GUILHERME LOPES GONÇALVES

A ALBUMINA INDUZ APOPTOSE DE PODÓCITOS MEDIADA PELO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E ATIVAÇÃO DA VIA PKC δ E P38 MAPK

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

São Paulo
2018

GUILHERME LOPES GONÇALVES

A ALBUMINA INDUZ APOPTOSE DE PODÓCITOS MEDIADA PELO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E ATIVAÇÃO DA VIA PKC δ E P38 MAPK

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Oliveira de Souza

Versão integral corrigida

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
Ficha Catalográfica elaborada pelo autor

Lopes Gonçalves, Guilherme
A ALBUMINA INDUZ APOPTOSE DE PODÓCITOS MEDIADA PELO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E ATIVAÇÃO DA VIA PKC δ E P38 MAPK / Guilherme Lopes Gonçalves; orientadora Maria Oliveira de Souza. -- São Paulo, 2018.
60 p.
Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
1. Podócitos. 2. Albumina. 3. Estresse de retículo endoplasmático. 4. Apoptose. I. Oliveira de Souza, Maria , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Guilherme Lopes Gonçalves

Título da Dissertação: A ALBUMINA INDUZ APOPTOSE DE PODÓCITOS MEDIADA PELO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E ATIVAÇÃO DA VIA PKC δ E P38 MAPK

Orientador(a): Profª. Drª. Maria Oliveira de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada em 12 de Abril de 2018, considerou

(X) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: Drª Deise Carla Almeida Leite Dellova
Instituição: Universidade de São Paulo

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: Drº Rildo Aparecido Volpini
Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: Drª Guiomar Nascimento Gomes
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Presidente: Assinatura: .....
Nome: Drª Maria Oliveira de Souza
Instituição: Universidade de São Paulo

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **792/2015** referente ao projeto intitulado: "***Efeito da albumina e as vias de sinalização correlatas na injúria de podócitos***" sob a responsabilidade de ***Guilherme Lopes Gonçalves*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Maria Oliveira de Souza,*** do Departamento de Fisiologia e Biofísica, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sonia e Sebastião.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por esta oportunidade.

À professora Maria Oliveira de Souza por todo apoio e orientação neste trabalho.

À minha família: Sonia, Sebastião e Augusto.

Às colegas de laboratório: Flávia, Jéssica, Bruna, Juliana, Vanessa e Mariana.

À Ana Flavia Tostes pela amizade.

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

Ao CEFAP/ICB.

Se você pode sonhar, você pode fazer.

Walt Disney

RESUMO

GONÇALVES, G. L. **A albumina induz apoptose de podócitos mediada pelo estresse de retículo endoplasmático e ativação da via PKC δ e p38 MAPK**. 2018. 61f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública caracterizado por alta morbidade e mortalidade e com enorme impacto social e econômico no sistema de saúde. Uma das consequências mais graves da progressão da DRC é a albuminúria, que se deve principalmente a lesões no epitélio tubular proximal e na membrana basal glomerular. O aumento da permeabilidade da barreira de ultrafiltração glomerular à albumina está diretamente relacionado à lesão podocitária, principalmente devido à perda de processos podais, estresse oxidativo, estresse de reticulo endoplasmático e eventos apoptóticos. No entanto, os mecanismos celulares envolvidos em tais processos ainda não foram elucidados. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos pelos quais a albumina participa na lesão de podócitos, considerando a contribuição da caveolina-1, GRP78, IRE-1α fosforilado, PKC δ fosforilada, p38 MAPK fosforilada e caspase-12 clivada. Para isso, utilizamos podócitos de camundongos diferenciados, os quais foram distribuídos em quatro grupos: controle e tratados com albumina nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL, em RPMI 1640 sem soro, durante 24 horas. Após o tratamento, a apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. Para os experimentos de imunofluorescência, as células foram tratadas com albumina fluorescente conjugada à isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1 mg/mL durante 30 min, 1h, 3h e 24h. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, objetiva de 63x. A expressão de proteínas foi analisada por western blotting; GRP78, PKC δ, p38 MAPK e caspase-12 clivada foram avaliadas por 30 min, 1h, 3h e 24h após o tratamento das células com albumina 1 mg/mL. GAPDH foi usado como controle endógeno. A análise estatística foi avaliada pela ANOVA *one-way* seguida do pós teste de Bonferroni. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Nossos resultados mostram que o tratamento das culturas celulares de podócitos com albumina, na concentração de 1 mg/mL, durante 24h resultou em um aumento significativo na taxa de apoptose total em comparação com o controle. Com relação à imunofluorescência, colocalizações entre albumina FITC e caveolina-1 foram observadas no período de 30 min, 1h, 3h e 24h. Em relação à expressão proteica, observou-se um aumento significativo na expressão da proteína GRP78 no período de 1 hora após o tratamento com albumina, o que indica um possível estresse de retículo endoplasmático. No caso da proteína IRE-1 fosforilada houve aumento da expressão em 30 min, 1h, 3h e 24h em relação ao grupo controle. Além disso, um aumento significativo na expressão das proteínas PKC δ fosforilada, p38 MAPK fosforilada e caspase-12 clivada foi observado nos períodos de 1h, 3h e 24h após o tratamento com albumina. Estes dois últimos parâmetros foram reduzidos pelo co-tratamento das células com SB203580 (10^{-7} M), um inibidor específico da p38 MAPK. Estes resultados sugerem que a proteína caveolina-1 tem um papel importante na internalização da albumina nos podócitos. Além disso, a albumina induz a apoptose por ativação do estresse de retículo nessas células, principalmente através da via GRP78/IRE-1α/PKC δ/p38 MAPK/caspase-12.

Palavras-chave: Podócitos. Albumina. Estresse de retículo endoplasmático. Apoptose

ABSTRACT

GONÇALVES G. L. **Albumin induces podocyte apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress and activation of the PKC δ and p38 MAPK pathway**. 2018. 61p. Master's thesis (Human Physiology) - Institute of Biomedical Sciences, Sao Paulo University, Sao Paulo, 2018.

Chronic kidney disease (CKD) is a public health problem characterized by high morbidity and mortality and with social and economic impact on the health system. One of the most serious consequences of CKD progression is albuminuria, which is mainly due to injury of the proximal tubular epithelium and the glomerular basement membrane. Increased permeability of the glomerular ultrafiltration barrier to albumin is directly related to podocyte injury, mainly due to loss of foot processes, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptotic events. However, the cellular mechanisms involved in such processes have not yet been elucidated. Thus, the aim of this study was to investigate the mechanisms by which albumin participates in podocyte injury, considering the contribution of caveolin-1, GRP78, phosphorylated IRE-1α, phosphorylated PKC δ, phosphorylated p38 MAPK, and cleaved caspase-12. For this, we used mice differentiated podocytes, which were distributed in four groups: control and treated with albumin concentrations of 1, 5 and 10 mg/mL in serum-free RPMI 1640 for 24 hours. After treatment, apoptosis was assessed by flow cytometry. For the immunofluorescence experiments, the cells were treated with 1 mg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) albumin for 30 min, 1h, 3h, and 24h. The images were obtained by confocal microscopy, 63x objective. Protein expression was analyzed by western blotting; GRP78, PKC δ, p38 MAPK and cleaved caspase-12 were evaluated 30 min, 1h, 3h and 24h after treatment of the cells with 1 mg/mL albumin. GAPDH was used as an endogenous control. Statistical analysis was assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. Values of $p<0.05$ were considered significant. Our results show that the treatment of podocytes with albumin at a concentration of 1 mg/mL for 24h resulted in a significant increase in the total apoptosis rate compared to the control. Regarding immunofluorescence, colocalizations between FITC albumin and caveolin-1 were observed in the period of 30 min, 1h, 3h and 24h. Regarding protein expression, a significant increase in GRP78 protein expression was observed within 1 hour of albumin treatment, indicating potential endoplasmic reticulum stress. In addition of the phosphorylated IRE-1 protein, expression increased in 30 min, 1h, 3h and 24h in relation to the control group. A significant increase on the expression of phosphorylated PKC δ, phosphorylated p38 MAPK and cleaved caspase-12 proteins was also observed at 1h, 3h and 24h after albumin treatment. These latter two parameters were reduced by co-treatment of the cells with SB203580 (10^{-7} M), a specific inhibitor of p38 MAPK. These results suggest that caveolin-1 protein plays an important role in the internalization of albumin in podocytes. In addition, albumin induces podocyte apoptosis by activating the endoplasmic reticulum stress in these cells, mainly through the GRP78/IRE1-α/PKC δ/p38 MAPK/caspase-12 pathway.

Keywords: Podocytes. Albumin. Endoplasmic reticulum stress. Apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da barreira de ultrafiltração glomerular.....18
Figura 2 - Esquema representativo da barreira de ultrafiltração glomerular detalhando a organização proteica dos processos podais.....20
Figura 3 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo em podócitos após tratamento com albumina, nas concentrações de 1, 5 ou 10 mg/mL, por 24h.....35
Figura 4 - Taxa de apoptose total (porcentagem total de células em apoptose precoce somado ao total de células em apoptose tardia, de cada grupo experimental) em podócitos após tratamento com albumina de soro bovino, nas concentrações de 1, 5 ou 10 mg/mL, por 24h.....
.....36
Figura 5 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 30 min, 1h, 3h e 24h após o tratamento.....38
Figura 6 - Marcação de caveolina-1 em podócitos controle.....39
Figura 7 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 30 min após o tratamento.....39
Figura 8 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 1h após o tratamento.....40
Figura 9 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 3h após o tratamento 40
Figura 10 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 24h após o tratamento.....41
Figura 11 - Intensidade de fluorescência FITC intracelular ao longo do tratamento com albumina FITC.....42
Figura 12 - *Blots* representativos para detecção de podocina (A), sinaptopodina (B) e caveolina-1 (C) em podócitos controle.....43
Figura 13 - Efeito da albumina na expressão da chaperona GRP78.....44
Figura 14 - Efeito da albumina na expressão da proteína pIRE-1α.....45
Figura 15 - Efeito da albumina na expressão da proteína pPKC δ.....46
Figura 16 - Efeito da albumina na expressão da proteína pp38 MAPK.....47
Figura 17 - Efeito da albumina na expressão da proteína caspase-12 clivada.....48
Figura 18 - Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína pp38 MAPK.....49
Figura 19 - Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína caspase-12 clivada…
.....50

Figura 20 - Esquema proposto da via de sinalização envolvida no tratamento de podócitos com albumina.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos valores do total de células apoptóticas.....36
Tabela 2 - Intensidade de fluorescência FITC ao longo do tratamento com albumina FITC 1 mg/mL.....42
Tabela 3 - Média dos valores para expressão da chaperona GRP78.....44
Tabela 4 - Média dos valores para expressão da proteína pIRE-1α.....45
Tabela 5 - Média dos valores para expressão da proteína pPKC δ.....46
Tabela 6 - Média dos valores para expressão da proteína pp38 MAPK/p38 MAPK.....47
Tabela 7 - Média dos valores para expressão da proteína caspase-12 clivada.....48
Tabela 8 - Média dos valores para expressão da proteína pp38 MAPK.....49
Tabela 9 - Média dos valores para expressão da proteína caspase-12 clivada.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-*Aminoactinomycin D*
ALB	Albumina de soro bovino
ALB FITC	Albumina conjugada à isotiocianato de fluoresceína
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AngII	Angiotensina II
ATF2	*Activating transcription factor 2*
ATF4	*Activating transcription factor 4*
ATF6	*Activating transcription factor 6*
BCA	Ácido bicinchonínico
Ca^{2+}	Íon cálcio
CARD	Domínio de recrutamento associado à caspases
CEPSH	Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHOP	*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*
CO_2	Gás carbônico
CTL	Grupo controle
DAG	Diacilglicerol
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eIF2α	*Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina I
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GRP78	*Glucose regulated protein* 78
IFN-γ	*Interferon gamma*
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IR	Injúria renal
IRE-1	*Inositol requiring kinase* 1
JNK	Quinases c-Jun N-terminal
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MBG	Membrana basal glomerular
NFkB	*Nuclear factor kappa B*
Nrf2	*Nuclear erythroid factor 2*
PERK	*Protein kinase like endoplasmatic reticulum kinase*
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
pp38 MAPK	p38 MAPK fosforilada
pPKC δ	Proteína quinase C δ fosforilada
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RE	Retículo endoplasmático
Redox	Redução-oxidação
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
SB203580	Inibidor de p38 MAPK
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SFB	Soro fetal bovino
TNFα	*Tumor necrosis factor alpha*
TRAF2	*TNF receptor-associated factor 2*
TRPC6	*Transient receptor potential cation channel subfamily* C *member* 6
UPR	Resposta às proteínas mal-enoveladas
UI	Unidades internacionais
VSMC	Células do músculo liso vascular
XBP1	*X-box binding protein 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....18
1.1 Barreira de ultrafiltração glomerular.....18
1.2 Doença renal crônica.....21
1.2.1 Injúria de podócitos.....22
1.2.2 Albuminúria e podócitos.....23
1.2.3 Albumina e estresse de retículo endoplasmático.....23
1.2.3.1 PERK.....23
1.2.3.2 IRE-1α.....25
1.2.3.3 ATF6.....25
1.2.3.4 Proteínas quinases.....25
1.2.3.4.1 Proteína quinase C.....26
1.2.3.4.2 Proteínas quinase reguladas por mitógenos.....26
1.2.3.5 Apoptose e caspase-12.....27
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....28
3 OBJETIVOS.....29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....30
4.1 Cultura Celular.....30
4.2 Grupos Experimentais.....31
4.3 Ensaio de Apoptose.....31
4.4 Imunofluorescência.....31
4.5 Expressão de proteínas por *western blotting*.....32

4.5.1 Preparação de amostras.....32
4.5.2 Aplicação das amostras em gel de poliacrilamida.....*32*
4.5.3 Transferência de proteínas do gel para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).....33
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....34
6 RESULTADOS.....35
6.1 Apoptose.....35
6.2 Imunofluorescência.....37
6.3 Expressão de podocina, sinaptopodina e caveolina-1 em podócitos.....43
6.4 Efeito da albumina na expressão da chaperona GRP78.....4
6.5 Efeito da albumina na expressão da proteína IRE-1α fosforilada.....4
6.6 Efeito da albumina na expressão da proteína PKC δ fosforilada.....4
6.7 Efeito da albumina na expressão de p38 MAPK fosforilada.....47
6.8 Efeito da albumina na expressão da proteína caspase-12 clivada.....48
6.9 Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína p38 MAPK fosforilada 49
6.10 Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína caspase-12 clivada.... 50
7 DISCUSSÃO.....51
8 CONCLUSÕES.....54
REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos fundamentais para o balanço hidroeletrolítico. Recebem cerca de 20% do débito cardíaco, participam da regulação do volume do fluido extracelular, do pH do meio interno e realizam a depuração plasmática de substâncias menos importantes para o organismo. A organização de sua vasculatura é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e formação da urina (De Jong *et al.*, 2007; Basile, 2009; Sequeira Lopez e Gomez, 2011). A ultrafiltração glomerular ocorre nos capilares glomerulares sendo controlada pelas forças de Starling e por ajustes funcionais da barreira de ultrafiltração glomerular (Kawada *et al.*, 2002).

