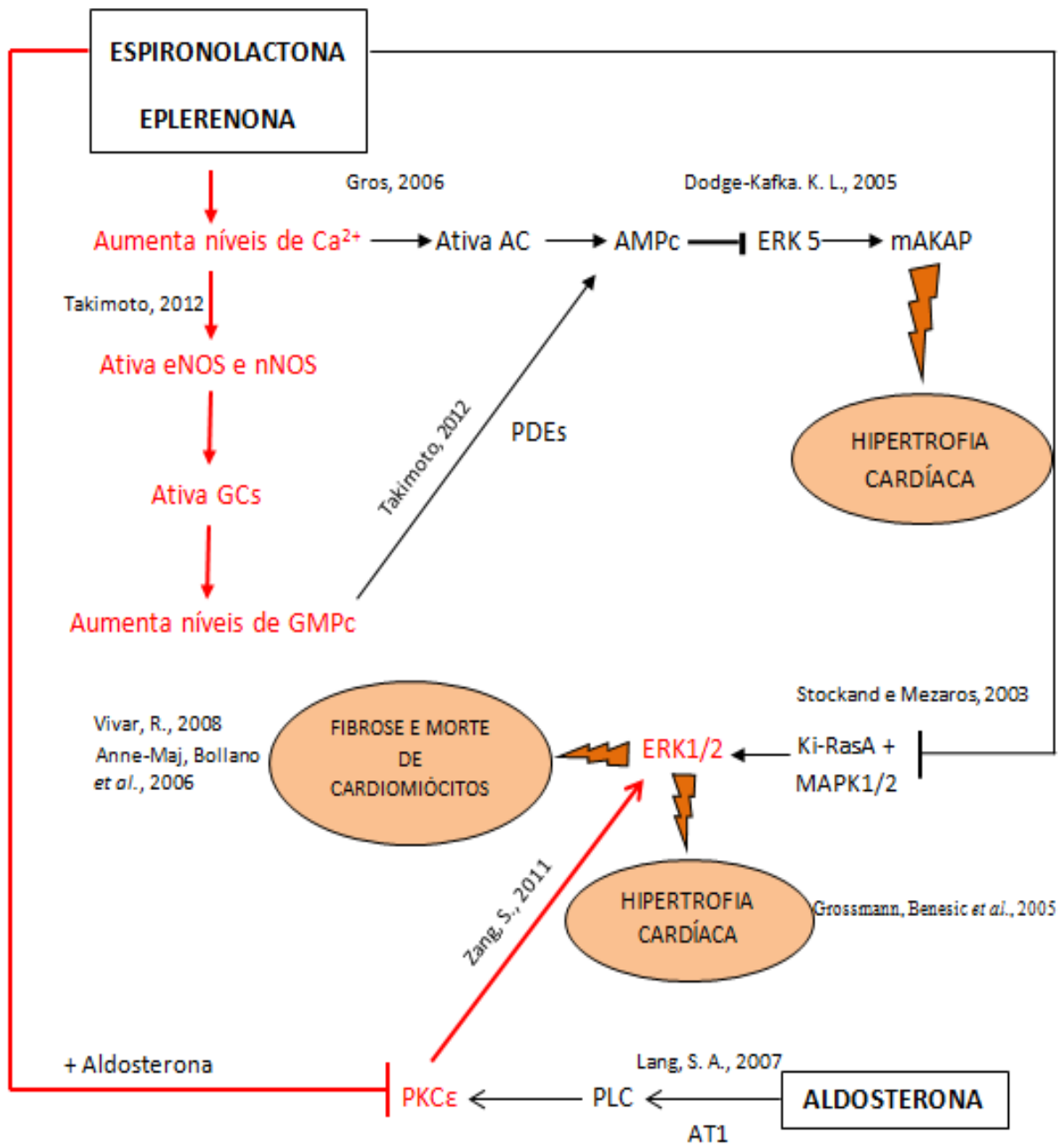
Alguns estudos têm demonstrado que o aumento de atividade de matriz metaloproteinase (MMP) em miócitos cardíacos está relacionado com o aumento de atividade de ERK1/2 (Rude, Duhaney *et al.*, 2005). Portanto, o efeito cardioprotetor do pré-tratamento com espironolactona e eplerenona é mais uma vez confirmado, já que sabe-se que as MMPs desempenham papel crítico da remodelagem do ventrículo esquerdo em resposta a espécies reativas de oxigênio (Kinugawa, Tsutsui *et al.*, 2000), citocinas inflamatórias (Siwik, Chang *et al.*, 2000) e angiotensina II (Brilla, Zhou *et al.*, 1994).

Complementarmente, alguns estudos comprovaram que a ERK1/2 quando fosforilada nos sítios de Thr202/Tyr204 está relacionada com indução de hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial (Grossmann, Benesic *et al.*, 2005; Anne-Maj, Bollano *et al.*, 2006).

O presente estudo demonstra que tanto a espironolactona como a eplerenona parecem atuar em duas vias principais para proteção do coração, sendo elas, inibição ou diminuição da proliferação de fibroblastos, o que diminui a fibrose cardíaca, e o aumento da proliferação de cardiomiócitos, que auxiliaria da recuperação do coração lesado. Além disso, conseguimos mostrar que essas drogas possuem efeitos cardioprotetores (proliferação de cardiomiócitos) independentes de sua ligação ao receptor glicocorticoide.

Porém, ainda não sabemos se os mecanismos que envolvem essa proteção estão relacionados com MR ou um outro receptor desconhecido ou ambos. Uma possibilidade para desencadear todos esses mecanismos de cardioproteção seria a ativação de canais iônicos, pois a literatura vem descrevendo várias funções desses canais na fisiologia de diversos processos, tais como regulação da pressão sanguínea, relaxamento de músculos e nervos, transdução sensorial e proliferação celular, além de doenças cardíacas e insuficiência renal (Bagal, 2013). Nós acreditamos que o principal canal iônico envolvido no processo cardioprotetor promovido pelas espironolactona e eplerenona possa ser os canais de potássio (K), pois sabe-se que tanto os canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) como os canais voltagem-dependentes ( $K_v$ ) são expressos em cardiomiócitos e estão envolvidos em uma série de condições patofisiológicas, inclusive infartos agudos de miocárdio (Saito, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre a relação de mudanças de atividade desses canais e as doenças cardiovasculares.

Considerando-se todos esses dados e o embasamento bibliográfico, nós conseguimos construir um esquema que pode representar as vias evocadas pela espironolactona e pela eplerenona no desenvolvimento de respostas cardioprotetoras, independente da via clássica (Figura 8).



