

FERNANDO AUGUSTO MALAVAZZI CASARE

**Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os  
receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na função e na morfologia renal de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2015

**FERNANDO AUGUSTO MALAVAZZI CASARE**

**Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na função e na morfologia renal de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza

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

São Paulo  
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Casare, Fernando Augusto Malavazzi.

Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os receptores ETA e ETB na função e morfologia renal de ratos / Fernando Augusto Malavazzi Casare. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia renal.

Versão do título para o inglês: Effect of interaction of Angiotensin II and AT1 receptor, or endothelin 3 and ETA and ETB receptors on renal function and morphology in rats.

1. Função renal de animal 2. Morfologia renal 3. Sistema renina-angiotensina 4. Endotelinas I. Souza, Profa. Dra. Maria Oliveira de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0170/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Fernando Augusto Malavazzi Casare.

Título da Tese: Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os receptores ETA e ETB na função e morfologia renal de ratos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil  
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **139** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Oliveira de Souza**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito da interação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e endotelina-3 sobre a função renal*" do qual participam o(s) aluno(s) **Fernando Augusto Malavazzi Casare**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **20.09.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER  
Secretário  
CEUA - ICB/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 060.14

São Paulo, 04 de agosto de 2014.

**REF.: Protocolo nº 0139/11.**

*"Efeito da interação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e endotelina-3 sobre a função renal"*

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 20.09.2017.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus pais, José Carlos e Ivanei e irmã Rejane, com amor,  
admiração e gratidão pelo apoio ao longo dessa caminhada,  
sempre impulsionando meu potencial.



## AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Maria Oliveira de Souza, por ter acreditado em minha capacidade, contribuindo para meu crescimento científico.

Às colegas de laboratório, por tornarem a árdua trilha da pesquisa mais alegre.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez, por ter me incentivado a continuar a minha formação acadêmica.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido ao longo desta pesquisa.

À Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, por disponibilizar seu laboratório para as medidas de HPLC.

À Profa. Fernanda Barrinha Fernandes pelo auxílio com as medidas de HPLC.

À Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni, por disponibilizar seu laboratório para as medidas de pressão arterial direta.

À Dra. Gisele Kruger Couto, pelo auxílio com as medidas de pressão arterial direta.

Aos funcionários do biotério Cleonice, Maria, Renata, Wilson e José pelo cuidado com os animais durante o período em que esse trabalho foi desenvolvido.

Aos funcionários da Secretaria de pós-graduação, José Maria e Paloma, pela eficiência em seu trabalho e o cuidado que têm com os alunos, ajudando-os com as regras do programa.

Aos docentes do Instituto de Ciências Biomédicas, por terem participado de forma direta ou indireta ao longo de minha formação.



## RESUMO

Casare FAM. Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na função e morfologia renal de ratos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

O presente estudo avaliou os efeitos dos hormônios, angiotensina II (Ang II) e Endotelina 3 (ET-3) na hemodinâmica, função e morfologia renal e a contribuição dos receptores de Ang II tipo 1 (AT1) para Ang II ou do tipo A (ETA) ou tipo B (ETB) para ETs. *Métodos:* Foram utilizados ratos Wistar, divididos em 4 grupos: controle, tratados com Ang II (200 ng/kg/min) ou ET-3 (1 pmol/kg/min) por 42 dias, tratados com losartan (10 mg/kg/dia), atrasentan (100 mg/kg/dia) ou BQ788 (4 mg/kg/dia), co-tratados com Ang II e losartan ou ET-3 e atrasentan ou BQ 788. Foram avaliados: pressão arterial, concentrações plasmáticas e intrarrenais de Angs e ETs, morfologia renal (pelos métodos de Verhoeff e PAS); função renal (pelo clearance de para-aminohipurato de sódio e inulina), para avaliar o fluxo plasmático renal e o ritmo de filtração glomerular, respectivamente; expressão de RNAm para os componentes do SRA, citocinas inflamatórias e de matriz extracelular. *Resultados:* O tratamento com Ang II induziu hipertensão arterial, aumentou as concentrações plasmáticas de ETs e Angs; induziu injúria glomerular, podocitúria e albuminúria, além de inflamação, aumento de RNAm para os componentes de matriz extracelular e remodelamento das artérias e arteríolas renais. O tratamento com losartan preveniu a maioria dos efeitos induzidos por Ang II. O tratamento com ET-3 induziu hipertensão arterial, injúria glomerular, alteração da função renal e aumento de RNAm intrarrenal para os componentes do SRA. O bloqueio do receptor ETA reparou os efeitos de ET-3 na hipertensão. O bloqueio de ETB reparou os efeitos de ET-3 nos parâmetros renais. Nossos resultados sugerem uma interação entre os sistemas SRA e endotelinas, induzindo mudanças na estrutura e função renal.

**Palavras-chave:** Função renal. Morfologia renal. Sistema renina-angiotensina. Endotelina 3.

## ABSTRACT

Casare FAM. Effect of interaction of Angiotensin II and AT1 receptor, or endothelin 3 and ETA and ETB receptors on renal function and morphology in rats. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The present study evaluated the effects of angiotensin II (Ang II) and endothelin 3 (ET-3) on renal hemodynamics, function and morphology, and the contribution of the Ang II type 1 receptor (AT1R) and ETs receptors type A (ETA) or type B (ETB) on these parameters. *Methods:* Wistar rats were allocated into 4 groups: control, treated with Ang II (200 ng/kg/min) or ET-3 (1 pmol/kg/min) for 42 days, treated with losartan (10 mg/kg/day), atrasentan (100 mM/kg/day) or BQ788 (4 mM/kg/day), co-treated with Ang II and losartan or ET-3 and atrasentan or BQ788. In this study were evaluated: blood pressure; plasma and intrarenal concentrations of Angiotensins and ET; renal morphology (Verhoeff or PAS stain methods); renal function, by clearance of sodium para-aminohippurate and inulin, to evaluate renal plasma flow and glomerular filtration rate, respectively; mRNA for RAS intrarenal components, inflammatory molecules and extracellular matrix components. *Results:* The treatment with Ang II induced hypertension, increased plasma concentrations of Angiotensins and ETs; induced glomerular injury, podocyte effacement and albuminúria, as well as renal tissue inflammation, increased mRNA for extracellular matrix components and renal arteries and afferent arterioles remodeling. The treatment with losartan prevented most of the effects induced by Ang II. The treatment with ET-3 induced hypertension, glomerular injury, renal dysfunction and increased intrarenal mRNA for SRA components and TNF $\alpha$ . The ETA receptor antagonist reduced ET-3 effects on hypertension. However, the ETB antagonist reduced ET-3 effects on renal function. Our results suggest an interaction between the SRA and the endothelin system, inducing changes in the structure and renal function.

**Keywords:** Renal function. Renal morphology. Renin-angiotensin system. Endothelin 3.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismos regulatórios da pressão arterial.....	18
Figura 2 -	Vias e enzimas envolvidas na formação das angiotensinas. ....	21
Figura 3 -	As principais vias de sinalização intracelular reguladas pela ativação do receptor AT1. ....	22
Figura 4 -	As principais vias de sinalização celular reguladas pela ativação do receptor AT2. ....	23
Figura 5 -	Esquema representativo das vias de biossíntese da endotelina 1 (ET-1).....	25
Figura 6 -	Esquema representativo das vias de sinalização da ET-1 na parede vascular.....	27
Figura 7 -	Estrutura macroscópica do rim e néfron.....	28
Figura 8 -	Efeitos da angiotensina II na pressão arterial de cauda e PAM.....	50
Figura 9 -	Efeitos da Ang II nas concentrações plasmáticas das Ang I, II e 1-7.....	51
Figura 10 -	Expressão proteica dos receptores AT1 e AT2.....	52
Figura 11 -	Efeito da Ang II sobre as concentrações das ang I, II e 1-7 e no RNAm para renina no tecido renal.....	53
Figura 12 -	Efeito da Ang II sobre a hemodinâmica e filtração glomerular .....	54
Figura 13 -	Efeito da Ang II no fluxo urinário.....	55
Figura 14 -	Efeito da Ang II na morfologia das artérias interlobulares.....	56
Figura 15 -	Efeito da Ang II na morfologia das arteríolas aferentes.....	57
Figura 16 -	Efeito da Ang II na morfometria glomerular.....	58
Figura 17 -	Efeito da Ang II na glomeruloesclerose.....	59
Figura 18 -	Efeito da Ang II na desmina em glomérulos.....	60
Figura 19 -	Efeito da Ang II na imuno-histoquímica de ED-1 em rins de ratos.....	61
Figura 20 -	Efeito da Ang II sobre a expressão de RNAm para TNF $\alpha$ , integrina $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1 e colágeno tipo III no tecido renal .....	63
Figura 21 -	Efeito da Ang II nas concentrações plasmáticas de ET-1 e ET-3.....	64
Figura 22 -	Efeito da ET-3 na pressão arterial de cauda.....	67
Figura 23 -	Efeito da ET-3 na expressão proteica dos receptores ETA e ETB.....	69
Figura 24 -	Efeito da ET-3 na hemodinâmica e filtração glomerular.....	70
Figura 25 -	Efeito da ET-3 sobre o fluxo urinário.....	72
Figura 26 -	Efeito da ET-3 na morfometria glomerular.....	74
Figura 27 -	Efeito da ET-3 na glomeruloesclerose.....	75
Figura 28 -	Efeito da ET-3 na desmina em glomérulos.....	77
Figura 29 -	Efeito da ET-3 na razão proteínas/creatinina urinária.....	78
Figura 30 -	Efeito da ET-3 na expressão RNAm para TNF $\alpha$ intrarrenal.....	80
Figura 31 -	Efeito da ET-3 na expressão de RNAm para os componentes do sistema endotelinas intrarrenal.....	81
Figura 32 -	Expressão de RNAm para os componentes do sistema renina-angiotensina intrarrenal.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros Fisiológicos, grupo Ang II.....	49
Tabela 2 -	Pressão Arterial (PA), grupo Ang II.....	50
Tabela 3 -	Concentrações plasmáticas de angiotensinas, grupo Ang II.....	51
	Concentrações de RNAm para renina e de angiotensinas no	
Tabela 4 -	tecido renal, grupo Ang II.....	53
Tabela 5 -	Hematócrito e hemodinâmica renal, grupo Ang II.....	54
Tabela 6 -	Fluxo urinário e manejo de eletrólitos, grupo Ang II.....	55
	Morfologia das artérias interlobulares, arteríolas aferentes e	
Tabela 7 -	glomérulos, grupo Ang II.....	57
Tabela 8 -	Progressão da injúria glomerular, grupo Ang II.....	59
	Podocitúria, albuminúria, contagem de células positivas para	
Tabela 9 -	ED-1, grupo Ang II.....	61
	Expressão de RNAm intrarrenal para elementos inflamatórios e	
Tabela 10 -	de matriz extracelular, grupo Ang II.....	63
Tabela 11 -	Efeito da Ang II na síntese de endotelinas 1 e 3.....	64
Tabela 12 -	Parâmetros Fisiológicos, grupo ET-3.....	66
Tabela 13 -	Pressão arterial de cauda, grupo ET-3.....	68
Tabela 14 -	Hemodinâmica renal, grupo ET-3.....	71
Tabela 15 -	Fluxo urinário e manejo renal de Na <sup>+</sup> , grupo ET-3.....	73
Tabela 16 -	Morfologia glomerular, grupo ET-3.....	76
	Concentração de proteínas na urina, número de células	
Tabela 17 -	positivas para ED1 e expressão de RNAm para TNF $\alpha$ .....	79
	Expressão de RNAm para os componentes do sistema	
Tabela 18 -	endotelinas e sistema renina-angiotensina intrarrenais.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT <sub>1</sub>	Receptor de Ang II tipo 1
AT <sub>2</sub>	Receptor de Ang II tipo 2
BSA	Albumina de soro bovino
CE	Carga excretada
CF	Carga filtrada
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
DOCA	acetato de deoxicorticosterona
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ENaC	Canal epitelial de sódio
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
ET-1	Endotelina-1
FE	Fração de excreção
FF	Fração de filtração
FPR	Fluxo plasmático renal
FF	Fração de filtração
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
MGB	Membrana basal glomerular
NF-κB	Fator nuclear kappa B” (NF-κB)
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
PA	Pressão arterial
PAH	Ácido para-amino-hipúrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinase
(P)RR	Receptor para pró-renina
RFG	Ritmo de filtração glomerular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RVR	Resistência vascular renal
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TGF-β1	Fator de crescimento transformador beta1
TGFβRII	Receptor para TGF beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
V	Fluxo urinário
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A

## LISTA DE FÓRMULAS

- (1) **Ganho de peso**..... Ganho de peso = (peso inicial – peso final)/(semanas tratamento)
- (2) **Fluxo urinário**.....  $V = (\text{volume}/\text{tempo})$
- (3) **Carga filtrada**.....  $CF_x = P_x \cdot RFG$
- (4) **Carga excretada**.....  $CE_x = U_x \cdot V$
- (5) **Fração de excreção**.....  $FE_x = CF_x / CE_x$
- (6) **Clearance**.....  $C_x = (U_x \cdot V) / P_x$
- (7) **Fração de filtração**.....  $FF = RFG / FPR$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1	<i>Pressão Arterial</i>	17
1.1.1	<i>Hipertensão Arterial</i>	17
1.1.2	<i>Mecanismos Regulatórios da Pressão Arterial</i>	18
1.2	<i>Sistema Renina-Angiotensina (SRA)</i>	19
1.3	<i>Angiotensina II e seus Receptores</i>	21
1.4	<i>Angiotensina II, hipertensão arterial e remodelamento vascular renal</i>	24
1.5	<i>Sistema Endotelinas (ET)</i>	25
1.6	<i>Endotelinas e seus receptores</i>	26
1.7	<i>Os rins e a homeostase do meio interno</i>	27
1.8	<i>O néfron</i>	28
1.8.1	<i>Glomérulo</i>	28
1.8.2	<i>Túbulos renais</i>	30
1.9	<i>Perfusão renal</i>	31
1.10	<i>Função do rim no controle da pressão arterial</i>	32
1.11	<i>O SRA local e a função renal</i>	32
1.12	<i>Sistema endotelinas local e a função renal</i>	33
1.13	<i>Interação entre o SRA e o Sistema Endotelinas</i>	33
1.14	<i>Modelos animais de hipertensão arterial para estudo da função renal</i>	34
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1	<i>Animais experimentais</i>	37
4.2	<i>Obtenção dos modelos experimentais</i>	37
4.2.1	<i>Grupos Tratados com Ang II e/ou Losartan</i>	37
4.2.2	<i>Grupos Tratados com Endotelina 3 (ET-3) e/ou BQ788 ou Atrasentan</i>	38
4.3	<i>Avaliação da ingestão de ração, água e do ganho de peso</i>	39
4.4	<i>Aferição da pressão arterial</i>	39
4.4.1	<i>Gaiolas metabólicas</i>	39
4.5	<i>Medida das concentrações de angiotensinas no plasma e no tecido renal</i>	40
4.6	<i>Avaliação das concentrações de endotelinas no plasma</i>	41



4.7	<i>Análise da função renal</i> .....	41
4.8	<i>Perfusão e Fixação do tecido renal</i> .....	41
4.9	<i>Parâmetros renais e plasmáticos</i> .....	42
4.10	<i>Avaliação da função renal</i> .....	42
4.11	<i>Morfologia Renal</i> .....	43
4.12	<i>Imuno-histoquímica</i> .....	44
4.13	<i>Avaliação da proteinúria</i> .....	45
4.14	<i>Contagem de podócitos na urina</i> .....	45
4.15	<i>Expressão proteica por Western blot</i> .....	45
4.15.1	Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose .....	46
4.16	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)</i> .....	46
4.16.1	<i>Extração do RNA total</i> .....	46
4.16.2	<i>Síntese do DNAc a partir do RNAm</i> .....	47
4.16.3	<i>Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real</i> .....	47
5	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	48
6	<b>RESULTADOS</b> .....	49
6.1	<i>Estudo com angiotensina II e losartan</i> .....	49
6.2	<i>Efeito da Ang II e/ou losartan sobre os parâmetros fisiológicos</i> .....	49
6.3	<i>Efeito da Ang II e/ou losartan sobre a pressão arterial</i> .....	49
6.4	<i>Concentrações de angiotensinas no plasma</i> .....	51
6.5	<i>Expressão dos receptores para angiotensina II no tecido renal</i> .....	52
6.6	<i>Concentrações de RNAm para renina e concentrações de angiotensinas no tecido renal</i> .....	52
6.7	<i>Hemodinâmica Renal</i> .....	53
6.8	<i>Fluxo urinário e manejo renal de Na<sup>+</sup></i> .....	55
6.9	<i>Morfologia vascular renal</i> .....	56
6.10	<i>Morfologia glomerular, excreção de podócitos e albuminúria</i> .....	59
6.11	<i>Imuno-histoquímica para ED-1</i> .....	62
6.12	<i>Expressão de RNAm intrarrenal para os componentes inflamatórios e de matriz extracelular</i> .....	63
6.13	<i>Efeito da Ang II e/ou losartan na síntese de endotelinas 1 e 3</i> .....	65
7	<b>RESULTADOS - ESTUDO COM ENDOTELINA 3 (ET-3)</b> .....	66
7.1	<i>Efeitos de ET-3 e/ou atrasentan ou BQ788 sobre os parâmetros fisiológicos</i> .....	66
7.2	<i>Efeito de ET- 3 e/ou atrasentan ou BQ788 sobre a pressão arterial de cauda</i> .....	68

<b>7.3</b>	<b><i>Hemodinâmica Renal e Fluxo Urinário</i></b> .....	<b>71</b>
<b>7.4</b>	<b><i>Fluxo Urinário e manuseio renal de Na<sup>+</sup></i></b> .....	<b>73</b>
<b>7.5</b>	<b><i>Morfologia glomerular</i></b> .....	<b>75</b>
7.5.1	<i>Área glomerular</i> .....	75
7.5.2	<i>Glomeruloesclerose</i> .....	76
7.5.3	<i>Expressão de desmina</i> .....	78
<b>7.6</b>	<b><i>Proteinúria</i></b> .....	<b>79</b>
<b>7.7</b>	<b><i>Expressão de RNAm par TNFa intrarenal</i></b> .....	<b>81</b>
<b>7.8</b>	<b><i>Expressão de RNAm para os componentes do sistema endotelinas intrarrenal</i></b> .....	<b>81</b>
<b>7.9</b>	<b><i>Expressão de RNAm para os componentes do SRA intrarrenal</i></b> .....	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
8.1	<i>Animais tratados com Ang II e Ang II/losartan</i> .....	84
8.2	<i>Animais tratados com Endotelina 3 e/ou atrasentan ou BQ788</i> .....	89
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Pressão Arterial

A pressão arterial é definida pelo produto do débito cardíaco (determinado pela frequência cardíaca e o débito sistólico) e da resistência vascular periférica. Como o coração bombeia o sangue para a artéria aorta de forma pulsátil, sua pressão varia entre 120 mmHg (pressão sistólica) e 80 mmHg (pressão diastólica), sendo a pressão média 100 mmHg. A medida que o sangue flui, a pressão cai gradativamente chegando a valores de 35 mmHg (próximo das terminações arteriolas) e 10 mmHg (próximo das terminações venosas), com uma média de cerca de 17 mmHg (1).

### 1.1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial é uma síndrome multifatorial altamente prevalente em todo o mundo e pode ser definida como a pressão sanguínea de valor igual ou superior a 140/90 mmHg (2). A hipertensão arterial está associada às alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos, além das alterações metabólicas associadas aos eventos cardiovasculares e cerebrais, consideradas as principais causas de óbitos.

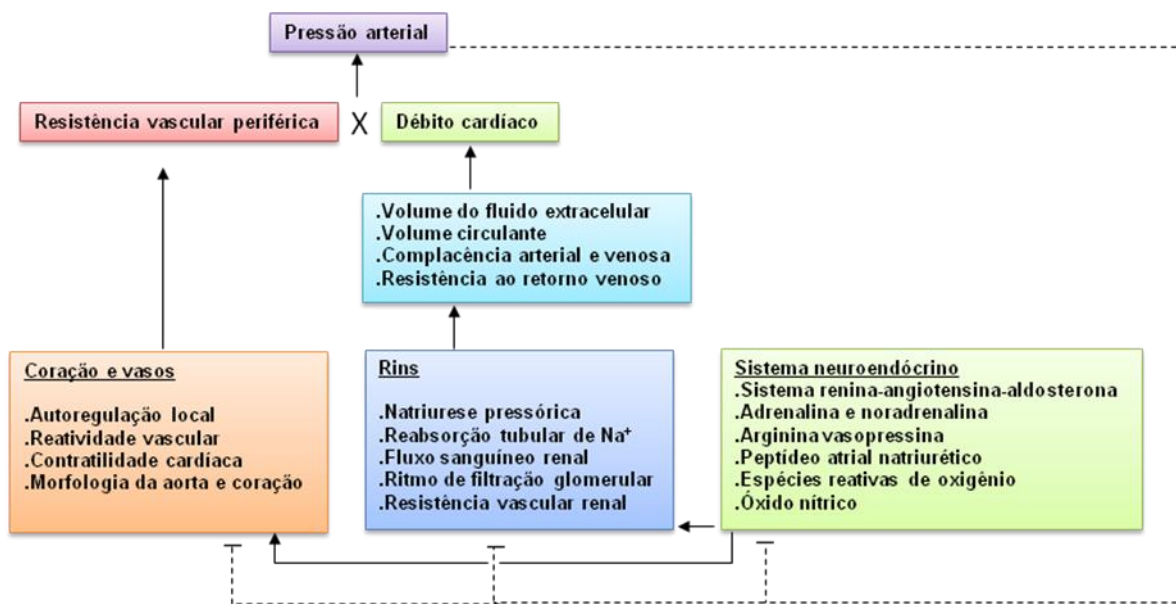
No mundo, aproximadamente um bilhão de pessoas sofrem de hipertensão arterial (3) e o número de óbitos por ano decorrentes dessa doença pode chegar aos sete milhões (4). Esses números tendem a crescer com o aumento da longevidade e a ocorrência de fatores de risco associados à obesidade e diabetes (5).

As causas da hipertensão arterial ainda não são bem compreendidas e na grande maioria dos casos não resulta apenas de única causa, configurando-se assim, a hipertensão arterial essencial ou primária. Esta corresponde a cerca de 90% dos casos e é consequência de interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais, como por exemplo a ingestão excessiva de sal, sedentarismo e fatores emocionais (6).

A hipertensão arterial secundária resulta de causa conhecida, sendo as doenças renais a causa mais comum desse tipo de hipertensão, destacando-se a estenose da artéria renal. Outras causas importantes são os transtornos endócrinos como a síndrome de Cushing e hiperaldosteronismo (7).

### 1.1.2 Mecanismos Regulatórios da Pressão Arterial

Há diversos mecanismos associados à regulação da pressão arterial e o desequilíbrio de um desses pode induzir hipertensão arterial. Em condições fisiológicas, o controle da pressão arterial envolve mecanismos neuroendócrinos, renais e cardiovasculares (**Figura 1**). Os rins são os principais órgãos envolvidos no controle da pressão arterial em longo prazo, regulando o volume do fluido extracelular, atuando no controle da excreção de sódio e água, o que constitui o mecanismo de pressão natriurese (8).



**Figura 1. Mecanismos regulatórios da pressão arterial.** A pressão arterial pode ser definida como débito cardíaco x resistência periférica. O débito cardíaco é influenciado pelo volume do fluido extracelular - regulado pelos rins, pelo mecanismo de pressão-natriurese. A resistência vascular periférica é determinada pela estrutura e função da vasculatura e mecanismos auto-regulatórios locais. Os fatores neuroendócrinos como os nervos simpáticos, hormônios, sistema parácrino e endócrino têm importante influência na função renal vascular, assim como os mecanismos homeostáticos de retroalimentação negativa (linhas pontilhadas) [adaptado de (5)].

Durante o desenvolvimento da hipertensão arterial; destacam-se o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e a ativação de sistemas e fatores humorais, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), arginina vasopressina (AVP), fatores endoteliais como as endotelinas (ET), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (9-12).

## 1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

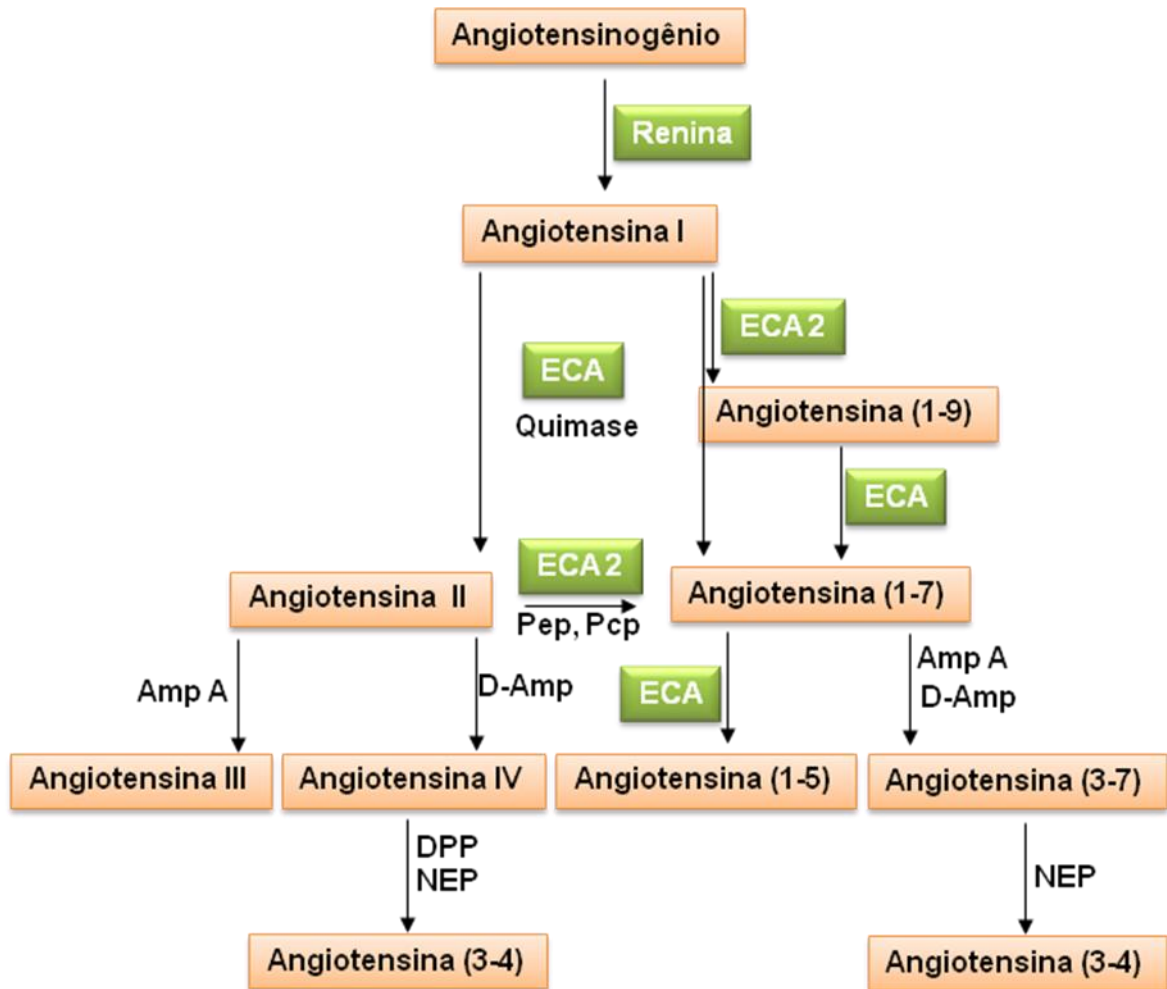
O SRA é um eixo hormonal constituído por diversos componentes, entre eles hormônios vasoativos, enzimas conversoras e diferentes tipos de receptores. Possui ampla distribuição no organismo e até mesmo produção local em alguns tecidos. Entre suas estão: o balanço de sódio, controle do volume do fluido extracelular e da pressão arterial. Desde a sua descoberta por Tigerstedt e Bergman no final do século XIX, o SRA vem sendo amplamente estudado. A sua caracterização teve início quando esses pesquisadores investigando extratos de córtex renal, de maneira independente da ativação simpática, observaram uma substância hipotética que na ocasião foi denominada “renina”, devido a sua origem renal. Nesse período já havia estabelecido uma relação entre a hipertensão arterial e a doença renal, devido os experimentos de Harry Goldblatt, nos quais o pesquisador induzia hipertensão secundária em cães (*Canis lupus familiaris*) a partir do clampeamento da artéria renal (13, 14).

No mesmo período, dois grupos, um americano liderado por Irvine Page e outro argentino liderado por Eduardo Braum Menendez, se empenharam para investigar a renina e observaram que a mesma apresentava um potente efeito vasoconstritor *in vivo* devido a sua ação sobre o substrato denominado angiotensinogênio. A substância ativa, gerada no plasma a partir da clivagem do angiotensinogênio pela renina foi então isolada e denominada angiotonina (15). Simultaneamente, o grupo argentino, reproduzindo o modelo de Goldblatt, observou no sangue renal, uma substância com potente efeito pressórico, de curta duração e diferente da renina; a esse novo composto deram o nome de hipertensina. Não foi difícil concluir que a angiotonina e a hipertensina eram a mesma substância, que passou a ser chamada de angiotensina (15). A partir da descoberta da angiotensina, inúmeros pesquisadores de diferentes países passaram a investigar e descrever o sistema renina-angiotensina-aldosterona, bem como as inter-relações da angiotensina e da aldosterona com o balanço de sódio.