1.1 Barreira de ultrafiltração glomerular

O glomérulo é composto de três tipos celulares: células mesangiais, células endoteliais dos capilares glomerulares e podócitos. Juntamente com a membrana basal glomerular (MBG), o endotélio e os podócitos formam a barreira de ultrafiltração glomerular (**Figura 1**).

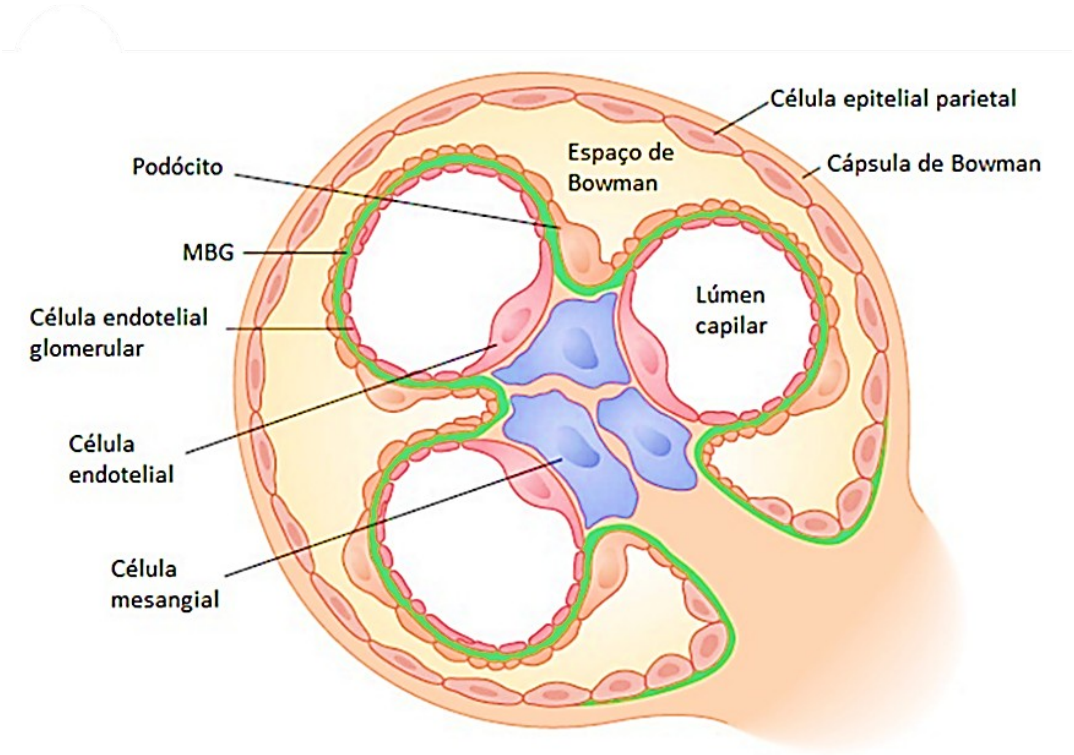

Figura 1 - Esquema representativo da barreira de ultrafiltração glomerular. No lúmen do capilar glomerular podemos observar as células endoteliais. A MBG é representada por uma linha de coloração verde. Na face externa, os podócitos estão ancorados à MBG. Fonte: Adaptado de Silverthorn, 2010.

As células mesangiais compõem o mesângio glomerular e estão em contato direto com células endoteliais dos capilares glomerulares, nas áreas em que a MBG não cobre o endotélio do capilar glomerular (Sakai e Kriz, 1987). O contato entre mesângio e MBG é facilitado pelos elementos de matriz extracelular como a fibronectina. Além disso, as células mesangiais produzem os componentes da matriz extracelular glomerular, mantêm a estrutura dos capilares glomerulares e possuem capacidade contrátil, o que permite o controle do fluxo intracapilar, regulando assim a ultrafiltração glomerular (Kriz *et al.*, 1990).

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

A MBG é um componente da matriz extracelular, que atua como barreira de ultrafiltração, separando a luz do capilar glomerular dos podócitos. Assim como a matriz extracelular, a MBG é constituída basicamente por macromoléculas como a fibronectina e o colágeno do tipo IV além da laminina, distroglicanos e proteoglicanos como a agrina (Yurchenco *et al.*, 2004). Devido à sua constituição proteica, a MBG apresenta cargas predominantemente negativas, o que dificulta a filtração de proteínas, especialmente as de cargas negativas.

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que exercem funções organizadoras e protetoras da estrutura e função glomerular. Estão envolvidos na ultrafiltração do plasma, na manutenção estrutural da MBG e na forma e integridade dos capilares glomerulares. Uma característica importante dessas células é a presença de processos podais (**figura 2**), que são prolongamentos do corpo celular constituídos por um citoesqueleto à base de actina. O citoesqueleto é altamente complexo e diversas outras proteínas mantém a morfologia e aderência dos podócitos à MBG (Leeuwis *et al.*, 2010). Os processos podais possuem três porções distintas: o lado basal, o lado apical e o diafragma.

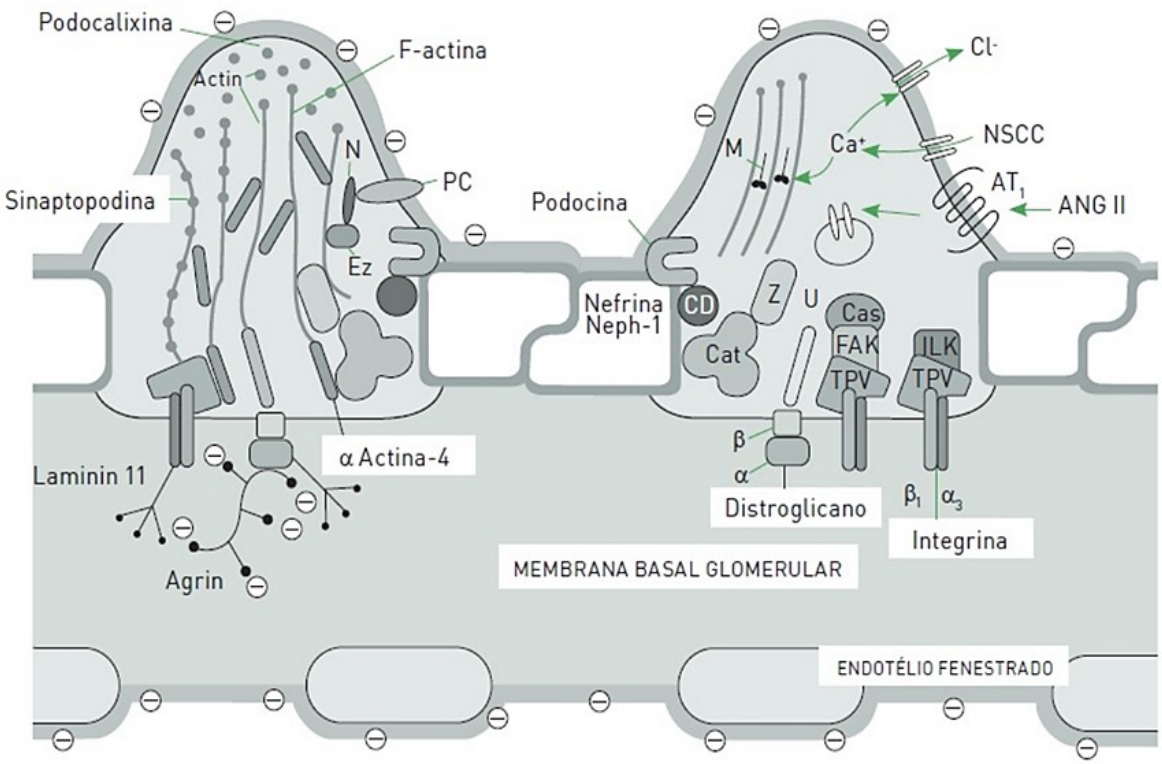

Figura 2 - Esquema representativo da barreira de ultrafiltração glomerular detalhando a organização proteica dos processos podais (adaptado de (Endlich *et al.*, 2001).

O lado basal conecta o podócito à MBG através das integrinas e distroglicanos (proteínas que organizam a interação entre a laminina e a matriz extracelular). As integrinas constituem a principal família de receptores de superfície que auxiliam na adesão da célula à matriz extracelular e transmitem sinais químicos e mecânicos (Schwartz, 1997). O lado apical dos podócitos contém proteínas carregadas negativamente como a podocalixina, sialoglicoproteína e a podoplanina, formando um glicocálix que, em condição fisiológica, restringe a passagem de moléculas aniônicas, principalmente a albumina (Qian *et al.*, 2001; Kittikulsuth *et al.*, 2011).

O diafragma é a camada mais complexa, com uma espessura constante de 40 nm (Carey, 2005). Proteínas específicas do diafragma interagem com a actina do citoesqueleto, influenciando vias de sinalização e a função dos podócitos. As proteínas expressas no diafragma incluem: nefrina, podocina, Neph 1 e 2, CD2AP, FAT 1 e 2 e o canal de cálcio TRPC6 (*Transient receptor potential cation channel, subfamily* C*, member* 6) (Mundel e Shankland, 2002).

Contudo, não é surpresa constatarmos que diversas doenças sistêmicas ou aquelas associadas às doenças renais como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e *diabetes mellitus*, podem induzir perda da função renal, essencialmente por alterar a morfologia, hemodinâmica, função glomerular e tubular renal (Kawada *et al.*, 2002). A perda maior ou menor da função renal é denominada doença renal, a qual pode ser classificada em aguda ou crônica.

1.2 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) representa um dos mais sérios problemas de saúde pública mundial. No Brasil, a prevalência de pacientes mantidos em programas de diálise corresponde a 503 pacientes por milhão de indivíduos de uma população (Sesso *et al.*, 2016) e a perspectiva de aumento do número de casos de DRC preocupa os profissionais do sistema de saúde de forma global. Outra preocupação não menos importante é que independente da doença de base, as complicações envolvidas com a DRC resultam em anemia, acidose metabólica, alteração no metabolismo mineral, desnutrição e doenças cardiovasculares. Em linhas gerais, a DRC é caracterizada por glomeruloesclerose, infiltração de leucócitos no interstício renal, fibrose túbulo intersticial (Abbate *et al.*, 2006; Schlondorff, 2008) e proteinúria - associada às alterações na barreira de ultrafiltração glomerular e injúria de podócitos, além de hipertensão arterial sustentada (Buckalew *et al.*, 1996). De acordo com a *National Kidney Fundation*, a progressão da DRC é classificada em estágios, conforme o grau de função renal do paciente.

1) início da lesão, mas com função renal preservada - ritmo de filtração glomerular (RFG) acima de 90 mL/min/1,73m^2;

2) início da perda da função renal - RFG entre 60 e 89 mL/min/1,73m^2;

3) injúria renal moderada - RFG entre 30 e 59 mL/min/1,73m^2, com níveis elevados de ureia e creatinina no plasma;

4) injúria renal severa - RFG entre 15 e 29 mL/min/1,73m^2, paciente com hipertensão arterial e edema;

5) fase terminal da injúria renal crônica - RFG menor que 15 mL/min/1,73m^2 e nessa condição, o paciente passa a depender de terapia por hemodiálise ou transplante (Coresh *et al.*, 2007). Apesar dos estágios bem definidos, ainda há dificuldade no diagnóstico e/ou

tratamento da DRC devido à carência de conhecimento para a identificação de fatores críticos nos estágios iniciais da doença, bem como a não-utilização de testes adequados para avaliação da função renal.

Durante a lesão de podócitos a estrutura elaborada do citoesqueleto é fisicamente alterada, resultando na perda dos processos podais. Sendo assim, as células remanescentes são incapazes de cobrir toda a MBG e manter a integridade da barreira de ultrafiltração, resultando na filtração de proteínas e, consequentemente, proteinúria. A proteinúria é um sinal clinicamente importante de disfunção renal e, nesta condição, uma quantidade significativa de albumina pode ser encontrada no ultrafiltrado glomerular e na urina (Okamura *et al.*, 2013; Reiser e Altintas, 2016).

1.2.1 Injúria de podócitos

A injúria glomerular pode ocorrer por vários fatores, incluindo a glomeruloesclerose, nefropatia diabética e hipertensão arterial. Essas doenças são associadas a múltiplos fatores como: angiotensina II, endotelina 1, estresse oxidativo, processos inflamatórios e hipertensão glomerular (Cardillo *et al.*, 2002). Nessas condições, a injúria de podócitos está associada essencialmente à perda de processos podais e apoptose – morte celular programada (Qian *et al.*, 2001), o que resulta na diminuição do número de podócitos. Sendo assim, as células remanescentes são incapazes de cobrir toda a MBG e manter a integridade da barreira de ultrafiltração. Como consequência, os podócitos são substituídos por tecido cicatricial e matriz extracelular (Leeuwis *et al.*, 2010). Dessa forma, a injúria de podócitos pode estar associada à proteinúria (Asanuma e Mundel, 2003; Meyrier, 2005).

A proteinúria merece destaque, pois além de ser indicador de injúria renal, é um importante fator de risco para a progressão da DRC (Toblli *et al.*, 2012). Em humanos com função renal preservada, proteínas de baixo peso molecular e uma pequena quantidade de albumina são filtradas pelo glomérulo e captadas no túbulo proximal. Quando a excreção de albumina se encontra na faixa de 30-300 mg/dia, considera-se como uma condição de microalbuminúria, indicador precoce de nefropatia. Para valores superiores a 300 mg/dia, considera-se macroalbuminúria, indicador de doença renal crônica terminal (De Jong *et al.*, 2007).

1.2.2 Albuminúria e podócitos

Considerando que em condições fisiológicas, a barreira de ultrafiltração glomerular é pouco permeável à albumina (Tojo e Kinugasa, 2012), pode se afirmar que em decorrência da capacidade endocítica do túbulo proximal, a depuração plasmática de albumina é baixa.

No epitélio tubular proximal, o principal mecanismo de endocitose é a mediada por receptor. Este processo envolve a interação entre moléculas solúveis do fluido extracelular e receptores presentes na superfície celular e a subsequente internalização deste complexo por meio de vesículas de clatrina originadas da membrana celular (Taylor *et al.*, 2011). No caso dos podócitos, a passagem paracelular de moléculas é restringida pelo diafragma, o qual contém proteínas integrais de membrana que se estendem entre os processos podais de podócitos adjacentes. Em estados proteinúricos, a passagem de albumina pela barreira de ultrafiltração pode ocorrer via paracelular, através do diafragma ou via transcelular, através do podócito. Alguns estudos *in vitro* mostram que podócitos cultivados podem realizar a endocitose e transcitose de albumina principalmente via caveolina-1 (Eyre *et al.*, 2007; Dobrinskikh *et al.*, 2014).