**Figura 11:** Esquema de um possível mecanismo das vias de ação de espironolactona e eplerenona. Em destaque (vermelho) as vias que são coincidentes para as duas drogas e em preto as vias ativadas somente por espironolactona.

*Conclusão*

## 6 – CONCLUSÃO

Estudos de novas drogas necessitam de exaustivos ensaios e testes laboratoriais para poderem, com segurança, serem utilizadas na clínica médica. Peculiarmente, novos efeitos relacionados aos antagonistas de receptor mineralocorticoide, focando, principalmente, na cardioproteção, estão sendo levantados pela clínica médica frequentemente, sendo que muitas dessas ações ainda encontram-se sem uma justificativa teórica que as embasem. Isso ocorre em função desses agentes terem sido inicialmente utilizados, unicamente, como simples antagonistas de MR. Em nosso estudo, que pela primeira vez, avaliou comparativamente os mecanismos intracelulares cardioprotetores da espironolactona e da eplerenona, podemos concluir que:

- A. Ambas promovem aumento da proliferação de cardiomiócitos e reversão de proliferação de fibroblastos induzida pela aldosterona;
- B. Sobre a participação dos segundos mensageiros, ambas são capazes de mobilizar  $Ca^{2+}$  e GMPc, além de ativarem ERK1/2 e reverterem a ativação de PKC promovida pela aldosterona;

Porém, devemos notar diferenças importantes encontradas entre essas duas drogas, como:

- A. Aumento de AMPc somente pela espironolactona;
- B. Aumento de GMPc, promovido pela eplerenona e revertido na presença de aldosterona, diferente do que foi encontrado para a espironolactona;
- C. Redução da proliferação de fibroblastos em relação ao controle, pela espironolactona, o que não ocorreu com a eplerenona;

A análise do conjunto de nossos dados implica em uma possível resposta cardioprotetora mais robusta da espironolactona em relação à eplerenona, apesar desse efeito necessitar ser demonstrado clinicamente. E finalmente, fica claro que não podemos considerar esse grupo farmacológico como apenas antagonistas de MR, uma vez que nossos dados, somados aos encontrados na literatura, demonstram, claramente, a atividade de vias diretas (independente de MR) tanto para espironolactona como para eplerenona, assim como já vem sido descrito para aldosterona.

# *Referências*



## 7- REFERÊNCIAS

AKAZAWA, H. E I. KOMURO. ROLES OF CARDIAC TRANSCRIPTION FACTORS IN CARDIAC HYPERTROPHY. CIRC RES, v.92, n.10, MAY 30, p.1079-88. 2003.

ALVES, G. B. INFLUENCE OF ANGIOTENSINOGEN AND ACE POLYMORPHISMS ON MYOCARDIAL HYPERTROPHY AND GAIN OF AEROBIC CAPACITY BY EXERCISE TRAINING IN YOUNG INDIVIDUALS. (TESE (PHD)). MEDICINA, USP, SÃO PAULO, 2007. 123 p.

ALZAMORA, R., E. T. MARUSIC, *ET AL*. NONGENOMIC EFFECT OF ALDOSTERONE ON  $Na^+$ ,  $K^+$ -ADENOSINE TRIPHOSPHATASE IN ARTERIAL VESSELS. ENDOCRINOLOGY, v.144, n.4, APR, p.1266-72. 2003.

ALZAMORA, R., L. MICHEA, *ET AL*. ROLE OF 11BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE IN NONGENOMIC ALDOSTERONE EFFECTS IN HUMAN ARTERIES. HYPERTENSION, v.35, n.5, MAY, p.1099-104. 2000.

ANASTASIA S. MIHAILIDOU, T. Y. L. L., MAHIDI MARDINI, JOHN W. FUNDER. GLUCOCORTICOIDS ACTIVATE CARDIAC MINERALOCORTICOID RECEPTORS DURING EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION. HYPERTENSION, v.54, p.306-1312. 2009.

ANNE-MAJ, S., E. BOLLANO, *ET AL*. HYPERINSULINEMIA: EFFECT ON CARDIAC MASS/FUNCTION, ANGIOTENSIN II RECEPTOR EXPRESSION, AND INSULIN SIGNALING PATHWAYS. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL, v.291, n.2, AUG, p.H787-96. 2006.

BAGAL, S. B., BROWN, A. D., COX, P. J., OMOTO, K., OWEN, R. M., PRYDE, D. C., SIDDEERS, B., SKERRATT, S. E., STEVENS, E. B., STORER, I. R., AND SWAIN, N. A. . ION CHANNELS AS THERAPEUTIC TARGETS: A DRUG DISCOVERY PERSPECTIVE. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, v.56, p.595-624. 2013.

BALAKUMAR, P. E G. JAGADEESH. 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, NOV, p.570-9. 2010.

BARRETO-CHAVES, M. L., A. HEIMANN, *ET AL*. STIMULATORY EFFECT OF DEXAMETHASONE ON ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IN NEONATAL RAT CARDIAC MYOCYTES. BRAZ J MED BIOL RES, v.33, n.6, JUN, p.661-4. 2000.

BERNARD, K., W. WANG, *ET AL*. 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, NOV 6, p.30754-65. 2009.

BOWLING, N., R. A. WALSH, *ET AL*. INCREASED PROTEIN KINASE C ACTIVITY AND EXPRESSION OF  $Ca^{2+}$ -SENSITIVE ISOFORMS IN THE FAILING HUMAN HEART. CIRCULATION, v.99, n.3, JAN 26, p.384-91. 1999.

BRILLA, C. G., L. S. MATSUBARA, *ET AL.* ANTIFIBROTIC EFFECTS OF SPIRONOLACTONE IN PREVENTING MYOCARDIAL FIBROSIS IN SYSTEMIC ARTERIAL HYPERTENSION. AM J CARDIOL, v.71, n.3, JAN 21, p.12A-16A. 1993.

BRILLA, C. G., G. ZHOU, *ET AL.* COLLAGEN METABOLISM IN CULTURED ADULT RAT CARDIAC FIBROBLASTS: RESPONSE TO ANGIOTENSIN II AND ALDOSTERONE. J MOL CELL CARDIOL, v.26, n.7, JUL, p.809-20. 1994.

BUENO, O. F., L. J. DE WINDT, *ET AL.* THE MEK1-ERK1/2 SIGNALING PATHWAY PROMOTES COMPENSATED CARDIAC HYPERTROPHY IN TRANSGENIC MICE. EMBO J, v.19, n.23, DEC 1, p.6341-50. 2000.