Hoje se sabe que a renina é uma aspartil-protease sintetizada sob a forma inativa, a pré-pró-renina, pelas células justaglomerulares renais (16). No retículo endoplasmático dessas células a pré-pró-renina é clivada em pró-renina (17). Enquanto uma porção da pró-renina é liberada na circulação, a outra porção é clivada por endopeptidases nos grânulos secretórios, formando a enzima proteolítica madura (18). A liberação da renina é mediada por mecanismos resultantes da estimulação de barorreceptores da arteríola aferente glomerular, influência dos nervos simpáticos e alterações na quantidade de NaCl detectada por células da mácula densa (19). Além do controle sistêmico, estudos também apontam para uma regulação

local dos processos envolvidos com a secreção de renina. No tecido vascular, os principais elementos reguladores são as endotelinas, o óxido nítrico e as prostaglandinas (20-22).

Na cascata de sinalização sistêmica clássica (**Figura 2**), a renina circulante cliva o angiotensinogênio proveniente principalmente do fígado em um decapeptídeo denominado angiotensina I (Ang I). Este, por sua vez, é clivado pela enzima conversora da Ang I (ECA1) formando o octapeptídeo angiotensina II (Ang II). A Ang II pode ser clivada pelas peptidases (aminopeptidase - Amp ou dipeptidil-aminopeptidase - D-Amp) e formar respectivamente as Ang (III) e (IV) (23-25). Além dos componentes clássicos do SRA, diversos outros foram descobertos ao longo dos anos. Uma enzima homóloga a ECA1, a ECA2 e as peptidases (prolil-endopeptidase, Pep e a prolil-caboxipeptidase, Pcp), estão envolvidas na clivagem de Ang II e formação de Ang-(1-7). Em 2007 foi descrito que o proto-oncogene *Mas* é um receptor para este peptídeo e que o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas parece compensar os efeitos cardiovasculares e renais do SRA clássico (26). A Ang (1-7) é detectada em vários tecidos, incluindo rins, coração, fígado, baço, pulmão e sistema nervoso central (25, 27) e quando é clivada pela ECA e peptidases (Amp ou D-Amp) forma respectivamente, Ang (1-5) e Ang (3-7). Nas últimas duas décadas, diversos estudos apontam para a existência da Ang (3-4), resultado da clivagem das Angs (3-7) e (IV) pela ação da neprilisina (NEP) e da aminopeptidase (AP) (28).



**Figura 2: Vias e enzimas envolvidas na formação das angiotensinas.** ECA: enzima conversora de angiotensina; Amp: aminopeptidase; NEP: neprilisina; Pcp:prolil carboxipeptidase; PEP: prolil endoepitidase; D-Amp: dipeptidil-aminopeptidase [Modificado de (29, 30)].

Nos últimos anos uma nova proteína, o receptor de pro-renina, (P)RR foi descoberto e descrito com uma função ativadora de renina independente de Ang II (31). O papel fisiológico destes novos componentes do SRA ainda não foi completamente desvendado, mas provavelmente exercem um impacto importante sobre a síntese e ação dos componentes do SRA clássico (32).

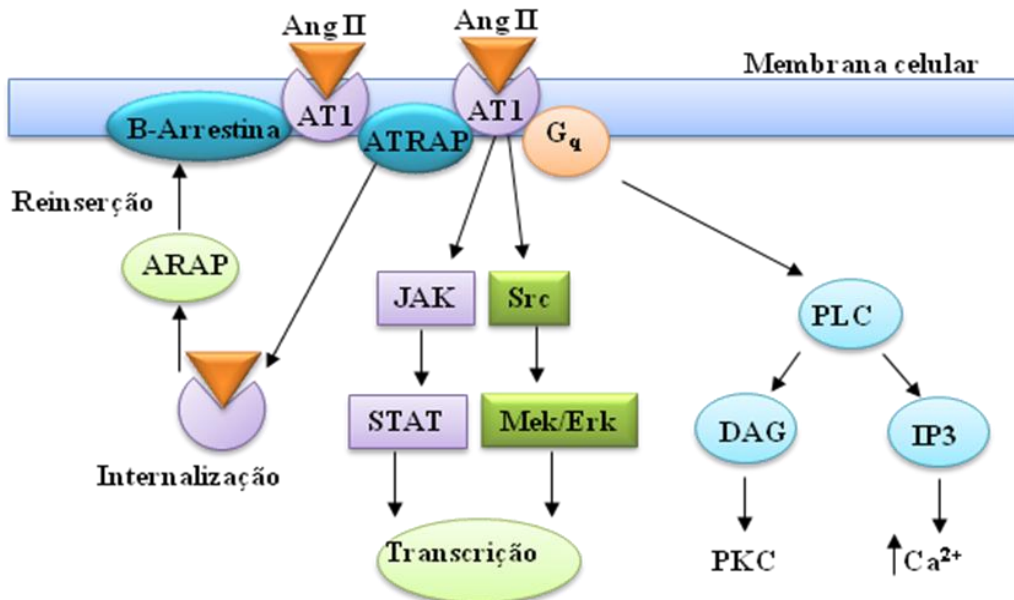
### 1.3 Angiotensina II e seus Receptores

O octapeptídeo Ang II de sequência  $\text{NH}_2\text{-Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Try}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-COOH}$  atua em vários tecidos via receptores do tipo AT1 (sensível a losartan) e AT2 (sensível a di(trifluoroacetato) sal hidratado - PD123319), ambos pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (33).



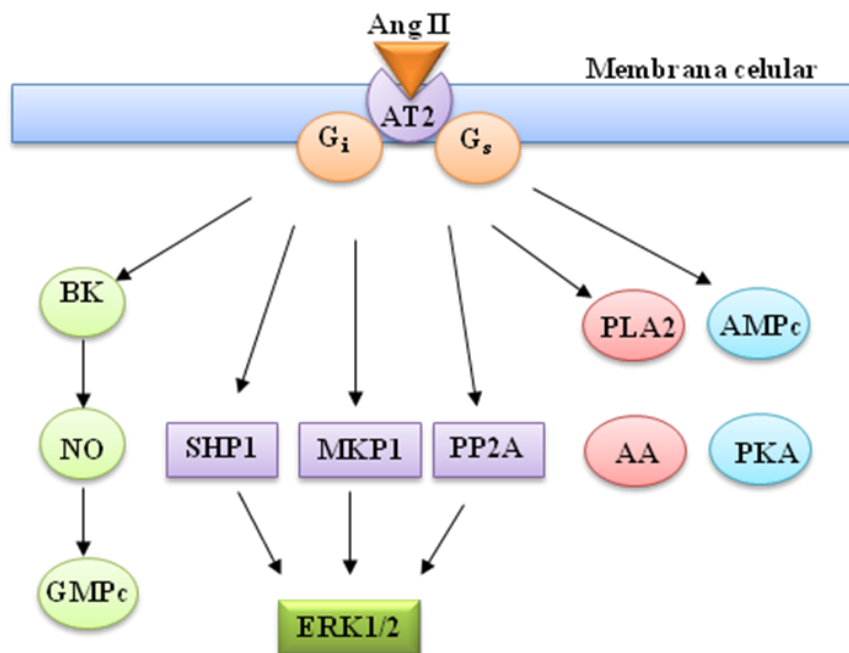
O receptor AT1 é amplamente distribuído nos sistemas nervoso, endócrino cardiovascular e renal. Em condições fisiológicas, o AT1 medeia os efeitos clássicos da Ang II, incluindo a manutenção do volume do fluido extracelular e da pressão arterial. (34). No entanto, o aumento das concentrações de Ang II no plasma ou aumento da expressão de AT1 nos diferentes tecidos, pode resultar em vasoconstrição, liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, retenção de sódio pelos segmentos do néfron, estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais), liberação de endotelina 1 e aumento de estresse oxidativo via espécies reativas de oxigênio (32).

A interação da Ang II com o receptor AT1 (**Figura 3**) ativa várias vias de sinalização intracelular moduladas pelas proteínas  $G_i$ ,  $G_{q12/13}$  e  $G_s$  e fosfolipase C (PLC), aumentando as concentrações de cálcio no citosol e consequentemente, ativação da proteína kinase C (PKC) e calmodulina (35). O AT1 pode também ativar vias independentes de proteína G, como a da proteína associada ao receptor AT1 (ATRAP) e a da  $\beta$ -arrestina (ambas envolvidas na internalização do AT1); da Janus cinase (JAK) e Src, que ativam respectivamente, as proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT), além das cinases reguladas por sinal extracelular (Erk) (36).



**Figura 3:** As principais vias de sinalização intracelular reguladas pela ativação do receptor AT1. A Ang II via receptor AT1 regula vias dependentes e independentes de proteína G. A ativação do AT1 pode resultar no aumento do cálcio citosólico e/ou ativação da proteína cinase C (PKC). O AT1 também pode interagir com a  $\beta$ -arrestina ou com a proteína associada a receptores AT1 (ATRAP), proteínas associadas à internalização do receptor e ativação de outras vias de sinalização. O AT1 também se associa as proteínas reguladoras dos processos de transcrição (JAK e Src) para estimular as vias STAT e Merk/Erk (organizado com base nos estudos de (37)).

O receptor AT2 é essencialmente expresso durante o desenvolvimento embrionário, decaindo após o nascimento; no entanto, persiste em vários órgãos incluindo o coração, rins e vasculatura, onde medeia importantes efeitos fisiológicos da Ang II (30). Sua expressão pode aumentar em casos de injúria cardíaca ou vascular e na cicatrização do tecido renal, sugerindo sua participação nos mecanismos de remodelamento tecidual (35, 37). As vias de sinalização celular decorrentes da ativação de AT2 (**Figura 4**) parecem depender de mecanismos associados ou não à proteína G. A interação do receptor AT2 com a proteína  $G_{i\alpha 2}$  e  $G_{i\alpha 3}$  já foi demonstrada (38), bem como as vias de sinalização dependentes da geração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e óxido nítrico, ativação da peptidil-peptidase 2 A (PPA2) e estimulação da fosfolipase A2 (39, 40).



**Figura 4: As principais vias de sinalização celular reguladas pela ativação do receptor AT2.** A ativação de AT2 resulta no aumento de bradicinina (BK) e ativação das vias de síntese de óxido nítrico (NO), o que resulta na síntese de monofosfato de guanina cíclico (GMPc) e consequentemente em vasodilatação e natriurese. Ocorre, ainda, a ativação de fosfatases, como a Scr-2 (SHP-1), peptidil-peptidase 2 A (PPA2), proteína cinase ativa por mitogen-1 (MPK-1), que inibem a atividade da regulada por sinal extracelular (Erk1/2). O AT2 também estimula a via de ativação da fosfolipase A2 (PLA2) para a síntese de ácido aracdônico (AA), bem como a adenilil ciclase (AC) para a síntese de AMPc e consequentemente a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) [organizado com base nos estudos de (30, 39, 40, 41)].

#### ***1.4 Angiotensina II, hipertensão arterial e remodelamento vascular renal***

A Ang II circulante é de grande importância fisiológica na regulação da pressão arterial, tônus vascular, hemodinâmica renal e homeostase de eletrólitos. Apesar dos efeitos benéficos, a Ang II em altas concentrações no plasma, induz hipertensão arterial associada às doenças renais e cardiovasculares (42, 43). Além disso, a Ang II também atua como agente pró-inflamatório, pró-fibrótico e induz estresse oxidativo (44-46).

Em modelos animais, a hipertensão arterial induzida pela infusão crônica de Ang II está diretamente associada ao remodelamento hipertrófico para dentro, especialmente em se tratando de vasos de resistência como as artérias mesentéricas (47-49). Nessa condição, esses vasos apresentam diâmetros reduzidos e conseqüente queda do fluxo sanguíneo. Entretanto, os vasos colaterais apresentam fluxo sanguíneo aumentado, uma resposta compensatória para assegurar a perfusão tecidual (50). Por outro lado, o fluxo sanguíneo aumentado induz liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais e conseqüente vasodilatação, posteriormente resultando em um remodelamento hipertrófico para fora (51, 52).

Nos rins, a Ang II pode induzir remodelamento hipertrófico para dentro, principalmente nos vasos pré-glomerulares. Muitos estudos confirmam que nessa condição ocorre aumento da resistência vascular renal (RVR), queda do fluxo sanguíneo renal (FSR) e do ritmo de filtração glomerular (RFG) (53-56). Entretanto, esses estudos foram realizados em animais que receberam Ang II por uma ou duas semanas.

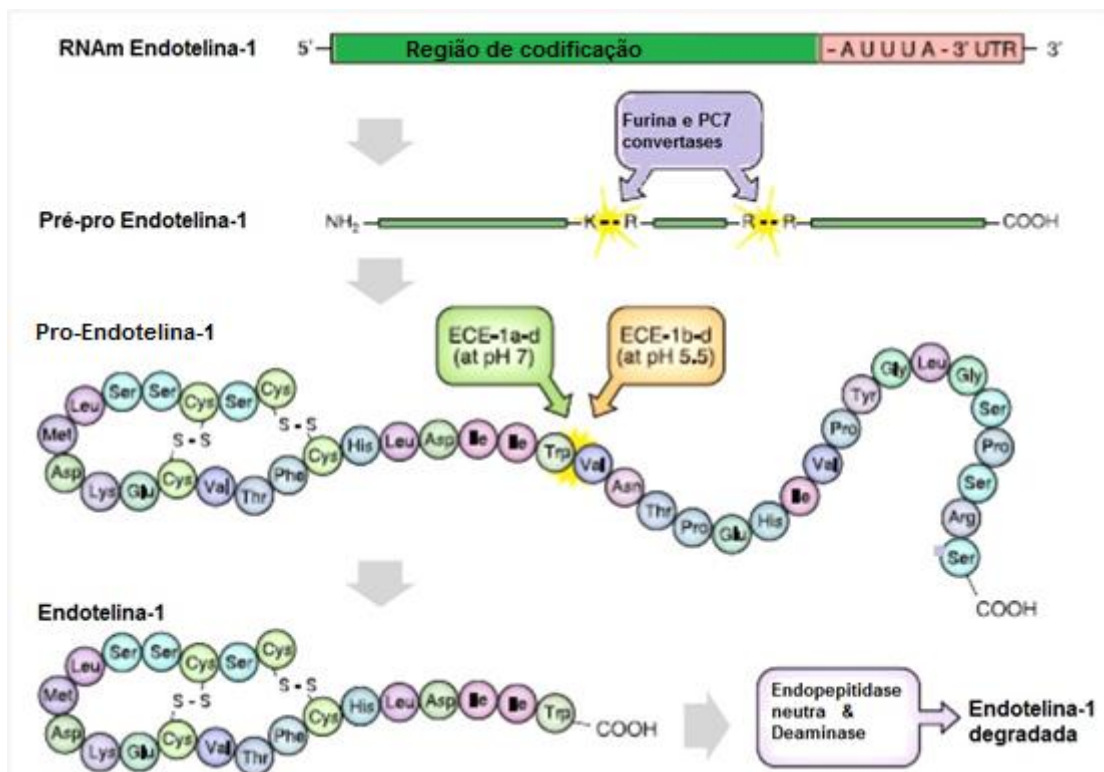
Em um estudo realizado por Chin e colaboradores (57) observou-se que ratos tratados com Ang II por duas semanas tiveram aumento na atividade da NO sintase (NOS) no córtex, mas não na medula renal, sugerindo que o aumento de NO no cortex pode atenuar o efeito vasoconstritor da Ang II e assegurar a perfusão glomerular. De fato, os autores observaram que nesse modelo, o FSR se manteve inalterado.

Em modelos de diabetes melitus, Brenner e colaboradores (58), propuseram a teoria da hiperfiltração, onde a queda progressiva na perfusão de muitos glomérulos induzia hiperfiltração nos glomérulos adjacentes, como resposta compensatória à perda da função de néfrons.

Até o presente, não se investigou sobre a relação entre hipertensão arterial induzida por Ang II e hiperfiltração glomerular associada às mudanças estruturais nos vasos pré-glomerulares.

### 1.5 Sistema Endotelinas (ET)

A endotelina é um peptídeo sintetizado essencialmente pelas células endoteliais, e sua ação vasoconstritora foi descrita pela primeira vez por Yanagisawa e colaboradores (59). Nas células endoteliais a endotelina (**Figura 5**) é sintetizada na forma de pré-pró-endotelina, molécula constituída por 212 aminoácidos (AA) e liberada na corrente sanguínea. A pré-pró-endotelina é a forma inativa, que é clivada, por endopeptidases, em um peptídeo de 38 aminoácidos (pró-ET ou *big endotelin*) com baixa atividade vasoativa. A pró-ET sob a ação da enzima conversora de endotelina (ECE) produz a forma biologicamente ativa da endotelina, com apenas 21 aminoácidos (60, 61). A transcrição da endotelina é sensível a diversos fatores, como Ang II, vasopressina, interleucina-1 (IL-1) e peptídeos natriuréticos (Imai et al., 1992). A endotelina pode ser sintetizada a partir de três genes diferentes, dando origem a três isoformas distintas: ET-1, ET-2, e ET-3 (62, 63). Além das células endoteliais, muitas células polarizadas também secretam endotelinas, incluindo as células renais que secretam os peptídeos para a urina (61).



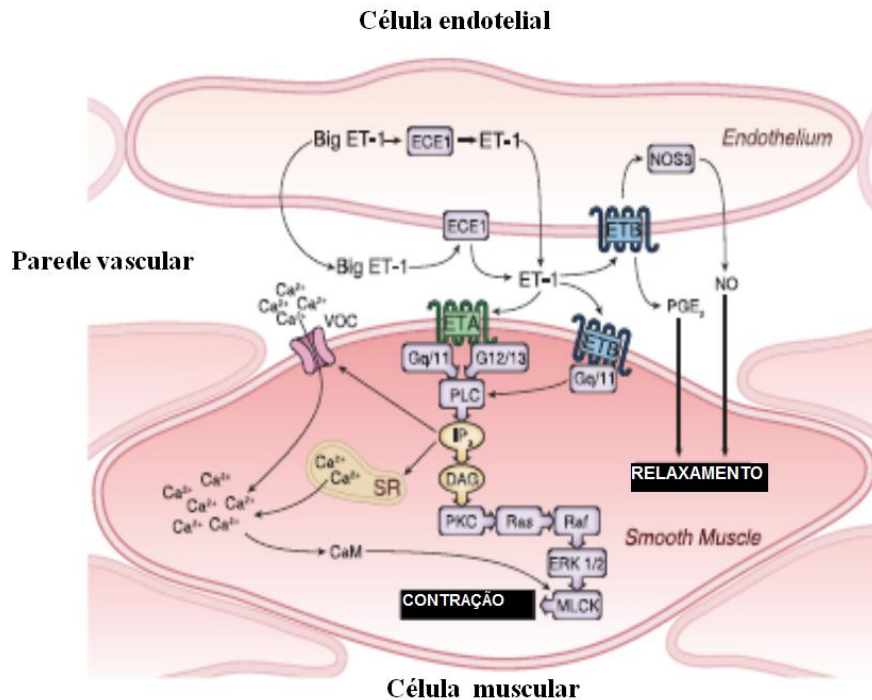
**Figura 5:** Esquema representativo das vias de biossíntese da endotelina 1 (ET-1). A pré-pró-endotelina é clivada pela ação da furina e convertases, formando a pró-ET. Esta é clivada por diferentes enzimas conversoras de ET (ECEs). Uma vez formada, a ET-1 pode ser degradada por endopeptidases e deaminases [adaptado de (61)].

Dos 3 peptídeos, a ET-1 é a isoforma mais estudada devido a sua importância para o sistema cardiovascular. A ET-1 é produto da clivagem do peptídeo pró-ET pela ECE 1, possui ações autócrina e parácrina, e pode se ligar a dois receptores específicos, o do tipo A (ETA) e do tipo B (ETB), ambos acoplados à proteína G (64). A interação de ET-1 com seus receptores é de longa duração (cerca de 2 horas), condição que favorece a manutenção de baixas concentrações plasmáticas do peptídeo (0,1 pM a 0,4 pM) (61). Pouco se conhece sobre o efeito da ET-3 no sistema cardiovascular e quase nada na função renal. No entanto, alguns estudos demonstraram que há aumento da concentração de ET-3 plasmática em pacientes com doença renal crônica (65) ou com glomeruloesclerose associada à hipertensão arterial (66). Sauvageau e colaboradores (67) demonstraram que a ET-3 também está associada à hipertensão pulmonar.

### **1.6 Endotelinas e seus receptores**

Os receptores ETA e ETB (**Figura 6**) são expressos na maioria das células do organismo (61). No entanto, os receptores ETA (sensíveis ao antagonista atrasentan) predominam nas células da musculatura lisa vascular, induzindo vasoconstrição. Já os receptores ETB (sensíveis ao antagonista BQ 788) são encontrados tanto em células da musculatura lisa vascular, promovendo vasoconstrição, quanto em células endoteliais, onde sua ativação resulta em vasodilatação, por estimular a produção e liberação de NO (68). A ET-1 e ET-2 apresentam similar capacidade de interação com os receptores ETA e ETB, enquanto a ET-3 interage essencialmente com os receptores ETB (69). No entanto, já foi demonstrado que quando em altas concentrações, a ET-3 pode atuar também via receptores ETA (67).

As vias de sinalização celular pelas quais a ET-1 induz a vasoconstrição são dependentes das interações de seus receptores (ETA e ETB) com as proteínas G<sub>q 11,12 ou 13</sub>, que ativam a fosfolipase C (PLC), resultando no aumento de cálcio no citosol e de diacilglicerol (DAG). Este último estimula a via da PKC/Mek/Erk1/2 e ambos os mensageiros (cálcio e Erk1/2) causam contração da célula muscular lisa. Os mecanismos intracelulares pelos quais a ET-3 exerce os seus efeitos nos tecidos ainda não são completamente conhecidos.

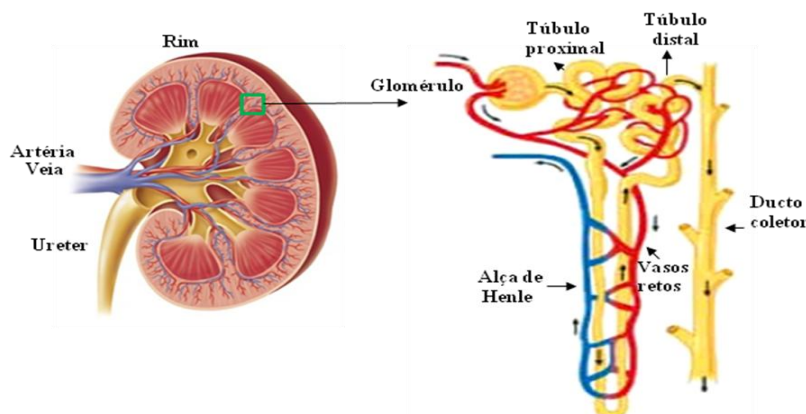


**Figura 6: Esquema representativo das vias de sinalização da ET-1 na parede vascular:** A ECE1 pode estar presente na membrana celular ou nos retículos, clivando a pró-ET1 em ET-1, cuja interação com ETA ou ETB na célula muscular lisa, ocorre a ativação da cascata da inositol trifosfato aumentando a concentração de cálcio intracelular, pela liberação do retículo sarcoplasmático e pela abertura de canais de cálcio, também estimulando a via da ERK1/2, resultando em vasoconstrição. Quando a ET-1 se liga ao receptor ETB presente na célula endotelial, estimula produção de NO pela ativação da NOS causando vasodilatação. [adaptado de (61)].

### 1.7 Os rins e a homeostase do meio interno

Em condições fisiológicas, a manutenção do volume do fluido extracelular é constante e apropriada para o funcionamento do organismo, exigindo controle da ingestão e excreção de água e solutos. Nesse contexto, os rins desempenham papel fundamental na manutenção da homeostase dos fluidos corporais, mantendo sua composição e volume controlados, apesar das grandes variações na ingestão diária de água e solutos (70). Além do controle hidroeletrólítico, os rins desempenham outras funções importantes, como a excreção de produtos finais do metabolismo; a manutenção do equilíbrio ácido-base; a síntese e secreção de hormônios como a eritropoetina - que atua na formação dos glóbulos vermelhos, o calcitriol - importante no metabolismo de cálcio e a angiotensina II - essencial na regulação da pressão arterial.

Em humanos, cada rim é formado por mais de um milhão de néfrons, unidades funcionais responsáveis pelos processos de ultrafiltração, reabsorção e secreção de moléculas que participarão da formação da urina final (**Figura 7**).



**Figura 7: Estrutura macroscópica do rim e do néfron** [adaptado de (71)]

## 1.8 O néfron

Cada néfron é formado por um glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman e um extenso segmento tubular subdividido em túbulo proximal (convoluto e reto), alça de Henle (segmentos fino e espesso), túbulo distal e ducto coletor (71). O tufo glomerular é composto de 3 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.

### 1.8.1 Glomérulo

As células mesangiais estão em contato direto com as células endoteliais dos capilares glomerulares e separadas dos podócitos pela MBG. Sakai e Kriz (72) estudando a relação entre a célula mesangial e a MBG descreveram que esta última não cobre totalmente a camada endotelial de revestimento do leito capilar, restando em áreas onde os prolongamentos mesangiais entram em contato direto com o endotélio glomerular fenestrado, constituindo as porções justamesangiais do capilar glomerular. Nas áreas em que não se estabelece contato direto, a conexão entre a célula mesangial e a MBG é realizada por componentes de matriz extracelular, destacando a densa rede de microfibrilas que ancora a membrana celular à fibronectina presente na matriz (73). As células mesangiais sintetizam os componentes de matriz extracelular glomerular e mantêm a integridade do tufo glomerular, formando um arcabouço que sustenta os capilares glomerulares. A capacidade contrátil dessas células



permite o controle do fluxo intracapilar e assim, a filtração glomerular de cada néfron individualmente.

As células mesangiais expressam receptores para a Ang II (74) e a interação entre o ligante e seus receptores resulta em uma série de eventos intracelulares, os quais culminam com o aumento da contração celular, estímulo à proliferação e aumento da produção de componentes de matriz extracelular. Além disso, elas passam a produzir mais fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF) e outras proteínas importantes para a fisiologia das células vizinhas como os podócitos e as células endoteliais glomerulares (75).

Na matriz extracelular de glomérulos saudáveis predominam os elementos como fibronectina e colágeno do tipo IV. Entretanto, em condições patológicas, ocorre aumento da expressão de fibronectina, laminina e colágeno total, com predomínio dos colágenos intersticiais do tipo I e do tipo III, normalmente encontrados na parede de arteríolas e no interstício (76). A expansão de matriz extracelular influencia vários aspectos do comportamento celular glomerular, tais como: adesão, crescimento, migração, proliferação, diferenciação e reparo (73).

A membrana basal glomerular (MGB) 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, fibronectina e colágeno do tipo IV além da laminina, distroglicanos e proteoglicanos (77).

As células endoteliais dos capilares glomerulares possuem fenestras com um diâmetro de 60 a 80 nanômetros (nm) e em seu lado luminal há o glicocálix carregado negativamente, que juntos constituem uma barreira com seletividade para tamanho e carga das moléculas (75). Essas células sintetizam compostos vasoativos que atuam no mesângio e em vasos pós-capilares como as arteríolas eferentes (78).

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que exercem funções organizadoras e protetoras da estrutura e função glomerular. São células envolvidas no processo de ultrafiltração do plasma, na manutenção da forma e integridade da membrana basal glomerular e dos capilares glomerulares e respondem aos vários mecanismos de sinalização celular. Os podócitos são caracterizados por extensos processos podais, que contém filamentos de actina finamente orquestrados com diversas outras proteínas, a fim de manter a sua morfologia e aderência à membrana basal (75). Apesar de separados das células

endoteliais pela membrana basal glomerular, os podócitos possuem a essencial função de suprir o endotélio capilar com o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) (79).

Diversos estudos apontam para três tipos principais de injúria de podócitos: (1) perda de processos podais; (2) desdiferenciação, acompanhada de proliferação e (3) apoptose (80). A perda dos processos podais é a primeira reação dos podócitos frente a qualquer tipo de injúria e envolve o rearranjo do citoesqueleto de actina e a sua interação com proteínas da membrana basal glomerular. A desdiferenciação resulta no decréscimo da função dessas células na barreira de ultrafiltração glomerular (80). Finalmente, a apoptose de podócitos ou seu desprendimento da membrana basal glomerular leva à diminuição do número de podócitos (podocitopenia), prejudicando a barreira de ultrafiltração, uma vez que os podócitos remanescentes são incapazes de cobrir toda a membrana basal glomerular. Como consequência, os podócitos são substituídos por tecido cicatricial e matriz extracelular (75).

A injúria glomerular pode estar associada às mutações genéticas, como é o caso da glomeruloesclerose focal; ou pode ser adquirida, essencialmente pelo aumento da pressão intraglomerular devido doenças como a hipertensão arterial, a nefropatia diabética e a síndrome metabólica. A obesidade também está associada às alterações funcionais e estruturais renais. De fato, múltiplos fatores metabólicos e hemodinâmicos têm sido propostos como contribuintes da nefropatia associada à obesidade; entre eles estão a Angiotensina II, a endotelina 1, o estresse oxidativo, os processos inflamatórios e a hipertensão glomerular (81).

### *1.8.2 Túbulos renais*

Os túbulos renais são constituídos por uma camada simples de células epiteliais, que separam a luz tubular do interstício renal e permitem o transporte vetorial de substâncias entre os dois compartimentos. Em condições fisiológicas, o túbulo proximal é responsável pela reabsorção de cerca de 80% do cloreto de sódio e de parcela semelhante do volume filtrado. A alça de Henle tem a função de criar um gradiente osmótico na medula renal, de tal forma que o fluido na porção externa da medula (próximo ao córtex) possua osmolalidade menor que o fluido da porção interna da mesma (próximo da pelve renal). Este gradiente é essencial para que os rins concentrem a urina, conservando a osmolalidade do organismo. O túbulo distal reabsorve cloreto de sódio, bicarbonato e cálcio. Além disso, secreta e reabsorve potássio, e secreta hidrogênio e amônia. O ducto coletor reabsorve sódio, secreta amônia e hidrogênio, e pode secretar ou reabsorver potássio e bicarbonato. Além disso, é um importante local de ação do hormônio vasopressina, o qual regula a absorção de água nesse segmento do néfron.