Lesões na MBG observadas na progressão de muitas doenças renais, permitem maior filtração de albumina e consequentemente a sobrecarga dessa proteína no túbulo proximal resulta em albuminúria (Christensen *et al.*, 2009; Tojo e Kinugasa, 2012). Nessa condição de persistente exposição das células tubulares a altas concentrações de albumina, tem-se observado a contribuição dessa proteína como mediador da síntese de fatores pró-inflamatórios evidentes na progressão de doenças renais (Baines e Brunskill, 2008; Peruchetti *et al.*, 2011).

Embora as vias de sinalização intracelular envolvidas nesse processo sejam pouco conhecidas, sabe-se que a exposição de podócitos a elevadas concentrações de albumina, resulta na síntese de fatores pró-inflamatórios como as citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNFα), as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e estimulação do NFκB (do inglês: nuclear factor κB) (Okamura *et al.*, 2013).

1.2.3 Albumina e estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela com função essencial na biossíntese, enovelamento e modificações estruturais de proteínas, além de atuar como reservatório de cálcio intracelular (Scheuner *et al.*, 2001). Quando o enovelamento de proteínas no RE é alterado devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o ânion superóxido (O_2-), produzido a partir do oxigênio molecular, alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, glicosilação e outros fatores, pode resultar na acumulação de proteínas mal enoveladas. Nesta situação, as células eucarióticas ativam uma série de cascatas de transdução de sinal que são coletivamente denominadas como resposta às proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response – UPR)*. Este mecanismo por sua vez, é mediado por três receptores localizados na membrana do RE: PERK (do inglês: *protein kinase like endoplasmatic reticulum kinase*), IRE-1α (do inglês: *inositol requiring kinase* 1) e ATF6 (do inglês: *activating transcription factor 6*) (Schröder e Kaufman, 2005). Em condições normais, esses receptores são mantidos em um estado inativo devido às interações com a chaperona GRP78 (do inglês: *glucose regulated protein 78*) (Kaufman, 1999; Bertolotti *et al.*, 2000; Ma e Hendershot, 2004; Bravo *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015). A chaperona GRP78 é uma proteína residente do RE e sua síntese pode ser estimulada por uma variedade de fatores que perturbam a função e homeostase dessa organela. Esta proteína atua como um sensor de estresse do RE e possui a capacidade de bloquear o processo apoptótico (Lee, 2005).

1.2.3.1 PERK

PERK é uma serina/treonina quinase transmembrana do tipo I, que apresenta um domínio citosólico cuja porção catalítica é homóloga com outras quinases da família eIF2α (do inglês: *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*). Após a dissociação do GRP78, a PERK induz sua autofosforilação e ativação de seu domínio quinase (Xu *et al.*, 2005). PERK fosforilada ativa os fatores Nrf2 (do inglês: *nuclear erythroid factor 2*) e eIF2α. O fator eIF2α fosforilado na serina 51 ativa o ATF4 (do inglês: *activating transcription factor 4*) (Rajesh *et al.*, 2015). Os fatores ATF4 e Nrf2 induzem aumento na expressão de genes que facilitam a adaptação das células ao estresse (Koromilas, 2015), incluindo os genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações do tipo redox (redução-oxidação) e secreção de proteínas (Harding *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 2003). Entretanto, nem todos os genes regulados por ATF4 são anti-apoptóticos. Quando o estresse de RE persiste e a quantidade de proteínas mal enoveladas aumenta, a via PERK/eIF2α/ATF4 é potencializada e nessa condição o ATF4 induz a transcrição de CHOP (do inglês: *CCAAT-enhancer-binding protein*

homologous protein), que leva ao aumento da produção de EROs no RE e ativa proteínas apoptóticas em resposta ao estresse de RE (Nishitoh, 2012).

1.2.3.2 IRE-1α

IRE-1α é uma proteína transmembrana do tipo I presente na membrana do RE, que apresenta um domínio citosólico serina/treonina quinase. Sua fosforilação desencadeia a ativação do fator de transcrição XBP1 (do inglês: *X-box binding protein 1*), capaz de entrar no núcleo para regular a expressão dos genes que participam dos processos de tráfego, enovelamento e degradação de proteínas. Além disso, XBP1 promove a sobrevivência celular, uma vez que inibe a expressão de CHOP e regula a expressão de genes envolvidos na expansão do compartimento do RE, além da secreção de proteínas. Por outro lado, o IRE-1α quando ativado, também é capaz de se ligar ao receptor de TRAF2 (do inglês: *TNF receptor-associated factor 2*) que, por sua vez, resulta em apoptose principalmente por ativação de outras proteínas quinases, como é o caso de quinases c-Jun N-terminal (JNK) e/ou p38 MAPK. A ativação de JNK resulta na ativação da proteína pró-apoptótica BIM e inibição da anti-apoptótica Bcl-2 (Xu *et al.*, 2005; Darling e Cook, 2014). No caso da p38 MAPK, pode levar à ativação de vários fatores de transcrição, como por exemplo o ATF2 (do inglês: *activating transcription factor 2*) e CHOP. De forma geral, a p38 MAPK e as quinases JNK são fosforiladas em resposta às alterações nos níveis de Ca^{2+} do RE, o que parece ser o provável mecanismo desencadeador de apoptose (Kim *et al.*, 2010).

1.2.3.3 ATF6

O ATF6 (do inglês: *activating transcription factor 6*) é uma proteína transmembrana do tipo II caracterizada por um elemento responsivo a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Após a indução do estresse RE, a dissociação da GRP78 leva à translocação do ATF6 para o aparelho de Golgi onde é clivado pelas proteases denominadas S1P e S2P, gerando um fator de transcrição ativo citosólico. Existem dois homólogos ATF6 já descritos: o ATF6α e o ATF6β. A isoforma α regula a expressão de genes envolvidos na capacidade do RE e a expressão de XBP1, já a isoforma β exerce efeito inibitório sobre a isoforma α (Darling e Cook, 2014).

1.2.3.4 Proteínas quinases

Sob o estresse de RE, as células são reguladas por várias proteínas quinases para a sobrevivência ou morte celular (Kadowaki *et al.*, 2004). As proteínas quinases e fosfatases têm sido descritas como elementos chave, devido ao seu papel regulatório na transdução de

sinal. De forma geral, as proteínas quinases podem regular os estágios iniciais da apoptose devido à fosforilação de proteínas-chave, em que as caspases são os principais alvos. Sua ativação resulta em alterações morfológicas características, tais como alterações na membrana celular, condensação de cromatina e fragmentação nuclear (Ryer *et al.*, 2005)

1.2.3.4.1 Proteína quinase C

A proteína quinase C (PKC) está envolvida em uma variedade de sinais intracelulares. A PKC é uma enzima amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em praticamente todos os tecidos de mamíferos. A família PKC é composta por quinases serina/treonina contendo um domínio regulatório N-terminal e catalítico C-terminal. Atualmente, sabe-se que a PKC constitui uma grande família de proteínas, com várias isoformas, as quais apresentam características individuais. A família PKC pode ser classificada em 4 grupos (Salamanca e Khalil, 2005):

1) Convencionais ou cPKCs: α, β e γ, as quais são ativadas por cálcio, fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) ou ésteres de forbol;
2) Novas ou nPKCs: δ, ε, η e θ as quais são ativadas por PS, DAG ou ésteres de forbol, porém são independentes de cálcio;
3) Atípicas ou aPKCs: ζ e λ/τ independentes de cálcio e insensíveis a DAG ou ésteres de forbol, mas são ativadas por PS.
4) PRKs: são semelhantes às atípicas, insensíveis a Ca^{2+}, DAG e ésteres de forbol, sendo ativadas por monômeros de proteína G.

A isoforma PKC δ (delta) é uma importante proteína envolvida na regulação da apoptose em vários tipos celulares. Estudos recentes demonstram um papel regulatório da PKC δ na indução de apoptose de células do músculo liso vascular (VSMC) via estresse de RE, ativação de IRE-1α e JNK (Larroque-Cardoso *et al.*, 2013). De forma interessante, camundongos *knock-out* para PKC δ, após uma lesão vascular, apresentaram um menor grau de apoptose em células VSMC em comparação ao *wild-type* (Leitges et al., 2001). Além disso, o papel da p38 MAPK como um intermediário entre a ativação de PKC δ e indução do gene da p53, o qual é pró-apoptótico, também tem sido reportado (Cosentino-Gomes *et al.*, 2012).

1.2.3.4.2 Proteínas quinase reguladas por mitógenos

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são quinases serina/treonina que convertem estímulos extracelulares em uma variedade de respostas intracelulares. As MAPK estão entre as mais conhecidas vias de transdução de sinal e são amplamente conservadas por toda a evolução em muitos processos fisiológicos. Todas as células eucarióticas possuem múltiplos caminhos de MAPK, que regulam de forma coordenada a expressão gênica, mitose, metabolismo, motilidade, sobrevivência, diferenciação e apoptose. As MAPK convencionais compreendem as quinases reguladas por sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2), JNK 1/2/3, isoformas p38 MAPK (a, β, γ, e δ) e ERK5. MAPKs atípicas compreendem ERK3/4, ERK7 e Nemo-like kinase (NLK). Notadamente, os grupos mais estudados de MAPKs de mamíferos são as isoformas ERK1/2, JNKs e p38 MAPK (Cargnello e Roux, 2011). As MAPKs são fosforiladas por ação de quinases específicas chamadas MAPK quinases (MAPKK), tais como MEK1 e MEK2. Enquanto a ativação da via MEK/ERK é comumente associada à uma proteção contra a morte celular, JNK e p38 MAPK estão mais relacionadas à apoptose (Gorostizaga *et al.*, 2013).

1.2.3.5 Apoptose e caspase-12

A apoptose é a forma mais relevante de morte celular. Ela desempenha um papel crucial ajustando o número de células do organismo. Resumidamente, a apoptose é desencadeada pela atividade das caspases, uma família de cisteína-proteases que estão presentes na maioria das células como zimógenos inativos (Pérez-Garijo, 2017). A caspase-12 contém um domínio de recrutamento associado à caspases (CARD) e dois domínios catalíticos, p20 e p10 (Szegezdi *et al.*, 2003). A caspase-12 é uma proteína cuja localização celular é restrita à membrana do RE e tem sido relatada como uma isoforma que inicia a apoptose seletivamente em resposta ao estresse de RE (Nakagawa e Yuan, 2000).

É importante ressaltar que os mecanismos pelos quais a albumina participa da injúria de podócitos em função do estresse de RE, PKC δ, MAPK e caspase-12, não são explorados e neste contexto, é pertinente a sua investigação.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A DRC é uma patologia grave e de alta incidência no sistema de saúde e sua progressão está associada a outras doenças de base, como a hipertensão arterial e o diabetes. Durante o período de progressão dessa doença ocorre crescente albuminúria. Estudos evidenciam que uma vez filtrada, a albumina na luz do túbulo proximal pode sofrer endocitose nas células epiteliais desse segmento do néfron. Outros estudos relatam que a albumina presente na MBG ou no espaço de Bowman pode induzir injúria de podócitos e assim, potencializar a albuminúria e a lesão do tecido renal na DRC. Entretanto, até o presente momento não se conhece os mecanismos pelos quais a albumina ativa as vias intracelulares responsáveis pela injúria dos podócitos.

Nossa hipótese é que na presença de albumina, os podócitos realizam sua endocitose via caveolina-1. No interior da célula, a albumina poderá induzir a dissociação da chaperona GRP78 e consequentemente possibilitar a fosforilação do IRE-1α. Em conjunto, essas proteínas poderão desencadear o estresse de RE. Nesta condição haverá a fosforilação da PKC δ e da p38 MAPK, o que pode resultar na apoptose dos podócitos via caspase-12.

Ao demonstrar a endocitose de albumina em podócitos e os efeitos deletérios dessa proteína nessas células, estaremos gerando informações relevantes sobre os eventos celulares responsáveis pela injúria de podócitos na DRC associada à albuminúria. Além disso, o presente estudo poderá contribuir para futuras opções terapêuticas que visam reduzir os riscos de uma exposição à albumina, a qual pode potencializar a injúria de podócitos na DRC.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi investigar os mecanismos pelos quais a albumina participa da injúria de podócitos, considerando a contribuição da caveolina-1 no processo de endocitose, GRP78, IRE-1α, indução do estresse de RE, fosforilação da PKC δ e ativação da p38 MAPK. Para tal, foram utilizados podócitos de camundongos (linhagem imortalizada) tratados com albumina por vários períodos de tempo.

Os objetivos específicos visaram investigar em cultura de podócitos:

- A endocitose de albumina FITC (conjugada à isotiocianato de fluoresceína) via caveolina-1, nos períodos de 30 min, 1, 3 e 24 horas;

- O efeito da albumina na expressão dos principais fatores associados ao estresse de retículo endoplasmático nos períodos de 30 min, 1, 3 e 24 horas;

- A participação das proteínas PKC δ, p38 MAPK e caspase-12 no processo apoptótico induzido por albumina;

- O efeito da albumina na apoptose de podócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos apresentados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH). O certificado de isenção foi registrado sob número de protocolo CEP-ICB 792/2015.

4.1 Cultura Celular

Foram utilizados podócitos de uma linhagem celular imortalizada estabelecida a partir do camundongo *Immortomouse*, que contém uma variante termossensível (ts58A) do antígeno SV40 (provenientes do Laboratório do Profº. Dr. Karlhans Endlich, Universidade de Heidelberg, Alemanha e cedidos pelo Profº. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). A expressão desse antígeno T pode ser estimulada por *interferon* gama (IFN-γ) (Sakai e Kriz, 1987; Schiwek *et al.*, 2004).

Para a proliferação celular os podócitos foram cultivados em recipientes de plástico para cultura de 25 cm² e 75 cm² (BD *Biocoat*™ comercializados com colágeno tipo I), mantidos em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, pH 7,2. Durante a proliferação celular o meio de cultura foi suplementado com 30 UI/ml de IFN-γ. Nesta fase as células foram mantidas a 33ºC e 5% de CO_2 . Para remoção dos podócitos do recipiente de cultura utilizou-se tripsina - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,05 % (Gibco).

Para a diferenciação celular, os podócitos cultivados em meio de cultura contendo 30 UI/mL de IFN-γ e em uma confluência de cerca de 90%, foram trispsinizados e subcultivados em placas de cultura contendo 5 µg/cm^2 de colágeno tipo I. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem IFN-γ e suplementado com 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, pH 7,2. Nessa condição, os podócitos foram mantidos a 37ºC e 5% de CO_2 durante 10 dias, e então utilizados para os experimentos.

4.2 Grupos Experimentais

1 - Controle (CTL): que não recebeu tratamento, em meio RPMI 1640 sem soro por 24h;

2 - Tratado com albumina de soro bovino (ALB): Inicialmente na concentração de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL, em meio RPMI 1640 sem soro por 24h. Em seguida na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h, 24h;

3 - Tratado com ALB na concentração de 1 mg/mL e/ou SB203580 – inibidor de p38 MAPK – (10^{-7} M): pelo período de 3h, em meio RPMI 1640 sem soro.