CALLERA, G. E., R. M. TOUYZ, *ET AL.* ALDOSTERONE ACTIVATES VASCULAR P38MAP KINASE AND NADPH OXIDASE VIA C-SRC. HYPERTENSION, v.45, n.4, APR, p.773-9. 2005.

CHEN QM, A. D., SUN H, XIE L, LIN Y, TERRAND J, MORRISSY S, E P. S. CORTICOSTEROIDS INHIBIT CELL DEATH INDUCED BY DOXORUBICIN IN CARDIOMYOCYTES: INDUCTION OF ANTIAPOPTOSIS, ANTIOXIDANT, AND DETOXIFICATION GENES. MOL PHARMACOL, v.67, p.1861-1873. 2005.

CHENG, C. M., H. J. HONG, *ET AL.* CRUCIAL ROLE OF EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE PATHWAY IN REACTIVE OXYGEN SPECIES-MEDIATED ENDOTHELIN-1 GENE EXPRESSION INDUCED BY ENDOTHELIN-1 IN RAT CARDIAC FIBROBLASTS. MOL PHARMACOL, v.63, n.5, MAY, p.1002-11. 2003.

CHUN, T. Y., L. J. BLOEM, *ET AL.* ALDOSTERONE INHIBITS INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES. ENDOCRINOLOGY, v.144, n.5, MAY, p.1712-7. 2003.

COUETTE, B., V. MARSAUD, *ET AL.* SPIRONOLACTONE, AN ALDOSTERONE ANTAGONIST, ACTS AS AN ANTIGLUCOCORTICOSTEROID ON THE MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS PROMOTER. ENDOCRINOLOGY, v.130, n.1, JAN, p.430-6. 1992.

DANSER, W. C. A. H. J. WHY ARE MINERALOCORTICOID RECEPTOR ANTAGONISTS CARDIOPROTECTIVE? . NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCH PHARMACOL, v.374, p.153-162. 2006.

DINIZ, G. P. AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DO RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II E DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO AKT/GSK3-BETA/MTOR NO PROCESSO DE HIPERTROFICA DO CARDIOMIÓCITO INDUZIDA PELO HORMÔNIO TIROIDEANO. (DOUTORADO). DEPARTAMENTO DE ANATOMIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, 2009. 104 p.

DIVIANI, D. MODULATION OF CARDIAC FUNCTION BY A-KINASE ANCHORING PROTEINS. CURR OPIN PHARMACOL, v.8, n.2, APR, p.166-73. 2008.

DODGE-KAFKA, K. L. S., J.; PARE, G. C. ET AL. . THE PROTEIN KINASE A ANCHORING PROTEIN MAKAP COORDINATES TWO INTEGRATED CAMP EFFECTOR PATHWAYS. . NATURE, v. 437, p. 574-578. 2005

DOOLEY, R., B. J. HARVEY, *ET AL.* NON-GENOMIC ACTIONS OF ALDOSTERONE: FROM RECEPTORS AND SIGNALS TO MEMBRANE TARGETS. MOL CELL ENDOCRINOL, v.350, n.2, MAR 24, p.223-34. 2011A.

\_\_\_\_\_. THE REGULATION OF CELL GROWTH AND SURVIVAL BY ALDOSTERONE. FRONT BIOSCI, v.16, p.440-57. 2011B.

DORRANCE, A. M., H. L. OSBORN, *ET AL.* SPIRONOLACTONE REDUCES CEREBRAL INFARCT SIZE AND EGF-RECEPTOR mRNA IN STROKE-PRONE RATS. AM J PHYSIOL REGUL INTEGR COMP PHYSIOL, v.281, n.3, SEP, p.R944-50. 2001.

FAIEZ ZANNAD, M. D., PH.D., JOHN J.V. MCMURRAY, M.D., HENRY KRUM, M.B., PH.D., DIRK J. VAN VELDHUISEN, M.D., PH.D., , M. D. KARL SWEDBERG, PH.D., HARRY SHI, M.S., JOHN VINCENT, M.B., PH.D., STUART J. POCOCK, PH.D., , *ET AL.* EPLERENONE IN PATIENTS WITH SYSTOLIC HEART FAILURE AND MILD SYMPTOMS. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, v.364, n.1, p.11-21. 2011.

FARMAN, N. E M. E. RAFESTIN-OBLIN. MULTIPLE ASPECTS OF MINERALOCORTICOID SELECTIVITY. AM J PHYSIOL RENAL PHYSIOL, v.280, n.2, FEB, p.F181-92. 2001.

FARQUHARSON, C. A. E A. D. STRUTHERS. SPIRONOLACTONE INCREASES NITRIC OXIDE BIOACTIVITY, IMPROVES ENDOTHELIAL VASODILATOR DYSFUNCTION, AND SUPPRESSES VASCULAR ANGIOTENSIN I/ANGIOTENSIN II CONVERSION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE. CIRCULATION, v.101, n.6, FEB 15, p.594-7. 2000.

FERNANDES-ROSA, L. F. A., R. R. S. . RESISTÊNCIA AOS MINERALOCORTICÓIDES: PSEUDO-HIPOALDOSTERONISMO TIPO 1. ARQ BRAS ENDOCRINOL METAB., v. v. 51, n.N. 3, p.P. 373-381. 2006.

FRANCHIMONT, D. OVERVIEW OF THE ACTIONS OF GLUCOCORTICOIDS ON THE IMMUNE RESPONSE: A GOOD MODEL TO CHARACTERIZE NEW PATHWAYS OF IMMUNOSUPPRESSION FOR NEW TREATMENT STRATEGIES. ANN N Y ACAD SCI, v.1024, JUN, p.124-37. 2004.

FUKASAWA, M., H. NISHIDA, *ET AL.* 6-[4-(1-CYCLOHEXYL-1H-TETRAZOL-5-YL)BUTOXY]-3,4-DIHYDRO-2-(1H)QUINOLINONE (CILOSTAZOL), A PHOSPHODIESTERASE TYPE 3 INHIBITOR, REDUCES INFARCT SIZE VIA ACTIVATION OF MITOCHONDRIAL CA<sup>2+</sup>-ACTIVATED K<sup>+</sup> CHANNELS IN RABBIT HEARTS. J PHARMACOL EXP THER, v.326, n.1, JUL, p.100-4. 2008.

FULLER, P. J., Y. YAO, *ET AL.* MECHANISMS OF LIGAND SPECIFICITY OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR. J ENDOCRINOL, v.213, n.1, APR, p.15-24. 2012.