## 1.9 Perfusão renal

Os rins recebem cerca de 20% do débito cardíaco e são os principais órgãos envolvidos na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico do organismo. A organização de sua vasculatura é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e formação da urina (82). A ultrafiltração do plasma que precede a formação da urina ocorre nos capilares glomerulares e é controlada pelas forças de Starling e por ajustes funcionais da barreira de ultrafiltração glomerular (83). Além de manter a homeostase hidroeletrólítica, os rins também exercem um importante papel endócrino, pois sintetizam diversos hormônios e compostos vasoativos como: angiotensinas, endotelinas, prostaglandinas e óxido nítrico (84).

O sangue oriundo da artéria aorta chega aos rins pelas artérias renais, e segue pelas artérias segmentares, interlobares, arqueadas e interlobulares, até alcançar as arteríolas aferentes, passando pelos capilares glomerulares e saindo pelas arteríolas eferentes, e posteriormente pelos capilares peritubulares (na porção cortical renal) e vasos retos (na porção medular renal) (82).

As artérias interlobulares e as arteríolas renais são vasos essenciais para a regulação do fluxo sanguíneo renal e glomerular (85, 86). Assim, alterações morfológicas e funcionais nos componentes da parede desses vasos, incluindo o endotélio, elastina, colágeno e células da musculatura lisa vascular, refletem diretamente na hemodinâmica glomerular. Um bom exemplo é o estímulo dos nervos simpáticos sobre a musculatura lisa das arteríolas aferentes e eferentes, que resulta na contração de ambos os vasos. Essa vasoconstrição aumenta a resistência vascular, reduzindo o fluxo sanguíneo renal e conseqüentemente, do ritmo de filtração glomerular (87). É importante ressaltar que de acordo com a lei de *Poiseuille* ( $Q = \Delta P \cdot \pi \cdot r^4 / 8l \cdot \eta$ ), o fluxo em um vaso cilíndrico é diretamente proporcional à quarta potência do raio desse vaso. Ou seja, pequenas alterações no raio do vaso, são suficientes para mudar de forma significativa o fluxo no mesmo (88). No rim, não é diferente, sendo o fluxo sanguíneo glomerular ajustado de acordo com pequenas mudanças no raio das arteríolas aferentes e eferentes.

Diversas doenças sistêmicas incluindo aquelas associadas às doenças renais como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e diabetes mellitus, podem induzir perda progressiva da função renal essencialmente por alterar a morfologia e função de vasos renais, mesângio, barreira de ultrafiltração glomerular e células tubulares (83). Frequentemente, a injúria na barreira de ultrafiltração glomerular leva à proteinúria e perda da função renal.

Assim, a disfunção glomerular é o fator etiológico mais comum para a falência renal e o estudo das bases moleculares da biologia glomerular é essencial para o seu entendimento (83).

### ***1.10 Função do rim no controle da pressão arterial***

O controle da excreção renal de sódio apresenta íntima relação com o controle da pressão arterial em médio e longo prazo, constituindo o mecanismo de diurese pressórica. O aumento da pressão arterial leva ao aumento da excreção de sódio e de água, promovendo redução do volume do fluido extracelular e, conseqüentemente do débito cardíaco, restaurando a pressão arterial para valores normais. Por outro lado, quedas na pressão arterial leva à diminuição da excreção renal de sódio e de água, a fim de restaurar a pressão arterial. A hipertensão arterial pode ser configurada, portanto, como uma anormalidade na natriurese. É importante ressaltar que diversos sistemas neuro-humorais agem em conjunto para garantir a eficiência deste mecanismo, que inclui o controle da liberação do fator natriurético, vasopressina, ativação do SRA e do sistema endotelinas (71).

### ***1.11 O SRA local e a função renal***

Os rins são importantes órgãos para a formação de Ang II, além da síntese de renina pelas células justaglomerulares, há expressão dos componentes do SRA por células mesangiais, podócitos, túbulo proximal e ducto coletor (81, 89), constituindo um sistema local capaz de produzir Ang II, expressando RNAm para angiotensinogênio, ECA, renina, além dos receptores para Ang II (90). De fato, as concentrações fisiológicas deste peptídeo no tecido renal, superam as plasmáticas, chegando a concentrações de 50 pM/mL no fluido intersticial renal de ratos (91). Além disso, a Ang II circulante pode ser captada pelas células renais de maneira dependente de receptores AT1 (92). As concentrações elevadas de Ang II no tecido renal indicam a importância do SRA na regulação da hemodinâmica renal e no controle da função tubular.

A ativação do SRA intrarrenal contribui para a hipertensão arterial e a progressão da lesão renal em doenças renais crônicas (93). A Ang II atua nas células mesangiais estimulando: contração, proliferação, glomerulosclerose e síntese de matriz extracelular e liberação de mediadores vasoativos, proliferativos e inflamatórios, como interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (94, 95). Em podócitos, a Ang II regula as funções como contração, organização do

citoesqueleto e apoptose (96), e nos túbulos renais atua no transporte de sódio, bicarbonato, hidrogênio e água (32, 87).

### ***1.12 Sistema endotelinas local e a função renal***

Os rins também são de grande importância para as endotelinas, pois além de produzir ET-1 apresentam ampla distribuição dos receptores ETA e ETB. Há evidências de que a endotelina sistêmica e a endotelina renal são independentes (97). Assim, a excreção de ET-1 pode ser um reflexo da produção de endotelina renal e não sistêmica (61). Nos rins, os receptores ETA estão distribuídos nas células musculares lisas vasculares das artérias arqueadas, nas arteríolas glomerulares, nos glomérulos e nos vasos retos, o que demonstra a influência da ET-1 na hemodinâmica renal influenciando o fluxo sanguíneo renal (FSR) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) (98, 99). Os receptores ETB são expressos nos glomérulos (100) e em maior número (proporção 2:1) no sistema de ductos coletores, modulando o manejo de eletrólitos e água, favorecendo a natriurese em alguns modelos animais (101-104). Estudos indicam que o efeito natriurético de ET-1 via receptor ETB se dá pela redução das atividades da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, isoforma 3 do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , co-transportador  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  localizados no túbulo proximal e na alça de Henle, além da atuação sobre o canal epitelial de sódio (ENaC) localizado no néfron distal (101, 105-108). Por outro lado, apesar da alta capacidade de interação entre ET-3 com o receptor ETB, ainda não está claro o efeito de ET-3 na função e transporte tubular renal.

### ***1.13 Interação entre o SRA e o Sistema Endotelinas***

Dado a importância do SRA e das ETs na regulação da pressão arterial, bem como no desenvolvimento da hipertensão arterial, é provável que haja interação entre os dois sistemas. No tecido renal, a Ang II em doses supra-fisiológicas (nanomolar), estimula a síntese e secreção de ET-1 (61), mas os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda não foram elucidados, e até o momento não se conhece o efeito da Ang II na síntese e secreção renal de ET-3.

A produção exacerbada de Ang II ou de ET-1 intrarrenal aumenta o estresse oxidativo, a deposição de matriz extracelular entre os glomérulos e o interstício renal, causa atrofia tubular e alterações na vasculatura renal, culminando com a injúria do tecido renal. Nessas condições, a fibrose renal está associada essencialmente ao aumento da expressão do fator de

crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), o qual induz o crescimento de fibroblastos; aumento da produção de colágeno e do TGF-  $\beta_1$  (20, 109).

#### ***1.14 Modelos animais de hipertensão arterial para estudo da função renal***

Desde a primeira metade do século XIX que Harry Goldblatt e seus colaboradores estabeleceram o primeiro modelo animal de hipertensão arterial (13, 14). Eles induziram a hipertensão secundária em cães, a partir do clampeamento da artéria renal. Desde então, inúmeros modelos de animais hipertensos foram criados, por indução cirúrgica (nephrectomia), endócrina (infusão de angiotensinas ou endotelinas), metabólica ou alimentar, como os resultantes da infusão de acetato de deoxicorticosterona (DOCA) (110); e até desenvolvimento de linhagens, como camundongos transgênicos que superexpressam o gene para renina; ou ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (111).

Em nosso estudo utilizamos os modelos de hipertensão endócrina, por infusão crônica de Ang II (112), (113) ou de endotelina 3 (114, 115).

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Estudos já demonstraram que pacientes com hipertensão arterial crônica apresentam ativação exacerbada do SRA (116), mas apesar disso o efeito da Ang II na função e morfologia renal em longo prazo ainda é pouco estudado.

A Ang II em altas concentrações plasmáticas, estimula o SRA e a síntese de endotelina 1 intrarrenal. A endotelina 1 reduz a síntese e liberação de renina. Porém, nada foi descrito sobre o efeito da Ang II na síntese de endotelina 3, nem a relação desses hormônios com a injúria renal em longo prazo.

Considerando que o modelo de infusão crônica de Ang II inicialmente causa redução do fluxo sanguíneo renal, e que estes valores são reestabelecidos nas semanas seguintes (55, 117), a nossa hipótese é que durante o tratamento crônico com Ang II, o remodelamento para dentro, de alguns vasos pré-glomerulares, poderiam induzir aumento no fluxo sanguíneo para seus vasos adjacentes, resultando em mudanças na perfusão glomerular. Além disso, postulamos uma interação entre os sistemas renina angiotensina e endotelinas no tecido renal.



### 3 OBJETIVOS

Considerando as observações apresentadas até o momento, o **objetivo geral** deste estudo foi investigar em ratos, os efeitos da infusão de Ang II ou da ET-3 por 42 dias (Seis semanas) na função e morfologia renal, além da importância dos receptores do tipo AT1 (para Ang II), ETA e ETB (para ET-3) nesses parâmetros.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar o padrão alimentar (ingestão de ração, água e ganho de peso);
- Avaliar a progressão da hipertensão arterial nos modelos com Ang II e ET-3;
- Avaliar a hemodinâmica e a função renal;
- Avaliar a morfologia renal e das proteínas associadas à injúria renal;
- Determinar as concentrações plasmáticas das angiotensinas e das endotelinas nos modelos utilizados;
- Avaliar a expressão gênica para os componentes do SRA, do sistema de endotelinas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de matriz extracelular.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 *Animais experimentais*

No estudo foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 200 gramas, adquiridos no biotério de criação e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e a ração. Todos os procedimentos utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) (Protocolo nº 139/110/02 de 2011) e estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

### 4.2 *Obtenção dos modelos experimentais*

Os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (Virbac, Carros, França) nas doses: 70 e 4 mg/kg de peso corporal, respectivamente, por via intramuscular. Após a perda completa dos reflexos de dor, uma pequena incisão subcutânea foi feita no dorso dos animais onde uma mini-bomba osmótica (Alzet, Cupertino, EUA) modelo 2006, foi implantada.

#### 4.2.1 *Grupos Tratados com Ang II e/ou Losartan*

Nesta etapa foram utilizados 72 ratos, divididos igualmente entre os grupos:

- **Controle** - os ratos foram submetidos a cirurgia, mas sem implante da mini-bomba;
- **Tratados com Ang II** - os ratos foram implantados com uma mini-bomba para infusão de Ang II (Tocris Bioscience, Minneapolis, EUA), na dose de 200 ng/kg/min via subcutânea (118), por 42 dias;
- **Tratados com losartan** (antagonista de AT1) - os ratos foram submetidos a cirurgia, mas as mini-bombas não foram implantadas. Os animais foram tratados com injeções diárias de losartan (DuPont - Dup 753), na dose de 10 mg/kg/dia via subcutânea (119), do 28º ao 42º dia;

- **Tratados com Ang II e losartan** - os ratos foram implantados com as mini-bombas para infusão de Ang II, na dose de 200 ng/kg/min via subcutânea e tratados injeções de losartan, na dose de 10 mg/kg/dia, via subcutânea, do 28° ao 42° dia.

#### 4.2.2 *Grupos Tratados com Endotelina 3 (ET-3) e/ou BQ788 ou Atrasentan*

Assim como no grupo anterior, todos os animais passaram por cirurgia, para implante de uma mini-bomba osmótica, conectada a um tubo PE50 inserido na veia jugular direita do animal, para a infusão intravenosa. Nesta etapa foram utilizados 50 ratos, distribuídos nos seguintes grupos:

- **Controle** - 10 ratos foram submetidos a cirurgia, mas sem implante da mini-bomba;
- **Tratados com ET-3** - 10 ratos foram implantados com as mini-bombas para infusão de ET-3, na dose de 1 pM/kg/min, (Tocris Bioscience, Minneapolis, EUA) (114) via endovenosa, por 42 dias;
- **Tratados com atrasentan** (antagonista de ETA) - 5 ratos foram submetidos a cirurgia, mas as mini-bombas não foram implantadas. Os animais receberam injeções diárias de atrasentan, na dose de 100 nM/kg/dia, via subcutânea, do 28° ao 42° dia;
- **Tratados com ET-3 e atrasentan** - 5 ratos implantados com mini-bomba para infusão de ET-3, na dose de 1 pM/kg/min, via endovenosa e tratados com atrasentan na dose de 100 nM/kg/dia, via subcutânea, do 28° ao 42° dia;
- **Tratados com BQ788** (antagonista de ETB) - 10 ratos foram submetidos a cirurgia, mas as mini-bombas não foram implantadas. Os animais receberam injeções diárias de atrasentan, na dose de 4 mM/kg/dia (120), via subcutânea, do 28° ao 42° dia;
- **Tratados com ET-3 e BQ788** - 10 ratos implantados com mini-bomba para infusão de ET-3, na dose de 1 pM/kg/min, via endovenosa e tratados com atrasentan na dose de 4 mM/kg/dia, via subcutânea, do 28° ao 42° dia.

Embora tenha ocorrido a morte de alguns animais durante este estudo, esses eventos isolados foram atribuídos aos procedimentos cirúrgicos ou à anestesia, mas não devido aos tratamentos utilizados.

### **4.3 Avaliação da ingestão de ração, água e do ganho de peso**

Os animais foram pesados em balança eletrônica (Acrimet) antes e depois do período de tratamento para o cálculo de ganho de peso, pela da fórmula:

*ganho de peso (gramas) = (peso inicial - peso final)/número de semanas de tratamento (6) (1)*

Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais, durante 24hs, para avaliação da ingestão de ração (gramas/dia) e água (mL/dia).

### **4.4 Aferição da pressão arterial**

Com a finalidade de monitorar a evolução da pressão arterial nos grupos experimentais, a pressão de cauda foi aferida semanalmente (antes e após as cirurgias) pelo método não invasivo de pletismografia de cauda (LE 5001, Panlab S.I. Barcelona, Espanha). Os animais foram previamente aclimatados ao contensor antes dos registros de pressão. Os valores de pressão de cauda correspondem à média de oito medidas sequenciais para cada animal.

No grupo tratado com angiotensina II e/ou losartan, ao final do tratamento, alguns desses animais (n = 6 por grupo) foram anestesiados com ketamina (75 mg/kg, i.m.) e xilazina (4 mg/kg, i.m.) para inserção de um cateter de polietileno PE50 na artéria carótida. Este por sua vez foi exteriorizado dorsalmente para a medida de pressão arterial direta em animais acordados. Após 24 horas da inserção do cateter, a pressão arterial sistólica e diastólica, bem como os batimentos cardíacos foram registrados usando um transdutor de pressão (modelo DT-100; Utah Medical Products, Midvale, UT, USA) e esses valores foram utilizados para obter a pressão arterial média (PAM) utilizando-se o software (Power Lab 4/25; AD Instruments, Sydney, Australia; 1 kHz sampling rate), como descrito previamente (121).

#### **4.4.1 Gaiolas metabólicas**

No 41º dia de tratamento os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. Tais amostras foram utilizadas para a quantificação de creatinina, proteínas totais e albumina.

#### 4.5 Medida das concentrações de angiotensinas no plasma e no tecido renal

As concentrações de angiotensinas I, II e 1-7 no plasma e no tecido renal foram quantificadas pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) no Laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dulce Elena Casarini – Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), conforme descrito por Coelho e colaboradores (122). Para as medidas no plasma, as amostras de sangue foram coletadas da artéria carótida e transferidas para um tubo de vidro, contendo anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e inibidores de protease (Roche, Mannheim, Alemanha). Para análises teciduais, aproximadamente 100 mg de tecido renal de cada animal foi homogeneizado em 3 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 0,34 M de sacarose, 0,3 M de NaCl e inibidores de protease (Roche) em pH 7.2 e armazenada a -80 °C. O processo de extração foi realizado em colunas Oasis C18 (Waters, Milford, EUA). As colunas foram ativadas seguindo esta ordem: 5 mL de metanol, 5 mL de tetra-hidrofurano, 5 mL de hexano, 5 mL de metanol e 10 mL de água Milli-Q. As amostras foram, então, aplicadas nas colunas e lavadas com: 10 mL de água Milli-Q, 5 mL de ácido acético a 4% e eluídas em 5 ml de etanol/ácido acético/H<sub>2</sub>O (90:4:6, v/v). As amostras coletadas foram liofilizadas em SpeedVac SC110 (Savant Instruments, New York, EUA) e reconstituídas com 500 µL de acetonitrila a 5% e 0,1% de ácido fosfórico. Em seguida, as amostras foram filtradas e injetadas na coluna analítica do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector com luz ultravioleta (214 nm), conforme relatado por Franco e colaboradores (123). As amostras de plasma ou homogenato renal passaram através da coluna Aquapore OD 300, 4,6 x 250 mm, 7 microns (Browlee PerkinElmer`s, Highlands North, EUA), equilibrada com 0,1% de ácido fosfórico em acetonitrila a 5% para a separação das angiotensinas. Para melhor separação das amostras, a corrida foi realizada em forma de gradiente de concentração a velocidade constante de 1,5 mL/min, num intervalo de aproximadamente 40 min. Em cada amostra foi adicionado 1 nM de Sarleo, controle interno além dos peptídeos Ang I, Ang 1-7 e Ang II. O tempo de retenção foi usado para identificar os picos de interesse previamente determinados pelos padrões. As concentrações plasmáticas e intrarrenais de Ang foram expressos em pM/L de sangue ou pM/g de tecido, respectivamente.

#### **4.6 Avaliação das concentrações de endotelinas no plasma**

As concentrações plasmáticas das endotelinas 1 e 3 foram avaliadas por ensaios de ELISA usando *Kits* comerciais específicos para esses peptídeos (*endothelin 1* ou *endothelin 3* EIA kits, Phoenix pharmaceuticals, Burlingame, USA), seguindo as instruções do fabricante.

#### **4.7 Análise da função renal**

Ao final dos tratamentos, no 42º dia, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Zoletil (tiletamida + zolazepam) (Virbac, Carros, França) e Xilazina (Virbac) nas doses de 50 e 5 mg/kg de peso, respectivamente. Após a perda completa dos reflexos de dor, a traqueia foi canulada com cateter de polietileno PE 260, para manutenção da ventilação adequada do animal, e doses adicionais de anestésico foram administradas quando necessárias para manutenção da sedação do animal.

Em seguida, um tubo de polietileno PE50 heparinizado (Hemofol, Cristália, Itapira, Brasil) foi inserido na artéria carótida direita e na veia jugular esquerda para coleta de sangue e infusão de solução, respectivamente. No início do experimento, os animais receberam infusão endovenosa contínua de solução salina (0,9 % de NaCl) e 3% de manitol à velocidade constante de 100 µL/min, por 30 minutos, com ajuda de uma bomba infusora (Harvard Instruments, Holliston, EUA). Após este período, uma dose inicial, no volume de 1 ml, contendo inulina (250 mg/kg) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e ácido para-amino-hipúrico (PAH - 5 mg/kg) (Sigma Aldrich) foi administrada, em bolus, e mantida a infusão contínua de salina, manitol, inulina (15 mg/ml) e PAH (4 mg/ml) durante o experimento.

Na bexiga urinária foi inserida uma cânula de polietileno PE260 para coleta de urina, utilizada nas análises de clearance. No total foram realizadas 4 coletas de sangue e urina, em intervalos de 20 minutos, sendo a primeira após 50 minutos após o bolus de inulina e PAH.

O volume urinário coletado também foi utilizado para calcular o fluxo urinário ( $V$ ), fórmula:  $V = (\text{volume/tempo}) (2)$ , sendo o volume de urina expresso em µL e o tempo em minutos.

#### **4.8 Perfusão e Fixação do tecido renal**

Ao término dos experimentos de clearance, os animais receberam mais uma dose de anestésico e imediatamente, a artéria e a veia renal do rim esquerdo foram amarradas com fio

de algodão para a remoção do mesmo, o qual foi congelado com nitrogênio líquido e armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e utilizado nas análises de PCR quantitativo (qPCR) e Western blot. A artéria aorta foi exposta e canulada para a perfusão do animal com tampão fosfato (PBS: 0,15M NaCl, 0,01M, pH 7.4), durante 10 minutos a uma velocidade máxima de 20 mL/min. Após esse período o rim direito foi removido e uma fatia da porção central do rim foi cortada transversalmente, fixada em formalina 4% tamponada (0,034 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 0,045 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) por 24 horas. Após a fixação os fragmentos foram transferidos para álcool 70% e encaminhados para o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da USP, para a montagem das lâminas histológicas.

#### 4.9 Parâmetros renais e plasmáticos

As osmolalidades da urina e do plasma foram medidas em osmômetro (Micro Osmometer, Precision Systems, Natick, EUA), e as concentrações de  $\text{Na}^+$  na urina e no plasma foram medidos por fotometria de chama (B462, Micronal, São Paulo, Brasil).

A carga filtrada (CF; em mEq/min/kg) do íon  $\text{Na}^+$  foi calculada pela fórmula:  $CF_x = P_x \cdot RFG$  (3), onde  $P_x$  é a concentração do íon no plasma e RFG é o ritmo de filtração glomerular.

A carga excretada (CE; em mEq/min/kg) foi calculada pela fórmula:  $CE_x = U_x \cdot V$  (4), onde  $U_x$  é a concentração do íon na urina e V é o fluxo urinário.

A fração de excreção (FE; em %) dos íons foi calculada pela fórmula:  $FE_x = CF_x / CE_x$  (5), onde  $CF_x$  é a carga filtrada do íon e  $CE_x$  é a carga excretada do mesmo íon.

#### 4.10 Avaliação da função renal

As concentrações plasmática e urinária da inulina e do PAH foram determinadas por método colorimétrico e sua leitura foi realizada em um espectrofotômetro. O *clearance* (C) dessas substâncias foi calculado pela equação:  $C_x = (U_x \cdot V) / P_x$  (6), onde  $U_x$  é a concentração da inulina ou do PAH na urina, V é o fluxo urinário e  $P_x$  é a concentração da inulina ou do PAH no plasma.

Os valores do ritmo de filtração glomerular (RFG; em mL/min/kg), foram calculados com base no *clearance* de inulina (quantificação pelo método de antrona, conforme descrito por **Fuhr e colaboradores** (124). A inulina plasmática é completamente filtrada nos glomérulos e por não ser nem reabsorvida nem secretada, a sua excreção urinária corresponde a filtração glomerular.

Os valores de fluxo plasmático renal (FPR; em mL/min/kg) foram calculados com base no *clearance* do PAH (determinado pela reação com N-Naftil (Química Especializada Erich, São Paulo, Brasil), conforme descrito por **Smith e colaboradores** (125). O PAH também é livremente filtrado, porém também é secretado pelos túbulos e não é reabsorvido, sendo praticamente todo excretado durante sua passagem pelos rins, sendo assim, sua excreção urinária é bastante próxima ao fluxo plasmático renal.

A fração de filtração (FF) é basicamente a porção de plasma que se torna ultrafiltrado ao passar pelos glomérulos, e pode ser calculada pela fórmula:  $FF = RFG / FPR$  (7).

Os valores de fluxo sanguíneo renal (FSR) foram estimados pela fórmula:  $FSR = FPR / 1 - Ht$  (8), onde, Ht é hematócrito. Conhecendo o FSR e a PAM, pode-se estimar a resistência vascular renal (RVR), pela fórmula:  $RVR = PAM / FSR$  (9).

#### **4.11 Morfologia Renal**

Os fragmentos do tecido renal foram removidos do álcool 70% e emblocados em parafina. Em seguida utilizando-se um micrótomo se obteve cortes renais transversais de 4 µm de espessura, os quais foram organizados em lâminas silanizadas. Para as análises morfológicas, os cortes renais foram corados pelo método de *Verhoeff* (126), para a identificação de fibras elásticas e colágeno da parede vascular. Além disso, permite a identificação de outras estruturas renais como glomérulos e túbulos. Para avaliar a glomeruloesclerose, os cortes renais foram corados pelo método de *ácido periódico-Schiff* (PAS). As análises das preparações foram realizadas utilizando um microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo (Eclipse 80i, Nikon, Toquio, Japão).

Aproximadamente 6 artérias interlobulares e 15 arteríolas aferentes, na área cortical renal de cada rato foram utilizadas para calcular o raio do lúmen ( $r = \text{diâmetro} / 2$ ) e a razão da área media-lúmen (M/L). No cálculo da área glomerular e avaliação da glomeruloesclerose foram considerados todos os glomérulos com máculas densas visíveis. As avaliações morfométricas e morfológicas foram feitas com o auxílio de um programa especializado



(NIS-Elements D , Nikon). Nos cortes corados por PAS os glomérulos foram classificados em graus de glomeruloesclerose, de acordo com a porcentagem de sua área afetada, conforme descrito por Saito e colaboradores (127), sendo: G0, normal; G1, para até 25% de área afetada; G2, com 26 a 50% de área afetada; G3, com 51 a 75% de área afetada, e G4, com mais de 75% de área afetada. Após a classificação das áreas, foi calculado o índice de glomeruloesclerose (IGS) para cada grupo, sendo  $IGS = (1 \times N_{G1} + 2 \times N_{G2} + 3 \times N_{G3} + 4 \times N_{G4}) / \text{Total de glomérulos}$ , onde  $N_{Gx}$  é o numero de glomérulos naquela escala.

#### **4.12 Imuno-histoquímica**

Para imuno-histoquímica, os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em álcool (100%, 90% e 75%) e então submetidos à recuperação antigênica, em solução Tampão citrato (pH 6.0) a 100 °C por 20 minutos, em seguida resfriadas em água destilada, por 20 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram banhadas em solução de peróxido de hidrogênio (Merck, Whitehouse Statio, EUA) a 3%, e azida sódica a 1% por 5 min.

Após o bloqueio das peroxidases foi realizado o bloqueio de proteínas não específicas, com soro de cabra 10% diluído em TBS (50 mM Tris-Cl e 150 mM NaCl, pH 7,6) por 60 min a temperatura ambiente, só então os cortes foram incubados *overnight* a 4 °C com anticorpo primário específico para desmina (1:500; Abcam, EUA) ou ED-1 (1:50; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido). Após a incubação os cortes foram banhados 2 vezes em TBS-T (TBS + 0,05% Tween 20) por 5 min e incubados com o anticorpo secundário biotinado anti-rabbit (1:200) e incubado no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) por 120 min. A reação de coloração foi desenvolvida com 3.3-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich) suplementada com peróxido de hidrogênio 0.3% (Merck). A contracoloração foi feita com *Methylgreen* (Amresco, Ohio, EUA). Para a montagem das lâminas se utilizou resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

A captura e análise das imagens foram realizadas no mesmo sistema de microscopia descrito anteriormente. Para as marcações de desmina, foram analisados, qualitativamente, 20 glomérulos de cada animal. Para a quantificação de ED-1, foi realizada a contagem das células ED-1 positivas de 50 campos por lâmina, para cada animal.

#### **4.13 Avaliação da proteinúria**

A concentração de proteínas totais na urina (obtida da gaiola metabólica) foi avaliada utilizando o *Kit* Sensiprot ELISA (Labtest, Brazil) e normalizada pela concentração de creatinina urinária, a qual foi medida por colorimetria (Labtest, Minas Gerais, Brazil) usando um espectrofotômetro ( $\mu$ Quant, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA), ambos experimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A razão foi dada por: *Concentração de proteínas totais na urina / Creatinina (10)*

A presença de albumina na urina foi confirmada por ensaio de ELISA utilizando o *Kit* (Nephrot Kit; Exocell, Philadelphia, PA), específico para detectar albumina na urina de ratos, e os experimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.14 Contagem de podócitos na urina**

Antes dos experimentos de clearance, 1 mL de urina foram coletados diretamente da bexiga e transferidos para um tubo Falcon com 11 mL de solução de HBSS e centrifugada a 650 g por 5 minutos. O sedimento foi ressuscitado em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 IU/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL streptomina e 2 mmol/L L-glutamine, pH 7,4 e transferido para placas de 6 poços revestidas por colágeno tipo I e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo a primeira troca de meio, após 24 horas e as demais a cada 48 horas. Os podócitos sobreviventes, já aderidos foram contados após a primeira troca do meio em um microscópio invertido (Nikon). Essa metodologia foi descrita por Petermann e colaboradores (128).