4.3 Ensaio de Apoptose

A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo utilizando *Annexin-V- FITC* (BioLegend) e 7-*Aminoactinomycin D* (*7-AAD,* Thermo Fischer). Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, quantificadas em câmara de Neubauer, ressuspendidas em quantidade apropriada de tampão *Cell Stain* (Biolegend) e centrifugadas a 2500 rotações por minuto (rpm), por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL de tampão *Cell Stain*. Após mais uma centrifugação (a 2500 rpm por 5 min) o sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressupendido em quantidade adequada de *Annexin Binding Buffer* (Biolegend) de forma a conter 10^6 células. Em seguida 200 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo, onde foi adicionado *Annexin-V-FITC* e incubado por 10 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Em seguida foi adicionado 100 µL do tampão com *7-AAD*. Por fim, a suspensão celular foi filtrada em tubos apropriados para citometria com filtro de 35µm e analisada em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II), sob configuração de 10000 eventos. As populações celulares foram caracterizadas como apoptose precoce (células marcadas apenas com *Annexin-V-FITC*), apoptose tardia (células marcadas com *Annexin-V-FITC* e *7-AAD*) e apoptose total (total de células em apoptose precoce somado ao total de células em apoptose tardia).

4.4 Imunofluorescência

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e, após o período de diferenciação, foram tratados com albumina FITC (Sigma Aldrich) na concentração de 1 mg/

mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. O grupo controle não recebeu esse tratamento. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as lamínulas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS 1x à 37°C. Após esse procedimento as lamínulas foram incubadas em paraformaldeído 4% por 8 minutos, à temperatura ambiente, para fixação das células, e as lavagens se repetiram com PBS 1x gelado. Para permeabilização as células foram expostas à uma solução de *Triton* 0,01% por 10 minutos, e novamente foram feitas 3 lavagens com PBS 1x à temperatura ambiente. O bloqueio foi feito com uma solução de albumina de soro bovino 1% e gelatina 0,2% em cada lamínula, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida repetiram-se as lavagens com PBS 1x à temperatura ambiente. As lamínulas foram incubadas por 12 horas com o anticorpo primário caveolina-1 (Cell Signaling, 1:100, anti-rabbit). Por fim, as lamínulas foram incubadas por 90 minutos, em câmara úmida, com o anticorpo secundário Alexa Fluor™ 568 (Life Technologies, 1:200, anti-rabbit). Após as lavagens, as lamínulas foram marcadas com DAPI para identificação do núcleo celular e montadas em lâminas de vidro utilizando o próprio meio de montagem do DAPI. As análises de imagem foram realizadas no sistema de microscopia confocal Zeiss LSM 780-NLO. Nesta etapa foi avaliada a colocalização entre albumina FITC e caveolina-1.

4.5 Expressão de proteínas por *western blotting*

4.5.1 Preparação de amostras

As células controle ou tratadas foram cultivadas em placas de petri e, após total confluência, o meio de cultura de cada placa foi substituído por 1 ml de PBS 1x. Em seguida, as células foram removidas por raspagem com tampão RIPA 1x gelado adicionado de um *cocktail* de inibidores de protease. A quantificação de proteínas totais das amostras foi realizada em triplicata, baseada no ácido bicinchonínico (BCA) para detecção colorimétrica, sob um comprimento de onda de 560 nm.

4.5.2 Aplicação das amostras em gel de poliacrilamida

As amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida-SDS (8% a 15%, com espessura de 1,5 mm), sendo 15µg de proteínas totais por *lane*. Foi utilizado um padrão de massa molecular específico (Cell Signaling, #14208). Em seguida, o gel foi submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e pH 7,3). A corrida das amostras

foi efetuada a 75V e interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel.

4.5.3 Transferência de proteínas do gel para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF)

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare Amersham Hybond-P). A membrana foi previamente tratada com tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Para a transferência, foi utilizado um sistema tipo ‘‘sanduíche’’, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 100 V, durante 1 ou 2h. Após esse período, a membrana foi transferida para uma solução de bloqueio [(NaCl 150 mM, fosfato de sódio monobásico (2,8 mM), fosfato de sódio dibásico (7,2 mM), albumina de soro bovino (5%), *Tween* 20 (0,1 %, Sigma)] durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana permaneceu incubada com anticorpo primário específico, previamente diluído em solução de bloqueio, por 12h, a 4°C, com leve agitação. Para remoção do excesso do anticorpo, foram realizadas 3 lavagens com tampão tris-salina-*Tween* 0,1% 1x (TBS-T) (por 10 min cada). Em seguida, a membrana foi incubada por mais 1h com o anticorpo secundário conjugado apropriado, em solução de bloqueio e novamente lavada como acima descrito. Após essas etapas, a membrana foi exposta ao reagente para detecção através de luminescência ECL™ (Amersham), por 2 min. Subsequentemente, exposta ao filme Hyperfilm™ MP (Amersham), por 30 segundos ou mais, à temperatura ambiente. Para a quantificação das bandas foi utilizado o *software ImageJ (National Institute of Mental Health,* Bethesda, MD).

Os anticorpos utilizados foram: phospho PKC δ (1:3000, Abcam, ab5658); p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling, #9212); phospho p38 MAPK (1:2000, Cell Signaling, #4511); Caveolina-1 (1:2000, Cell Signaling, #3267); Sinaptopodina (1:4000, Santa Cruz Biotechnology, sc-50459); Podocina (1:3000, Sigma Aldrich, P0372); GRP78 (1:8000, StressMarq, SPC-167); Caspase-12 (1:4500, Abcam, ab62484); phospho IRE-1α (1:3000, Abcam, ab48187); GAPDH (1:2000, Cell Signaling, #2118).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada pelo método *one-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni utilizando o *software GraphPad Prism* versão 6.0; $p<0,05$ é considerado significativo em comparação ao controle ou tratado com albumina. Os resultados são apresentados como um valor médio ± erro padrão. As análises quantitativas das colocalizações entre caveolina-1 e albumina FITC foram obtidas a partir do *software* ZEN™ (Zeiss).

6 RESULTADOS

6.1 Apoptose

A apoptose consiste em morte celular programada e pode ser quantificada por citometria de fluxo utilizando marcadores específicos. No presente estudo foram utilizados os marcadores *annexin-V-FITC* e *7-AAD*. A **figura 3** mostra o experimento representativo dos níveis de apoptose em podócitos tratados com albumina de soro bovino nas concentrações de 1, 5 ou 10 mg/mL, pelo período de 24 horas. As populações celulares foram definidas como apoptose precoce (quadrante inferior direito – Q3) e apoptose tardia (quadrante superior direito – Q2). Os valores representativos em porcentagem estão inseridos dentro de cada um dos quadrantes.

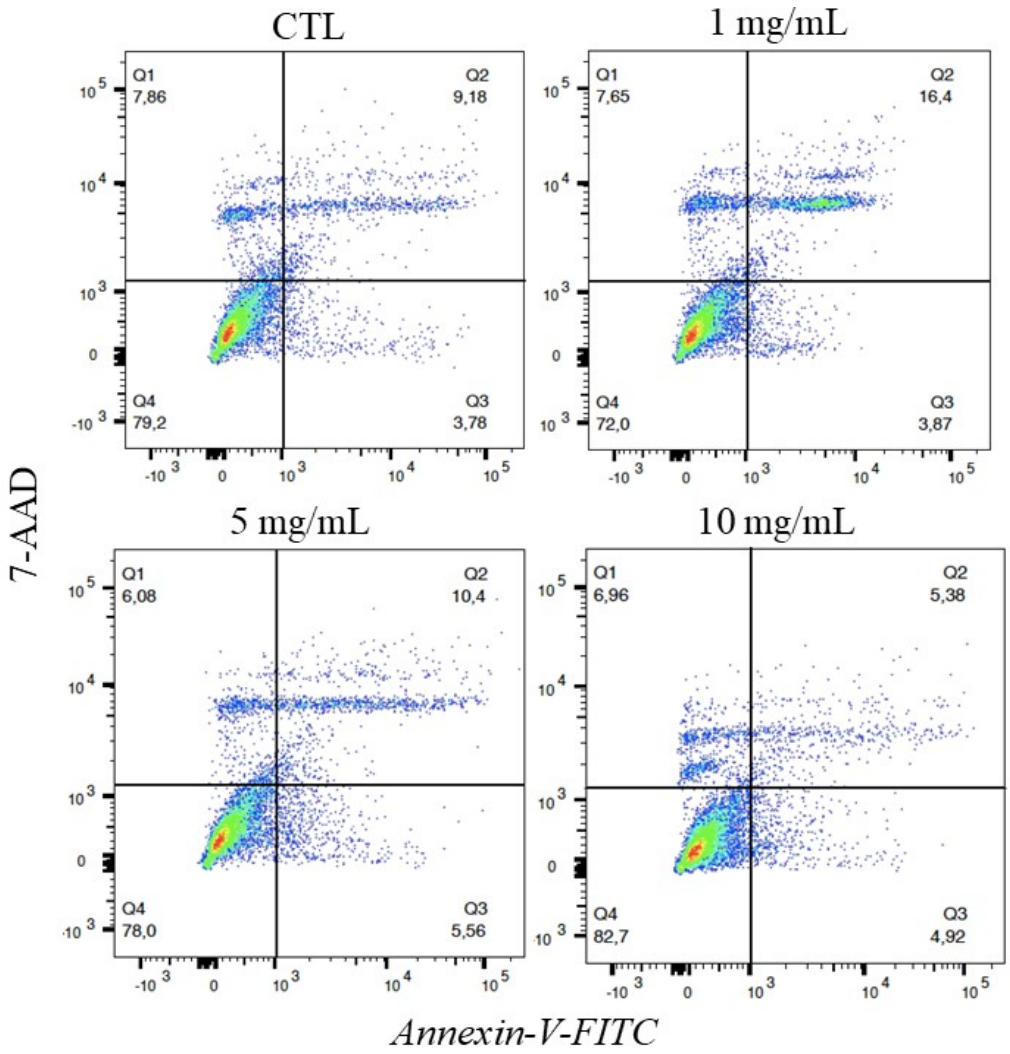

Figura 3 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo em podócitos após tratamento com albumina, nas concentrações de 1, 5 ou 10 mg/mL, por 24h. São apresentados os gráficos representativos de cada tratamento. As células foram marcadas com *annexin-V-FITC* e *7-AAD*.

A análise estatística dos experimentos de citometria de fluxo revelou que o tratamento com albumina de soro bovino na concentração de 1 mg/mL, por 24 horas, levou à um aumento significativo na taxa de apoptose total em relação ao controle. Por outro lado, o tratamento nas concentrações de 5 ou 10 mg/mL, por 24 horas, não foi diferente estatisticamente do controle. Os valores estatísticos (média ± erro padrão) estão representados na **figura 4** e **tabela 1**.

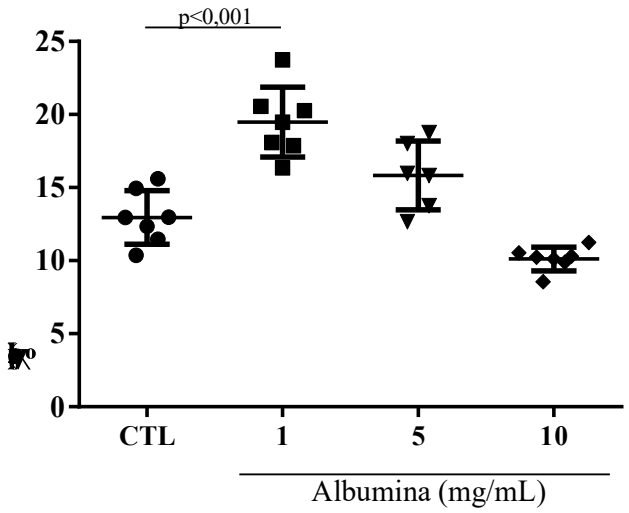

Figura 4 - Taxa de apoptose total (porcentagem total de células em apoptose precoce somado ao total de células em apoptose tardia, de cada grupo experimental) em podócitos após tratamento com albumina de soro bovino, nas concentrações de 1, 5 ou 10 mg/mL, por 24h. Análise estatística é apresentada como média ± erro padrão (n=6-7).

Tabela 1: Média dos valores do total de células apoptóticas.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL	ALB 5 mg/mL	ALB 10 mg/mL
Total de células apoptóticas (%)	12,95 (±0,69)	19,47 (±0,90)***	15,83 (±0,96)	10,12 (±0,30)

A análise estatística é apresentada como média ± erro padrão. ***p<0,001 *versus* CTL (controle). ALB (albumina de soro bovino)

6.2 Imunofluorescência

Considerando a predominância da apoptose no grupo tratado com albumina de soro bovino na concentração de 1 mg/mL, passamos a avaliar apenas este grupo nos experimentos de imunofluorescência. Para tal, foi avaliada a endocitose de albumina FITC na concentração de 1 mg/mL nos períodos de 30 min, 1h, 3h, 24h e sua colocalização com a caveolina-1. A **figura 5** é representativa dos experimentos de imunofluorescência. As **figuras 6, 7, 8, 9** e **10** representam ampliações do *merged* de cada grupo experimental para uma melhor visualização. As setas brancas indicam que a albumina intracelular colocaliza com a caveolina-1. Os gráficos de intensidade de fluorescência pela distância demonstram uma associação das fluorescências verde e vermelha, demonstrando assim as colocalizações. Na **figura 11** e **tabela 2** é possível observar um aumento na quantidade de albumina FITC no meio intracelular ao longo do tratamento.