FULLERTON, M. J. E J. W. FUNDER. ALDOSTERONE AND CARDIAC FIBROSIS: IN VITRO STUDIES. CARDIOVASC RES, v.28, n.12, DEC, p.1863-7. 1994.

FUNDER, J. W. NEW BIOLOGY OF ALDOSTERONE, AND EXPERIMENTAL STUDIES ON THE SELECTIVE ALDOSTERONE BLOCKER EPLERENONE. AM HEART J, v.144, n.5 SUPPL, NOV, p.S8-11. 2002.

\_\_\_\_\_. ALDOSTERONE RESURGENS--LETTER FROM EPHEBUS. J CLIN ENDOCRINOL METAB, v.88, n.6, JUN, p.2373-5. 2003.

\_\_\_\_\_. RECONSIDERING THE ROLES OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR. HYPERTENSION, v.53, n.2, FEB, p.286-90. 2009.

FUNDER, J. W., D. FELDMAN, *ET AL.* SPECIFIC ALDOSTERONE BINDING IN RAT KIDNEY AND PAROTID. J STEROID BIOCHEM, v.3, n.2, FEB, p.209-18. 1972.

FUNDER, J. W., P. T. PEARCE, *ET AL.* MINERALOCORTICOID ACTION: TARGET TISSUE SPECIFICITY IS ENZYME, NOT RECEPTOR, MEDIATED. SCIENCE, v.242, n.4878, OCT 28, p.583-5. 1988.

GIESTAS, A., I. PALMA, *ET AL.* [RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM (RAAS) AND ITS PHARMACOLOGIC MODULATION]. ACTA MED PORT, v.23, n.4, JUL-AUG, p.677-88. 2010.

GREENWOOD, A. K., P. C. BUTLER, *ET AL.* MULTIPLE CORTICOSTEROID RECEPTORS IN A TELEOST FISH: DISTINCT SEQUENCES, EXPRESSION PATTERNS, AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITIES. ENDOCRINOLOGY, v.144, n.10, OCT, p.4226-36. 2003.

GROS, R. ADENYLYL CYCLASE ISOFORM-SELECTIVE REGULATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE PROLIFERATION AND CYTOSKELETAL REORGANIZATION. CIRCULATION RESEARCH, v. 99, n. 8, p.845-852. 2006.

GROSSMANN, C., A. BENESIC, *ET AL.* HUMAN MINERALOCORTICOID RECEPTOR EXPRESSION RENDERS CELLS RESPONSIVE FOR NONGENOTROPIC ALDOSTERONE ACTIONS. MOL ENDOCRINOL, v.19, n.7, JUL, p.1697-710. 2005.

GROSSMANN, C. E M. GEKLE. NEW ASPECTS OF RAPID ALDOSTERONE SIGNALING. MOL CELL ENDOCRINOL, v.308, n.1-2, SEP 24, p.53-62. 2009.

GUSTAFSSON, A. B. E L. L. BRUNTON. BETA-ADRENERGIC STIMULATION OF RAT CARDIAC FIBROBLASTS ENHANCES INDUCTION OF NITRIC-OXIDE SYNTHASE BY INTERLEUKIN-1BETA VIA MESSAGE STABILIZATION. MOL PHARMACOL, v.58, n.6, DEC, p.1470-8. 2000.

HADOKE, P. W. F. C., C; KOTELEVTSSEV, Y.V; WILLIAMS, B.C; KENYON, C.J. ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION IN MICE AFTER TRANSGENIC KNOCKOUT OF TYPE 2, BUT NOT TYPE 1, 11B-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE. CIRCULATION v.104, p. 2832–2837. 2001.

HAFEZI-MOGHADAM, A., T. SIMONCINI, *ET AL.* ACUTE CARDIOVASCULAR PROTECTIVE EFFECTS OF CORTICOSTEROIDS ARE MEDIATED BY NON-TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE. NAT MED, v.8, n.5, MAY, p.473-9. 2002.

HASEROTH, K., D. GERDES, *ET AL.* RAPID NONGENOMIC EFFECTS OF ALDOSTERONE IN MINERALOCORTICOID-RECEPTOR-KNOCKOUT MICE. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, v.266, n.1, DEC 9, p.257-61. 1999.

HAYASHI, M., T. TSUTAMOTO, *ET AL.* IMMEDIATE ADMINISTRATION OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR ANTAGONIST SPIRONOLACTONE PREVENTS POST-INFARCT LEFT VENTRICULAR REMODELING ASSOCIATED WITH SUPPRESSION OF A MARKER OF MYOCARDIAL COLLAGEN SYNTHESIS IN PATIENTS WITH FIRST ANTERIOR ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION. CIRCULATION, v.107, n.20, MAY 27, p.2559-65. 2003.

HEINEKE, J. E J. D. MOLKENTIN. REGULATION OF CARDIAC HYPERTROPHY BY INTRACELLULAR SIGNALLING PATHWAYS. NAT REV MOL CELL BIOL, v.7, n.8, AUG, p.589-600. 2006.

HEO, K. S., K. FUJIWARA, *ET AL.* DISTURBED-FLOW-MEDIATED VASCULAR REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION. CIRC J, v.75, n.12, p.2722-30. 2011.

ISHIZAWA, K., Y. IZAWA, *ET AL.* ALDOSTERONE STIMULATES VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL PROLIFERATION VIA BIG MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1 ACTIVATION. HYPERTENSION, v.46, n.4, OCT, p.1046-52. 2005.

ISOLDI, M. C., E. A. PEREIRA, *ET AL.* THE ROLE OF CALCIUM, CALCIUM-ACTIVATED K<sup>+</sup> CHANNELS, AND TYROSINE/KINASE IN PSORALEN-EVOKED RESPONSES IN HUMAN MELANOMA CELLS. BRAZ J MED BIOL RES, v.37, n.4, APR, p.559-68. 2004.

ISOLDI, M. C. M., S. R.; CASTRUCCI, A. M. L.; LIMA, L. H. R. G.; VISCONTI, M. A.; REBOUÇAS, N. A. IDENTIFICATION OF PROTEIN KINASE C (PKC) ISOFORMS IN TELEOSTEAN, AMPHIBIAN AND AVIAN PIGMENT CELLS. . PIGMENT CELL RESEARCH, v. v. 16, p. p. 639-643. 2003.