#### **4.15 Expressão proteica por Western blot**

As amostras de tecido renal foram homogeneizadas em solução de sacarose [sacarose 250 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM] e 1% do complexo de inibidores de proteases (Sigma). Em seguida, a concentração total de proteínas da cada amostra foi determinada pelo método “Micro BCA Assay” (Pierce Biotechnology, Illinois, USA) e solubilizadas em tampão *sodium dodecyl sulfate* (SDS) (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8; SDS 2%; glicerol 20%;  $\beta$ -mercaptoetanol 1,96% e azul de bromofenol 0,05%) de forma a conter 50  $\mu$ g de proteínas por amostra. Em seguida, as amostras foram aplicadas, juntamente com um padrão de massa molecular específico (Bio-Rad), em gel de poliácridamida (10% a 12% com espessura de 1,5

mm), o qual foi submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM; glicina 192 mM e pH 7,3). A corrida das amostras no gel foi efetuada a 100 mV, sendo interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel.

#### *4.15.1 Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose*

Após a eletroforese os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore), previamente tratada com tampão de transferência (Tris base 25 mM; glicina 192 mM e metanol 20%), por cerca de 20 minutos. Para a transferência, foi utilizado um sistema tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada voltagem de 100 mV, durante 1 hora. Após esse período, a membrana foi mantida em solução de bloqueio (NaCl 150 mM; Fosfato de Sódio Monobásico 2,8 mM; Fosfato de Sódio Dibásico 7,2 mM; leite em pó desnatado 5%; Tween-20 0,1 % (Sigma Aldirch) durante uma hora a fim de diminuir possíveis interações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada em anticorpo primário específico, previamente diluído em solução de bloqueio (1:1000 v/v), *overnight* a 4 °C e leve agitação. Para remover o excesso de anticorpo, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos cada, sendo 2 com água destilada e 2 com TBS-Tween 20 (0,05%). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos secundário em temperatura ambiente e leve agitação durante 1 hora, também diluídos em solução de bloqueio (1:2000 v/v) e novamente lavada como acima descrito.

Após essas etapas, a membrana foi banhada em reagente de luminescência ECL (Amersham), por 1 minuto, prensada contra as folhas de filme Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (Amersham), para a revelação das bandas.

As proteínas analisadas por *Western blot* foram os receptores AT1, AT2 para angiotensina II; ETA e ETB para endotelinas. As bandas foram analisadas por densitometria usando o programa de imagens Scion Image (imID, Pharmacy Biotech, Uppsala, USA).

### **4.16 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)**

#### *4.16.1 Extração do RNA total*

As amostras de tecido renal foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas e homogeneizadas em 1 ml de TRIzol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em seguida, o homogenato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa

dissociação dos complexos nucleoproteicos. O RNA total foi extraído em mini-colunas do kit RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Neste processo, as amostras foram passadas também por uma coluna que retém DNA genômico, assegurando maior pureza do RNA extraído.

#### 4.16.2 Síntese do DNAc a partir do RNAm

Para a síntese de DNAc à partir do RNAm extraído foi utilizado o *kit* High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante, partindo-se de uma concentração inicial de 500 ng de RNA.

#### 4.16.3 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNAc (20 ng) obtido no RT-PCR foi utilizado na análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Na obtenção das sondas, foram selecionadas aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir ainda mais o impacto de contaminação por DNA genômico.

As sondas utilizadas foram: Angiotensinogênio, Rn00593114\_ml, Renina, Rn00561847-m1; fator de necrose tumoral  $\alpha$  Rn00560677-sl; (TNF $\alpha$ ), Rn99999017-m1; Fator de crescimento transformador  $\beta$ 1, Rn00579674-ml; colágeno III, Rn01437681-m1; integrina  $\beta$ 1, Rn00566727-ml; endotelina 1: Rn00561129-m1; endotelina 3 Rn01755284-ml; enzima conversora de endotelina: Rn595843-ml; e o gene endógeno GAPDH, Rn01775763-g1.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicatas no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no programa StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems). A semelhança das eficiências de amplificação das sondas (próximo a 100%) permite a utilização do modelo matemático  $2^{\Delta\Delta CT}$  para o cálculo das diferenças de expressão entre os genes alvo e endógeno. Assim, os resultados estão apresentados conforme aumento ou redução da expressão em relação ao grupo controle (*fold change*).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados, teste  $t$  de Student, para comparação entre dois grupos e a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism Software. As comparações com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas e os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  erro padrão da média.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 *Estudo com angiotensina II e losartan*

Para a maioria dos parâmetros investigados, exceto para o estudo da expressão de renina, o grupo tratado apenas com losartan não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Por isso, esse grupo quando apresentado nos gráficos, não é descrito ou discutido.

### 6.2 *Efeito da Ang II e/ou losartan sobre os parâmetros fisiológicos*

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, o tratamento com Ang II não alterou a ingestão diária de ração, o ganho de peso ou a relação peso do rim/peso do animal. Entretanto, a Ang II induziu aumento de 22% no consumo de água, e apesar de não ser estatisticamente diferente do controle, este efeito foi amenizado no grupo tratado com Ang II e losartan.

**Tabela 1:** Parâmetros Fisiológicos

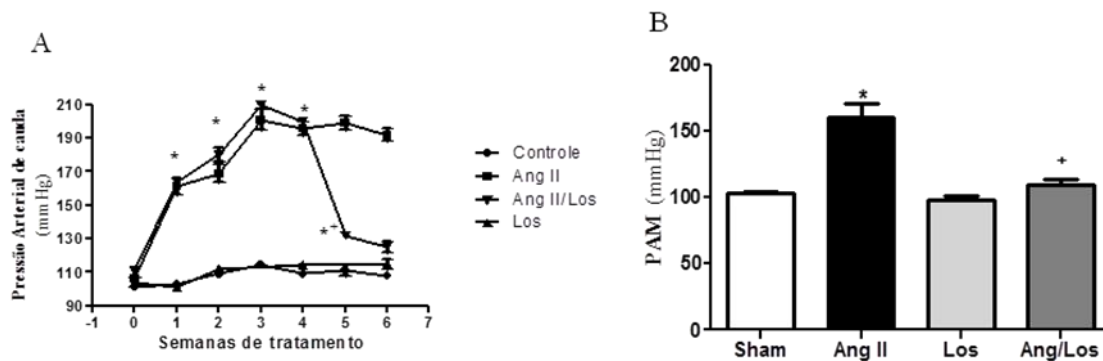
Parâmetros	Controle (n = 10)	Ang II (n = 10)	Los (n = 10)	Ang II/Los (n = 10)
Ingestão de ração, g/dia	18,4 ± 0,8	18,5 ± 1,3	17,6 ± 1,0	15,9 ± 1,1
Peso corporal final, g	349 ± 7	335 ± 13	333 ± 9	348 ± 10
Ganho de peso, g/semana	32,2 ± 0,9	28,5 ± 1,4	30,7 ± 1,6	32,6 ± 3,0
Peso renal/animal, mg/g	8,6 ± 0,4	8,7 ± 0,4	9,1 ± 0,3	8,4 ± 0,2
Ingestão de água, mL/dia	35,0 ± 2,8	43,0 ± 3,8	35,1 ± 3,6	38,4 ± 4,4

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. Ang II, Angiotensina II (200 ng/kg/min); Los, losartan (10mg/kg/dia).

### 6.3 *Efeito da Ang II e/ou losartan sobre a pressão arterial*

A medida de pressão arterial foi avaliada semanalmente por pletismografia de cauda, com os animais acordados. Conforme apresentado na **Figura 8 A** e **Tabela 2**, no início do estudo (semana zero) a PA de cauda foi similar entre os grupos. No grupo tratado com Ang II a PA de cauda aumentou progressivamente em comparação ao grupo controle, e após a 3ª semana de tratamento com Ang II atingiu um patamar estável até a 6ª semana de tratamento. O tratamento com losartan reduziu significativamente o efeito de Ang II sobre esse parâmetro.

No final do tratamento, seis animais de cada grupo foram submetidos aos registros de pressão arterial por método direto, com os animais acordados, e conforme apresentado na **Figura 8 B** e **Tabela 2**, a pressão arterial média (PAM) observada em cada grupo confirma os resultados obtidos pela pletismografia de cauda, onde se pode observar que no grupo tratado com Ang II a média é significativamente maior que a do grupo controle. O tratamento com losartan reduziu o efeito da Ang II sobre a PAM.



**Figura 8:** Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) na progressão da pressão arterial de cauda (A) e na pressão arterial média (PAM) (B). Os valores são média  $\pm$  EPM. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan. \* $p < 0,05$  versus Controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II.

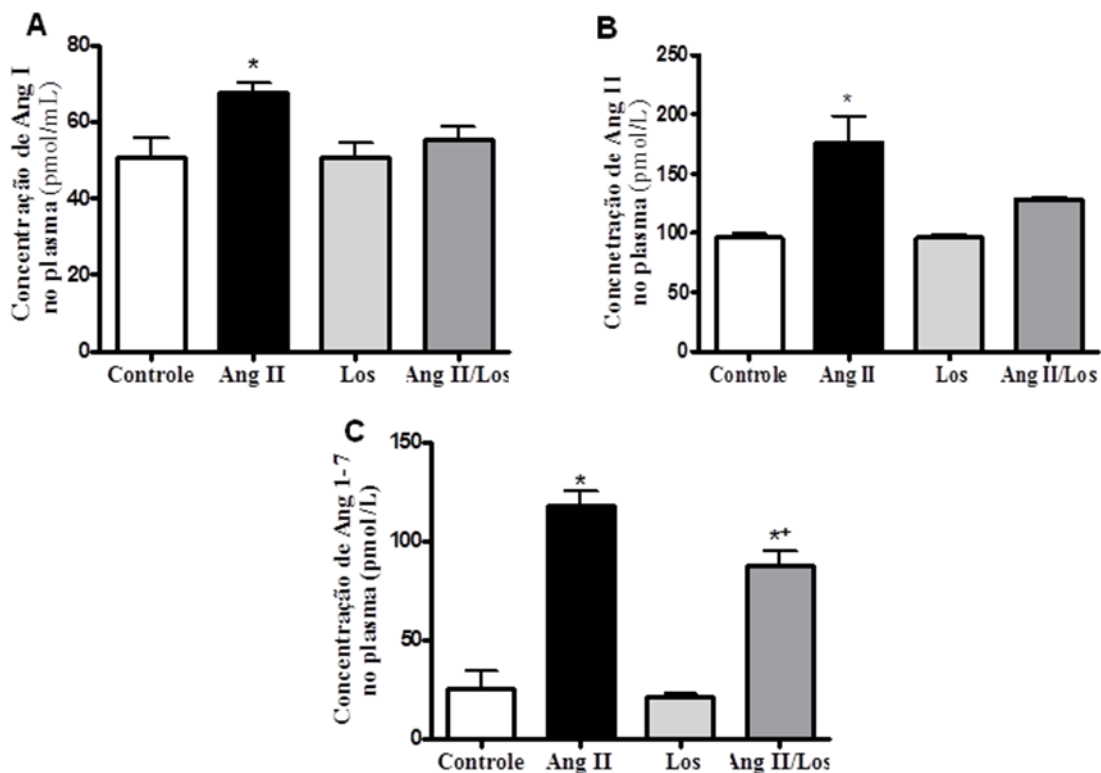
**Tabela 2:** Pressão Arterial (PA)

Parâmetro	Controle (n = 10)	Ang II (n = 10)	Los (n = 10)	Ang II/Los (n = 10)
<i>Pressão arterial de cauda</i>				
PA Inicial, mmHg	101 $\pm$ 1	106 $\pm$ 2	104 $\pm$ 3	111 $\pm$ 1
PA Final, mmHg	108 $\pm$ 2	185 $\pm$ 5*	115 $\pm$ 3	125 $\pm$ 2* <sup>+</sup>
Parâmetro	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Los (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
<i>Pressão arterial direta</i>				
PAM, mmHg	103 $\pm$ 2	160 $\pm$ 8*	99 $\pm$ 3	109 $\pm$ 3 <sup>+</sup>

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan. \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II.

#### 6.4 Concentrações de angiotensinas no plasma

As concentrações plasmáticas de angiotensinas foram avaliadas pelo método de HPLC. Os resultados apresentados na **Figura 9** e **Tabela 3** demonstram que o tratamento com Ang II não alterou as concentrações plasmáticas de Ang I em comparação ao controle (**A**), mas induziu significativo aumento nas concentrações de Ang II (**B**) e de Ang 1-7 (**C**) em comparação aos respectivos controles. O losartan reduziu apenas parcialmente o efeito da Ang II sobre a concentração da Ang 1-7.



**Figura 9:** Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) nas concentrações plasmáticas de Ang I (**A**), Ang II (**B**) e Ang 1-7 (**C**). Os valores são média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus controle, + $p < 0,05$  versus Ang II.

**Tabela 3:** Concentrações plasmáticas de angiotensinas.

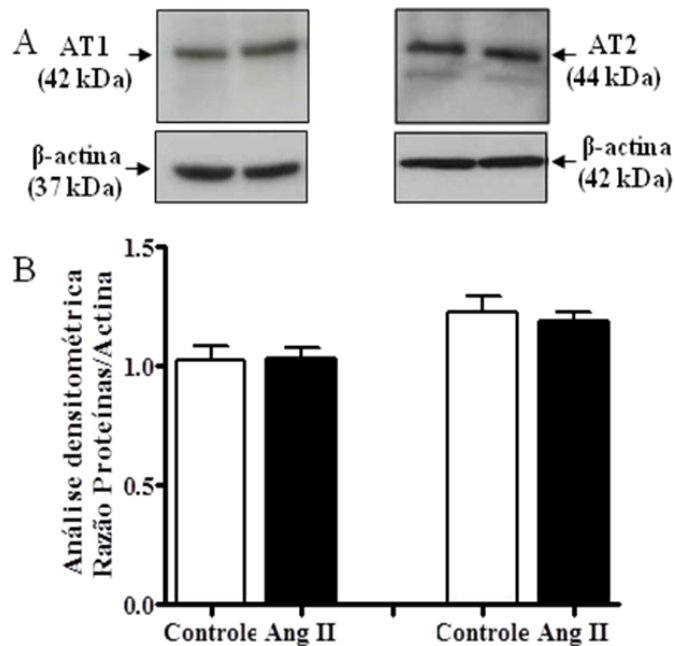
Parâmetros Plasmáticos	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Los (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
Ang I, pmol/L	50,59 $\pm$ 5,26	67,58 $\pm$ 2,42	50,57 $\pm$ 3,82	55,15 $\pm$ 3,65
Ang II, pmol/L	95,85 $\pm$ 3,73	176,15 $\pm$ 13,48*	95,94 $\pm$ 2,88	128,50 $\pm$ 1,69
Ang 1-7, pmol/L	25,07 $\pm$ 8,77	117,93 $\pm$ 6,89*	21,26 $\pm$ 1,69	87,37 $\pm$ 7,75*+

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. Ang I, Angiotensina I; Ang II, Angiotensina II; Ang 1-7, Angiotensina 1-7; Los, losartan. \* $p < 0,05$  versus controle, + $p < 0,05$  versus Ang II.



### 6.5 Expressão dos receptores para angiotensina II no tecido renal

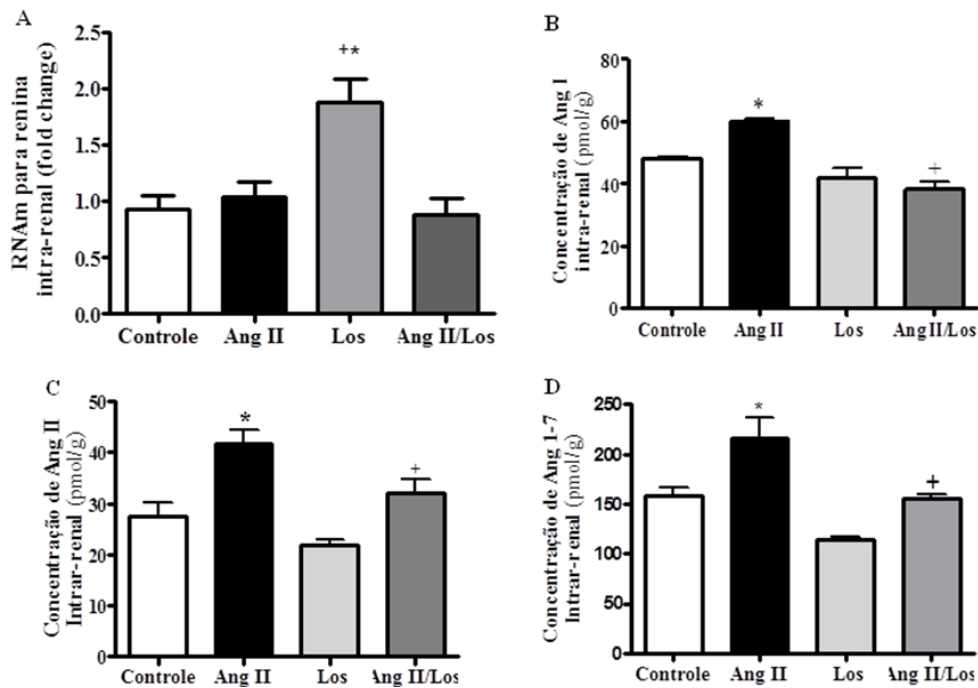
O tratamento com Ang II não alterou a expressão proteica dos receptores AT1 ou AT2 no tecido renal, em relação ao grupo controle (**Figura 10 A e B**) [AT1 (Controle:  $1,02 \pm 0,05$ ; Ang II:  $1,03 \pm 0,04$ ); AT2 (Controle:  $1,22 \pm 0,06$ ; Ang II:  $1,18 \pm 0,03$ )].



**Figura 10:** Efeito do tratamento com Ang II (200 ng/kg/min) na expressão proteica dos receptores AT1 e AT2 para Ang II no tecido renal. (A) experimento representativo; (B) valores médios  $\pm$  EPM obtidos por análise densitométrica de 6 animais por grupo. Ang II, Angiotensina II.

### 6.6 Concentrações de RNAm para renina e concentrações de angiotensinas no tecido renal

A concentração de RNAm para renina não foi alterada entre os grupos controle, tratado com Ang II ou Ang II/Los, mas foi significativamente aumentada no grupo tratado apenas com losartan (**Figura 11, A e Tabela 4**). Apesar disso, o tratamento com Ang II induziu aumento nas concentrações de Ang I, Ang II e Ang 1-7 no tecido renal em comparação aos respectivos controles. O tratamento com Ang II e losartan restaurou os níveis desses peptídeos para os observados nos grupos controles (**Figura 11, B-D e Tabela 4**).



**Figura 11:** Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) nas concentrações de RNAm para renina no tecido renal (A) e nas concentrações dos peptídeos Ang I (B), Ang II (C) e Ang 1-7 (D). Os valores são média ± EPM. \* $p < 0,05$  versus Controle; + $p < 0,05$  versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, Losartan.

**Tabela 4:** Concentrações de RNAm para renina e de angiotensinas no tecido renal.

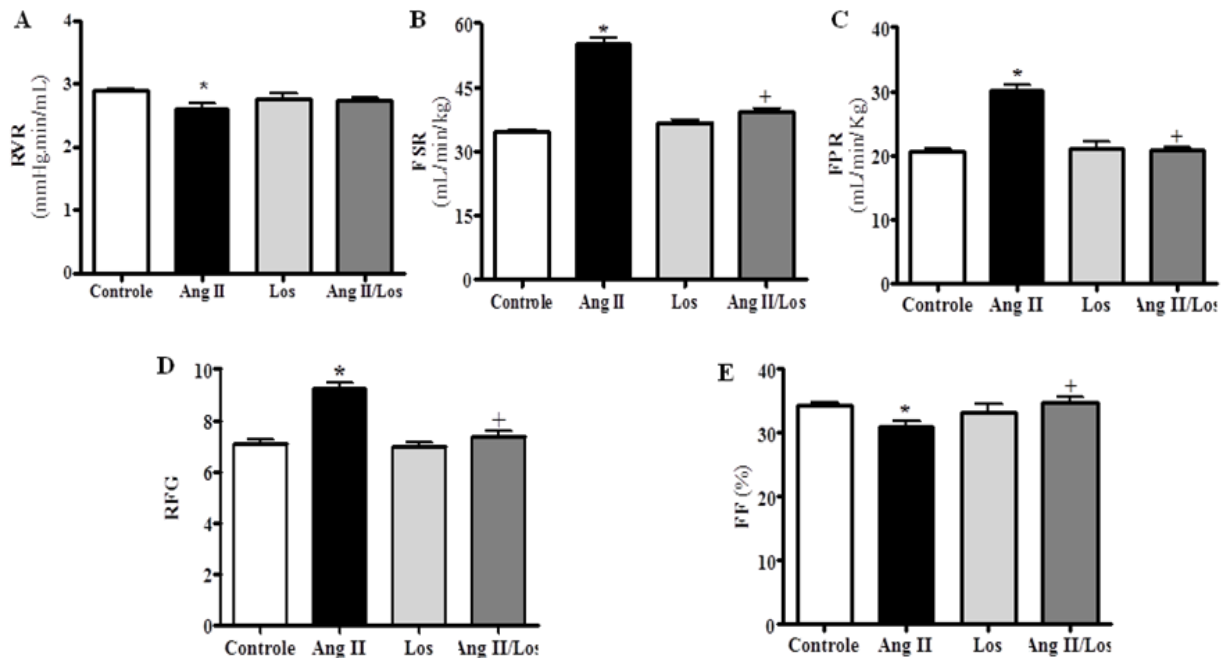
Parâmetros intrarrenais	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Los (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
RNAm Renina, <i>fold change</i>	0,93 ± 0,11	1,04 ± 0,30	1,87 ± 0,20* <sup>+</sup>	0,88 ± 0,14
Ang I, pmol/g	47,38 ± 0,26	60,15 ± 0,48*	41,96 ± 3,06	38,22 ± 2,46 <sup>+</sup>
Ang II, pmol/g	27,60 ± 1,91	43,37 ± 2,26*	21,83 ± 1,12	32,08 ± 2,12 <sup>+</sup>
Ang 1-7, pmol/g	157,85 ± 8,79	216,19 ± 20,20*	114,45 ± 1,76	156,04 ± 3,31 <sup>+</sup>

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. Ang I, Angiotensina I; Ang II, Angiotensina II; Ang 1-7, Angiotensina 1-7; Los, losartan. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus Ang II.

## 6.7 Hemodinâmica Renal

Conforme apresentado na **Tabela 5**, houve aumento do hematócrito nos grupos tratados com Ang II. Entretanto, como apresentado na **Figura 12 A - D e Tabela 5**, o tratamento com Ang II induziu queda significativa da resistência vascular renal (RVR) em comparação ao grupo controle. Sob essa condição, o fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo plasmático renal (FPR) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) foram significativamente aumentados em comparação aos respectivos controles. Sob a mesma condição, a fração de filtração (FF) dada pela razão do RFG/FPR foi reduzida em comparação ao grupo controle

(Figura 12 E). No grupo tratado com Ang II e losartan os valores para todos os parâmetros descritos acima foram similares aos respectivos controles.



**Figura 12:** Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) na resistência vascular renal (RVR) (A), no fluxo sanguíneo renal (FSR) (B), fluxo plasmático renal (FPR) (C), ritmo de filtração glomerular (RFG) (D) e fração de filtração (FF) (E). Os valores são média ± EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan.

**Tabela 5:** Hematócrito e hemodinâmica renal.

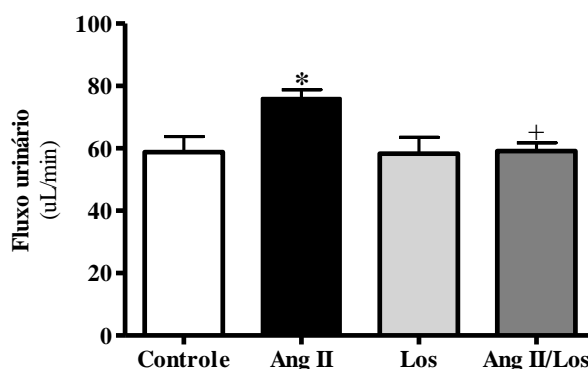
Parâmetros	Controle (n = 10)	Ang II (n = 10)	Los (n = 10)	Ang II/Los (n = 10)
Hematócrito, %	41 ± 2	46 ± 1*	42 ± 1	46 ± 1*
RVR, mmHg/mL/min/kg	2,87 ± 0,05	2,62 ± 0,06*	2,74 ± 0,08	2,76 ± 0,06
FSR, mL/min/kg	34,5 ± 3,0	55,8 ± 6,3*	36,7 ± 2,4	39,3 ± 4,1 <sup>+</sup>
FPR, mL/min/kg	20,7 ± 0,3	30,1 ± 0,8*	21,2 ± 1,0	20,8 ± 0,5 <sup>+</sup>
RFG, mL/min/kg	7,0 ± 0,2	9,2 ± 0,2*	6,9 ± 0,3	7,3 ± 0,2 <sup>+</sup>
Fração de Filtração, %	34,3 ± 0,8	30,9 ± 0,8*	33,3 ± 2,9	34,7 ± 0,8 <sup>+</sup>

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. RVR, resistência vascular renal; FSR, fluxo sanguíneo renal; FPR, fluxo plasmático renal; RFG, ritmo de filtração glomerular; FF, fração de filtração \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan.

### 6.8 Fluxo urinário e manejo renal de Na<sup>+</sup>

O tratamento com Ang II também induziu aumento no fluxo urinário (V) em comparação ao grupo controle, e o losartan restaurou esse parâmetro para valores próximos ao controle (**Figura 13** e **Tabela 6**).

Conforme apresentado na **Tabela 6**, nenhum tratamento modificou as concentrações do íon Na<sup>+</sup> no plasma. Entretanto, o tratamento com Ang II induziu aumento da carga filtrada e da carga excretada de Na<sup>+</sup> (provavelmente devido ao aumento do RFG), mas não alterou a fração de excreção desse íon. As alterações induzidas pelo tratamento com Ang II foram reduzidas pelo losartan.



**Figura 13:** Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) no fluxo urinário (V). Os valores são média ± EPM. \**p* < 0,05 versus controle; <sup>+</sup>*p* < 0,05 versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan.

**Tabela 6:** Fluxo urinário e manejo de eletrólitos.

Parâmetros	Controle (n = 10)	Ang II (n = 10)	Los (n = 10)	Ang II/Los (n = 10)
Fluxo Urinário (V), µL/min	48,4 ± 2,7	71,0 ± 3,0*	59,0 ± 3,0	55,2 ± 2,6 <sup>+</sup>
Na <sup>+</sup> plasmático, mEq/L	138 ± 1	142 ± 2	138 ± 2	138 ± 1
Carga filtrada de Na <sup>+</sup> , mEq/min	1.076 ± 70	1.821 ± 325*	1.180 ± 110	1.163 ± 106 <sup>+</sup>
Carga excretada de Na <sup>+</sup> , mEq/min	1,68 ± 0,17	2,78 ± 0,23*	1,53 ± 0,11	1,28 ± 0,13 <sup>+</sup>
Fração de excreção de Na <sup>+</sup> , %	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,01

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. Carga filtrada (CF) do íon (RFG x P<sub>íon</sub>); carga excretada (CE) do íon (U<sub>íon</sub> x V), onde V é o fluxo urinário; fração de excreção do íon (U<sub>íon</sub>/CF) x 100; U, urina; P, plasma \**p* < 0,05 versus controle; <sup>+</sup>*p* < 0,05 versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan.

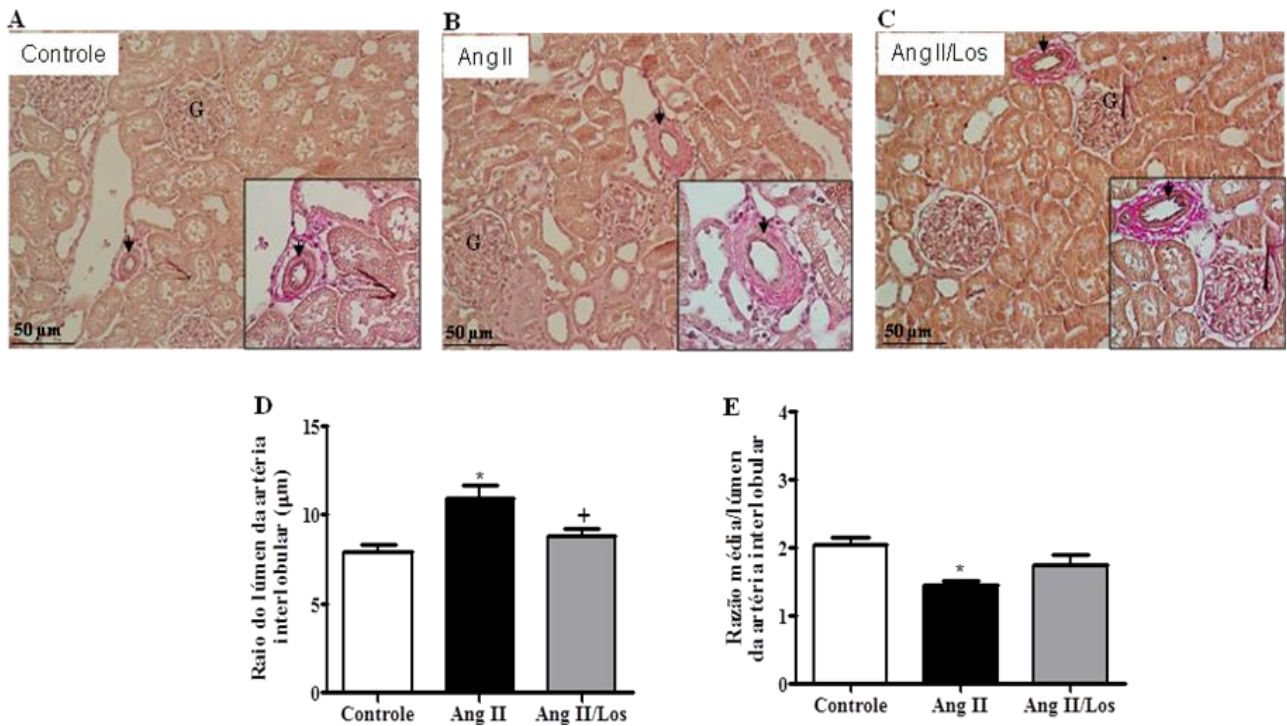
## 6.9 *Morfologia vascular renal*

Os resultados apresentados a seguir correspondem ao dos grupos controle, tratados com Ang II ou com Ang II e losartan.