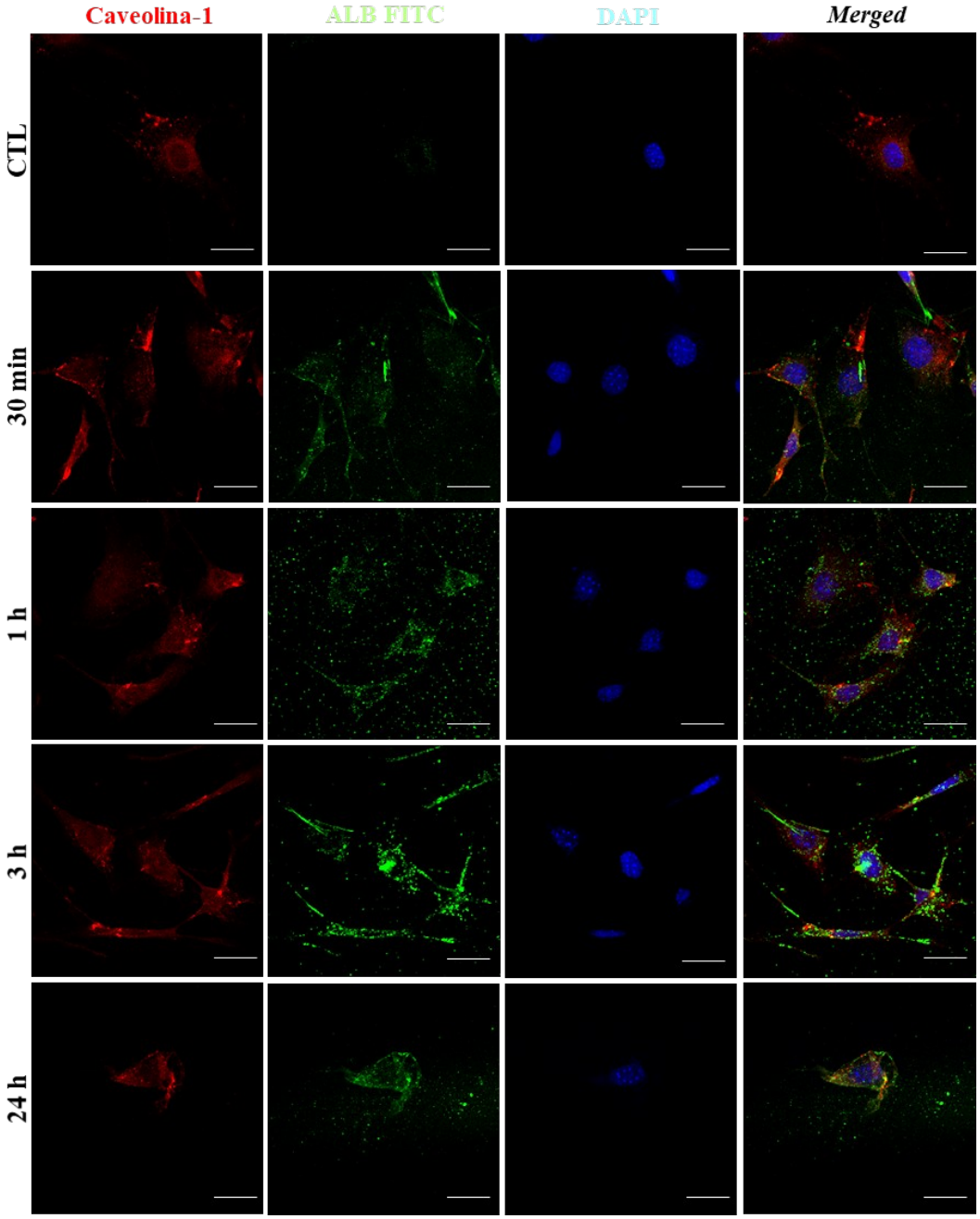

Figura 5 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 30 min, 1h, 3h e 24h após o tratamento. A concentração de albumina FITC utilizada foi de 1 mg/mL. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO. As áreas tracejadas são ampliadas nas figuras seguintes. Albumina FITC é marcada em verde; caveolina-1 em vermelho; DAPI em azul. Barra de escala de 20 µm. O experimento é representativo de três lamínulas.

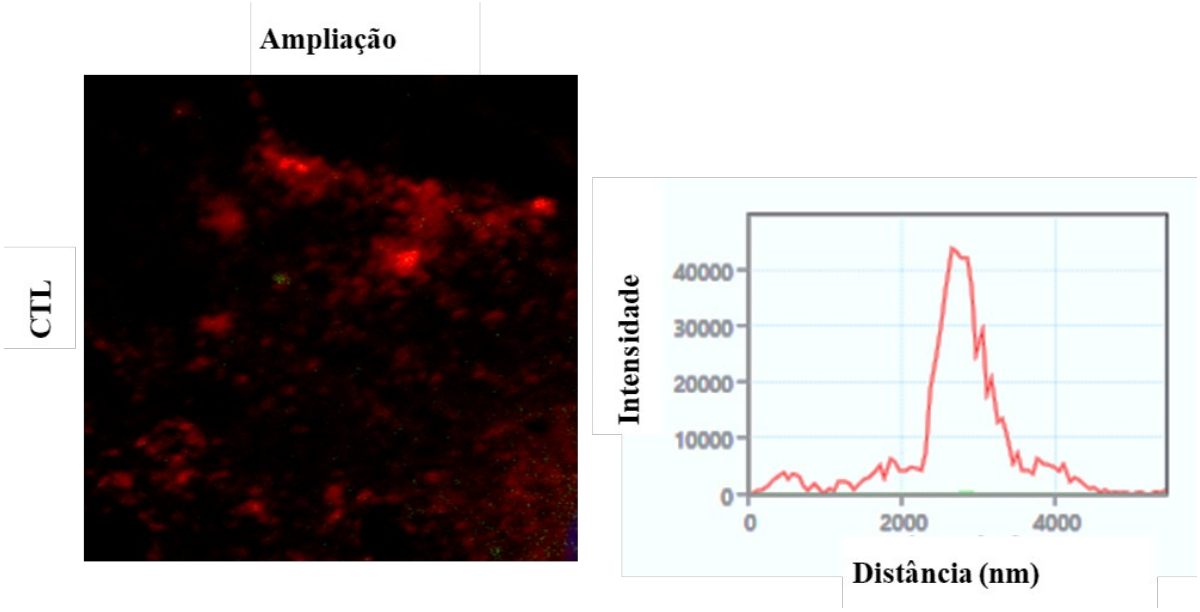

Figura 6 - Marcação de caveolina-1 em podócitos controle. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO. Caveolina-1 é marcada em vermelho. O gráfico de intensidade (valores arbitrários) em função da distância (nm) demonstra apenas a fluorescência vermelha. Obtido a partir do *software* ZEN™ (Zeiss). O experimento é representativo de três lamínulas.

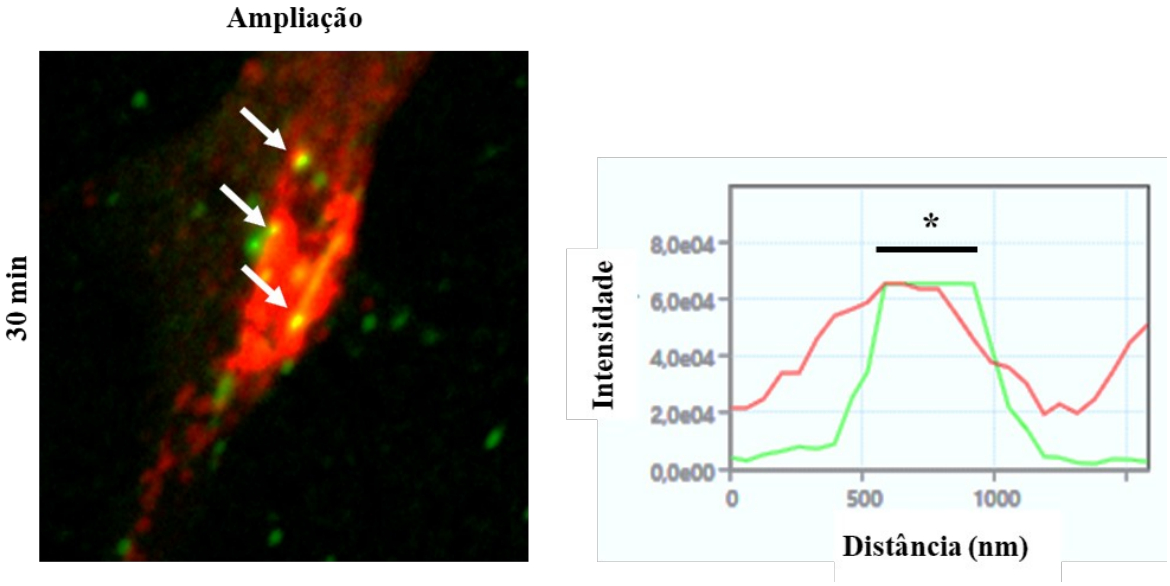

Figura 7 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 30 min após o tratamento. A concentração de albumina FITC utilizada foi de 1 mg/mL. As figuras foram ampliadas para evidenciar as colocalizações de albumina FITC e caveolina-1, as quais são apontadas por setas brancas. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO. Albumina FITC é marcada em verde; caveolina-1 em vermelho. O gráfico de intensidade (valores arbitrários) em função da distância (nm) demonstra uma sobreposição entre as fluorescências verde e vermelha na área demarcada. Obtido a partir do *software* ZEN™ (Zeiss). O experimento é representativo de três lamínulas.

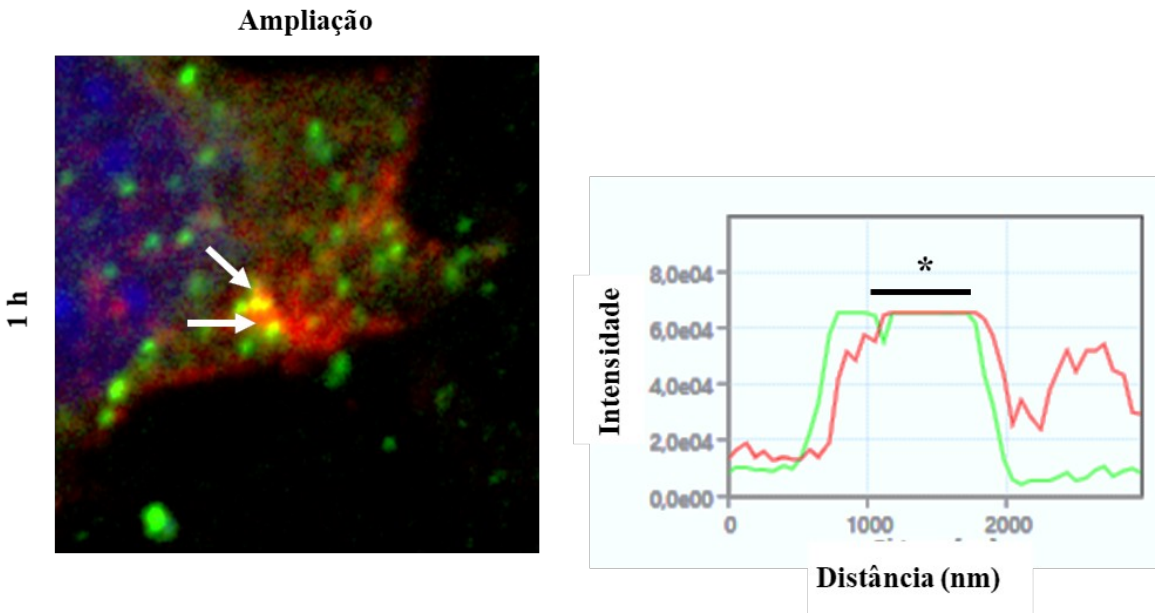

Figura 8 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 1h após o tratamento. A concentração de albumina FITC utilizada foi de 1 mg/mL. As figuras foram ampliadas para evidenciar as colocalizações de albumina FITC e caveolina-1, as quais são apontadas por setas brancas. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO. Albumina FITC é marcada em verde; caveolina-1 em vermelho; DAPI em azul. O gráfico de intensidade (valores arbitrários) em função da distância (nm) demonstra uma sobreposição entre as fluorescências verde e vermelha na área demarcada. Obtido a partir do *software* ZEN™ (Zeiss). O experimento é representativo de três lamínulas.

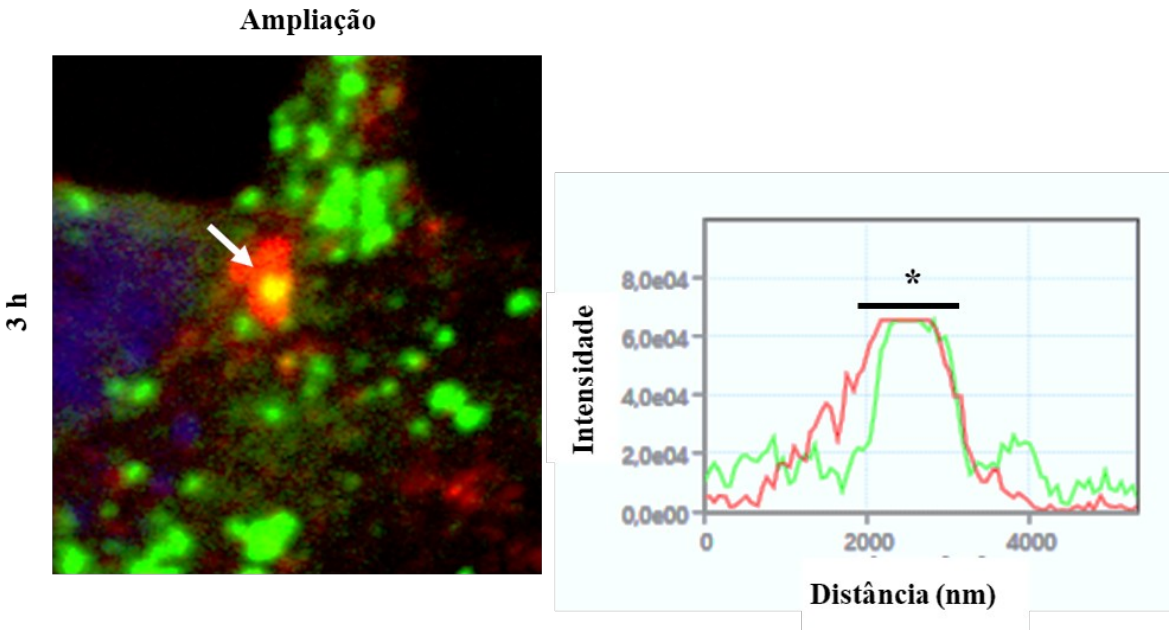

Figura 9 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 3h após o tratamento. A concentração de albumina FITC utilizada foi de 1 mg/mL. As figuras foram ampliadas para evidenciar as colocalizações de albumina FITC e caveolina-1, as quais são apontadas por setas brancas. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO. Albumina FITC é marcada em verde; caveolina-1 em vermelho; DAPI em azul. O gráfico de intensidade (valores arbitrários) em função da distância (nm) demonstra uma sobreposição entre as fluorescências verde e vermelha na área demarcada. Obtido a partir do *software* ZEN™ (Zeiss). O experimento é representativo de três lamínulas.

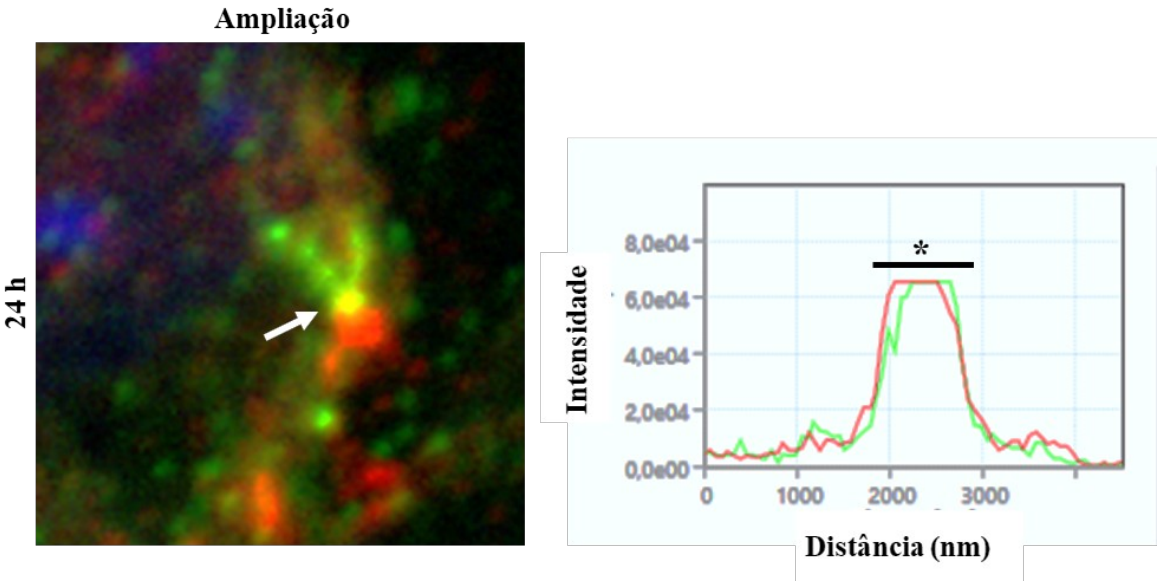

Figura 10 - Endocitose de albumina FITC por podócitos e sua colocalização com caveolina-1 em função do tempo de 24h após o tratamento. A concentração de albumina FITC utilizada foi de 1 mg/mL. As figuras foram ampliadas para evidenciar as colocalizações de albumina FITC e caveolina-1, as quais são apontadas por setas brancas. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO. Albumina FITC é marcada em verde; caveolina-1 em vermelho; DAPI em azul. O gráfico de intensidade (valores arbitrários) em função da distância (nm) demonstra uma sobreposição entre as fluorescências verde e vermelha na área demarcada. Obtido a partir do *software* ZEN™ (Zeiss). O experimento é representativo de três lamínulas.