JU, H., X. WANG, *ET AL.* IDENTIFICATION AND TISSUE DISTRIBUTION OF A NOVEL RAT GLUCOCORTICOID RECEPTOR SPLICE VARIANT. ACTA BIOCHIM POL, v.56, n.1, p.109-13. 2009.

KAPILOFF, M. S., L. A. PIGGOTT, *ET AL.* AN ADENYLYL CYCLASE-MAKAPBETA SIGNALING COMPLEX REGULATES CAMP LEVELS IN CARDIAC MYOCYTES. J BIOL CHEM, v.284, n.35, AUG 28, p.23540-6. 2009.

KAPILOFF, M. S., R. V. SCHILLACE, *ET AL.* MAKAP: AN A-KINASE ANCHORING PROTEIN TARGETED TO THE NUCLEAR MEMBRANE OF DIFFERENTIATED MYOCYTES. J CELL SCI, v.112 ( PT 16), AUG, p.2725-36. 1999.

KASS, D. A. E E. TAKIMOTO. REGULATION AND ROLE OF MYOCYTE CYCLIC GMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE-1. PROC NATL ACAD SCI U S A, v.107, n.24, JUN 15, p.E98; AUTHOR REPLY E99. 2010.

KINUGAWA, S., H. TSUTSUI, *ET AL.* TREATMENT WITH DIMETHYLTHIOUREA PREVENTS LEFT VENTRICULAR REMODELING AND FAILURE AFTER EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION IN MICE: ROLE OF OXIDATIVE STRESS. CIRC RES, v.87, n.5, SEP 1, p.392-8. 2000.

KOBAYASHI, N., K. YOSHIDA, *ET AL.* CARDIOPROTECTIVE MECHANISMS OF EPLERENONE ON CARDIAC PERFORMANCE AND REMODELING IN FAILING RAT HEARTS. HYPERTENSION, v.47, n.4, APR, p.671-9. 2006.

KOHLER, E., S. BERTSCHIN, *ET AL.* DOES ALDOSTERONE-INDUCED CARDIAC FIBROSIS INVOLVE DIRECT EFFECTS ON CARDIAC FIBROBLASTS? J VASC RES, v.33, n.4, JUL-AUG, p.315-26. 1996.

LATOUCHE, C., Y. SAINTE-MARIE, *ET AL.* MOLECULAR SIGNATURE OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR SIGNALING IN CARDIOMYOCYTES: FROM CULTURED CELLS TO MOUSE HEART. ENDOCRINOLOGY, v.151, n.9, SEP, p.4467-76. 2010.

LEMARIE, C. A., S. M. SIMEONE, *ET AL.* ALDOSTERONE-INDUCED ACTIVATION OF SIGNALING PATHWAYS REQUIRES ACTIVITY OF ANGIOTENSIN TYPE 1A RECEPTORS. CIRC RES, v.105, n.9, OCT 23, p.852-9. 2009.

LOMBES, M., N. BINART, *ET AL.* CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION OF THE HUMAN MINERALOCORTICOSTEROID RECEPTOR WITH HORMONE RESPONSE ELEMENTS. BIOCHEM J, v.292 (Pt 2), JUN 1, p.577-83. 1993.

LOMBES, M., M. E. OBLIN, *ET AL.* IMMUNOHISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL EVIDENCE FOR A CARDIOVASCULAR MINERALOCORTICOID RECEPTOR. CIRC RES, v.71, n.3, SEP, p.503-10. 1992.

LOSEL, R. M., E. FALKENSTEIN, *ET AL.* NONGENOMIC STEROID ACTION: CONTROVERSIES, QUESTIONS, AND ANSWERS. PHYSIOL REV, v.83, n.3, JUL, p.965-1016. 2003.

LOWENBERG, M., J. TUYNMAN, *ET AL.* RAPID IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS OF GLUCOCORTICOIDS MEDIATED THROUGH LCK AND FYN. BLOOD, v.106, n.5, SEP 1, p.1703-10. 2005.

MACFADYEN, R. J., C. S. BARR, *ET AL.* ALDOSTERONE BLOCKADE REDUCES VASCULAR COLLAGEN TURNOVER, IMPROVES HEART RATE VARIABILITY AND REDUCES EARLY MORNING RISE IN HEART RATE IN HEART FAILURE PATIENTS. CARDIOVASC RES, v.35, n.1, JUL, p.30-4. 1997.

MARVER, D., J. STEWART, *ET AL.* RENAL ALDOSTERONE RECEPTORS: STUDIES WITH (3H)ALDOSTERONE AND THE ANTI-MINERALOCORTICOID (3H)SPIROLACTONE (SC-26304). PROC NATL ACAD SCI U S A, v.71, n.4, APR, p.1431-5. 1974.

MCENEANEY, V., R. DOOLEY, *ET AL.* PROTEIN KINASE D STABILIZES ALDOSTERONE-INDUCED ERK1/2 MAP KINASE ACTIVATION IN M1 RENAL CORTICAL COLLECTING DUCT CELLS TO PROMOTE CELL PROLIFERATION. J STEROID BIOCHEM MOL BIOL, v.118, n.1-2, JAN, p.18-28. 2010.

MCMAHON, E. G. RECENT STUDIES WITH EPLERENONE, A NOVEL SELECTIVE ALDOSTERONE RECEPTOR ANTAGONIST. CURR OPIN PHARMACOL, v.1, n.2, APR, p.190-6. 2001.

MICHAEL V. BERRIDGE, A. S. T., KATHY D. MCCOY, AND RUI WANG. THE BIOCHEMICAL AND CELLULAR BASIS OF CELL PROLIFERATION ASSAYS THAT USE TETRAZOLIUM SALTS. BIOCHEMICA, v.6. 1996.

MICHEA, L., A. M. DELPIANO, *ET AL.* EPLERENONE BLOCKS NONGENOMIC EFFECTS OF ALDOSTERONE ON THE NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> EXCHANGER, INTRACELLULAR CA<sup>2+</sup> LEVELS, AND VASOCONSTRICTION IN MESENTERIC RESISTANCE VESSELS. ENDOCRINOLOGY, v.146, n.3, MAR, p.973-80. 2005.

MIESFELD, R., S. RUSCONI, *ET AL.* GENETIC COMPLEMENTATION OF A GLUCOCORTICOID RECEPTOR DEFICIENCY BY EXPRESSION OF CLONED RECEPTOR cDNA. CELL, v.46, n.3, AUG 1, p.389-99. 1986.

MIHAILIDOU, A. S., H. BUNDGAARD, *ET AL.* HYPERALDOSTERONEMIA IN RABBITS INHIBITS THE CARDIAC SARCOLEMAL NA(+) - K(+) PUMP. CIRC RES, v.86, n.1, JAN 7-21, p.37-42. 2000.