Considerando que as artérias interlobulares (AI) e as arteríolas aferentes (AA) renais são vasos essenciais para a regulação do fluxo sanguíneo glomerular (85, 86), no atual estudo nós analisamos a morfologia desses vasos. Com o intuito de padronizar os parâmetros (raio dos vasos e tamanho dos glomérulos), todas as análises morfológicas foram realizadas no córtex renal, evitando, portanto a inclusão de estruturas da região justamedular.

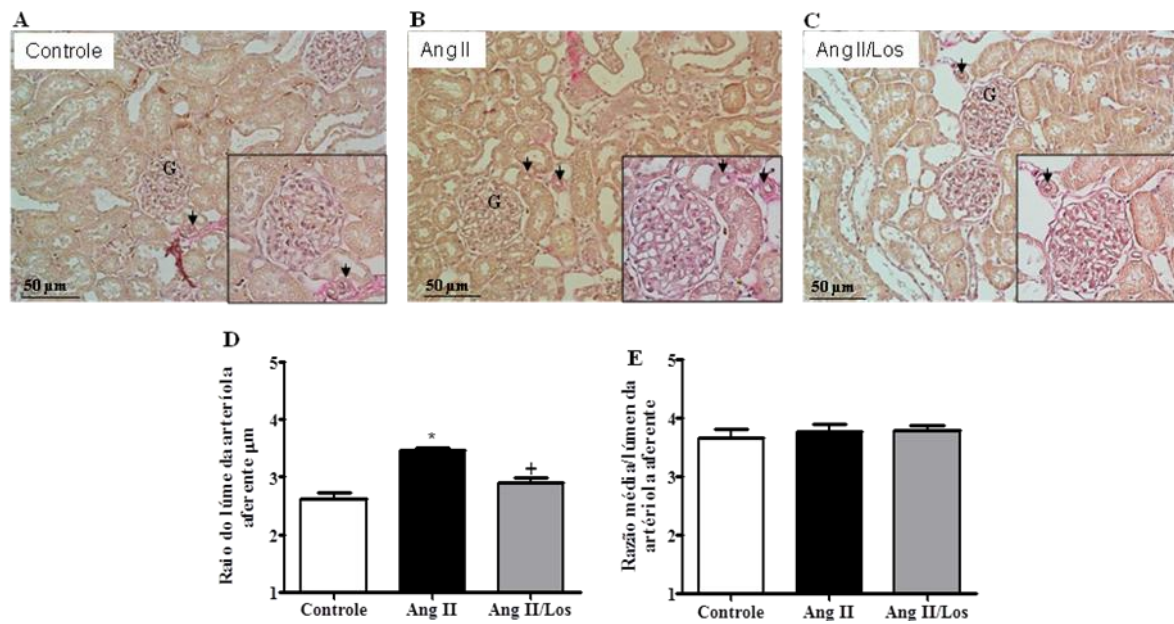
Observando os cortes histológicos, **Figura 14 A - C**, pudemos notar que o tratamento com Ang II induziu injúria por toda a área cortical, fibrose perivascular e alterações tubulointersticiais consistentes com mudanças estruturais, como infiltração de células inflamatórias, perda da borda em escova das células do túbulo proximal e células apoptóticas em alguns seguimentos tubulares quando comparadas ao grupo controle. Conforme apresentado na **Figura 14 A - E** e **Tabela 7**, nos animais tratados com Ang II, as artérias interlobulares (indicadas por setas) apresentaram aumento do lúmen, expansão da camada adventícia, deposição de fibras de colágeno (cor magenta) e diminuição da camada elástica (cor preta) em comparação ao grupo controle. O tratamento com losartan conteve a progressão dos efeitos deletérios da Ang II nos parâmetros citados acima.

A razão média/lúmen (M/L) também foi calculada, e como apresentado na **Figura 14 A - C, E** e **Tabela 7**, no grupo tratado com Ang II a camada média das artérias interlobulares foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle e recuperada apenas parcialmente no grupo tratado com Ang II e losartan.



**Figura 14:** Morfologia das artérias interlobulares (AI) renais de ratos. Cortes transversais de 4 µm corados por *Verhoeff*, indicando fibras elásticas (cor preta) e colágeno (cor magenta). Aumento de 200x e imagem em destaque com aumento de 400x. O raio de cada AI foi calculado pelo programa NIS-Element e os valores são média ± EPM (6 artérias/cada 10 animais). \* $p < 0,05$  versus controle. G, glomérulo; Ang II, Angiotensina II; Los, losartan; barras, 50 µm.

A mesma análise foi realizada nas arteríolas aferentes (AA – indicadas por setas), como apresentado na **Figura 15 A - C** e **Tabela 7**. O tratamento com Ang II induziu aumento significativo no raio do lúmen das AAs em comparação ao grupo controle, e no grupo Ang II tratado com losartan, o raio do lumen ficou igual ao do controle. A razão das áreas média-lúmen (M/L) das arteríolas aferentes não foi diferente entre os grupos (**Figura 15 A - C, E** e **Tabela 7**).



**Figura 15:** Morfologia das arteríolas aferentes (AAs) de ratos. Cortes transversais corados por *Verhoeff*. Aumento de 200x e imagem em destaque com aumento de 400x. O raio de cada AA foi calculado pelo programa NIS-Element e os valores são média  $\pm$  EPM (15 arteríolas/cada 10 animais). \* $p < 0,05$  versus controle. G, glomérulo; Ang II, Angiotensina II; Los, losartan; barras, 50  $\mu$ m.

**Tabela 7:** Morfologia das artérias interlobulares, arteríolas aferentes e glomérulos

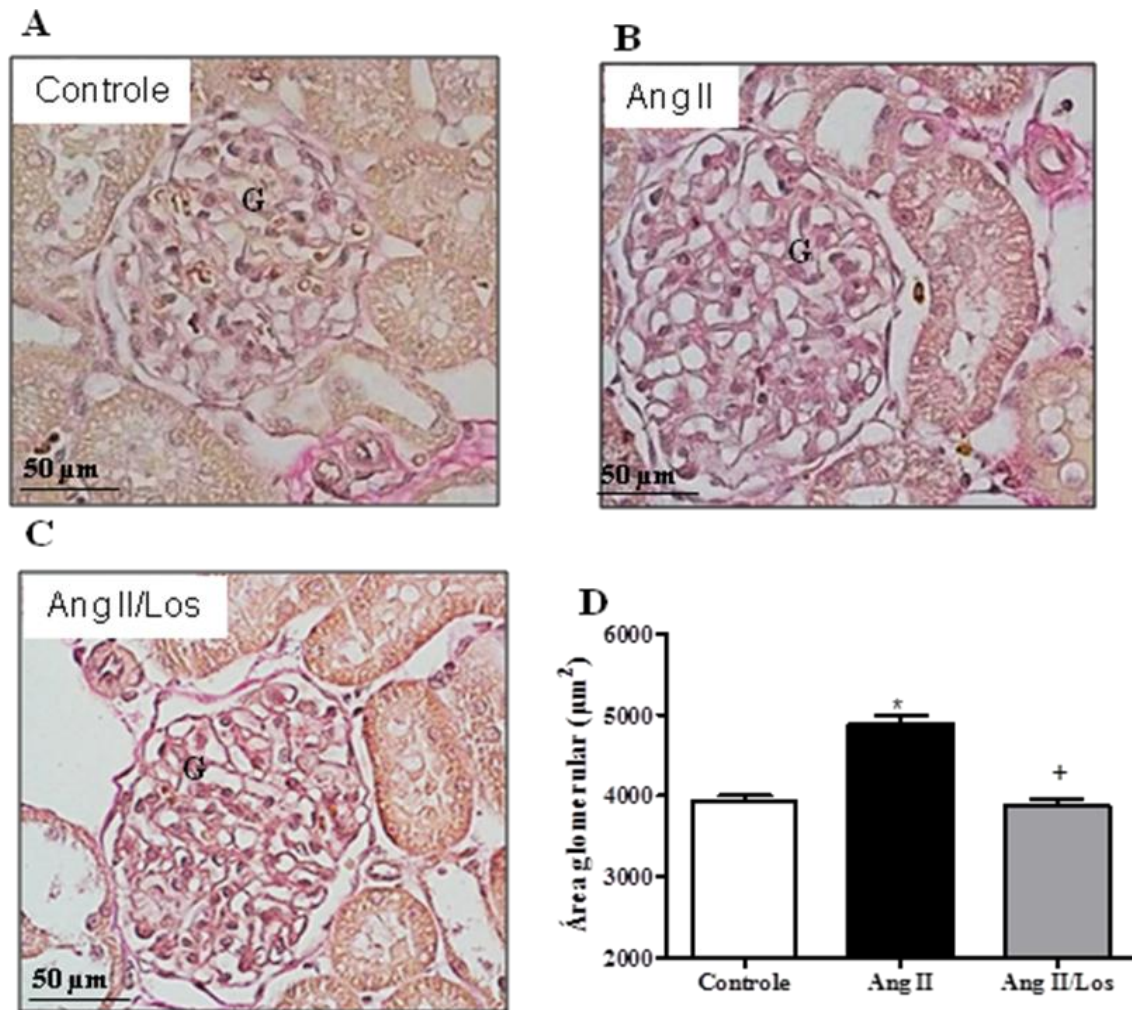
Parâmetros	Controle (n = 10)	Ang II (n = 10)	Ang II/Los (n = 10)
Raio do lúmen da AI, $\mu$ m	7,95 $\pm$ 0,36	10,96 $\pm$ 0,70*	8,80 $\pm$ 0,41 <sup>+</sup>
Razão Média/Luz da AI	2,03 $\pm$ 0,13	1,47 $\pm$ 0,09*	1,75 $\pm$ 0,14
Raio do lúmen da AA, $\mu$ m	2,61 $\pm$ 0,10	3,46 $\pm$ 0,06*	2,89 $\pm$ 0,08 <sup>+</sup>
Razão Média/Luz da AA	3,66 $\pm$ 0,15	3,78 $\pm$ 0,12	3,78 $\pm$ 0,10

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo são indicados em parênteses. \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II. AI, artéria interlobular (6 artérias por animal), AA arteríola aferente (15 arteríolas por animal).



### 6.10 Morfologia glomerular, excreção de podócitos e albuminúria

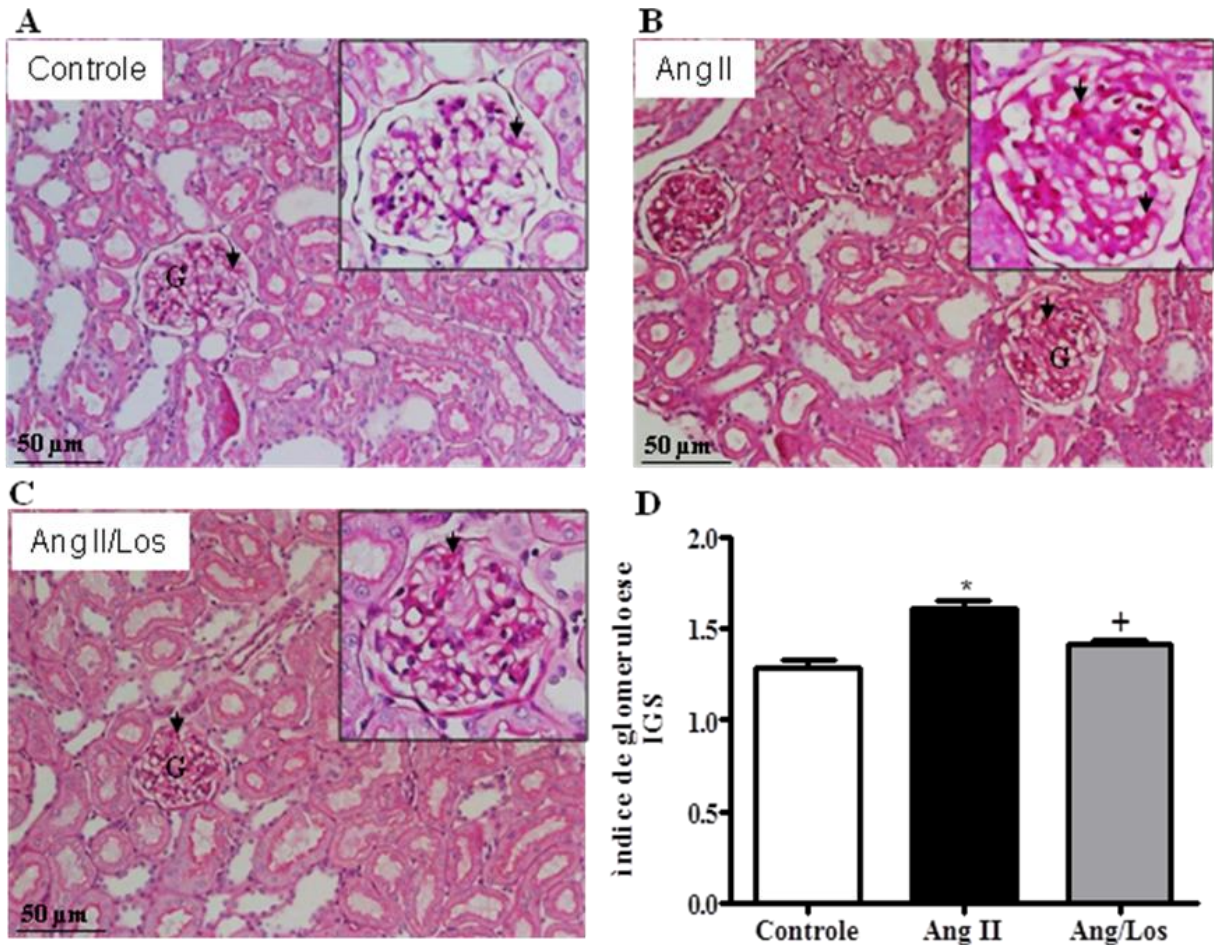
O tratamento com Ang II induziu aumento significativo da área glomerular em comparação ao grupo controle. No entanto, no grupo tratado com Ang II e losartan, os valores para a área glomerular não foram diferentes do grupo controle (**Figura 15 A - C com aumento de 400x, Figura 16 A - C e Tabela 8**).



**Figura 16:** Morfologia glomerular de ratos. Cortes transversais de 4 µm corados por Verhoeff. Foram utilizados 6 animais por grupo e seus glomérulos foram manualmente contornados, e tiveram sua área determinada pelo programa NIS-Element. imagens capturadas em aumento do 400x. Os valores são média ± EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus Ang II. G, glomérulo; Ang II, Angiotensina II; Los, Losartan; barras, 50 µm.

Conforme apresentado na **Figura 17 A - C e Tabela 8**, o tratamento com Ang II também induziu glomeruloesclerose (indicado por setas) em comparação ao grupo controle. Entretanto, no grupo tratado com Ang II e losartan esse parâmetro apresentou-se menos evidente, mas ainda elevado quando comparado ao grupo controle. O índice de glomeruloesclerose (IGS) é apresentado na **Figura 17 D e Tabela 8**.





**Figura 17:** Glomeruloesclerose em ratos. Cortes transversais de 4  $\mu\text{m}$  corados por PAS (evidencia glomeruloesclerose). Foram utilizados 6 animais por grupo e todos seus glomérulos foram classificados de acordo com o grau de glomeruloesclerose afetando a área glomerular, segundo a escala: G0 para glomérulos normais, G1 para glomérulos com até 25% da sua área afetada; G2 entre 25 a 50% da área afetada; G3 entre 50 a 75% da área afetada e G4 para mais de 75% da área afetada. Imagens capturadas em aumento de 400x. Os valores são média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus Ang II. G, glomérulo; Ang II, Angiotensina II; Los, Losartan; barras, 50  $\mu\text{m}$ .

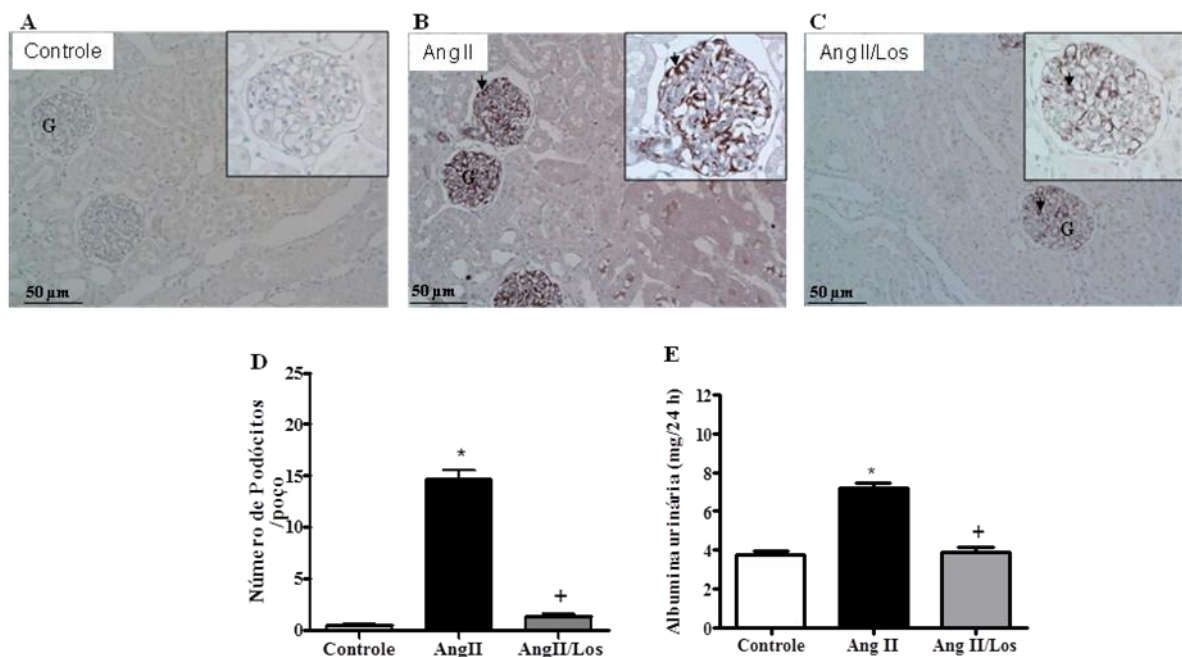
**Tabela 8:** Progressão da injúria glomerular

Parâmetros	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
Area Glomerular, $\mu\text{m}^2$	4200 $\pm$ 141	5015 $\pm$ 81*	4229 $\pm$ 161 <sup>+</sup>
Glomeruloesclerose G1, %	35,5 $\pm$ 3,8	21,6 $\pm$ 2,3*	23,2 $\pm$ 1,9*
Glomeruloesclerose G1, %	30,3 $\pm$ 0,6	30,7 $\pm$ 0,9	34,2 $\pm$ 1,4
Glomeruloesclerose G2, %	18,0 $\pm$ 2,5	22,6 $\pm$ 2,1	24,4 $\pm$ 1,7
Glomeruloesclerose G3, %	11,4 $\pm$ 1,9	15,8 $\pm$ 2,6	14,2 $\pm$ 0,8
Glomeruloesclerose G4, %	4,8 $\pm$ 0,6	9,3 $\pm$ 2,2*	4,0 $\pm$ 0,5 <sup>+</sup>
IGS	1,29 $\pm$ 0,03	1,61 $\pm$ 0,04*	1,41 $\pm$ 0,02 <sup>+</sup>

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo está indicado em parênteses. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus Ang II. G1-G4, graus de glomeruloesclerose; IGS, índice de glomeruloesclerose

Conforme apresentado na **Figura 18 A - C**, as análises de imuno-histoquímica indicam que o tratamento com Ang II induziu intensa marcação de desmina (indicado por setas) em comparação ao grupo controle. Adicionalmente, como apresentado na **Figura 18D e Tabela 9**, o tratamento com Ang II induziu perda de podócitos na urina em comparação ao grupo controle. No grupo tratado com Ang II e losartan esse parâmetro foi similar ao grupo controle.

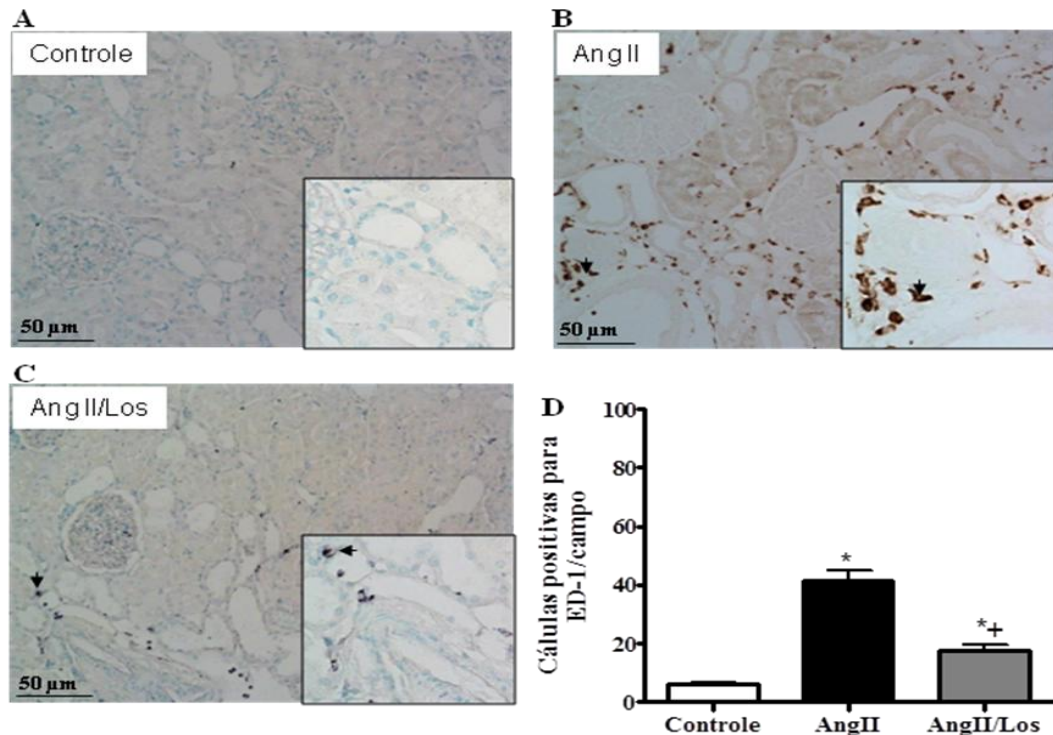
Conforme apresentado na **Figura 18 E e Tabela 9**, o tratamento com Ang II induziu albuminúria em comparação ao grupo controle, e no grupo tratado com Ang II e losartan esse parâmetro foi similar ao controle.



**Figura 18:** Marcações por imuno-histoquímica para desmina em glomérulos de ratos (A-C). Para tal, foram utilizados 5 animais por grupo e 20 glomérulos por animal. As análises foram realizadas no programa NIS-Element com imagens capturadas em aumento de 200x, e as imagens em destaque com aumento de 400x. Amostras de urina de 10 animais por grupo foram coletadas da bexiga urinária e transferidas para placas de cultura contendo colágeno do tipo I. Os podócitos aderidos foram contados com auxílio do microscópio de base invertida e as médias dos grupos estão representadas em (D). Excreção de albumina de 10 animais por grupo (E). Os valores são média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus Ang II. G, glomérulo; Los, losartan; barras, 50  $\mu$ m.

### 6.11 Imuno-histoquímica para ED-1

Conforme apresentado na **Figura 19 (A-D)** e **Tabela 9**, o tratamento com Ang II induziu aumento significativo do número de células positivas para ED-1 nas áreas tubulointesticiais em comparação ao grupo controle, e o tratamento com losartan reduziu a incidência dessas marcações.



**Figura 19:** Marcações por imuno-histoquímica para ED-1 em rins de ratos (A-D). Foram utilizados 6 animais/grupo e 50 campos/animal. As imagens foram capturadas pelo programa NIS-Elements (Nikon) com aumento de 200x e as imagens em destaque foram capturadas com aumento de 400x. As setas indicam células marcadas pelo anticorpo anti-ED-1. Os valores são média  $\pm$  EPM (E). \*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus Ang II. G, glomérulo; Ang II, Angiotensina II; Los, losartan; barras, 50  $\mu$ m.

**Tabela 9:** Podocitúria, albuminúria, contagem de células positivas para ED-1.

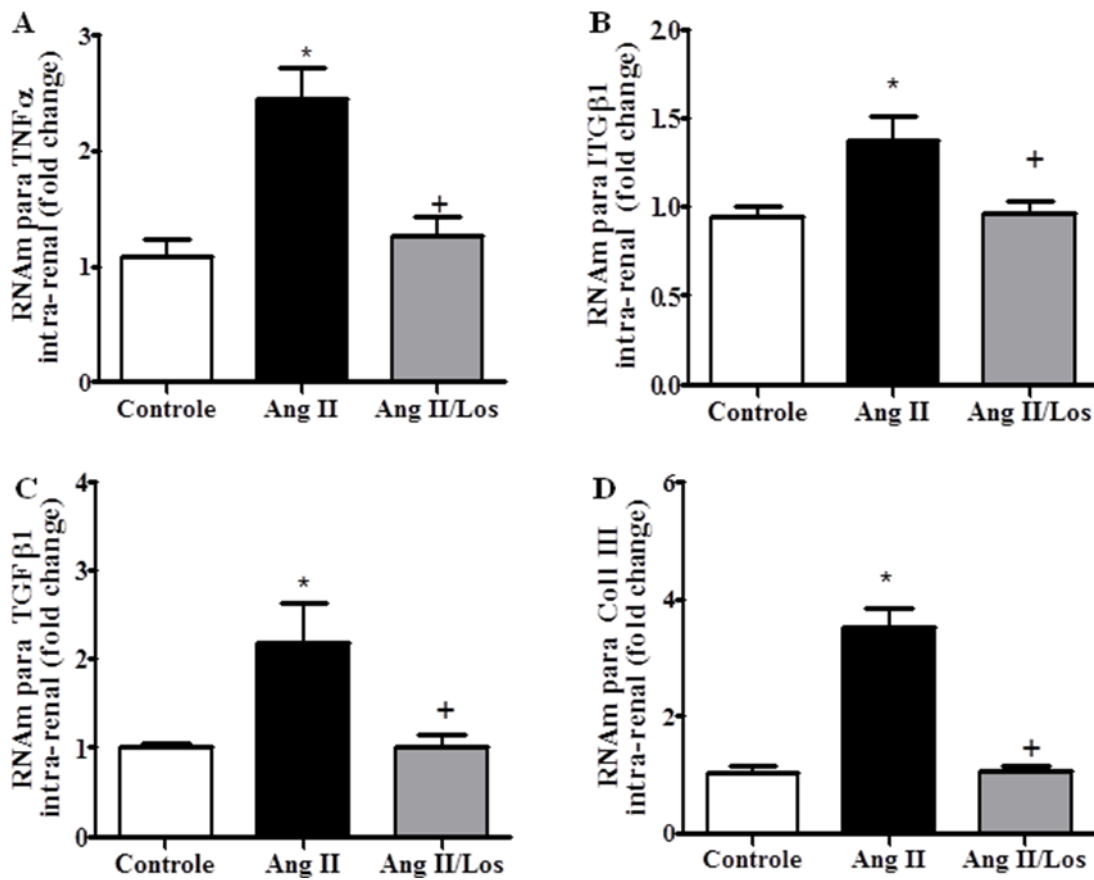
Parâmetros	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
Número do podócitos/poço	0,5 $\pm$ 0,01	14,7 $\pm$ 0,89*	1,30 $\pm$ 0,30 <sup>+</sup>
Células positivas p/ ED-1	6,61 $\pm$ 0,36	41,60 $\pm$ 3,15*	17,34 $\pm$ 2,07 <sup>+</sup>
	Controle (n = 10)	Ang II (n = 10)	Ang II/Los (n = 10)
Albuminúria, (mg/24h)	3,78 $\pm$ 0,19	7,20 $\pm$ 0,24*	3,91 $\pm$ 0,23 <sup>+</sup>

Os valores são médias  $\pm$  EPM, número de animais por grupo está indicado em parênteses.

\*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus Ang II.

### ***6.12 Expressão de RNAm intrarrenal para os componentes inflamatórios e de matriz extracelular***

Como descrito acima, as análises morfológicas e imuno-histológicas demonstraram que o tratamento com Ang II induziu mudanças severas na área glomerular e no compartimento tubulointersticial, sugerindo inflamação e fibrose no tecido renal. Esses processos são complexos e estão envolvidos com a síntese de citocinas e secreção de vários componentes da matriz extracelular. O TNF $\alpha$  por exemplo, é uma citocina produzida por macrófagos e pode estar associada a uma resposta inflamatória exacerbada. Analisamos também a expressão de RNAm para integrina  $\beta 1$  (ITG- $\beta 1$ ), TGF $\beta 1$  e colágeno III (Col III), proteínas associadas ao acúmulo de matriz extracelular. Conforme apresentado na **Figura 20 A-D e Tabela 10**, o tratamento com Ang II induziu aumento significativo na expressão de RNAm para TNF $\alpha$ , ITG- $\beta 1$ , TGF $\beta 1$  e Col III em comparação aos respectivos controles, corroborando com as análises morfológicas descritas anteriormente. No grupo tratado com Ang II e losartan esses parâmetros não foram diferentes de seus respectivos controles.



**Figura 20:** Expressão de RNAm para TNF $\alpha$  (A), integrina (ITG)  $\beta$ 1 (B), TGF- $\beta$ 1 (C) e colágeno tipo III (Col III) (D) no tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Os valores são média  $\pm$  EPM (E). \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II.