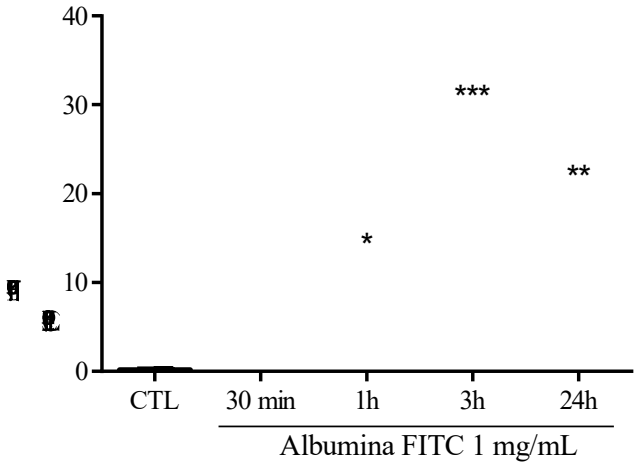

Figura 11 - Intensidade de fluorescência FITC intracelular ao longo do tratamento com albumina FITC. As células foram tratadas com albumina FITC na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. Os valores são arbitrários (média ± erro padrão) (n=3). $^{*}p<0,05$ *versus* CTL. $^{**}p<0,01$ *versus* CTL. $^{***}p<0,001$ *versus* CTL

Tabela 2: Intensidade de fluorescência FITC ao longo do tratamento com albumina FITC 1 mg/mL.

Grupo experimental	CTL	30 min	1h	3h	24h
Intensidade de fluorescência FITC (valores arbitrários)	0,19 (±0,02)	8,06 (±1,15)	10,84 (±1,28)*	21,58 (±4,36)***	17,07 (±2,37)**

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). $^{***}p<0,001$ *versus* CTL. $^{**}p<0,01$ *versus* CTL. $^{*}p<0,05$ *versus* CTL.

6.3 Expressão de podocina, sinaptopodina e caveolina-1 em podócitos

Para comprovar que a linhagem celular estudada apresenta características funcionais preservadas foi realizada a análise da expressão proteica por *western blotting* para as proteínas podocina, sinaptopodina e caveolina-1. Os resultados são apresentados na **figura 12**.

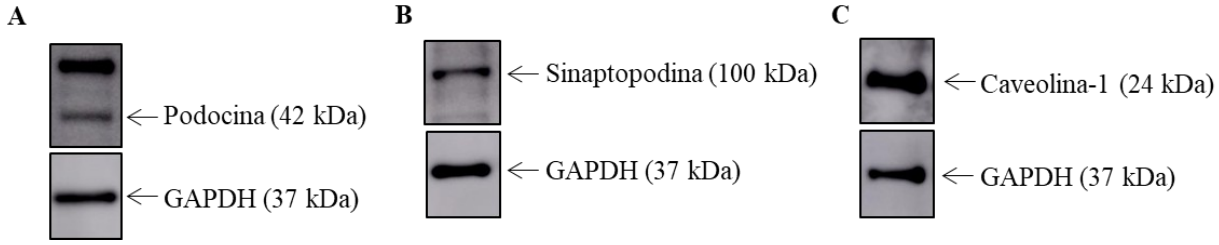

Figura 12 - *Blots* representativos para detecção de podocina (A), sinaptopodina (B) e caveolina-1 (C) em podócitos controle (n=3).

6.4 Efeito da albumina na expressão da chaperona GRP78

Considerando a predominância da apoptose no grupo tratado com albumina na concentração de 1 mg/mL, passamos a investigar apenas este grupo nos experimentos de *western blotting*. Com relação à expressão da chaperona GRP78, os resultados da **figura 13** e **tabela 3** mostram que o tratamento com albumina aumentou sua expressão apenas no período de 1h em relação ao grupo controle.

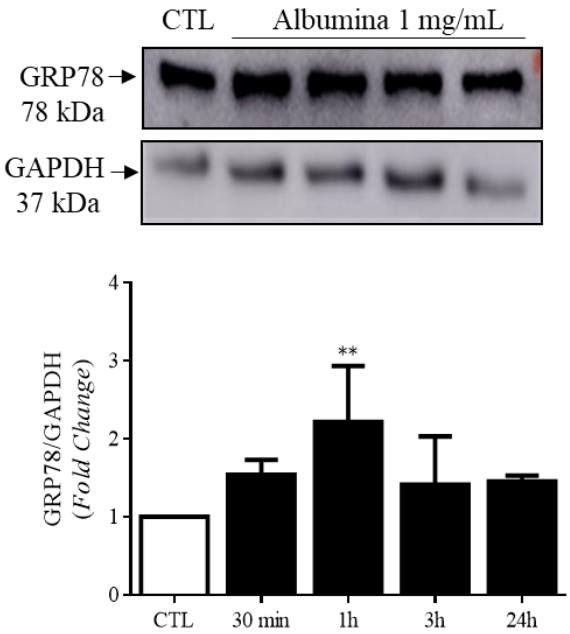

Figura 13 - Efeito da albumina na expressão da chaperona GRP78. As células foram tratadas com albumina na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. *Blots* representativos para detecção da chaperona GRP78 e GAPDH (n=3). A análise densitométrica (GRP78/GAPDH) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). $^{**}p<0.01$ *versus* CTL.

Tabela 3: Média dos valores para expressão da chaperona GRP78.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 30 min	ALB 1 mg/mL 1h	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL 24h
GRP78/GAPDH (Fold Change)	1,00	1,54 (±0,09)	2,21 (±0,41)**	1,41 (±0,30)	1,45 (±0,03)

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). $^{**}p<0,01$ *versus* CTL .

6.5 Efeito da albumina na expressão da proteína IRE-1α fosforilada

Os resultados da **figura 14** e **tabela 4** mostram que o tratamento com albumina aumentou a expressão da proteína IRE-1α fosforilada (pIRE-1α) em 30 min, 1h, 3h e 24h em relação ao grupo controle.

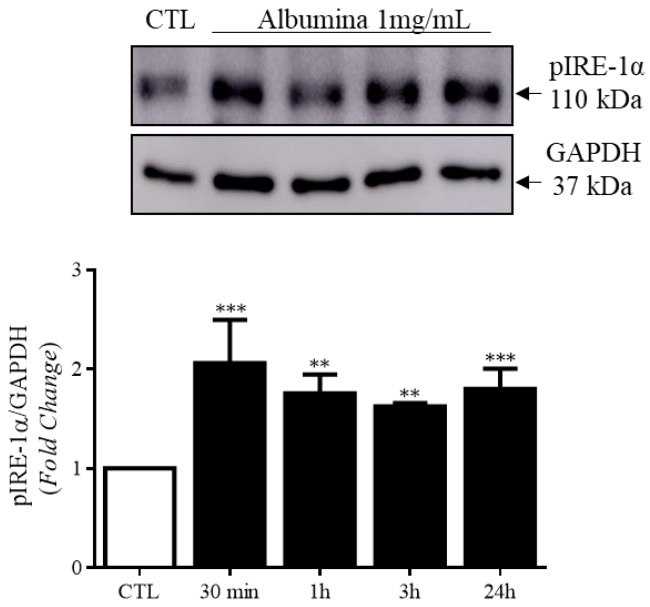

Figura 14 - Efeito da albumina na expressão da proteína pIRE-1α. As células foram tratadas com albumina na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. *Blots* representativos para detecção da proteína pIRE-1α e GAPDH (n=3). A análise densitométrica (pIRE-1α/GAPDH) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). ***p<0,001 *versus* CTL. **p<0,01 *versus* CTL .

Tabela 4: Média dos valores para expressão da proteína pIRE-1α.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 30 min	ALB 1 mg/mL 1h	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL 24h
pIRE-1α/GAPDH (Fold Change)	1,00	2,06 (±0,21)***	1,75 (±0,09)**	1,62 (±0,01)**	1,80 (±0,10)***

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). ***p<0,001 *versus* CTL. **p<0,01 *versus* CTL.

6.6 Efeito da albumina na expressão da proteína PKC δ fosforilada

Os resultados da **figura 15** e **tabela 5** mostram que o tratamento com albumina não alterou a expressão da proteína PKC δ fosforilada (pPKC δ) no período de 30 min em relação ao grupo controle. No entanto, aumentou significativamente a expressão dessa proteína nos períodos de 1, 3 e 24 horas.

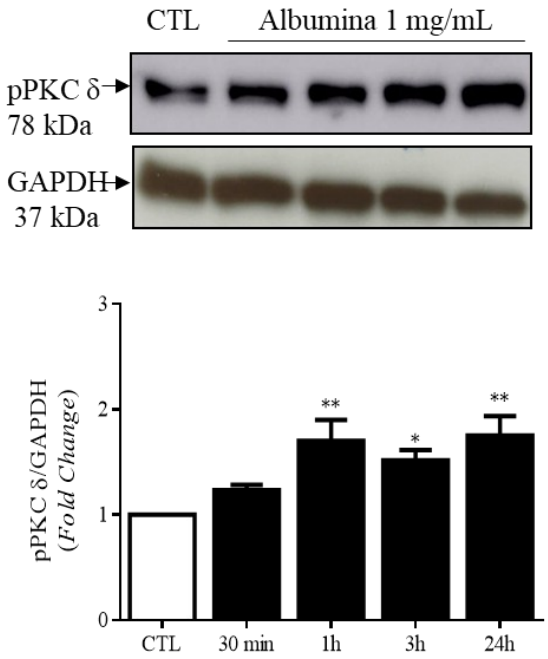

Figura 15 - Efeito da albumina na expressão da proteína pPKC δ. As células foram tratadas com albumina na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. *Blots* representativos para detecção da proteína pPKC δ e GAPDH (n=4). A análise densitométrica (pPKC δ/GAPDH) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). $^{**}p<0,01$ *versus* CTL. $^{*}p<0.05$ *versus* CTL.

Tabela 5: Média dos valores para expressão da proteína pPKC δ.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 30 min	ALB 1 mg/mL 1h	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL 24h
pPKC δ/GAPDH (Fold Change)	1,00	1,23 (±0,06)	1,70 (±0,20)**	1,51 (±0,09)*	1,75 (±0,18)**

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=4). $^{**}p<0,01$ *versus* controle. $^{*}p<0,05$ *versus* CTL.

6.7 Efeito da albumina na expressão de p38 MAPK fosforilada

Conforme apresentado na **figura 16** e **tabela 6** o tratamento com albumina por 30 min não alterou a expressão da p38 MAPK fosforilada (pp38 MAPK), quando comparado ao controle. Entretanto, o tratamento por 1, 3 e 24h induziu um significativo aumento desse parâmetro em relação ao controle, sendo que o pico de expressão dessa proteína ocorreu em 3 horas.

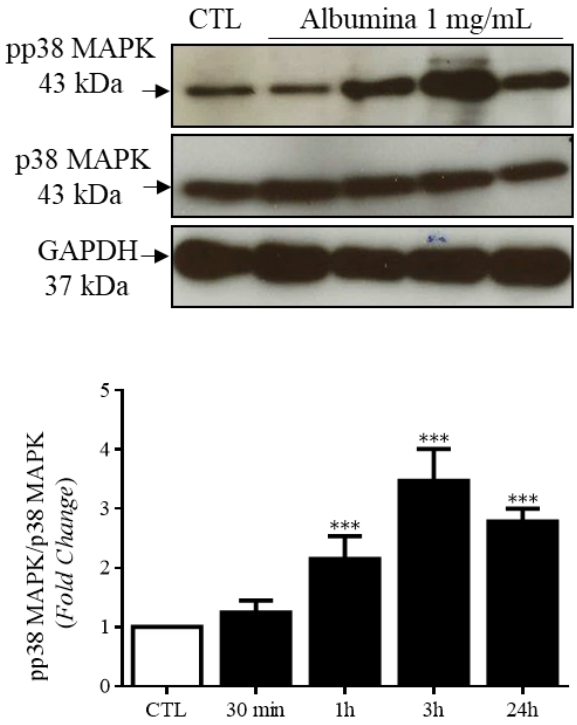

Figura 16 - Efeito da albumina na expressão da proteína pp38 MAPK. As células foram tratadas com albumina na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. *Blots* representativos para detecção das proteínas pp38 MAPK, p38 MAPK e GAPDH (n=3). A análise densitométrica (pp38 MAPK/p38 MAPK) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). ***p<0,001 *versus* CTL.

Tabela 6: Média dos valores para expressão da proteína pp38 MAPK/p38 MAPK.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 30 min	ALB 1 mg/mL 1h	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL 24h
pp38MAPK/p38MAPK (Fold Change)	1,00	1,24 (±0,10)	2,15 (±0,19)***	3,47 (±0,26)***	2,78 (±0,12)***

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). ***p<0.001 *versus* CTL.

6.8 Efeito da albumina na expressão da proteína caspase-12 clivada

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios. Após um sinal de morte celular são ativadas por clivagem proteolítica. Conforme apresentado na **figura 17** e **tabela 7,** o tratamento com albumina por 30 min não alterou a expressão da proteína caspase-12 clivada, quando comparado ao controle. Entretanto, os tratamentos por 1, 3 e 24 horas induziram um significativo aumento desse parâmetro em relação ao controle.