MIHAILIDOU, A. S. E J. W. FUNDER. NONGENOMIC EFFECTS OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR ACTIVATION IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM. STEROIDS, v.70, n.5-7, MAY-JUN, p.347-51. 2005.

MIHAILIDOU, A. S., T. Y. LOAN LE, *ET AL.* GLUCOCORTICOID ACTIVATE CARDIAC MINERALOCORTICOID RECEPTORS DURING EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION. HYPERTENSION, v.54, n.6, DEC, p.1306-12. 2009.

MORAIS. C, A. H., M. M; AMANCIO, G. C; LEMOS, D. S; SILVA, M. E; SANTOS, R. A .S; CULHANE, J; CARVALHO, P. B AND ISOLDI. M. C. CROSS-TALKING BETWEEN GENOMIC AND NON-GENOMIC ALDOSTERONE PATHWAYS, LEADING TO CARDIOMYOCYTE HYPERTROPHY. CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, v.EM SUBMISSÃO. 2013.

MUJOO, K., J. S. KRUMENACKER, *ET AL.* NITRIC OXIDE-CYCLIC GMP SIGNALING IN STEM CELL DIFFERENTIATION. FREE RADIC BIOL MED, v.51, n.12, DEC 15, p.2150-7. 2011.

NAGAI, Y., K. MIYATA, *ET AL.* ALDOSTERONE STIMULATES COLLAGEN GENE EXPRESSION AND SYNTHESIS VIA ACTIVATION OF ERK1/2 IN RAT RENAL FIBROBLASTS. HYPERTENSION, v.46, n.4, OCT, p.1039-45. 2005.

NAGATA, K., K. OBATA, *ET AL.* MINERALOCORTICOID RECEPTOR ANTAGONISM ATTENUATES CARDIAC HYPERTROPHY AND FAILURE IN LOW-ALDOSTERONE HYPERTENSIVE RATS. HYPERTENSION, v.47, n.4, APR, p.656-64. 2006.

NAGATA, K., F. SOMURA, *ET AL.* AT1 RECEPTOR BLOCKADE REDUCES CARDIAC CALCINEURIN ACTIVITY IN HYPERTENSIVE RATS. HYPERTENSION, v.40, n.2, AUG, p.168-74. 2002.

NAPPI, J. M. E A. SIEG. ALDOSTERONE AND ALDOSTERONE RECEPTOR ANTAGONISTS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE. VASC HEALTH RISK MANAG, v.7, p.353-63. 2011.

NIJMEIJER, R., M. WILLEMSSEN, *ET AL.* TYPE II SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2 BINDS TO ISCHEMIC FLIP-FLOPPED CARDIOMYOCYTES AND SUBSEQUENTLY INDUCES CELL DEATH. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL, v.285, n.5, NOV, p.H2218-24. 2003.

NISHIDA, H., T. SATO, *ET AL.* NEW ASPECTS FOR THE TREATMENT OF CARDIAC DISEASES BASED ON THE DIVERSITY OF FUNCTIONAL CONTROLS ON CARDIAC MUSCLES: MITOCHONDRIAL ION CHANNELS AND CARDIOPROTECTION. J PHARMACOL SCI, v.109, n.3, MAR, p.341-7. 2009.

NISHIOKA, T., MAIKO SUZUKI, MSc,\* KATSUYA ONISHI, MD,† NOBUYUKI TAKAKURA, MD,‡, M. HIROYASU INADA, \* TOSHIMICHI YOSHIDA, MD,\* MICHIAKI HIROE, MD,§, *ET AL.* EPLERENONE ATTENUATES MYOCARDIAL FIBROSIS IN THE ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSIVE MOUSE: INVOLVEMENT OF TENASCIN-C INDUCED BY ALDOSTERONE-MEDIATED INFLAMMATION. CARDIOVASC PHARMACOL, v.49, p.261–268. 2007.

NUNEZ, L., R. A. VALERO, *ET AL.* CELL PROLIFERATION DEPENDS ON MITOCHONDRIAL CA<sup>2+</sup> UPTAKE: INHIBITION BY SALICYLATE. J PHYSIOL, v.571, n.Pt 1, FEB 15, p.57-73. 2006.

NÚÑEZ, L. C., R; GÓMEZ, R; VAQUERO, M; DELPÓN, E E Y. J. TAMARGO. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA EPLERENONA. REVISTA ESPANHOLA DE CARDIOLOGIA SUPLEMENTAR, v.6, p.31-47. 2006.

O'MALLEY, B. THE YEAR IN BASIC SCIENCE: NUCLEAR RECEPTORS AND COREGULATORS. MOL ENDOCRINOL, v.22, n.12, DEC, p.2751-8. 2008.

OAKLEY, R. H., J. C. WEBSTER, *ET AL*. EXPRESSION AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF THE BETA-ISOFORM OF THE HUMAN GLUCOCORTICOID RECEPTOR. ENDOCRINOLOGY, v.138, n.11, NOV, p.5028-38. 1997.

OBERLEITHNER, H. ALDOSTERONE MAKES HUMAN ENDOTHELIUM STIFF AND VULNERABLE. KIDNEY INT, v.67, n.5, MAY, p.1680-2. 2005.

OBERLEITHNER, H., T. LUDWIG, *ET AL*. HUMAN ENDOTHELIUM: TARGET FOR ALDOSTERONE. HYPERTENSION, v.43, n.5, MAY, p.952-6. 2004.

OUVRARD-PASCAUD, A., Y. SAINTE-MARIE, *ET AL*. CONDITIONAL MINERALOCORTICOID RECEPTOR EXPRESSION IN THE HEART LEADS TO LIFE-THREATENING ARRHYTHMIAS. CIRCULATION, v.111, n.23, JUN 14, p.3025-33. 2005.

PASCUAL-LE TALLEC, L. E M. LOMBES. THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: A JOURNEY EXPLORING ITS DIVERSITY AND SPECIFICITY OF ACTION. MOL ENDOCRINOL, v.19, n.9, SEP, p.2211-21. 2005.

PATRICK W.F. HADOKE, J. I. A. B. R. W. THERAPEUTIC MANIPULATION OF GLUCOCORTICOID METABOLISM IN CARDIOVASCULAR DISEASE. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, v. 156, p. 689–712. 2009.