**Tabela 10:** Expressão de RNAm intrarrenal para elementos inflamatórios e de matriz extracelular

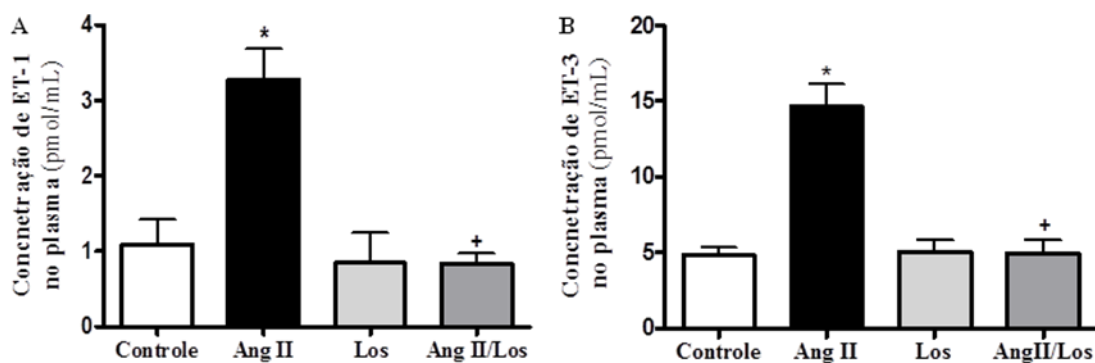
Parâmetros	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
TNF $\alpha$	1,08 $\pm$ 0,15	2,45 $\pm$ 0,27*	1,27 $\pm$ 0,16 <sup>+</sup>
ITG $\beta$ 1	0,94 $\pm$ 0,06	1,37 $\pm$ 0,13*	0,96 $\pm$ 0,06 <sup>+</sup>
TGF $\beta$ 1	1,00 $\pm$ 0,04	2,19 $\pm$ 0,04*	1,04 $\pm$ 0,14 <sup>+</sup>
Col III	1,03 $\pm$ 0,12	3,51 $\pm$ 0,34*	1,06 $\pm$ 0,09 <sup>+</sup>

Os valores são médias  $\pm$  EPM, número de animais por grupo está indicado em parênteses. \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus Ang II. TNF $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; (ITG)  $\beta$ 1, integrina beta 1; ITGF $\beta$ 1, fator de transformação do crescimento beta 1 e Col III, colágeno do tipo III.

### 6.13 Efeito da Ang II e/ou losartan na síntese de endotelinas 1 e 3

Considerando que a Ang II pode estimular o sistema endotelinas, investigamos o efeito da mesma sobre a síntese das endotelinas 1 (ET-1) e 3 (ET-3). A determinação das concentrações das ETs plasmáticas foram feitas por método de ELISA, utilizando os kits: *Endothelin-1 (ET-1) (Human, Rat, Mouse, Porcine, Bovine, Canine, Rabbit, Monkey) - EIA* e *Endothelin-3 (ET-3) (Human, Rat, Porcine) - EIA* (Phoenix Pharmaceuticals), que também já foram utilizados em outros estudos, (129, 130).

Nossos resultados (**Figura 21 A e B e Tabela 11**) demonstram que o tratamento com Ang II induziu aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ET-1 e ET-3 em relação aos respectivos controles, e no grupo tratado com Ang II e losartan esses parâmetros foram similares aos respectivos controles.



**Figura 21:** Efeito da Ang II e/ou losartan nas concentrações plasmáticas de ET-1 e ET-3. Os valores são média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, Losartan.

**Tabela 11:** Efeito da Ang II na síntese de endotelinas 1 e 3

Parâmetros	Controle (n = 6)	Ang II (n = 6)	Los (n = 6)	Ang II/Los (n = 6)
ET-1 Plasmática, pmol/mL	1,09 $\pm$ 0,20	3,28 $\pm$ 0,86*	0,84 $\pm$ 0,40	0,84 $\pm$ 0,12 <sup>+</sup>
ET-3 Plasmática, pmol/mL	4,84 $\pm$ 0,37	14,64 $\pm$ 0,79*	5,04 $\pm$ 0,75	4,89 $\pm$ 0,91 <sup>+</sup>

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses.

\* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus Ang II. Ang II, Angiotensina II; Los, losartan.

ET, Endotelina.



## 7 RESULTADOS - ESTUDO COM ENDOTELINA 3 (ET-3)

Assim como no estudo com angiotensina II, no estudo com endotelina 3, a maioria dos parâmetros investigados com os antagonistas dos receptores ETA (atrasentan) e ETB (BQ788) não apresentaram diferenças em relação aos respectivos grupos controles. Por isso, esses grupos quando apresentados nos gráficos, não serão descritos ou discutidos.

### 7.1 Efeitos de ET-3 e/ou atrasentan ou BQ788 sobre os parâmetros fisiológicos

Conforme apresentado na **Tabela 12**, o tratamento com ET-3 e/ou atrasentan ou BQ788 não alterou a ingestão diária de ração, o ganho de peso ou o peso renal em relação aos respectivos controles. Entretanto, o grupo tratado com ET-3 ingeriu mais água em comparação ao controle. O tratamento com atrasentan ou BQ788 reduziu o efeito de ET-3 sobre esse parâmetro.

**Tabela 12:** Parâmetros fisiológicos para os animais controles, tratados com ET-3 (1 pmol/min/kg) e/ou antagonistas dos receptores ETA (atrasentan, 100 nM/kg/dia) e ETB (BQ788, 4 mM/kg/dia).

Parâmetros	Controle (n = 8)	ET-3 (n = 8)	ATR (n = 4)	ET-3/ATR (n = 4)	BQ788 (n = 8)	ET-3/BQ (n = 8)
Ingestão de ração, g/dia	20,7 ± 1,9	20,1 ± 2,8	16,6 ± 1,7	16,4 ± 1,5	23,3 ± 1,4	23,0 ± 0,9
Peso corpóreo final, g	356 ± 6	364 ± 6	381 ± 9	373 ± 9	368 ± 11	364 ± 11
Ganho de peso, g/semana	33 ± 1	34 ± 1	28,7 ± 1,8	28,8 ± 1,7	34 ± 2	32 ± 2
Peso Rim, mg	1.541 ± 4	1.570 ± 3	1.529 ± 59	1.459 ± 34	1.411 ± 9	1.554 ± 7
Razão rim /animal, mg/g	8,3 ± 0,3	8,4 ± 0,1	8,1 ± 0,2	7,5 ± 0,2	7,2 ± 0,4	7,6 ± 0,2
Ingestão de água, mL/dia	37,1 ± 2,1	44,4 ± 1,5*	34,4 ± 2,7	33,2 ± 1,9 <sup>+</sup>	33,6 ± 2,0	33,1 ± 1,6 <sup>+</sup>

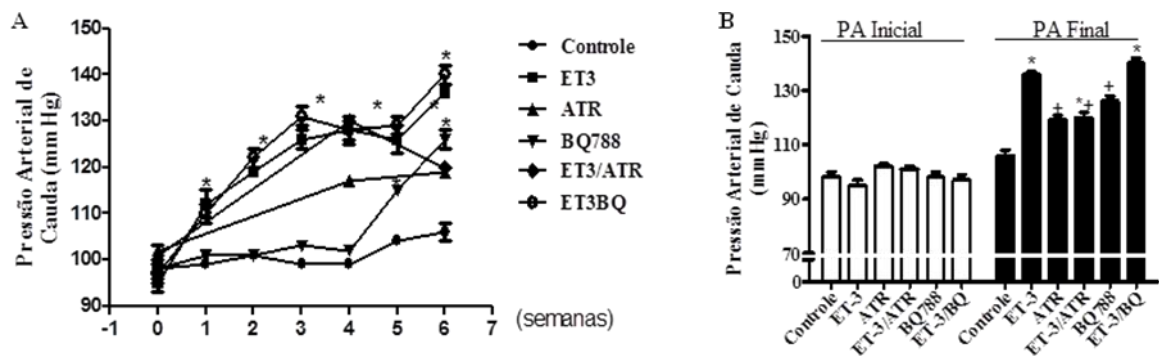
Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. ET-3, Endotelina 3; ATR, atrasentan (antagonista do receptor ETA) e BQ, BQ788 (antagonista do receptor ETB). \*p<0,05 versus controle.



## 7.2 Efeito de ET-3 e/ou atrasentan ou BQ788 sobre a pressão arterial de cauda

A medida de pressão arterial foi avaliada semanalmente por pletismografia de cauda, com os animais acordados. Conforme apresentado na **Figura 22 A**, no início do estudo (semana zero) a pressão arterial de cauda era similar entre os grupos. No grupo tratado com ET-3, a PA aumentou progressivamente em comparação ao grupo controle. O tratamento com atrasentan atenuou o aumento progressivo da PA induzida por ET-3. Porém, o tratamento com BQ 788 não só induziu significativo aumento da PA, como também não alterou o efeito da ET-3 sobre esse parâmetro.

Os valores médios da PA inicial e final para cada grupo são apresentados na **Figura 22 B** e **Tabela 13**.



**Figura 22:** Efeito de ET-3 (1 pmol/min/kg) e/ou atrasentan (100 nM/kg/dia) ou BQ788 (4 mM/kg/dia) na progressão da pressão arterial de cauda (A). Os valores médios da PA inicial e final também são apresentados (B). Os valores são média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  versus controle;  $^+ p < 0,05$  versus ET-3. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3.

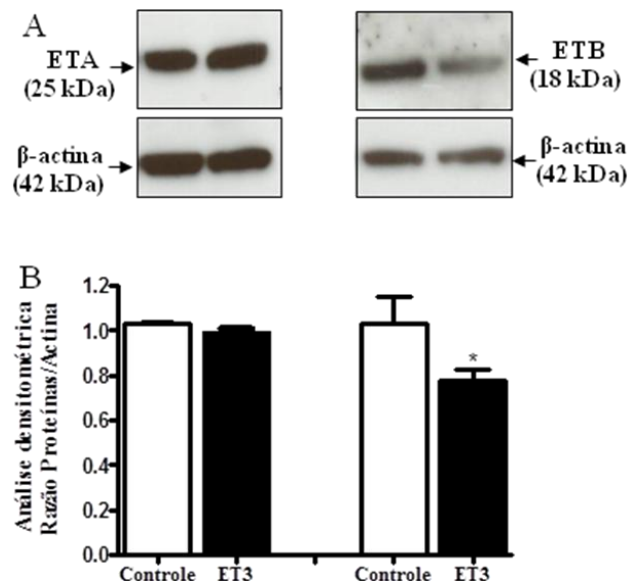
**Tabela 13:** Pressão arterial de cauda de animais controles, tratados com ET-3 (1 pmol/min/kg) e/ou antagonistas dos receptores ETA (atrasentan, (100 nM/kg/dia) e ETB (BQ788, 4 mM/kg/dia).

Parâmetros	Controle (n = 8)	ET-3 (n = 8)	ATR (n = 4)	ET-3/ATR (n = 4)	BQ788 (n = 8)	ET-3/BQ (n = 8)
PA Inicial, mm Hg	98 ± 2	95 ± 2	102 ± 1	101 ± 1	98 ± 2	97 ± 2
PA Final, mm Hg	106 ± 2	136 ± 1*	119 ± 2*	120 ± 2**	126 ± 2*	140 ± 2*

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. \*  $p < 0.05$  versus controle, \*\*  $p < 0.05$  versus endotelina 3; Endotelina 3; ATR atrasentan; BQ, BQ788.

### 7.2.1 Expressão dos Receptores para Endotelinas

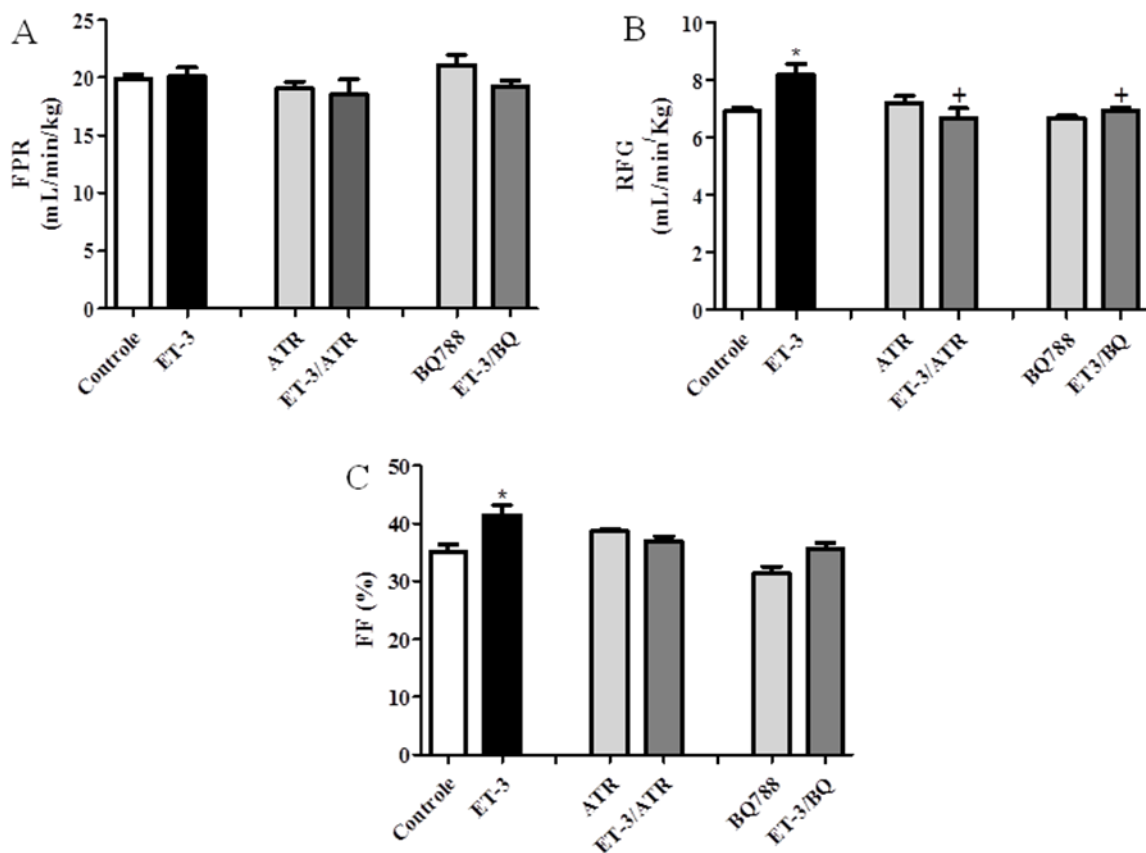
A avaliação da expressão dos receptores para as endotelinas por *Western blot* (**Figura 23 A e B**) indica que o tratamento com ET-3 não alterou a expressão dos receptores ETA, mas reduziu a expressão dos receptores ETB em relação ao grupo controle [ETA (Controle:  $1,02 \pm 0,01$ , ET-3:  $0,98 \pm 0,02$ ); ETB (Controle  $1,03 \pm 0,01$ , ET-3:  $0,78 \pm 0,04$ )].



**Figura 23:** Efeito de ET-3 (1 pmol/min/kg) na expressão proteica dos receptores ETA e ETB. (A) experimento representativo; (B) valores médios obtidos por análise densitométrica de 5 animais. Os valores são média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus Controle. ET-3, endotelina-3.

### 7.3 Hemodinâmica Renal e Fluxo Urinário

Conforme apresentado na **Figura 24 A, B e Tabela 14** o tratamento com ET-3 não alterou o fluxo plasmático renal, mas induziu aumento significativo no ritmo de filtração glomerular e na fração de filtração em comparação aos respectivos controles. O tratamento com atrasentan ou BQ788 atenuou o efeito de ET-3 sobre o RFG, mas não alterou a fração de filtração.



**Figura 24:** Efeito de ET-3 (1 pmol/min/kg) e/ou atrasentan (100 nM/kg/dia) ou BQ788 (4 mM/kg/dia) no fluxo plasmático renal (FPR) (A), ritmo de filtração glomerular (RFG) (B) e fração de filtração (FF) (C). Os valores são média ± EPM. \*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus ET-3. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3.

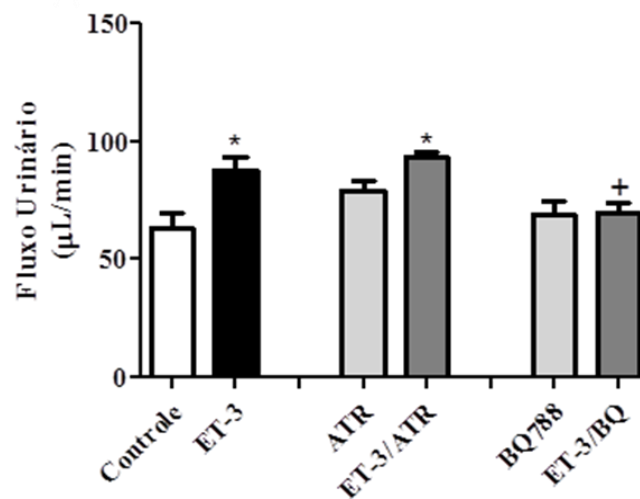
**Tabela 14:** Hemodinâmica renal de animais tratados com ET-3 (1 pmol/min/kg) e/ou atrasentan (100 nM/kg/dia) ou BQ788 (4 mM/kg/dia).

Parâmetros	Controle (n = 8)	ET-3 (n = 8)	ATR (n = 4)	ET-3/ATR (n = 4)	BQ788 (n = 8)	ET-3/BQ (n = 8)
FPR, mL/min/kg	19,9 ± 0,4	20,8 ± 0,8	19,0 ± 0,6	18,5 ± 0,9	20,0 ± 0,8	19,3 ± 0,4
RFG, mL/min/kg	6,9 ± 0,1	8,0 ± 0,4*	7,2 ± 0,3	6,7 ± 0,3 <sup>+</sup>	6,7 ± 0,1	7,0 ± 0,1 <sup>+</sup>
Fração de Filtração, %	35,1 ± 1,2	41,5 ± 1,7*	38,7 ± 0,6	36,9 ± 1,2	31,3 ± 1,2	35,6 ± 1,0

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. FPR, fluxo plasmático renal; RFG, ritmo de filtração glomerular. \*  $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup>  $p < 0,05$  versus ET-3. ET-3, Endotelina 3; ATR, atrasentan BQ, BQ788.

#### 7.4 Fluxo Urinário e manuseio renal de $\text{Na}^+$

Conforme apresentado na **Figura 25** e **Tabela 15**, o tratamento com ET-3 induziu aumento no fluxo urinário, em comparação ao grupo controle. O tratamento com BQ788 impediu o aumento do fluxo urinário, enquanto o tratamento com atrasentan manteve o efeito de ET-3 sobre este parâmetro. Nenhum dos tratamentos modificou a concentração do íon  $\text{Na}^+$  no plasma. O tratamento com ET-3 induziu aumento significativo da carga filtrada de  $\text{Na}^+$ , mas não alterou a carga excretada nem a fração de excreção desse íon. Possivelmente este aumento esteja relacionado ao aumento do RFG. Nos grupos tratados com ET-3 e atrasentan ou BQ788 esses parâmetros não foram diferentes do grupo controle.



**Figura 25:** Efeito da Endotelina 3 (1 pmol/min/kg) e/ou atrasentan (100 nM/kg/dia) ou BQ788 (4 mM/kg/dia) sobre o fluxo urinário (V). Os valores são média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus ET-3. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3.

**Tabela 15:** Fluxo urinário e manejo renal de Na<sup>+</sup> de animais tratados com ET-3 (1 pmol/min/kg) e/ou atrasentan (100 nM/kg/dia) ou BQ788 (4 mM/kg/dia).

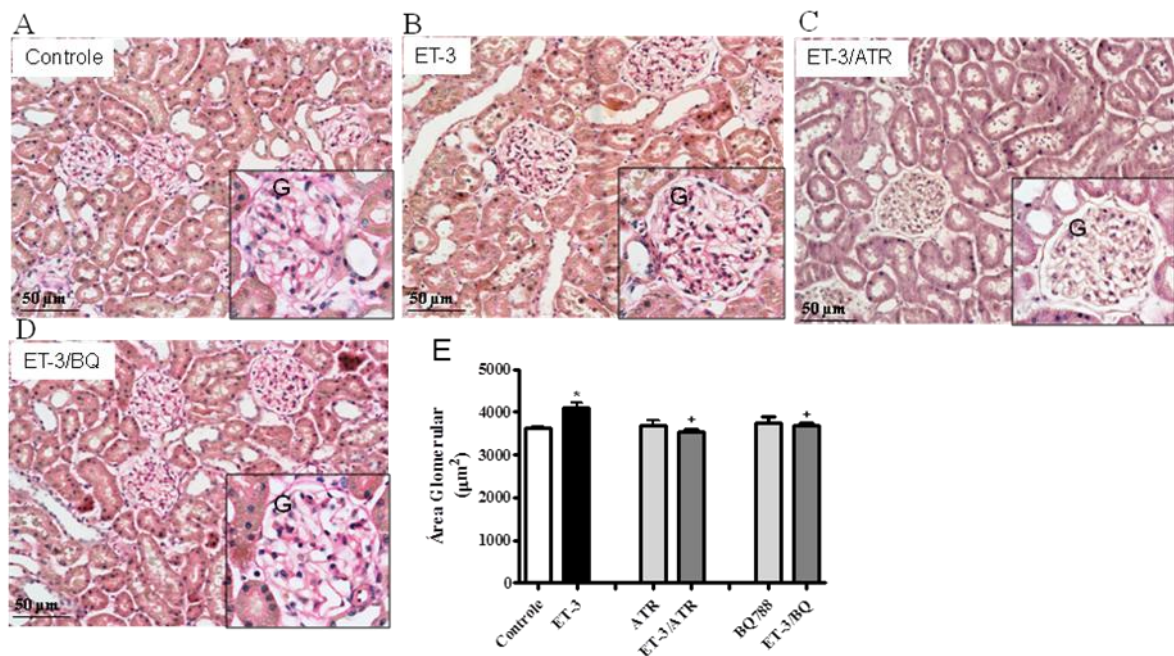
Parâmetros	Controle (n = 8)	ET-3 (n = 8)	ATR (n = 4)	ET-3/ATR (n = 4)	BQ788 (n = 8)	ET-3/BQ (n = 8)
Fluxo Urinário (V), $\mu\text{L}/\text{min}$	63 $\pm$ 7	88 $\pm$ 6*	79 $\pm$ 4	94 $\pm$ 3*	69 $\pm$ 6	69 $\pm$ 4*
Na <sup>+</sup> plasmático, mEq/L	139 $\pm$ 2	136 $\pm$ 2	132 $\pm$ 3	131 $\pm$ 2	135 $\pm$ 2	138 $\pm$ 2
Carga filtrada de Na <sup>+</sup> , mEq/min	929 $\pm$ 43	1164 $\pm$ 37*	911 $\pm$ 35	880 $\pm$ 42*	970 $\pm$ 43	958 $\pm$ 34*
Carga excretada, mEq/min	3,6 $\pm$ 0,8	4,0 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,6
Fração de excreção de Na <sup>+</sup> %	0,33 $\pm$ 0,11	0,35 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,07

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. Carga filtrada (CF) de Na<sup>+</sup> (RFG  $\times$  P<sub>Na<sup>+</sup></sub>); Carga excretada (CE) de Na<sup>+</sup> (U<sub>Na<sup>+</sup></sub>  $\times$  v); fração de excreção de Na<sup>+</sup> (CE<sub>Na<sup>+</sup></sub>/CF<sub>Na<sup>+</sup></sub>)  $\times$  100. \*  $p < 0,05$  versus controle; †  $p < 0,05$  versus ET-3. ET-3, endotelina 3; ATR, atrasentan; bQ, BQ788.

## 7.5 Morfologia glomerular

### 7.5.1 Área glomerular

Conforme apresentado na **Figura 26 A-E** e **Tabela 16**, O tratamento com ET-3 (B) induziu aumento significativo na área glomerular em comparação ao grupo controle (A) e o tratamento com atrasentan (C) ou BQ788 (D) restaurou esse parâmetro para valores próximos ao controle.

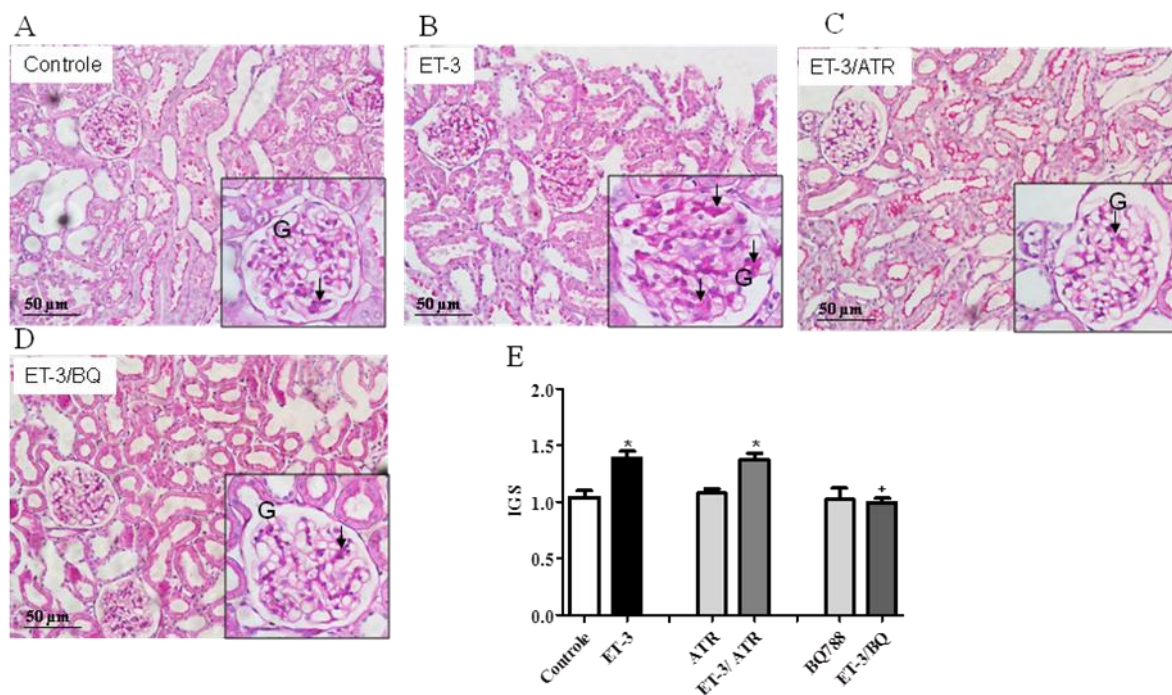


**Figura 26:** Morfologia glomerular de ratos. Cortes transversais de 4 µm corados por *Verhoeff*. Foram utilizados de 4 a 6 animais por grupo, os glomérulos foram manualmente contornados e a área foi determinada pelo programa NIS-Element. Imagens capturadas em aumento de 200x, imagem em destaque em aumento de 400x. Os valores são média ± EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus ET-3. G, glomérulo; ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3. Barras, 50 µm.



### 7.5.2 Glomeruloesclerose

Conforme apresentado na **Figura 27 A-E** e **Tabela 16**, o tratamento com ET-3 (B) também induziu glomeruloesclerose (indicado por setas) em comparação ao grupo controle (A). O tratamento com atrasentan (C) não alterou o efeito da ET-3, mas o tratamento com BQ788 (D) conseguiu conter os efeitos da ET-3, ficando similar ao grupo controle. O índice de glomeruloesclerose (IGS) é apresentado na **Figura 27 E** e **Tabela 16**.



**Figura 27:** Glomeruloesclerose em ratos. Cortes transversais de 4 µm corados por PAS (evidência glomeruloesclerose). Foram utilizados 4-6 animais por grupo e todos seus glomérulos foram classificados de acordo com o grau de glomeruloesclerose afetando a área glomerular, segundo a escala: G0 para glomérulos normais, G1 para glomérulos com até 25% da sua área afetada; G2 entre 25 a 50% da área afetada; G3 entre 50 a 75% da área afetada e G4 para mais de 75% da área afetada. Imagens capturadas em aumento de 200x e 400x. Os valores são média ± EPM. \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus ET-3. G, glomérulo; ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3. Barras, 50 µm.