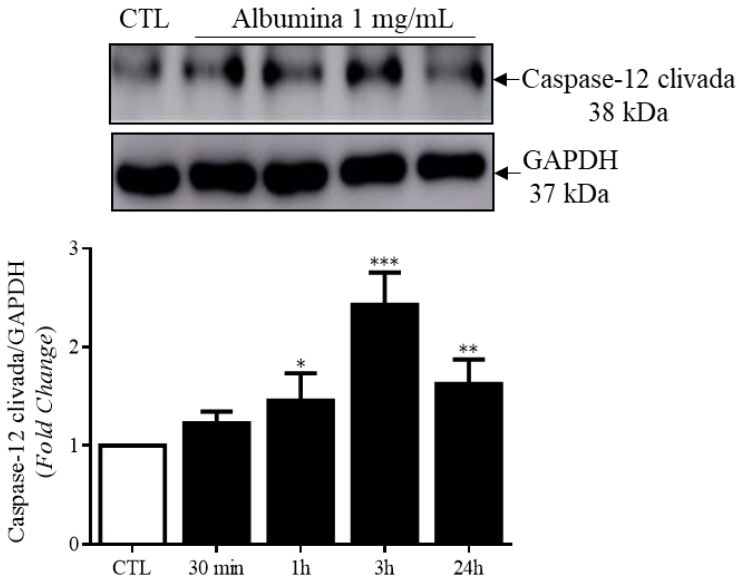

Figura 17 - Efeito da albumina na expressão da proteína caspase-12 clivada. As células foram tratadas com albumina na concentração de 1 mg/mL por 30 min, 1h, 3h e 24h. *Blots* representativos para detecção da proteína caspase-12 clivada e GAPDH (n=3). Análise densitométrica (Caspase-12 clivada/GAPDH) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). ***p<0,001 *versus* CTL. **p<0,01 *versus* CTL. *p<0,05 *versus* CTL .

Tabela 7: Média dos valores para expressão da proteína caspase-12 clivada.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 30 min	ALB 1 mg/mL 1h	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL 24h
Caspase-12 clivada/GAPDH (Fold Change)	1,00	1,22 (±0,06)	1,45 (±0,13)*	2,42 (±0,18)***	1,62 (±0,14)**

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). ***p<0,001 *versus* CTL. **p<0,01 *versus* CTL. *p<0,05 *versus* CTL.

6.9 Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína p38 MAPK fosforilada

Para confirmar a fosforilação da p38MAPK durante o tratamento com albumina os podócitos foram tratados com SB203580 (10^{-7} M) e albumina pelo período de tempo de 3h. Nossos resultados (**figura 18 e tabela 8**) revelam que o SB203580 preveniu o efeito estimulador da albumina 1 mg/mL na expressão da pp38 MAPK.

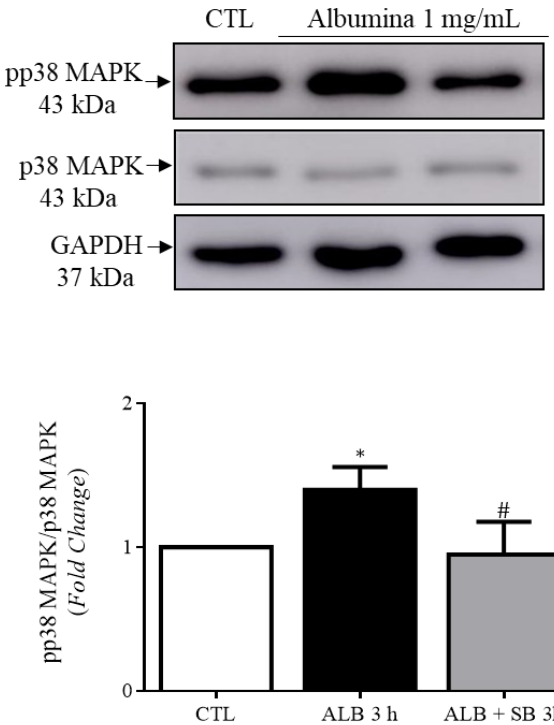

Figura 18 - Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína pp38 MAPK. As células foram tratadas com SB203580 (10^{-7} M) e/ou albumina na concentração de 1 mg/mL por 3h. *Blots* representativos para detecção das proteínas pp38 MAPK, p38 MAPK e GAPDH (n=3). A análise densitométrica (pp38 MAPK/p38 MAPK) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). $^{*}p<0,05$ *versus* CTL. $^{\#}p<0,05$ *versus* ALB 3h.

Tabela 8: Média dos valores para expressão da proteína pp38 MAPK.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL+SB 3h
pp38MAPK/p38MAPK (Fold Change)	1,00	1,39(±0,09)*	0,94 (±0,11)$^{\#}$

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). $^{*}p<0,05$ *versus* CTL . $^{\#}p<0,05$ *versus* ALB 1 mg/mL3h.

6.10 Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína caspase-12 clivada

Para averiguar a participação da proteína pp38 MAPK no processo de apoptose induzido por albumina e mediado por caspase-12, os podócitos foram tratados com SB203580 (10^{-7} M) e albumina pelo período de tempo de 3h. Em nossos resultados (**figura 19** e **tabela 9**) houve uma diminuição significativa da expressão da proteína caspase-12 clivada em relação ao grupo tratado com albumina 1 mg/mL, por 3h, entretanto essa diminuição não foi significativa quando comparada ao grupo controle.

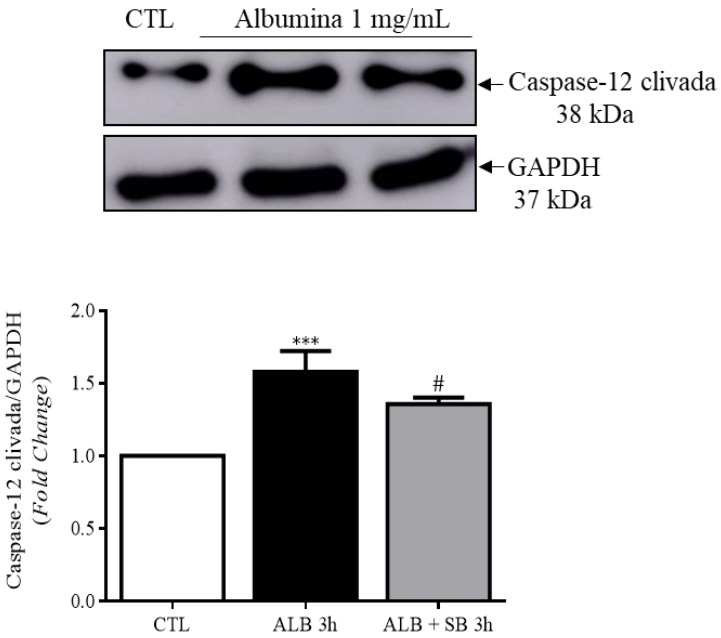

Figura 19 - Efeito da albumina e SB203580 na expressão da proteína caspase-12 clivada. As células foram tratadas com SB203580 (10^{-7} M) e/ou albumina na concentração de 1 mg/mL por 3h. *Blots* representativos para detecção da proteína Caspase-12 clivada e GAPDH (n=3). A análise densitométrica (Caspase-12 clivada/GAPDH) é apresentada como *fold change* (média ± erro padrão). ***p<0,001 *versus* CTL . $^{\#}$p<0,05 *versus* ALB 3h.

Tabela 9: Média dos valores para expressão da proteína caspase-12 clivada.

Grupo experimental	CTL	ALB 1 mg/mL 3h	ALB 1 mg/mL+SB 3h
Caspase-12 clivada/GAPDH (Fold Change)	1,00	1,57 (±0,07)***	1,35 (±0,02)$^{\#}$

Os valores são apresentados como *fold change* (média ± erro padrão) (n=3). ***p<0,001 *versus* CTL. $^{\#}$p<0,05 *versus* ALB 1mg/mL 3h.

7 DISCUSSÃO

Sabe-se que os podócitos têm um papel essencial na manutenção da barreira de ultrafiltração glomerular, entretanto uma situação desfavorável como a sobrecarga de albumina, a qual é característica de estados proteinúricos, pode induzir a morte dessas células, o que potencializa as lesões na MBG e consequentemente na progressão da DRC.

Em humanos, a presença de albumina na urina com valores superiores a 300 mg/dia é considerada como macroalbuminúria, indicador de doença renal crônica terminal (De Jong *et al.*, 2007). Por outro lado, Erkan e colaboradores (Erkan *et al.*, 2001; Erkan *et al.*, 2005) utilizando culturas celulares de túbulo proximal, observaram que o uso de albumina nas concentrações de 5, 10 ou 20 mg/mL em um período de tratamento superior a 3 dias pode induzir alterações morfológicas e necrose celular. Além disso, He e colaboradores (He *et al.*, 2011) demonstraram que a exposição de podócitos à albumina nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 mg/mL por 24 horas induziu crescente e significativa apoptose. Vale ressaltar que neste estudo, mesmo considerando 5 mg/mL uma condição de microalbuminúria, os autores não avaliaram concentrações menores e nem as vias de sinalização responsáveis pelo evento. Neste contexto, o nosso protocolo experimental corrobora as observações da literatura e nossos resultados indicam que a concentração de 1 mg/mL de albumina no período de 24 horas já é suficiente para induzir um significativo índice de apoptose total em podócitos. Nas concentrações de 5 e 10 mg/mL, não observamos índices significativos de apoptose em relação ao grupo controle, o que sugere saturação do processo de endocitose de albumina em nosso modelo. De forma interessante, Buchäckert e colaboradores (Buchäckert *et al.*, 2012) observaram que em células pulmonares, a eficiência na endocitose de albumina segue um padrão que depende da concentração do substrato e da temperatura do meio. Os autores sugerem saturação do sistema quando as concentrações de albumina no meio externo superam 10 mg/mL e que essa condição favorece a eliminação de albumina.

Considerando que a apoptose foi confirmada no grupo tratado com albumina 1 mg/mL por 24 horas, decidimos prosseguir com essa concentração para avaliar o processo de endocitose. Este por sua vez, foi monitorado pela marcação com caveolina-1. Caveolinas são proteínas envolvidas da compartimentalização da membrana celular que promovem a endocitose de vários tipos de substâncias (Boscher e Nabi, 2012). Em nosso estudo, as análises por microscopia confocal confirmam a endocitose de albumina em podócitos e indicam um importante papel da caveolina-1 nesse processo, já que foram observadas uma

série de colocalizações em todos os períodos de tempo testados. Foi possível observar um aumento nos níveis de fluorescência FITC no meio intracelular ao longo do tratamento, resultante da captação de albumina pelas células. Dados da literatura mostram que linhagens de podócitos humanos podem realizar a endocitose de albumina FITC principalmente via caveolina-1. Uma vez dentro da célula a albumina pode sofrer degradação lisossomal ou até mesmo transcitose (Dobrinskikh *et al.*, 2014). É importante ressaltar que em experimentos anteriores observamos uma discreta colocalização entre albumina FITC e cubilina em podócitos, entretanto os dados não foram aqui apresentados devido ao pequeno número experimental.

O RE é uma organela multifuncional essencial para síntese, enovelamento e processamento de proteínas. Para que haja um enovelamento proteico adequado, é necessário um equilíbrio entre a quantidade de proteínas e a capacidade de processamento do RE. No entanto, estímulos fisiopatológicos podem interromper esta homeostase, resultando em um acúmulo de proteínas mal enoveladas, condição conhecida como estresse de RE (Oslowski e Urano, 2011). Dados de literatura sugerem que a sobrecarga de albumina intracelular induz acúmulo de proteínas mal enoveladas (Lindenmeyer *et al.*, 2008). Sob condições fisiológicas, as proteínas sensoras do RE como a PERK, IRE1 e ATF6 interagem com a chaperona GRP78, o que suprime suas atividades. No entanto, em resposta ao estresse de RE, a GRP78 é recrutada para promover o enovelamento proteico (Gorostizaga *et al.*, 2013). Estudos mostram que em células HEK293 o IRE1α ativado recruta a TRAF2 para a membrana do RE e ativa a JNK em resposta ao estresse de RE (Zhu *et al.*, 2014). Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a PKC δ participa da apoptose induzida por estresse de RE, ativando principalmente a via JNK (Humphries *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Gomel *et al.*, 2007; Qi e Mochly-Rosen, 2008). No presente estudo, o tratamento de podócitos com albumina na concentração de 1 mg/mL durante 1 hora resultou em aumento da expressão de GRP78 e no aumento da fosforilação de IRE1α e PKC δ. Em conjunto, esses resultados indicam que a via de sinalização GRP78/IRE1α/PKC δ contribui para o estresse de RE. Além disso, observamos que o aumento da expressão de pIRE1α em 30 min induziu o aumento da expressão de PKC δ fosforilada, a qual foi significativamente aumentada em 1h, sendo que ambas as proteínas mantiveram os estados fosforilados durante o processo apoptótico, confirmando seu papel na apoptose. Dado que a fosforilação da PKC δ está associada à resposta de estresse de RE nos podócitos tratados com albumina, é importante compreender os mecanismos fundamentais pelos quais a PKC δ inicia e mantém o processo apoptótico. No entanto, o mecanismo exato

de ação de PKC δ em podócitos ainda não é claro, pois parece estar envolvido em múltiplas vias de sinalização. Dados de literatura sugerem que PKC δ interage com vários membros da família MAPK, incluindo p38 MAPK e JNK (Humphries *et al.*, 2006; Gomel *et al.*, 2007). Outros estudos *in vitro* relataram que podócitos de pacientes com proteinúria nefrótica ou podócitos de camundongos expostos à albumina, resultaram em apoptose mediada por p38 MAPK (Susztak *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2008). No entanto, a via que conecta a p38 MAPK e a lesão podocitária não foi demonstrada. Nossos experimentos revelaram que a expressão de p38 MAPK fosforilada e caspase-12 clivada foi mediada por albumina, bem como a apoptose de podócitos, foi prevenida pelo uso do SB203580, um inibidor específico de p38 MAPK. Em conjunto, esses resultados reforçam o papel da interação p38 MAPK/caspase-12 na apoptose de podócitos induzida por albumina e evidenciam a via intracelular mediada por GRP78/IRE1α/PKC δ/p38 MAPK/caspase-12. Um esquema proposto da via de sinalização é apresentado na **figura 20**.