PEARL JM, N. D., SCHWARTZ SM, WAGNER CJ, BAUER SM, SETSER EA, E D. JY. GLUCOCORTICOID REDUCE ISCHEMIA-REPERFUSION-INDUCED MYOCARDIAL APOPTOSIS IN IMMATURE HEARTS. ANN THORAC SURG., v.74:, p.830–836. 2002.

PEREIRA, A. C., M. PAULO, *ET AL*. NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND BIOLOGICAL FUNCTIONS OF NITRIC OXIDE RELEASED FROM RUTHENIUM COMPOUNDS. BRAZ J MED BIOL RES, v.44, n.9, SEP, p.947-57. 2011.

PESSÔA, B. S. O BLOQUEIO DO RECEPTOR MINERALOCORTICÓIDE MELHORA A NEFROPATIA PELO AUMENTO DA ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS DIABÉTICOS HIPERTENSOS. (MESTRADO). PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS . FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS, CAMPINAS, SP 2010.

PETER, W., M. BEATO, *ET AL*. RECOMBINANT RABBIT UTEROGLOBIN EXPRESSED AT HIGH LEVELS IN E. COLI FORMS STABLE DIMERS AND BINDS PROGESTERONE. PROTEIN ENG, v.3, n.1, OCT, p.61-6. 1989.

PITT, B., W. REMME, *ET AL*. EPLERENONE, A SELECTIVE ALDOSTERONE BLOCKER, IN PATIENTS WITH LEFT VENTRICULAR DYSFUNCTION AFTER MYOCARDIAL INFARCTION. N ENGL J MED, v.348, n.14, APR 3, p.1309-21. 2003.



PITT, B., F. ZANNAD, *ET AL.* 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, SEP 2, p.709-17. 1999.

PITZALIS, C., N. PIPITONE, *ET AL.* REGULATION OF LEUKOCYTE-ENDOTHELIAL INTERACTIONS BY GLUCOCORTICOIDS. ANN N Y ACAD SCI, v.966, JUN, p.108-18. 2002.

PORTER, G. A. E I. S. EDELMAN. THE ACTION OF ALDOSTERONE AND RELATED CORTICOSTEROIDS ON SODIUM TRANSPORT ACROSS THE TOAD BLADDER. J CLIN INVEST, v.43, APR, p.611-20. 1964.

RAFIQ, K., D. NAKANO, *ET AL.* EFFECTS OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR BLOCKADE ON GLUCOCORTICOID-INDUCED RENAL INJURY IN ADRENALECTOMIZED RATS. J HYPERTENS, v.29, n.2, FEB, p.290-8. 2011.

ROCHA, R., C. T. STIER, JR., *ET AL.* ALDOSTERONE: A MEDIATOR OF MYOCARDIAL NECROSIS AND RENAL ARTERIOPATHY. ENDOCRINOLOGY, v.141, n.10, OCT, p.3871-8. 2000.

ROSSI, G. P., A. SACCHETTO, *ET AL.* CHANGES IN LEFT VENTRICULAR ANATOMY AND FUNCTION IN HYPERTENSION AND PRIMARY ALDOSTERONISM. HYPERTENSION, v.27, n.5, MAY, p.1039-45. 1996.

ROSSIER, M. F., M. PYTHON, *ET AL.* CONTRIBUTION OF MINERALOCORTICOID AND GLUCOCORTICOID RECEPTORS TO THE CHRONOTROPIC AND HYPERTROPHIC ACTIONS OF ALDOSTERONE IN NEONATAL RAT VENTRICULAR MYOCYTES. ENDOCRINOLOGY, v.151, n.6, JUN, p.2777-87. 2010.

RUDE, M. K., T. A. DUHANEY, *ET AL.* ALDOSTERONE STIMULATES MATRIX METALLOPROTEINASES AND REACTIVE OXYGEN SPECIES IN ADULT RAT VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES. HYPERTENSION, v.46, n.3, SEP, p.555-61. 2005.

SAITO, T., FUJIWARA, Y., FUJIWARA, R., HASEGAWA, H., KIBIRA, S., MIURA, H., AND MIURA, M. ROLE OF AUGMENTED EXPRESSION OF INTERMEDIATE CONDUCTANCE  $Ca^{2+}$ -ACTIVATED  $K^{+}$  CHANNELS IN POSTISCHAEMIC HEART. CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY, v. 29, p. 324–329. 2002.

SANCHEZ-MAS, J., M. C. TURPIN, *ET AL.* DIFFERENTIAL ACTIONS OF EPLERENONE AND SPIRONOLACTONE ON THE PROTECTIVE EFFECT OF TESTOSTERONE AGAINST CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS IN VITRO. REV ESP CARDIOL, v.63, n.7, JUL, p.779-87. 2010.

SCHMIDT, K., R. TISSIER, *ET AL.* CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR ANTAGONISTS AT REPERFUSION. EUR HEART J, v.31, n.13, JUL, p.1655-62. 2010.

SIWIK, D. A., D. L. CHANG, *ET AL.* INTERLEUKIN-1 $\beta$  AND TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  DECREASE COLLAGEN SYNTHESIS AND INCREASE MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVITY IN CARDIAC FIBROBLASTS IN VITRO. CIRC RES, v.86, n.12, JUN 23, p.1259-65. 2000.

SOHN, H. J., K. H. YOO, *ET AL.* ALDOSTERONE MODULATES CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE NEONATAL RAT HEART. J KOREAN MED SCI, v.25, n.9, SEP, p.1296-304. 2010.

SONG, I. H. E F. BUTTGEREIT. NON-GENOMIC GLUCOCORTICOID EFFECTS TO PROVIDE THE BASIS FOR NEW DRUG DEVELOPMENTS. MOL CELL ENDOCRINOL, v.246, n.1-2, FEB 26, p.142-6. 2006.

STANGHERLIN, A., F. GESELLCHEN, *ET AL.* cGMP SIGNALS MODULATE cAMP LEVELS IN A COMPARTMENT-SPECIFIC MANNER TO REGULATE CATECHOLAMINE-DEPENDENT SIGNALING IN CARDIAC MYOCYTES. CIRC RES, v.108, n.8, APR 15, p.929-39. 2011.

STOCKAND, J. D. E J. G. MESZAROS. ALDOSTERONE STIMULATES PROLIFERATION OF CARDIAC FIBROBLASTS BY ACTIVATING KI-RASA AND MAPK1/2 SIGNALING. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL, v.284, n.1, JAN, p.H176-84. 2003.