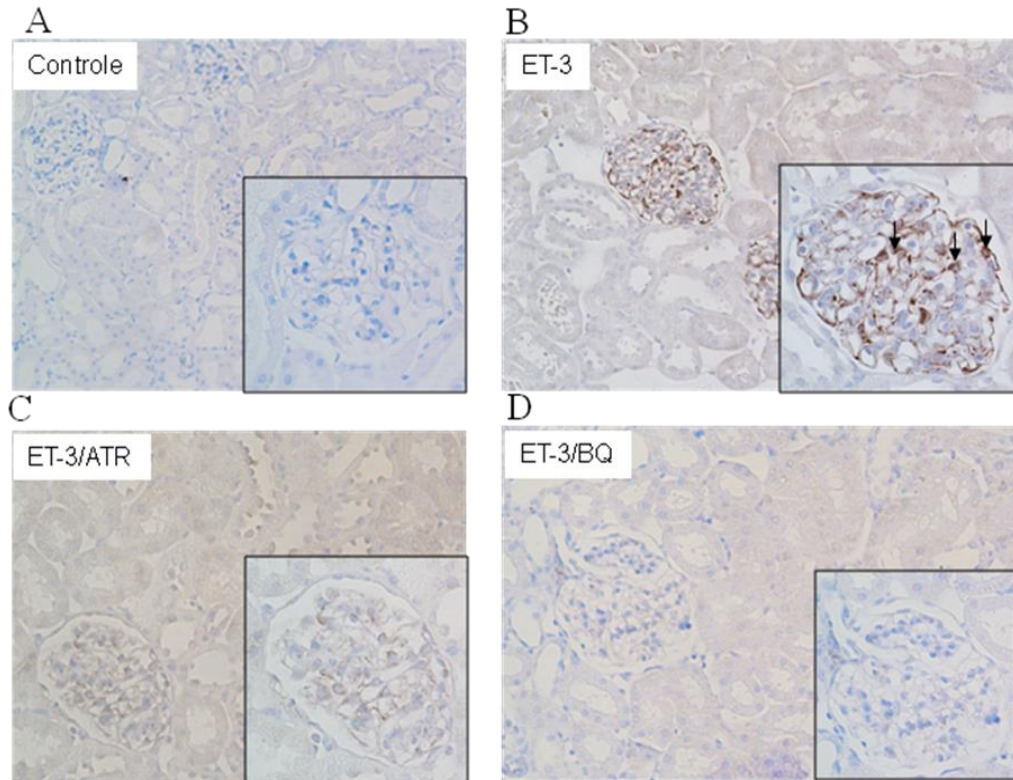
**Tabela 16:** Morfologia glomerular

Parâmetros	Controle (n = 8)	ET-3 (n = 8)	ATR (n = 4)	ET-3/ATR (n = 4)	BQ (n = 8)	ET-3/BQ (n = 8)
Área glomerular, $\mu\text{m}^2$	3.635 $\pm$ 26	4.096 $\pm$ 124*	3962 $\pm$ 103	3534 $\pm$ 71 <sup>+</sup>	3.730 $\pm$ 162	3.677 $\pm$ 66 <sup>+</sup>
Glomeruloesclerose 0, %	40,8 $\pm$ 1,4	25,4 $\pm$ 1,3*	40 $\pm$ 1,8	31,1 $\pm$ 1,5*	32,2 $\pm$ 5,0	39,5 $\pm$ 3,2 <sup>+</sup>
Glomeruloesclerose 1, %	31,4 $\pm$ 1,5	35,4 $\pm$ 3,6	30,1 $\pm$ 1,6	27,9 $\pm$ 1,1	39,5 $\pm$ 1,9	34,0 $\pm$ 3,4
Glomeruloesclerose 2, %	15,2 $\pm$ 1,5	21,3 $\pm$ 1,2*	15,2 $\pm$ 0,8	21,4 $\pm$ 1,4*	22,4 $\pm$ 3,3	17,1 $\pm$ 1,2
Glomeruloesclerose 3, %	8,1 $\pm$ 1,6	10,7 $\pm$ 1,6	9,5 $\pm$ 1,0	12,0 $\pm$ 1,0	5,9 $\pm$ 2,1	6,1 $\pm$ 1,2
Glomeruloesclerose 4, %	4,5 $\pm$ 1,4	7,1 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 0,8	7,7 $\pm$ 2,1	-	3,2 $\pm$ 1,6
IGS	1,04 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,06*	1,08 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,07*	1,02 $\pm$ 0,14	0,99 $\pm$ 0,05 <sup>+</sup>

Valores são médias  $\pm$  SE, número de animais por grupo está indicado em parênteses. \* $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus ET-3. ET-3, Endotelina 3; ATR, atramentam; BQ, BQ 788 e IGS, índice de glomeruloesclerose.

### 7.5.3 Expressão de desmina

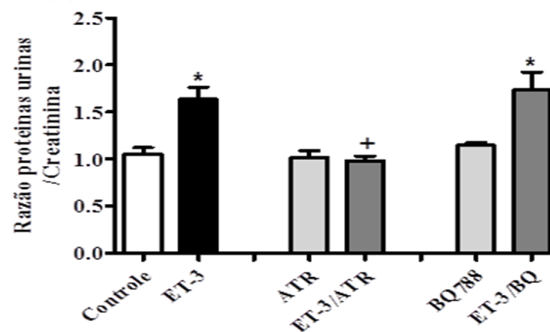
Conforme apresentado na **Figura 28 A-C**, as análises de imuno-histoquímica indicam que o tratamento com ET-3 (B) induziu intensa marcação de desmina (indicado por setas) em comparação ao grupo controle (A). No grupo tratado com ET-3 e atrasentan (C) ou BQ788 (D), esse parâmetro foi similar ao controle.



**Figura 28:** Marcações por imuno-histoquímica para desmina em glomérulos de ratos (A-D). Para tal, foram utilizados 3-5 animais por grupo e 30 glomérulos por animal. As análises foram realizadas no programa NIS-Element com imagens capturadas em aumento de 200x, e as imagens em destaque com aumento de 400x. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3. Barras, 50  $\mu$ m.

## 7.6 Proteinúria

Conforme apresentado na **Figura 29 A e Tabela 17**, o tratamento com ET-3 induziu significativo aumento de proteínas na urina (representadas pela razão proteínas totais/creatinina) em comparação ao grupo controle. No grupo tratado com ET-3 e atrasentan este parâmetro não foi diferente do controle. Entretanto, o BQ788 não corrigiu a proteinúria induzida por ET-3.



**Figura 29:** Razão proteínas/creatinina urinária. Para as análises foram utilizadas as amostras de urina da gaiola metabólica de 8 animais/grupo. Os valores são média  $\pm$  EPM (D). \* $p < 0,05$  versus controle; + $p < 0,05$  versus ET-3. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3.

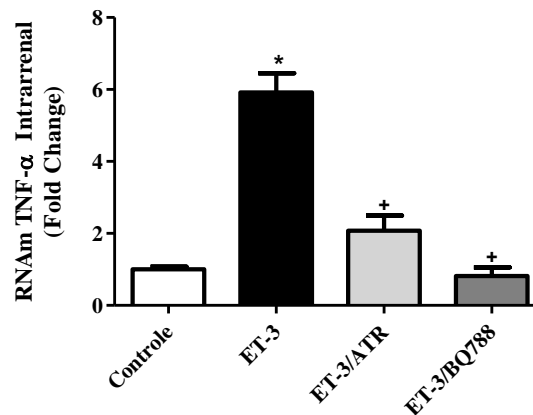
**Tabela 17:** Concentração de proteínas na urina.

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle (n = 8)</b>	<b>ET-3 (n = 8)</b>	<b>ATR (n = 4)</b>	<b>ET-3/ATR (n = 4)</b>	<b>BQ788 (n = 8)</b>	<b>ET-3/BQ (n = 8)</b>
Razão proteínas/Cr na urina	1,05 ± 0,06	1,64 ± 0,13*	1,02 ± 0,07	0,96 ± 0,05 <sup>†</sup>	1,14 ± 0,03	1,73 ± 0,01*

Os valores são média ± EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. \*  $p < 0,05$  versus controle; <sup>†</sup>  $p < 0,05$  versus ET-3. ET-3, Endotelina 3; ATR, Atrasentam; BQ, BQ788.

### 7.7 Expressão de RNAm para TNF $\alpha$ intrarrenal

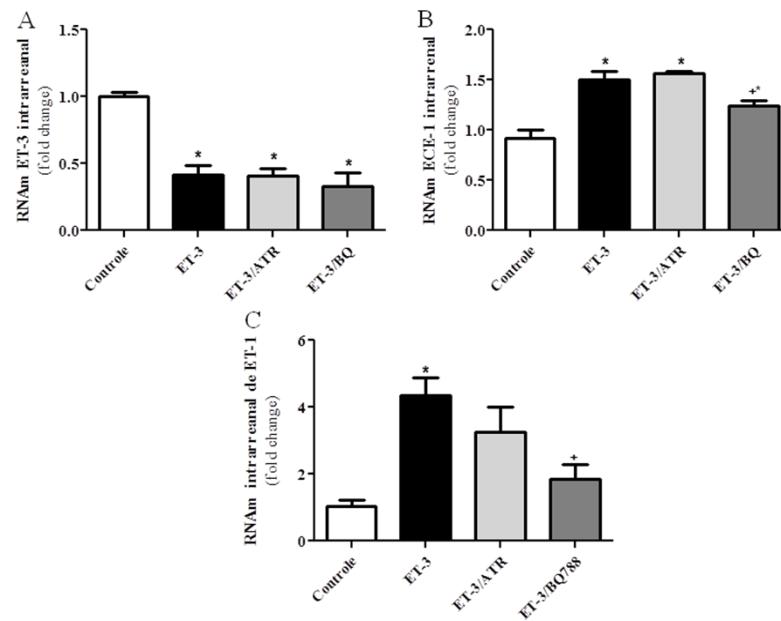
Conforme apresentado na **Figura 30 e Tabela 18**, o tratamento com ET-3 induziu significativo aumento na expressão de RNAm para TNF $\alpha$  no tecido renal. O tratamento com ET-3 e atrasentan ou BQ788 manteve esse parâmetro próximo ao grupo controle.



**Figura 30:** Expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  intrarrenal em animais tratados com ET-3 e atrasentan ou BQ788, simultaneamente. Foram utilizados 4 animais/grupo, e os valores são média  $\pm$  EPM (E). \*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus ET-3. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3.

### 7.8 Expressão de RNAm para os componentes do sistema endotelinas intrarrenal

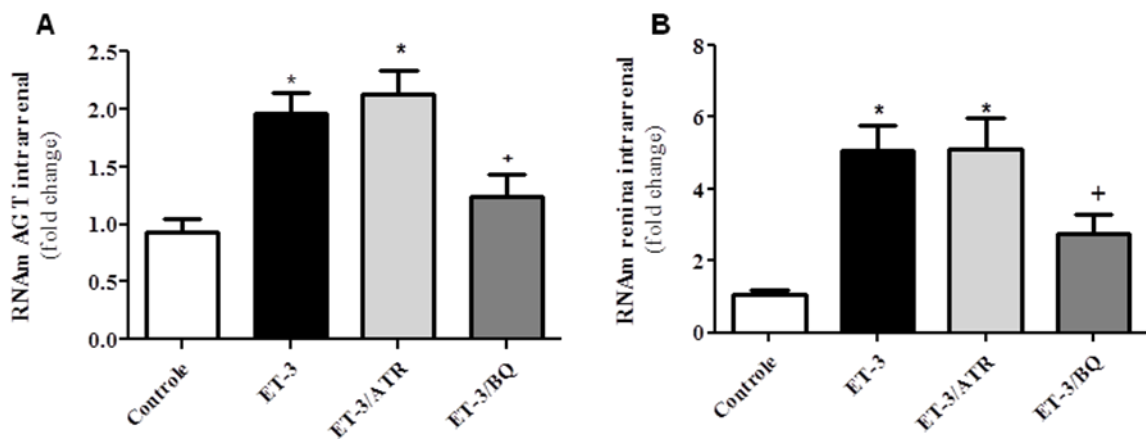
Conforme apresentado na **Figura 31 A-C e Tabela 18**, o tratamento com ET-3 reduziu a expressão de RNAm para a própria ET-3 intrarrenal, em comparação ao grupo controle. Entretanto, nessa condição se observou um aumento significativo de RNAm para a enzima conversora de endotelina (ECE-1) e para a endotelina 1 em comparação aos respectivos controles. O tratamento com atrasentan não alterou os efeitos de ET-3 sobre tais parâmetros, e o tratamento com BQ788 não alterou o efeito de ET-3 sobre a síntese de RNAm para ET-3, mas reduziu os efeitos do peptídeo sobre a síntese de RNAm para ECE-1 e ET-1.



**Figura 31:** Expressão de RNAm para os componentes do sistema endotelinas intrarrenal de animais tratados com ET-3 e atrasentan ou BQ788, simultaneamente (A-D). Foram utilizados 4-6 animais/grupo, e os valores são média  $\pm$  EPM (E). \*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus ET-3. ART, atrasentan; BQ, BQ788.

### 7.9 Expressão de RNAm para os componentes do SRA intrarrenal

Conforme apresentado na **Figura 32 A,B e Tabela 18**, o tratamento com ET-3 induziu aumento significativo na expressão de RNAm para o angiotensinogênio e renina no tecido renal, comparando aos respectivos controles. O tratamento com atrasentan não alterou o efeito de ET-3 sobre esses parâmetros, e o tratamento com BQ788 reduziu o efeito do peptídeo sobre a síntese de RNAm para angiotensinogênio e renina.



**Figura 32:** Expressão de RNAm para os componentes do sistema renina-angiotensina intrarrenal de animais tratados com ET-3 e atrasentan ou BQ788, simultaneamente (A-B). Foram utilizados 4-6 animais/grupo, e os valores são média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  versus controle; +  $p < 0,05$  versus ET-3. ATR, atrasentan; BQ, BQ788; ET-3, endotelina 3.

**Tabela 18:** Expressão de RNAm para os componentes do sistema endotelinas e sistema renina-angiotensina intrarrenais.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle (n = 8)</b>	<b>ET-3 (n = 8)</b>	<b>ET-3/ATR (n = 4)</b>	<b>ET-3/BQ (n = 8)</b>
TNF- $\alpha$ , <i>fold change</i>	1,01 $\pm$ 0,07	5,90 $\pm$ 0,05*	2,01 $\pm$ 0,04 <sup>+</sup>	0,82 $\pm$ 0,02 <sup>+</sup>
RNAm para ET-3, <i>fold change</i>	1,01 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,07*	0,41 $\pm$ 0,05*	0,33 $\pm$ 0,04*
RNAm para ECE 1, <i>fold change</i>	0,92 $\pm$ 0,08	1,50 $\pm$ 0,08*	1,56 $\pm$ 0,01*	1,24 $\pm$ 0,04 <sup>+</sup> *
RNAm para ET-1, <i>fold change</i>	1,05 $\pm$ 0,18	4,36 $\pm$ 0,51*	3,26 $\pm$ 0,74*	1,84 $\pm$ 0,45 <sup>+</sup>
RNAm para AGT, <i>fold change</i>	0,93 $\pm$ 0,11	1,96 $\pm$ 0,18*	2,13 $\pm$ 0,19*	1,24 $\pm$ 0,19 <sup>+</sup>
RNAm para renina, <i>fold change</i>	1,04 $\pm$ 0,14	5,60 $\pm$ 0,73*	5,19 $\pm$ 0,86*	2,75 $\pm$ 0,54 <sup>+</sup> *

Os valores são média  $\pm$  EPM, número de animais por grupo é indicado entre parênteses. \*  $p < 0,05$  versus controle; <sup>+</sup> $p < 0,05$  versus ET-3. ET-3, Endotelina 3; ATR, Atrasentam; BQ, BQ788.



## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 *Animais tratados com Ang II e Ang II/losartan*

Estudos prévios demonstraram que a estimulação crônica do sistema renina angiotensina sistêmico por uma ou duas semanas induz hipertensão arterial, aumento da contratilidade das células da musculatura lisa vascular e da resistência vascular periférica (42). Outro potencial mecanismo pelo qual a Ang II pode mediar a persistência da hipertensão arterial envolve o efeito do peptídeo nos rins (131). Adicionalmente, outros estudos demonstram a importância dos antagonistas dos receptores AT1 em prevenir a hipertensão arterial (112, 132). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, uma vez que no modelo estudado (infusão de Ang II por 6 semanas), a hipertensão arterial foi persistente e sensível ao losartan (antagonista de AT1).

Em modelos animais com hipertensão arterial induzida por infusão de Ang II se espera o aumento da concentração da Ang II no plasma (133), fato corroborado pelos nossos estudos, onde também observamos esse aumento.

Considerando que um aumento da Ang II sistêmica pode regular a atividade do SRA intrarrenal (134), avaliamos a função do SRA intrarrenal em nosso modelo animal. Nossos dados demonstraram que a dose de Ang II utilizada foi suficiente para garantir o aumento das concentrações intrarrenais de Ang I e Ang II. Esses resultados sugerem um mecanismo de retroalimentação positiva da Ang II sistêmica sobre a ativação do SRA intrarrenal. Embora não se conheça o mecanismo exato, sabe-se que a Ang II induz a síntese do TGF- $\beta$ 1 e do fator nuclear -  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), o qual estimula a síntese de angiotensinogênio (135). Embora a Ang II não tenha alterado a expressão dos receptores AT1 e AT2, nossos dados demonstraram que AT1 contribuiu para a internalização e/ou síntese intrarrenal das Ang I e Ang II. Esses dados foram confirmados pela ação de losartan, que reduziu o estímulo da Ang II sobre o SRA intrarrenal. Adicionalmente, vários estudos sugerem que a estimulação crônica do SRA intrarrenal acarreta em ações patogênicas da Ang II, via AT1, nos processos inflamatórios e de estresse oxidativo do tecido renal (136, 137). Em parte, esses achados convergem com os nossos resultados, com os quais observamos um efeito positivo da Ang II, via AT1 na síntese de TNF $\alpha$  e TGF $\beta$ 1. O aumento na expressão do RNAm intrarrenal para renina, observado no grupo tratado apenas com losartan pode ser explicado pela inibição do mecanismo de retroalimentação negativa da Ang II sobre as células justaglomerulares, onde a ação da Ang II, via AT1, reduz a secreção e a expressão de RNAm para renina. Portanto o

bloqueio de AT1 eleva a produção de renina intrarrenal, principalmente na região cortical (138).

O efeito crônico de Ang II sobre a hemodinâmica renal é extensivamente estudado por importantes pesquisadores, incluindo Barry M. Brenner; Gabriel L. Navar e seus colaboradores, entre outros (139, 140). Vários estudos também demonstraram que em ratos ou camundongos, o efeito crônico de Ang II por uma ou duas semanas, induz aumento da resistência nos vasos pré-glomerulares e arteríolas eferentes, aumentando a resistência vascular renal por induzir remodelamento hipertrófico para dentro em algumas ramificações dos vasos pré-glomerulares. Essas alterações associadas à redução do lúmen dos vasos pré-glomerulares, resultam na redução do FPR, RFG (53, 54, 141) e do coeficiente de ultrafiltração glomerular (Kf) (85), com consequente perda de néfrons funcionais.

Brenner e colaboradores propuseram que a progressão de algumas das doenças renais crônicas, esteja associada à perda dos néfrons funcionais remanescentes, que sofrem injúrias devido a um processo de hiperfiltração, na tentativa de compensar os néfrons perdidos (58, 139). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, uma vez que em nosso modelo animal, a hipertensão arterial decorrente da interação entre Ang II e o receptor AT1 também resultou em hipertrofia glomerular e um significativo aumento no lúmen dos vasos pré-glomerulares, o que resultou no aumento do FPR e do RFG, o que pode ser uma resposta compensatória devido à perda de néfrons funcionais, ou perda da capacidade de autorregulação desses vasos.

O aumento do ritmo de filtração glomerular induzida por Ang II via AT1 foi acompanhada pelo aumento do fluxo urinário, da filtração e da carga excretada de  $\text{Na}^+$ . Entretanto, não alterou a concentração urinária de  $\text{Na}^+$  o que demonstra a presença de mecanismos atuantes na regulação do balanço de  $\text{Na}^+$  para a manutenção do volume do fluido extracelular. A excreção de  $\text{Na}^+$  é bastante complexa, uma vez que depende da dose e duração do tratamento com Ang II, bem como da magnitude da resposta hipertensiva (142). Estudos que utilizaram infusão crônica de Ang II por duas semanas demonstram que inicialmente a Ang II induz retenção de  $\text{Na}^+$ , mas depois de alguns dias, quando começa o balanço do íon, a hipertensão arterial persiste (143). Os nossos dados sugerem que em longo prazo, a Ang II atua sobre múltiplos mecanismos para manter o balanço de  $\text{Na}^+$ , principalmente no túbulo proximal (principal seguimento responsável pela reabsorção de  $\text{Na}^+$ ) e nos segmentos mais distais do néfron (responsáveis pelo ajuste fino do transporte de  $\text{Na}^+$ ).

A parede das artérias é constituída por uma camada interna composta por células endoteliais; uma camada média composta por células da musculatura lisa vascular e tecido

elástico, e uma camada externa (adventícia) composta por tecido conjuntivo, cujas células interagem com uma matriz extracelular rica em fibras de colágeno. A parede das arteríolas é constituída por células endoteliais e uma camada de células da musculatura lisa vascular, a qual se funde com o tecido conjuntivo por não possuir a camada elástica externa presente nas artérias. Conforme descrito previamente, ratos infundidos com Ang II por uma ou duas semanas desenvolvem mudanças vasculares, incluindo remodelamento hipertrófico para dentro, principalmente em artérias de resistência como as mesentéricas (47-49, 144) e nessa condição, as artérias adjacentes recebem um aumento no seu fluxo sanguíneo, constituindo uma resposta compensatória para assegurar a perfusão do trato gastrointestinal (50). Entretanto, o fluxo elevado nos vasos adjacentes, acaba induzindo remodelamento para fora, mecanismo que ajuda a manter a integridade do vaso perante as novas condições hemodinâmicas (50, 144-148). De fato o aumento do fluxo sanguíneo resulta em aumento da tensão de cisalhamento, o que estimula a liberação de NO, que é um dos mecanismos associados ao remodelamento para fora, muitas vezes também ocorre o espessamento da camada média dos vasos, o que caracteriza um remodelamento hipertrófico (51, 148, 149). No entanto, alguns dos mecanismos envolvidos com a hipertrofia vascular ainda carecem de mais descobertas.

Considerando a importância dos vasos pré-glomerulares no controle da hemodinâmica glomerular e a vulnerabilidade desses vasos para os efeitos tróficos induzidos pela Ang II (54), nós investigamos quais alterações seriam promovidas na morfologia dos vasos pré-glomerulares frente a 6 semanas de infusão de Ang II.

As análises morfológicas demonstraram que a infusão crônica de Ang II induziu aumento significativo no raio do lúmen de várias artérias interlobulares e arteríolas aferentes, que convergiam para os néfrons. Além disso, nós observamos um decréscimo de 20% na razão das áreas da camada média pela área do lúmen (razão média/lumem) das artérias interlobulares, sugerindo um discreto rearranjo dos componentes da camada média desses vasos, mas não observamos mudanças na razão média/lúmen das arteríolas aferentes. A ação da Ang II via AT1 induziu aumento na área que compreende o tecido conjuntivo da camada adventícia das artérias interlobulares e arteríolas aferentes, sugerindo alterações nos componentes da matriz extracelular, e conseqüentemente o desenvolvimento e/ou progressão do remodelamento vascular, como previamente descrito para pequenas artérias mesentéricas (150). Adicionalmente, a interação de Ang II e receptor AT1 pode aumentar a produção de ROS (84), e na mesma situação pode ocorrer interação do peptídeo com o receptor AT2, induzindo a liberação de NO, o qual combate a injúria renal induzida pela ROS (151).

Dumnot e colaboradores (152) sugeriram uma contribuição de NO no espessamento de vasos de resistência na progressão da hipertrofia vascular. Apesar disso, não abordamos a produção de NO ou ROS em nosso modelo experimental.

A perda de néfrons funcionais pode estar associada à hiperfiltração glomerular, que também é um fator contribuinte para a injúria glomerular nos néfrons remanescentes (58). Esses glomérulos com hiperfiltração frequentemente desenvolvem glomeruloesclerose (58, 153). A expansão dos capilares glomerulares e a deformação do mesângio decorrentes do alto fluxo sanguíneo estimulam a proliferação de células mesangiais e a síntese de componentes da matriz extracelular (154, 155). Em nosso estudo, notamos que no grupo Ang II além do aumento no RFG, houve o aumento da área glomerular e da glomeruloesclerose.

A injúria glomerular induzida pela infusão crônica de Ang II foi confirmada pela pronunciada expressão de desmina glomerular. Em glomérulos saudáveis, a desmina é distribuída essencialmente nas células mesangiais. Durante a injúria glomerular, a expressão de desmina é aumentada nas células mesangiais e passa a ser um marcador da injúria também de podócitos (156). De fato, a cultura das amostras de urina, revelou a presença de um número significativo de podócitos viáveis (capacidade de aderência e morfologia preservada), em ratos infundidos com Ang II. A perda desses podócitos pode ter sido influenciada pelo aumento do fluxo sanguíneo renal, causando maior pressão sobre a parede do capilar glomerular e na membrana de ultrafiltração, com conseqüente desprendimento de podócitos da membrana de ultrafiltração. Entretanto, não descartamos a excreção de podócitos inviáveis visto que a glomeruloesclerose observada pode induzir a morte dessas células, prejudicando a capacidade de seleção da barreira de ultrafiltração, condição que esta relacionada à proteinúria (157). De fato, nossos resultados confirmaram a ocorrência de proteinúria, principalmente pela albuminúria observada. Vale ressaltar que todos os efeitos de Ang II sobre esses parâmetros foram atenuados pelo tratamento com losartan, sugerindo a contribuição dos receptores AT1 sobre as alterações induzidas por Ang II na morfologia e função glomerular.

A albuminúria está associada a doenças renais crônicas (DRC), essencialmente por induzir infiltrações e fibrose tubulointersticiais (158). Isso ocorre por múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo a indução de apoptose por estresse de retículo, estresse oxidativo, infiltração de células inflamatórias e sustentado processo fibrogênico (159, 160). Estudos prévios demonstraram que o complexo proteico formado pela interação cubulina/megalina é essencial para a reabsorção/internalização de albumina pelas células do túbulo proximal (161). Além disso, Liu e colaboradores demonstraram que a inflamação tubulointersticial e a injúria renal induzida por albumina, estão envolvidas na internalização

de albumina pelo complexo megalina/cubulina (158). Nossos resultados estão de acordo com esses achados e sugerem uma relação entre a albuminúria e a inflamação tubulointersticial observada, e em seguida confirmada pelo expressivo número de células positivas para ED-1 (marcador de macrófagos). Novamente, o tratamento com losartan foi eficaz na redução desses parâmetros para valores próximos aos observados no grupo controle.

Os macrófagos são os maiores produtores de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e são também altamente responsivos a essa citocina, cujas funções celulares incluem proliferação, sobrevivência, diferenciação e apoptose (162), e também apresenta função importante no desenvolvimento de muitas doenças crônicas inflamatórias (163). Nossos resultados confirmaram a contribuição da Ang II via AT1 no aumento da expressão de RNAm para TNF $\alpha$  intrarrenal, sugerindo uma interação entre a produção intrarrenal de Ang II e a inflamação tecidual, com conseqüente injúria renal.

A inflamação tubulointersticial está associada à fibrose, um importante fator para a perda progressiva da função renal em muitas doenças renais crônicas. No rim, a fibrose intersticial está associada ao acúmulo de componentes de matriz extracelular, incluindo os complexos proteicos compostos por proteínas de adesão como colágenos dos tipos I, II e III; fibronectina, laminina e proteoglicanos. A adesão celular à matriz extracelular é mediada principalmente pela integrina  $\beta$ 1, presente na superfície celular (164). Esta proteína também pode atuar como um receptor sensível a força e distensão celular, traduzindo um estímulo mecânico em sinais bioquímicos, disparando cascatas de sinalização que provocam o aumento na sua expressão e também na de TGF- $\beta$ 1, fibronectina e colágenos dos tipos III e IV, culminando em deposição de matriz extracelular e fibrose no tecido renal (165).

Em condição patológica induzida por obstrução uretral unilateral (OUU), a integrina  $\beta$ 1 ativou a c-Scr e conseqüente fosforilação do “*signal transducer and transcription factor 3*” (STAT3), agravando o quadro de fibrose tubulointersticial (165, 166). Sabe-se também que a integrina  $\beta$ 1/c-Scr/STAT3 regula a síntese de TGF $\beta$ 1, o qual estimula a Smad2/3, proteína associada à expressão de fibronectina, colágeno III e IV, acúmulo de matriz extracelular e fibrose renal (167). Nossos dados estão de acordo com esses achados, uma vez que observamos aumento significativo na expressão de RNAm para integrina  $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1 e colágeno III em animais infundidos com Ang II. Como esperado, o efeito estimulador da Ang II sobre esses fatores foi reduzido pelo losartan. Esses resultados sugerem que o estresse mecânico induzido pelas alterações hemodinâmicas intra-renais pode ter induzido uma resposta linear onde Ang II/AT1 estimula a síntese de integrina  $\beta$ 1, a qual estimula a síntese

de TGF- $\beta$ 1 e conseqüentemente a síntese de colágeno III, culminando com a infiltração e fibrose glomerular e tubulointersticial.

Outros moduladores da síntese de colágeno incluem aldosterona e endotelinas (168). Em nosso estudo observamos que a Ang II via AT1 induziu aumento na concentração das endotelinas 1 e 3 no plasma.

Em conclusão, nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II por 42 dias (seis semanas) foi capaz de induzir severa hipertensão arterial, alterar a hemodinâmica e a função renal, bem como induzir alterações na morfologia renal, como injúria na parede das artérias interlobulares e arteríolas aferentes, injúria glomerular, proteinúria, podocitúria e infiltração de macrófagos. Além disso a Ang II também foi capaz de estimular a síntese de endotelinas 1 e 3. O tratamento com losartan foi capaz de reverter total ou parcialmente grande parte dos efeitos deletérios da Ang II, o que indica uma importante contribuição dos receptores AT1 nesses processos.

## **8.2 Animais tratados com Endotelina 3 e/ou atrasentan ou BQ788**

Os rins apresentam ampla distribuição dos receptores ETA e ETB (169). Os receptores ETA são prevalentes nas células da musculatura lisa vascular e medeiam principalmente os efeitos vasoconstritores das endotelinas (169). Já os receptores ETB são descritos em células endoteliais onde medeiam os efeitos vasodilatadores e em células da musculatura lisa vascular, onde contribuem para os efeitos vasoconstritores (68, 170, 171).