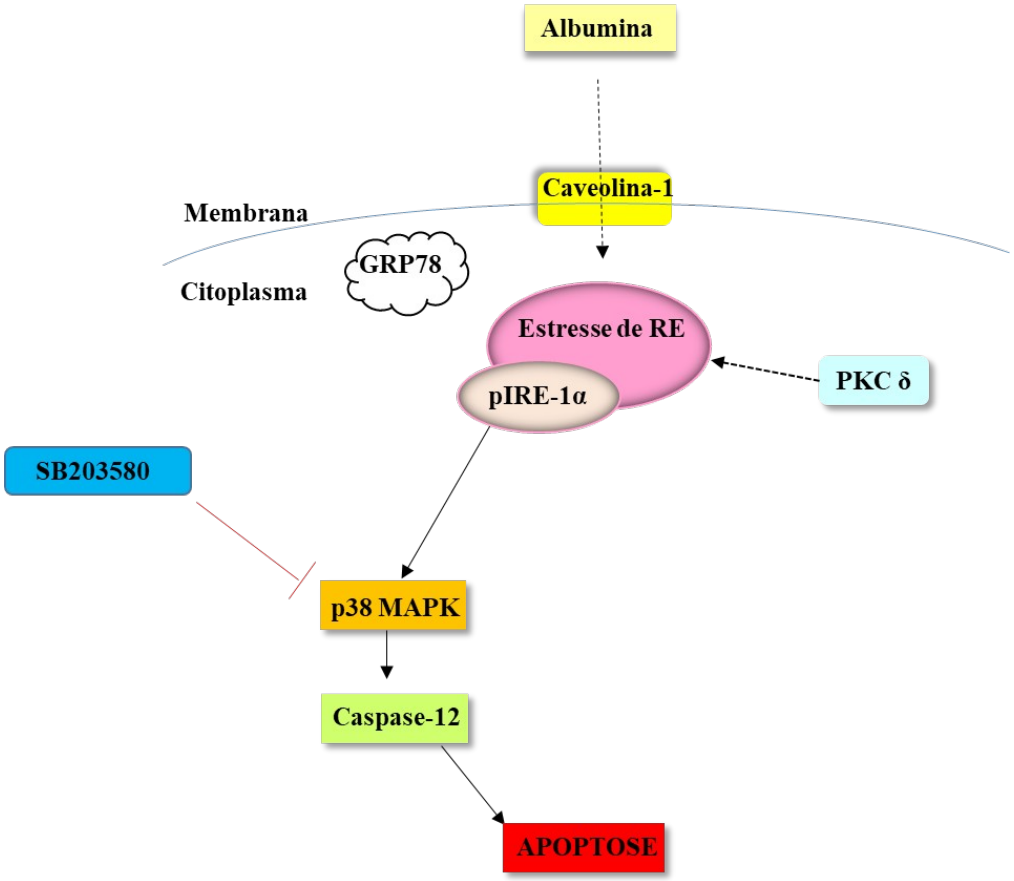

Figura 20 - Esquema proposto da via de sinalização envolvida no tratamento de podócitos com albumina (Fonte: o autor).

8 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a proteína caveolina-1 tem um importante papel na internalização de albumina em podócitos. Além disso, a albumina na concentração de 1 mg/mL no meio intracelular induz apoptose dessas células principalmente pelo estresse de RE e fosforilação da PKC δ e p38 MAPK. Sendo assim, nosso estudo pode ajudar a identificar alvos terapêuticos para a prevenir a lesão podocitária em nefropatias associadas à albuminúria.

REFERÊNCIAS

ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? **J Am Soc Nephrol,** v. 17, n. 11, p. 2974-84, Nov 2006. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035611 >.

ASANUMA, K.; MUNDEL, P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. **Clin Exp Nephrol,** v. 7, n. 4, p. 255-9, Dec 2003. ISSN 1342-1751. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712353 >.

BAINES, R. J.; BRUNSKILL, N. J. The molecular interactions between filtered proteins and proximal tubular cells in proteinuria. **Nephron Exp Nephrol,** v. 110, n. 2, p. e67-71, 2008. ISSN 1660-2129. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849618 >.

BASILE, J. New therapeutic options in patients prone to hypertension: a focus on direct Renin inhibition and aldosterone blockade. **Am J Med Sci,** v. 337, n. 6, p. 438-44, Jun 2009. ISSN 0002-9629. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390429 >.

BERTOLOTTI, A. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nat Cell Biol,** v. 2, n. 6, p. 326-32, Jun 2000. ISSN 1465-7392. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854322 >.

BOSCHER, C.; NABI, I. R. Caveolin-1: role in cell signaling. **Adv Exp Med Biol,** v. 729, p. 29-50, 2012. ISSN 0065-2598. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411312 >.

BRAVO, R. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. **Int Rev Cell Mol Biol,** v. 301, p. 215-90, 2013. ISSN 1937-6448. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23317820 >.

BUCHÄCKERT, Y. et al. Megalin mediates transepithelial albumin clearance from the alveolar space of intact rabbit lungs. **J Physiol,** v. 590, n. 20, p. 5167-81, Oct 2012. ISSN 1469-7793. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826129 >.

BUCKALEW, V. M. et al. Prevalence of hypertension in 1,795 subjects with chronic renal disease: the modification of diet in renal disease study baseline cohort. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Am J Kidney Dis,** v. 28, n. 6, p. 811-21, Dec 1996. ISSN 0272-6386. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957032 >.

CARDILLO, C. et al. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. **Circulation,** v. 105, n. 4, p. 452-6, Jan 2002. ISSN 1524-4539. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815427 >.

CAREY, R. M. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.45, 2005. p.840-4. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 75, n. 1, p. 50-83, Mar 2011. ISSN 1098-5557. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372320 >.

CHENG, Y. C. et al. Albumin overload down-regulates integrin-β1 through reactive oxygen species-endoplasmic reticulum stress pathway in podocytes. **J Biochem,** v. 158, n. 2, p. 101-8, Aug 2015. ISSN 1756-2651. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713411 >.

CHRISTENSEN, E. I.; VERROUST, P. J.; NIELSEN, R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. **Pflugers Arch,** v. 458, n. 6, p. 1039-48, Oct 2009. ISSN 1432-2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499243 >.

CORESH, J. et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. **JAMA,** v. 298, n. 17, p. 2038-47, Nov 2007. ISSN 1538-3598. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17986697 >.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; MEYER-FERNANDES, J. R. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. **Int J Mol Sci,** v. 13, n. 9, p. 10697-721, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109817 >.

DARLING, N. J.; COOK, S. J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. **Biochim Biophys Acta,** v. 1843, n. 10, p. 2150-63, Oct 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440275 >.

DE JONG, P. E.; GANSEVOORT, R. T.; BAKKER, S. J. Macroalbuminuria and microalbuminuria: do both predict renal and cardiovascular events with similar strength? **J Nephrol,** v. 20, n. 4, p. 375-80, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1121-8428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17879201 >.

DOBRINSKIKH, E. et al. Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 306, n. 9, p. F941-51, May 2014. ISSN 1522-1466. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573386 >.

ENDLICH, K.; KRIZ, W.; WITZGALL, R. Update in podocyte biology. **Curr Opin Nephrol Hypertens,** v. 10, n. 3, p. 331-40, May 2001. ISSN 1062-4821. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11342794 >.

ERKAN, E.; DE LEON, M.; DEVARAJAN, P. Albumin overload induces apoptosis in LLC-PK(1) cells. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 280, n. 6, p. F1107-14, Jun 2001. ISSN 1931-857X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352849 >.

ERKAN, E. et al. Induction of renal tubular cell apoptosis in focal segmental glomerulosclerosis: roles of proteinuria and Fas-dependent pathways. **J Am Soc Nephrol,** v. 16, n. 2, p. 398-407, Feb 2005. ISSN 1046-6673. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601749 >.

EYRE, J. et al. Statin-sensitive endocytosis of albumin by glomerular podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 292, n. 2, p. F674-81, Feb 2007. ISSN 1931-857X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032937 >.

FUNABIKI, K. et al. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. **Clin Nephrol,** v. 34, n. 6, p. 239-46, Dec 1990. ISSN 0301-0430. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2073766 >.

GOMEL, R. et al. The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways. **Mol Cancer Res,** v. 5, n. 6, p. 627-39, Jun 2007. ISSN 1541-7786. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579121 >.

GOROSTIZAGA, A. et al. Modulation of albumin-induced endoplasmic reticulum stress in renal proximal tubule cells by upregulation of mapk phosphatase-1. **Chem Biol Interact,** v. 206, n. 1, p. 47-54, Oct 2013. ISSN 1872-7786. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994741 >.

HARDING, H. P. et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol Cell,** v. 5, n. 5, p. 897-904, May 2000. ISSN 1097-2765. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882126 >.

_____. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell,** v. 11, n. 3, p. 619-33, Mar 2003. ISSN 1097-2765. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12667446 >.

HE, F. F. et al. Role of CD2-associated protein in albumin overload-induced apoptosis in podocytes. **Cell Biol Int,** v. 35, n. 8, p. 827-34, Aug 2011. ISSN 1095-8355. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166652 >.

HUMPHRIES, M. J. et al. Suppression of apoptosis in the protein kinase Cdelta null mouse in vivo. **J Biol Chem,** v. 281, n. 14, p. 9728-37, Apr 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452485 >.

KADOWAKI, H.; NISHITOH, H.; ICHIJO, H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. **J Chem Neuroanat,** v. 28, n. 1-2, p. 93-100, Sep 2004. ISSN 0891-0618. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363494 >.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev,** v. 13, n. 10, p. 1211-33, May 1999. ISSN 0890-9369. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10346810 >.

KAWADA, N. et al. A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. **J Am Soc Nephrol,** v. 13, n. 12, p. 2860-8, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444204 >.

KIM, D. S. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death and autophagy in human gingival fibroblasts. **Biol Pharm Bull,** v.

33, n. 4, p. 545-9, 2010. ISSN 1347-5215. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410583 >.

KITTIKULSUTH, W.; POLLOCK, J. S.; POLLOCK, D. M. Sex differences in renal medullary endothelin receptor function in angiotensin II hypertensive rats. **Hypertension,** v. 58, n. 2, p. 212-8, Aug 2011. ISSN 1524-4563. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646601 >.

KOROMILAS, A. E. Roles of the translation initiation factor eIF2α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. **Biochim Biophys Acta,** v. 1849, n. 7, p. 871-80, Jul 2015. ISSN 0006-3002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497381 >.

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

LARROQUE-CARDOSO, P. et al. Role of protein kinase C δ in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells. **Cell Death Dis,** v. 4, p. e520, Feb 2013. ISSN 2041-4889. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449456 >.

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods,** v. 35, n. 4, p. 373-81, Apr 2005. ISSN 1046-2023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15804610 >.

LEEUWIS, J. W. et al. Targeting podocyte-associated diseases. In: (Ed.). **Adv Drug Deliv Rev**. Netherlands: 2010 Elsevier B.V, v.62, 2010. p.1325-36. ISBN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking).

LEITGES, M. et al. Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase Cdelta-null mice. **J Clin Invest,** v. 108, n. 10, p. 1505-12, Nov 2001. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714742 >.

LINDENMEYER, M. T. et al. Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress. **J Am Soc Nephrol,** v. 19, n. 11, p. 2225-36, Nov 2008. ISSN 1533-3450. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776125 >.

LIU, J. et al. NF-kappaB is required for UV-induced JNK activation via induction of PKCdelta. **Mol Cell,** v. 21, n. 4, p. 467-80, Feb 2006. ISSN 1097-2765. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483929 >.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **J Chem Neuroanat,** v. 28, n. 1-2, p. 51-65, Sep 2004. ISSN 0891-0618. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363491 >.

MEYRIER, A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Clin Pract Nephrol,** v. 1, n. 1, p. 44-54, Nov 2005. ISSN 1745-8323. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932363 >.

MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol,** v. 13, n. 12, p. 3005-15, Dec 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12444221 >.

NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J Cell Biol,** v. 150, n. 4, p. 887-94, Aug 2000. ISSN 0021-9525. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953012 >.

NISHITOH, H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. **J Biochem,** v. 151, n. 3, p. 217-9, Mar 2012. ISSN 1756-2651. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210905 >.

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

OSLOWSKI, C. M.; URANO, F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. **Methods Enzymol,** v. 490, p. 71-92, 2011. ISSN 1557-7988. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266244 >.

PERUCHETTI, D. B. et al. (Na+ + K+)-ATPase is a target for phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B and protein kinase C pathways triggered by albumin. **J Biol Chem,** v. 286, n. 52, p. 45041-7, Dec 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057272 >.

PÉREZ-GARIJO, A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. **Semin Cell Dev Biol**, Dec 2017. ISSN 1096-3634. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29199139 >.

QI, X.; MOCHLY-ROSEN, D. The PKCdelta -Abl complex communicates ER stress to the mitochondria - an essential step in subsequent apoptosis. **J Cell Sci,** v. 121, n. Pt 6, p. 804-13, Mar 2008. ISSN 0021-9533. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18285444 >.

QIAN, H.; PIPOLO, L.; THOMAS, W. G. Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. **Mol Endocrinol,** v. 15, n. 10, p. 1706-19, Oct 2001. ISSN 0888-8809 (Print)0888-8809 (Linking). Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

RAJESH, K. et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. **Cell Death Dis,** v. 6, p. e1591, Jan 2015. ISSN 2041-4889. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25590801 >.

REISER, J.; ALTINTAS, M. M. Podocytes. **F1000Res,** v. 5, 2016. ISSN 2046-1402. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918173 >.

RYER, E. J. et al. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent

mechanisms. **J Biol Chem,** v. 280, n. 42, p. 35310-7, Oct 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118209 >.

SAKAI, T.; KRIZ, W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. **Anat Embryol (Berl),** v. 176, n. 3, p. 373-86, 1987. ISSN 0340-2061. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3631536 >.

SALAMANCA, D. A.; KHALIL, R. A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochem Pharmacol,** v. 70, n. 11, p. 1537-47, Nov 2005. ISSN 0006-2952. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139252 >.

SCHEUNER, D. et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Mol Cell,** v. 7, n. 6, p. 1165-76, Jun 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430820 >.

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

SCHLONDORFF, D. O. Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. **Kidney Int,** v. 74, n. 7, p. 860-6, Oct 2008. ISSN 1523-1755. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650795 >.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu Rev Biochem,** v. 74, p. 739-89, 2005. ISSN 0066-4154. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952902 >.

SCHWARTZ, M. A. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. **J Cell Biol,** v. 139, n. 3, p. 575-8, Nov 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348275 >.

SEQUEIRA LOPEZ, M. L.; GOMEZ, R. A. Development of the renal arterioles. **J Am Soc Nephrol,** v. 22, n. 12, p. 2156-65, Dec 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052047 >.

SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. **J Bras Nefrol,** v. 38, n. 1, p. 54-61, Mar 2016. ISSN 2175-8239. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27049365 >.

SUSZTAK, K. et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. **Diabetes,** v. 55, n. 1, p. 225-33, Jan 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16380497 >.

SZEGEZDI, E.; FITZGERALD, U.; SAMALI, A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1010, p. 186-94, Dec 2003. ISSN 0077-8923. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033718 >.

TAYLOR, M. J.; PERRAIS, D.; MERRIFIELD, C. J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. **PLoS Biol,** v. 9, n. 3, p. e1000604, Mar 2011. ISSN 1545-7885. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445324 >.

TOBLLI, J. E. et al. Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications. **Int J Nephrol,** v. 2012, p. 546039, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844592 >.

TOJO, A.; KINUGASA, S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. **Int J Nephrol,** v. 2012, p. 481520, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22685655 >.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **J Clin Invest,** v. 115, n. 10, p. 2656-64, Oct 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200199 >.

YOSHIDA, S. et al. Podocyte injury induced by albumin overload in vivo and in vitro: involvement of TGF-beta and p38 MAPK. **Nephron Exp Nephrol,** v. 108, n. 3, p. e57-68, 2008. ISSN 1660-2129. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391505 >.

YURCHENCO, P. D.; AMENTA, P. S.; PATTON, B. L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol,** v. 22, n. 7, p. 521-38, Jan 2004. ISSN 0945-053X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996432 >.

ZHU, X. et al. Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway. **J Biol Chem,** v. 289, n. 44, p. 30567-77, Oct 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225294 >.