STOWASSER, M. S., J.; LEANO, R.; GORDON, R.D.; WARD, G.; COWLEY, D.; MARWICK, T.H. EVIDENCE FOR ABNORMAL LEFT VENTRICULAR STRUTURE AND FUNCTION IN NORMOTENSIVE INDIVIDUALS WITH FAMILIAL HYPERALDOSTERONISM TYPE I. J. . CLIN.ENDOCRINOL.METAB v. v. 90, n.9, p.5070-5076. 2005.

STURM, A., N. BURY, *ET AL.* 11-DEOXYCORTICOSTERONE IS A POTENT AGONIST OF THE RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS) MINERALOCORTICOID RECEPTOR. ENDOCRINOLOGY, v.146, n.1, JAN, p.47-55. 2005.

SWEDBERG, K. E., P.; KJEKSHUS, J. ET AL. . HORMONES REGULATING CARDIOVASCULAR FUNCTION IN PATIENTS WITH SEVERE CONGESTIVE HEART FAILURE AND THEIR RELATION TO MORTALITY. CIRCULATION, v.82, n.5. 1990.

TAKEDA, Y. PLEIOTROPIC ACTIONS OF ALDOSTERONE AND THE EFFECTS OF EPLERENONE, A SELECTIVE MINERALOCORTICOID RECEPTOR ANTAGONIST. HYPERTENS RES, v.27, n.11, NOV, p.781-9. 2004.

TAKEDA, Y., I. MIYAMORI, *ET AL.* PRODUCTION OF ALDOSTERONE IN ISOLATED RAT BLOOD VESSELS. HYPERTENSION, v.25, n.2, FEB, p.170-3. 1995.

TAKIMOTO, E. CYCLIC GMP-DEPENDENT SIGNALING IN CARDIAC MYOCYTES. CIRC J, v.76, n.8, p.1819-25. 2012.

TOUYZ, R. M. S. M., G. YAO, D. ENDEMANN AND E.L. SCHIFFRIN. P-343: ALDOSTERONE ACTIVATES ERK1/2 AND P38MAP KINASE IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS BY NONGENOMIC MECHANISMS IN WKY AND SHR – ROLE OF ENDOTHELIN-1P-343. AMERICAN JOURNAL OF HYPERTENSION, v. 17. 2004.

VIVAR, R., C. SOTO, *ET AL.* PHOSPHOLIPASE C/PROTEIN KINASE C PATHWAY MEDIATES ANGIOTENSIN II-DEPENDENT APOPTOSIS IN NEONATAL RAT CARDIAC FIBROBLASTS EXPRESSING AT1 RECEPTOR. J CARDIOVASC PHARMACOL, v.52, n.2, AUG, p.184-90. 2008.

WALCZAK, C., F. GAIGNIER, *ET AL.* ALDOSTERONE INCREASES VEGF-A PRODUCTION IN HUMAN NEUTROPHILS THROUGH PI3K, ERK1/2 AND P38 PATHWAYS. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, v.1813, n.12, DEC, p.2125-32. 2011.

- WANG, J. Y., L.; SOLENBERG, P. J. ET AL. ALDOSTERONE STIMULATES ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME EXPRESSION AND ACTIVITY IN RAT NEONATAL CARDIAC MYOCYTES. . J CARD FAIL, v. 8 n.3, p.167-174. 2002.
- WEBER, K. T. ALDOSTERONE IN CONGESTIVE HEART FAILURE. N ENGL J MED, v.345, n.23, DEC 6, p.1689-97. 2001.
- WILSON, P., J. MORGAN, *ET AL.* MEDIATORS OF MINERALOCORTICOID RECEPTOR-INDUCED PROFIBROTIC INFLAMMATORY RESPONSES IN THE HEART. CLIN SCI (LOND), v.116, n.9, MAY, p.731-9. 2009.
- XUE, B., T. G. BELTZ, *ET AL.* CENTRAL INTERACTIONS OF ALDOSTERONE AND ANGIOTENSIN II IN ALDOSTERONE- AND ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL, v.300, n.2, FEB, p.H555-64. 2011.
- YAMAMOTO, K. R. STEROID RECEPTOR REGULATED TRANSCRIPTION OF SPECIFIC GENES AND GENE NETWORKS. ANNU REV GENET, v.19, p.209-52. 1985.
- YANG, C., Y. WANG, *ET AL.* GHRELIN PROTECTS H9C2 CARDIOMYOCYTES FROM ANGIOTENSIN II-INDUCED APOPTOSIS THROUGH THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS PATHWAY. J CARDIOVASC PHARMACOL, v.59, n.5, MAY, p.465-71. 2012.
- YANG, J., C. Y. CHANG, *ET AL.* IDENTIFICATION OF LIGAND-SELECTIVE PEPTIDE ANTAGONISTS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR USING PHAGE DISPLAY. MOL ENDOCRINOL, v.25, n.1, JAN, p.32-43. 2010.
- YOUNG, M. J. E J. W. FUNDER. MINERALOCORTICOID RECEPTORS AND PATHOPHYSIOLOGICAL ROLES FOR ALDOSTERONE IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM. J HYPERTENS, v.20, n.8, AUG, p.1465-8. 2002.
- ZHANG, A., Z. JIA, *ET AL.* ALDOSTERONE INDUCES EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION VIA ROS OF MITOCHONDRIAL ORIGIN. AM J PHYSIOL RENAL PHYSIOL, v.293, n.3, SEP, p.F723-31. 2007.
- ZHANG S, L. H., YANG SJ. TRIBULOSIN SUPPRESSES APOPTOSIS VIA PKC EPSILON AND ERK1/2 SIGNALING PATHWAY DURING HYPOXIA/REOXYGENATION IN NEONATAL RAT VENTRICULAR CARDIAC MYOCYTES. J ASIAN NAT PROD RES., v.13, n.12, p.1135-45. 2011.
- ZHAO, Z., W. WANG, *ET AL.* PROTEIN KINASE C EPSILON-DEPENDENT EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 5 PHOSPHORYLATION AND NUCLEAR TRANSLOCATION INVOLVED IN CARDIOMYOCYTE HYPERTROPHY WITH ANGIOTENSIN II STIMULATION. J CELL BIOCHEM, v.109, n.4, MAR 1, p.653-62. 2010.

*ANEXOS*

## **8 - ANEXOS**

### 8.1 – Certificado de aprovação do comitê de ética de uso animal



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. 2011/83 do projeto, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Avaliação 'in vitro' do efeito cardioprotetor da espirolactona e eplerenona em cardiomiócitos de ratos neonatos*", 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 1/3/2013.

Ouro Preto, 22 de dezembro de 2011.

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