O efeito agudo de ET-1 na hemodinâmica renal é mediado por ambos os receptores ETA e ETB (59, 172, 173). Nessa condição a ET-1 via ETA induz contração de vasos pré-glomerulares, incluindo as arteríolas aferentes, o que resulta na queda do fluxo sanguíneo renal e do ritmo de filtração glomerular (174). Ainda nessa condição, o receptor ETB também contribui para a constrição dos vasos pré-glomerulares (Gurbanov et al., 1996), porém regula a síntese de óxido nítrico (NO) na medula renal, resultando em dilatação da vasculatura dessa porção renal (169, 175, 176). Além do efeito hemodinâmico, a ET-1 via ETB regula o manejo renal de água e sódio, visto que o peptídeo inibe a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas células tubulares renais e a ação do hormônio antidiurético no ducto coletor, resultando em diurese e natriurese associadas ao aumento da pressão arterial (177-179); (180). Vale ressaltar que os efeitos de ET-1 acima mencionado são variáveis e dependem da dose utilizada (179). Além disso, é pouco conhecido o efeito de ET-1 em longo prazo na hemodinâmica e função renal.

Considerando os efeitos de ET-1 no tecido renal que foram descritos acima e que muito pouco se conhece sobre os efeitos de ET-3, a segunda parte de nosso estudo relata os efeitos desse peptídeo na hemodinâmica, função e morfologia renal, e a relação dos receptores ETA e ETB nesses parâmetros.

Estudos indicam que a ET-3 em doses altas (acima de 3 pmol) atua como peptídeo vasoconstritor (181) e em doses baixas (1-3 pmol) atua como peptídeo vasodilatador (170). Em nosso estudo utilizamos ET-3 em uma dose considerada baixa, porém o efeito observado foi o aumento da pressão arterial. O tratamento prolongado com ET-3 reduziu a expressão do receptor ETB, sugerindo que houve internalização e degradação de parte da população de ETB ao se ligar a ET-3, como demonstrado por Kohan e colaboradores (61). A internalização é uma característica peculiar dos receptores acoplados a proteína G, os quais têm a expressão aumentada durante a queda ou ausência de seus agonistas e têm a expressão reduzida durante a exposição a altas concentrações dos agonistas.

O efeito pressórico que observamos apenas com BQ788 (4 mM/kg/dia) foi também identificado por outros pesquisadores e parece estar envolvido com a queda do NO sistêmico, uma vez que o receptor ETB é o responsável pelo estímulo da produção e liberação de NO quando relacionado as ETs (182-185). Outra possibilidade é que o bloqueio ou a redução na expressão do receptor ETB tenha reduzido o clearance de ET-1 (169), potencializando assim seu efeito pressórico via ETA.

Outro indício que o efeito pressórico está relacionado com a ativação do receptor ETA, é a redução da hipertensão nos animais tratados com atrasentan, um antagonista do receptor ETA. Além da redução da disponibilidade de receptores ETB, a infusão com ET-3 também aumentou a expressão de RNAm para ET-1. Há também a possibilidade de uma relação entre o sistema de ET e SRA, principalmente intrarrenal, como demonstrado mais a frente.

Nos estudos de hemodinâmica renal, a infusão crônica com ET-3 não alterou o FPR, mas induziu aumento do RFG e da FF. Esses resultados estão de acordo com os achados de Watanabe e colaboradores (186), os quais sugerem que a infusão aguda de ET-3 em baixa dose aumenta o RFG, devido a maior sensibilidade da arteríola eferente às endotelinas, causando assim aumento da filtração glomerular por aumento da pressão intraglomerular. Tais respostas induzidas por ET-3 podem estar associadas ao aumento do NO ou alterações morfológicas no mesângio ou na barreira de ultrafiltração glomerular, e também a maior sensibilidade da arteríola eferente as endotelinas. Os tratamentos com o atrasentan ou BQ788 isoladamente não alteraram os parâmetros hemodinâmicos renais em comparação ao grupo

controle, mas atenuaram os efeitos de ET-3 sobre o RFG, sugerindo que no tecido renal o efeito de ET-3, seja dependente dos receptores ETA e ETB. Vale lembrar que também pode haver ação da ET-1 sobre esses receptores (182).

O aumento do RFG resultou em um aumento da carga filtrada de  $\text{Na}^+$  no grupo ET-3, mas sem alterar a carga excretada e nem a fração de excreção o que refletiu num aumento do fluxo urinário nesse grupo. O aumento no fluxo urinário pode estar associado ao aumento do RFG e ao efeito vasodilatador da ET-3 via ETB na medula renal, reduzindo o efeito do mecanismo contra-corrente, essencial para formação de urina hiperosmótica. O tratamento com atrasentan não corrigiu a influência de ET-3 nesse parâmetro, demonstrando que o principal efeito diurético nesse grupo foi dependente do receptor ETB (187).

Até o momento, nada foi descrito sobre o efeito de ET-3 na morfologia renal geral. Considerando as alterações da hemodinâmica renal descritas acima, investigamos o efeito de ET-3 na morfologia glomerular. Nossos resultados apontam para um efeito estimulador de ET-3, via ETA e ETB, sobre a expansão glomerular, glomeruloesclerose e proteinúria, sugerindo injúria glomerular associada a alterações na membrana de ultrafiltração glomerular que antecede a perda progressiva da função glomerular. Para confirmar essas alterações morfológicas, investigamos a expressão de desmina, marcador de lesão glomerular, a qual foi aumentada no grupo infundido com ET-3 e ausente nos grupos tratados com antagonistas dos receptores ETA e ETB.

Vale ressaltar que nesse estudo não encontramos indícios de injúria tubular nem perda de podócitos pela urina. Apesar da imuno-histoquímica para avaliar a infiltração de macrófagos no tecido renal não ter sido realizada, a alta expressão de RNAm para  $\text{TNF}\alpha$  no grupo de animais tratados com ET-3, sugere a existência de um processo inflamatório e possível infiltração dos macrófagos no tecido renal. O tratamento com atrasentan ou BQ788, reduziu a expressão de  $\text{TNF-}\alpha$ .

Como era de se esperar, o tratamento com ET-3 induziu acentuada queda na expressão de RNAm para o gene de ET-3, que persistiu mesmo perante o tratamento com os bloqueadores ETA ou ETB, sugerindo a existência de um mecanismo de retroalimentação negativo sobre a síntese de ET-3. Apesar disso, o tratamento com ET-3 induziu aumento na expressão de RNAm para a enzima conversora de endotelina 1 (ECE1) e consequente aumento de RNAm para ET-1; para o angiotensinogênio e para a renina, sugerindo um mecanismo de retroalimentação positivo para a síntese de ET-1 e dos componentes do SRA. O efeito estimulador de ET-3 sobre a síntese da ET1 e dos componentes do SRA, parece ser regulado principalmente pelo receptor ETB.



## 9 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II por 42 dias foi capaz de estimular a síntese de endotelinas 1 e 3, induzir severa hipertensão arterial, alterar a hemodinâmica e a função renal, bem como induzir alterações na morfologia renal, como injúria na parede das artérias interlobulares e arteríolas aferentes, injúria glomerular, proteinúria, podocitúria e infiltração de macrófagos. O tratamento com losartan foi capaz de reverter total ou parcialmente grande parte dos efeitos deletérios da Ang II, o que indica uma importante contribuição dos receptores AT1 nesses processos.

A endotelina 3 também se apresentou como potencial efetor para um modelo de hipertensão arterial. Além disso, a ET-3 via receptores ETA e ETB induziu alterações na função e morfologia renal de forma similar a Ang II.

Esse estudo também sugere uma importante interação funcional entre os sistemas renina-angiotensina e endotelinas.

## REFERÊNCIAS\*

1. Berne-Levy. Fisiologia 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 844 p.
2. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000;101(3):329-35.
3. Hajjar I, Kotchen JM, Kotchen TA. Hypertension: trends in prevalence, incidence, and control. *Annu Rev Public Health*. 2006;27:465-90.
4. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206-52.
5. Kotchen TA. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *Am J Hypertens*. 2010;23(11):1170-8.
6. Bolívar JJ. Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. *Int J Hypertens*. 2013;2013:547809.
7. Lawlor DA, O'Callaghan MJ, Mamun AA, Williams GM, Bor W, Najman JM. Early life predictors of adolescent smoking: findings from the Mater-University study of pregnancy and its outcomes. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2005;19(5):377-87.
8. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001;7(9):1003-9.
9. Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem*. 1992;111(1-2):103-8.
10. Campos RR, Bergamaschi CT. Comments on Point:Counterpoint: The dominant contributor to systemic hypertension: Chronic activation of the sympathetic nervous system vs. Activation of the intrarenal renin-angiotensin system. Sympathetic activation: cause or consequence of hypertension? *J Appl Physiol* (1985). 2010;109(6):2013-4.
11. Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CM, Plonczynski M, Gomez-Sanchez CE. Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension. *Exp Physiol*. 2010;95(1):120-30.
12. Rautureau Y, Schiffrin EL. Endothelin in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(2):128-36.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

13. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension : i. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934;59(3):347-79.
14. Van Epps HL. Harry Goldblatt and the discovery of renin. *J Exp Med*. 2005;201(9):1351.
15. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2001;38(6):1246-9.
16. Galen FX, Devaux C, Houot AM, Menard J, Corvol P, Corvol MT, et al. Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. Evidences for a renin precursor. *J Clin Invest*. 1984;73(4):1144-55.
17. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, Kaneshiro Y, Itoh H. Renin, prorenin and the kidney: a new chapter in an old saga. *J Nephrol*. 2009;22(3):306-11.
18. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:310-9.
19. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ*. 2009;33(4):270-4.
20. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(7):441-50.
21. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(6):681-5.
22. Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;114(3):e83-92.
23. Wolf G, Wenzel U, Assmann KJ, Stahl RA. Renal expression of aminopeptidase A in rats with two-kidney, one-clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(12):1935-42.
24. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int*. 2002;61(6):1986-95.
25. Danziger RS. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev*. 2008;13(3):293-8.
26. Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007;16(2):122-8.

27. Zimmerman D, Burns KD. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123(6):333-46.
28. Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:522-35.
29. Axelband F, Assunção-Miranda I, de Paula IR, Ferrão FM, Dias J, Miranda A, et al. Ang-(3-4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regul Pept*. 2009;155(1-3):81-90.
30. Carey RM, Padia SH. Role of angiotensin AT(2) receptors in natriuresis: Intrarenal mechanisms and therapeutic potential. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(8):527-34.
31. Burckle C, Bader M. Prorenin and its ancient receptor. *Hypertension*. 2006;48:549-51.
32. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(6):615-21.
33. Miura SI, Saku K. Recent progress in the treatment of cardiovascular disease using olmesartan. *Clin Exp Hypertens*. 2013.
34. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10 Suppl 11:S23-9.
35. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415-72.
36. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 2005;308(5721):512-7.
37. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(9):1001-15.
38. Pratt RE, Dzau VJ. Pharmacological strategies to prevent restenosis: lessons learned from blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1996;93(5):848-52.
39. Jöhren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res*. 2004;62(3):460-7.
40. Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*. 1997;100(2):264-9.
41. Padia SH, Howell NL, Siragy HM, Carey RM. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. *Hypertension*. 2006; 47: 537-44.

42. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*. 1992;19(5):464-74.
43. Von Thun AM, Vari RC, el-Dahr SS, Navar LG. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels by chronic angiotensin II infusion. *Am J Physiol*. 1994;266(1 Pt 2):F120-8.
44. Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(11):643-56.
45. Haugen EN, Croatt AJ, Nath KA. Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney Int*. 2000;58(1):144-52.
46. Rüster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(7):1189-99.
47. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991;17(5):626-35.
48. Lever AF. Slow developing pressor effect of angiotensin II and vascular structure. *J Hypertens Suppl*. 1993;11(3):S27-8.
49. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002;17:105-9.
50. Dumont O, Kauffenstein G, Guihot AL, Guérineau NC, Abraham P, Loufrani L, et al. Time-related alteration in flow- (shear stress-) mediated remodeling in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Int J Hypertens*. 2014;2014:859793.
51. Bouvet C, Belin de Chantemèle E, Guihot AL, Vessières E, Bocquet A, Dumont O, et al. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2007;50(1):248-54.
52. Pourageaud F, De Mey JG. Vasomotor responses in chronically hyperperfused and hypoperfused rat mesenteric arteries. *Am J Physiol*. 1998;274(4 Pt 2):1301-7.
53. Zhu Q, Wang Z, Xia M, Li PL, Van Tassell BW, Abbate A, et al. Silencing of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*. 2011;58(4):657-64.
54. Edgley AJ, Kett MM, Anderson WP. Evidence for renal vascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(7):1401-6.
55. Wang CT, Chin SY, Navar LG. Impairment of pressure-natriuresis and renal autoregulation in ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279(2):319-25.

56. Kost CK, Herzer WA, Li P, Notoya M, Mizuhira V, Inagami T, et al. Angiotensin II-induced structural and functional alterations in spontaneously hypertensive rat kidney. *Am J Physiol.* 1996;270(1 Pt 2):229-36.
57. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, Kobori H, Moreno C, Navar LG. Increased activity and expression of Ca(2+)-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1999;277(5 Pt 2):797-804.
58. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int.* 1996;49(6):1774-7.
59. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332(6163):411-5.
60. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension.* 2008;52:452-9.
61. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev.* 2011; 91:1-77.
62. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension.* 1992;19(6 Pt 2):753-7.
63. Azarani A, Boileau G, Crine P. Recombinant human endothelin-converting enzyme ECE-1b is located in an intracellular compartment when expressed in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J.* 1998;333(Pt 2):439-48.
64. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990;348(6303):730-2.
65. Suzuki N, Matsumoto H, Miyauchi T, Goto K, Masaki T, Tsuda M, et al. Endothelin-3 concentrations in human plasma: the increased concentrations in patients undergoing haemodialysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;169(2):809-15.
66. Wolf SC, Smolczyk H, Brehm BR, Erley CM, Risler T. Endothelin-1 and endothelin-3 levels in different types of glomerulonephritis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S482-5.
67. Sauvageau S, Thorin E, Villeneuve L, Dupuis J. Endothelin-3-dependent pulmonary vasoconstriction in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Peptides.* 2008;29(11):2039-45.

68. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9797-800.
69. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett*. 1998;428:304-8.
70. Féraille E, Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev*. 2001;81(1):345-418.
71. Aires MM. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. 1335 p.
72. Sakai T, Kriz W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. *Anat Embryol (Berl)*. 1987;176(3):373-86.
73. Kriz W, Elger M, Lemley KV, Sakai T. Mesangial cell-glomerular basement membrane connections counteract glomerular capillary and mesangium expansion. *Am J Nephrol*. 1990;10 Suppl 1:4-13.
74. Ernsberger P, Zhou J, Damon TH, Douglas JG. Angiotensin II receptor subtypes in cultured rat renal mesangial cells. *Am J Physiol*. 1992;263(3 Pt 2):F411-6.
75. Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, Kok RJ, Goldschmeding R. Targeting podocyte-associated diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62:1325-36.
76. Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y, Nagai Y, Koide H. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. *Clin Nephrol*. 1990;34(6):239-46.
77. Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol*. 2004;22(7):521-38.
78. Sun YB, Qu X, Zhang X, Caruana G, Bertram JF, Li J. Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. *PLoS One*. 2013;8(1):e55027.
79. Mundel P, Reiser J. Proteinúria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int*. 2010;77:571-80.
80. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinúria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;69: 2131-47.

81. do Carmo JM, Tallam LS, Roberts JV, Brandon EL, Biglane J, da Silva AA, et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(3):R803-12.
82. Sequeira Lopez ML, Gomez RA. Development of the renal arterioles. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(12):2156-65.
83. Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):164-9.
84. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(4):339-52.
85. Denton KM, Anderson WP, Sinniah R. Effects of angiotensin II on regional afferent and efferent arteriole dimensions and the glomerular pole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(2):R629-38.
86. Anderson WP, Kett MM, Stevenson KM, Edgley AJ, Denton KM, Fitzgerald SM. Renovascular hypertension: structural changes in the renal vasculature. *Hypertension*. 2000;36(4):648-52.
87. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:439-65.
88. Sriram K, Intaglietta M, Tartakovsky DM. Non-newtonian flow of blood in arterioles: consequences for wall shear stress measurements. *Microcirculation*. 2014.
89. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(1):42-52.
90. Liebau MC, Lang D, Böhm J, Endlich N, Bek MJ, Witherden I, et al. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(3):F710-9.
91. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Angiotensin II type 1 receptor-mediated augmentation of renal interstitial fluid angiotensin II in angiotensin II-induced hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(10):1897-903.
92. van Kats JP, de Lannoy LM, Jan Danser AH, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension*. 1997;30(1 Pt 1):42-9.
93. Navar LG, Mitchell KD, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Nishiyama A. Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2001;2:S176-S84.



94. Anderson PW, Do YS, Hsueh WA. Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension*. 1993;21(1):29-35.
95. Ito S, Amin J, Ren Y, Arima S, Abe K, Carretero OA. Heterogeneity of angiotensin action in renal circulation. *Kidney Int Suppl*. 1997;63:S128-31.
96. Wennmann DO, Hsu HH, Pavenstadt H. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes. *Semin Nephrol*. 2012;32(4):377-84.
97. Prisco D, Filippini M, Francalanci I, Paniccia R, Gensini GF, Seneri GG. Effect of n-3 fatty acid ethyl ester supplementation on fatty acid composition of the single platelet phospholipids and on platelet functions. *Metabolism*. 1995;44(5):562-9.
98. Karet FE. Endothelin peptides and receptors in human kidney. *Clin Sci (Lond)*. 1996;91(3):267-73.
99. Kohan DE. Endothelin, hypertension and chronic kidney disease: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19(2):134-9.
100. Owada A, Tomita K, Terada Y, Sakamoto H, Nonoguchi H, Marumo F. Endothelin (ET)-3 stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate production via ETB receptor by producing nitric oxide in isolated rat glomerulus, and in cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest*. 1994;93(2):556-63.
101. Kohan DE, Padilla E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest*. 1993;91(3):1235-40.
102. Nambi P, Pullen M, Brooks DP, Gellai M. Identification of ETB receptor subtypes using linear and truncated analogs of ET. *Neuropeptides*. 1995;29(6):331-6.
103. Wesson DE. Endogenous endothelins mediate increased acidification in remnant kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(9):1826-35.
104. Kuc R, Davenport AP. Comparison of endothelin-A and endothelin-B receptor distribution visualized by radioligand binding versus immunocytochemical localization using subtype selective antisera. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44 Suppl 1:S224-6.
105. Tomita K, Nonoguchi H, Terada Y, Marumo F. Effects of ET-1 on water and chloride transport in cortical collecting ducts of the rat. *Am J Physiol*. 1993;264(4 Pt 2):F690-6.
106. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am J Physiol*. 1992;263(3 Pt 2):F488-95.
107. Plato CF, Pollock DM, Garvin JL. Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via ET(B) receptor-mediated NO release. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279(2):F326-33.

108. Ge Y, Stricklett PK, Hughes AK, Yanagisawa M, Kohan DE. Collecting duct-specific knockout of the endothelin A receptor alters renal vasopressin responsiveness, but not sodium excretion or blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(4):F692-8.
109. Ihn H. The role of TGF-beta signaling in the pathogenesis of fibrosis in scleroderma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2002;50(5):325-31.
110. Selye H. Production of Nephrosclerosis by Overdosage with Desoxycorticosterone Acetate. *Can Med Assoc J*. 1942;47(6):515-9.
111. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*. 2005;146(3):160-73.
112. Zou LX, Imig JD, von Thun AM, Hymel A, Ono H, Navar LG. Receptor-mediated intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 1996;28(4):669-77.
113. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):180-6.
114. Saleh MA, Boesen EI, Pollock JS, Savin VJ, Pollock DM. Endothelin-1 increases glomerular permeability and inflammation independent of blood pressure in the rat. *Hypertension*. 2010;56(5):942-9.
115. Kittikulsuth W, Pollock JS, Pollock DM. Sex differences in renal medullary endothelin receptor function in angiotensin II hypertensive rats. *Hypertension*. 2011;58(2):212-8.
116. Luke RG. Essential hypertension: a renal disease? A review and update of the evidence. *Hypertension*. 1993;21(3):380-90.
117. Stevenson KM, Edgley AJ, Bergström G, Worthy K, Kett MM, Anderson WP. Angiotensin II infused intrarenally causes preglomerular vascular changes and hypertension. *Hypertension*. 2000;36(5):839-44.
118. Kelly DJ, Cox AJ, Gow RM, Zhang Y, Kemp BE, Gilbert RE. Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension*. 2004;44(2):195-202.
119. Kawano Y, Yoshida K, Matsuoka H, Omae T. Chronic effects of central and systemic administration of losartan on blood pressure and baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1994;7(6):536-42.
120. Merlen C, Farhat N, Luo X, Chatenet D, Tadevosyan A, Villeneuve LR, et al. Intracrine endothelin signaling evokes IP3-dependent increases in nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;62:189-202.

121. Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001;133(1):117-24.
122. Coelho MS, Lopes KL, Freitas ReA, de Oliveira-Sales EB, Bergasmaschi CT, Campos RR, et al. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept.* 2010;162(1-3):61-7.
123. Franco MoC, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RC, et al. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 2003;59(3):767-75.
124. Fuhr J, Kaczmarczyk J, Kruttgen CD. [A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics]. *Klin Wochenschr.* 1955;33(29-30):729-30.
125. Smith HW, Finkelstein N, Aliminosa L, Crawford B, Graber M. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J Clin Invest.* 1945;24(3):388-404.
126. Puchtler H, Waldrop FS. On the mechanism of Verhoeff's elastica stain: a convenient stain for myelin sheaths. *Histochemistry.* 1979;62(3):233-47.
127. Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int.* 1987;32(5):691-9.
128. Petermann AT, Krofft R, Blonski M, Hiromura K, Vaughn M, Pichler R, et al. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Int.* 2003;64(4):1222-31.
129. Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG, et al. Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(24):11649-57.
130. Hodeib AA, Elsharawy TA, Fawzi HA. Assessment of serum homocysteine, endothelin-1, and nitric oxide levels in behçet's disease. *Indian J Dermatol.* 2010;55(3):215-20.
131. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3):251-87.
132. Wang CT, Zou LX, Navar LG. Renal responses to AT1 blockade in angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(4):535-42.
133. Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2001;37(5):1329-35.

134. Satou R, Shao W, Navar LG. Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2015.
135. Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL, Hsieh TJ, Guo DF, Hébert MJ, et al. Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2006;69(11):1977-85.
136. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2002(82):S12-22.
137. Ozawa Y, Kobori H, Suzuki Y, Navar LG. Sustained renal interstitial macrophage infiltration following chronic angiotensin II infusions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(1):F330-9.
138. Tybitanclová K, Szabová L, Grima M, Ingert C, Zelezná B, Zórad S. Blockade of AT1 receptors by losartan did not affect renin gene expression in kidney medulla. *Gen Physiol Biophys*. 2006;25(1):43-51.
139. Abdi R, Brenner BM. Impact of renin angiotensin system blockade on renal function in health and disease: an end or a beginning? *Semin Nephrol*. 2004;24(2):141-6.
140. Navar LG. The role of the kidneys in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005;7(9):542-9.
141. Aizawa T, Ishizaka N, Taguchi J, Nagai R, Mori I, Tang SS, et al. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats : possible role in renoprotection. *Hypertension*. 2000;35(3):800-6.
142. Zhao D, Seth DM, Navar LG. Enhanced distal nephron sodium reabsorption in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension*. 2009;54(1):120-6.
143. Lohmeier TE, Hildebrandt DA. Renal nerves promote sodium excretion in angiotensin-induced hypertension. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):429-34.
144. De Mey JG, Schiffers PM, Hilgers RH, Sanders MM. Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1022-7.
145. Lehoux S, Tronc F, Tedgui A. Mechanisms of blood flow-induced vascular enlargement. *Biorheology*. 2002;39(3-4):319-24.
146. Cousin M, Custaud MA, Baron-Menguy C, Toutain B, Dumont O, Guihot AL, et al. Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*. 2010;55(1):109-15.

147. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4(1):49-55.
148. Pourageaud F, De Mey JG. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. *Am J Physiol.* 1997;273(4 Pt 2):H1699-706.
149. Loufrani L, Levy BI, Henrion D. Defect in microvascular adaptation to chronic changes in blood flow in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circ Res.* 2002;91(12):1183-9.
150. Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(2):125-31.
151. Griffin KA, Bidani AK. Angiotensin II type 2 receptor in chronic kidney disease: the good side of angiotensin II? *Kidney Int.* 2009;75(10):1006-8.
152. Dumont O, Loufrani L, Henrion D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(2):317-24.
153. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol.* 1981;241(1):F85-93.
154. Cortes P, Riser BL, Zhao X, Narins RG. Glomerular volume expansion and mesangial cell mechanical strain: mediators of glomerular pressure injury. *Kidney Int Suppl.* 1994;45:S11-6.
155. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003;23(2):194-9.
156. Crowley SD, Vasievich MP, Ruiz P, Gould SK, Parsons KK, Pazmino AK, et al. Glomerular type 1 angiotensin receptors augment kidney injury and inflammation in murine autoimmune nephritis. *J Clin Invest.* 2009;119(4):943-53.
157. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(10):2941-52.
158. Liu D, Wen Y, Tang TT, Lv LL, Tang RN, Liu H, et al. Megalin/cubulin-lysosome-mediated albumin reabsorption is involved in the tubular cell activation of NLRP3 inflammasome and tubulointerstitial inflammation. *J Biol Chem.* 2015.

159. Li X, Pabla N, Wei Q, Dong G, Messing RO, Wang CY, et al. PKC-delta promotes renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(7):1115-24.
160. Eddy AA. Proteinuria and interstitial injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(2):277-81.
161. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, et al. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1859-67.
162. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103.
163. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(3-4):335-43.
164. Kagami S, Kondo S. Beta1-integrins and glomerular injury. *J Med Invest.* 2004;51(1-2):1-13.
165. Hamzeh MT, Sridhara R, Alexander LD. Cyclic stretch-induced TGF- $\beta$ 1 and fibronectin expression is mediated by  $\beta$ 1-integrin through c-Src- and STAT3-dependent pathways in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308(5):F425-36.
166. Yeh YC, Wei WC, Wang YK, Lin SC, Sung JM, Tang MJ. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces Smad3-dependent  $\beta$ 1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol.* 2010;177(4):1743-54.
167. Wang DT, Huang RH, Cheng X, Zhang ZH, Yang YJ, Lin X. Tanshinone IIA attenuates renal fibrosis and inflammation via altering expression of TGF- $\beta$ /Smad and NF- $\kappa$ B signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats. *Int Immunopharmacol.* 2015;26(1):4-12.
168. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):581-7.
169. Hoffman A, Abassi ZA, Brodsky S, Ramadan R, Winaver J. Mechanisms of big endothelin-1-induced diuresis and natriuresis : role of ET(B) receptors. *Hypertension.* 2000;35(3):732-9.
170. Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5:S85-8; discussion S102.
171. Fukuroda T, Nishikibe M, Ohta Y, Ihara M, Yano M, Ishikawa K, et al. Analysis of responses to endothelins in isolated porcine blood vessels by using a novel endothelin antagonist, BQ-153. *Life Sci.* 1992;50(15):PL107-12.

172. Hirata Y, Matsuoka H, Kimura K, Fukui K, Hayakawa H, Suzuki E, et al. Renal vasoconstriction by the endothelial cell-derived peptide endothelin in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1989;65(5):1370-9.
173. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I. Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest.* 1989;83(5):1762-7.
174. Cairns HS, Rogerson ME, Fairbanks LD, Neild GH, Westwick J. Endothelin induces an increase in renal vascular resistance and a fall in glomerular filtration rate in the rabbit isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol.* 1989;98(1):155-60.
175. Gurbanov K, Rubinstein I, Hoffman A, Abassi Z, Better OS, Winaver J. Differential regulation of renal regional blood flow by endothelin-1. *Am J Physiol.* 1996;271(6 Pt 2):F1166-72.
176. Zou AP, Cowley AW. Nitric oxide in renal cortex and medulla. An in vivo microdialysis study. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2):194-8.
177. Katoh T, Chang H, Uchida S, Okuda T, Kurokawa K. Direct effects of endothelin in the rat kidney. *Am J Physiol.* 1990;258(2 Pt 2):F397-402.
178. Zeidel ML, Brady HR, Kone BC, Gullans SR, Brenner BM. Endothelin, a peptide inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase in intact renaltubular epithelial cells. *Am J Physiol.* 1989;257(6 Pt 1):C1101-7.
179. Nadler SP, Zimpelmann JA, Hébert RL. Endothelin inhibits vasopressin-stimulated water permeability in rat terminal inner medullary collecting duct. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1458-66.
180. Hoffman A, Haramati A, Dalal I, Shuranyi E, Winaver J. Diuretic-natriuretic actions and pressor effects of big-endothelin (1-39) in phosphoramidon-treated rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;205(2):168-73.
181. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem.* 1989;264(25):14954-9.
182. Gratton JP, Cournoyer G, D'Orléans-Juste P. Endothelin-B receptor-dependent modulation of the pressor and prostacyclin-releasing properties of dynamically converted big endothelin-1 in the anesthetized rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S161-3.
183. Okada M, Nishikibe M. BQ-788, a selective endothelin ET(B) receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev.* 2002;20(1):53-66.
184. Karaki H, Sudjarwo SA, Hori M. Novel antagonist of endothelin ETB1 and ETB2 receptors, BQ-788: effects on blood vessel and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205(1):168-73.

185. Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol.* 1994;113(2):336-8.
186. Watanabe M, Izumi Y, Soma M, Watanabe Y, Fukuda N, Abe Y, et al. Effect of endothelin-3 (ET-3) on renal function in rat perfused kidney. *Endocrinol Jpn.* 1991;38(4):435-40.
187. Boesen EI, Pollock DM. Cooperative role of ETA and ETB receptors in mediating the diuretic response to intramedullary hyperosmotic NaCl infusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6):1424-32.