UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JUNYA DE LACORTE SINGULANI

O papel da aldosterona no desenvolvimento das lesões
tubulointersticiais em ratos hipertensos 2R-1C

Ribeirão Preto - SP

2012

JUNYA DE LACORTE SINGULANI

O papel da aldosterona no desenvolvimento das lesões
tubulointersticiais em ratos hipertensos 2R-1C

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Barbosa
Coelho

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Singulani, Junya de Lacorte

O papel da aldosterona no desenvolvimento das lesões tubulointersticiais em ratos hipertensos 2R-1C. Ribeirão Preto, 2012.

89 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Coelho, Eduardo Barbosa.

1. Aldosterona. 2. Hipertensão renovascular. 3. Rins. 4. Espironolactona. 5. Amilorida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Junya de Lacorte Singulani

O papel da aldosterona no desenvolvimento das lesões tubulointersticiais em ratos hipertensos 2R-1C

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof.: Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: Dr. Carlos Renato Tirapelli

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a Deus, pelo amor incondicional, pela graça e pelo refúgio nas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A Deus por suprir todas as minhas necessidades de acordo com sua perfeita vontade e pelas pessoas colocadas em meu caminho.

Aos meus pais pelo amor, humildade, conselhos e alicerces deixados para que eu pudesse prosseguir.

À minha família, em especial aos meus irmãos, Cláudia, Emiliana, Roberto e Rafaela, sobrinhos e cunhados pela ajuda e pelo incentivo incondicional na realização dos meus objetivos.

Ao Rafael pelo carinho, paciência e companheirismo em todos os momentos, cujos ouvidos me trazem alívio e palavras me fazem respirar antes das decisões.

Ao prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a Terezila Coimbra por disponibilizar o laboratório e pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Aos amigos do laboratório de nefrologia Aline, Andréia, Diego, Flávia, Gabriel, Heverton, Soraia e Valéria pelo convívio e auxílio, em especial a Juliana pela disponibilidade em me ajudar nos experimentos.

As amigas do laboratório de fisiologia renal Cláudia, Cleonice, Evelyn e Heloísa pela sempre boa vontade em me auxiliarem.

Aos funcionários do biotério Adalberto, Maurício e Roni pelos cuidados com os animais e ajuda no projeto.

Aos profs. Dr. Gyl Silva e Dr. Roberto Costa e aos técnicos Flávio Leite e Guilherme Lemos pelo auxílio nas inclusões e cortes de tecidos em parafina.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Sônia Maria, Fátima Helena e José Waldik pela colaboração e serviços prestados.

Aos funcionários da Biblioteca Central pelo auxílio nas normas bibliográficas.

Aos professores Dr. Carlos Renato Tirapelli e Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann pela disponibilidade e pelas contribuições e sugestões para a melhoria desse trabalho e para meu amadurecimento científico.

À Tatiane e Ana Paula pela ajuda, amizade e convivência diária.

Aos amigos de perto, especialmente, Aline Fassini, Camila, Francisco, Jannyerson, Karina, Karla, Pâmela e Rheure.

Aos meus amigos por optarem estar perto mesmo havendo distância física, especialmente, Adriana, Ana Paula, Andrêssa, Clarisse, Priscila, Rodrigo e Samira.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

RESUMO

SINGULANI, J. L. **O papel da aldosterona no desenvolvimento das lesões tubulointersticiais em ratos hipertensos 2R-1C**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A aldosterona participa da progressão das doenças renais em modelos experimentais e ensaios clínicos. Considerando que o modelo de hipertensão renovascular 2 rins-1 clipe (2R-1C) é caracterizado pela atividade elevada do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da aldosterona na lesão renal presente nesse modelo através do bloqueio do receptor mineralocorticoide (RM) com espironolactona. Ratos Wistar foram submetidos ao procedimento cirúrgico para colocação de um clipe de prata na artéria renal esquerda e após 2 semanas do desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R-1C, foram divididos em 3 grupos sendo que para o primeiro grupo nenhuma droga foi administrada (n=8), para o segundo grupo foi administrado por via oral 20 mg/Kg/dia de espironolactona (n=10) e para o terceiro, 7 mg/Kg/dia de amilorida (n=12). O peso e a pressão sistólica foram monitorados semanalmente. Coletas de urina (durante 24 h) e sangue foram realizadas em 3 períodos distintos: antes do procedimento cirúrgico; na 2ª semana após a cirurgia (antes do início do tratamento) e na 6ª semana após a cirurgia (após o término do tratamento). As amostras foram utilizadas para análise de creatinina, osmolalidade, sódio, potássio e albuminúria. Ao final do experimento, os rins foram perfundidos e pesados. Análise histológica para avaliar a extensão das alterações tubulointersticiais foi realizada. Além disso, marcadores de inflamação (ED-1 e p-JNK), de produção de matriz extracelular (fibronectina), de miofibroblastos (α -actina de músculo liso) e de transdiferenciação tubular (vimentina) na região tubulointersticial cortical e de lesão nos podócitos (desmina) foram avaliados. O tratamento com espironolactona foi capaz de atenuar o aumento na excreção de albumina, o aumento na concentração plasmática de creatinina e a redução na depuração de creatinina. No rim clipado dos ratos 2R-1C, as lesões tubulointersticiais e podocitárias, demonstradas pelos marcadores estudados, foram discretas e a terapia com espironolactona ou amilorida não foi capaz de minimizá-las. Por outro lado, no rim não clipado, a

administração de espironolactona atenuou o aumento de matriz extracelular e a lesão nos podócitos. Os efeitos benéficos da espironolactona ocorreram independentes da redução na pressão sanguínea e podem ser em parte, dependentes do bloqueio do canal epitelial de sódio (ENaC). Tais efeitos trazem perspectiva para espironolactona como uma ferramenta terapêutica a ser explorada em pacientes com estenose de artéria renal.

Palavras-chave: aldosterona, hipertensão renovascular, rins, espironolactona, amilorida.

ABSTRACT

SINGULANI, J. L. **The role of aldosterone in the development of tubulointerstitial damage in hypertensive rats 2K-1C.** 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Aldosterone is involved in the progression of renal disease in experimental models and clinical trials. Considering that the model of renovascular hypertension 2 kidney-1 clip (2K-1C) is characterized by a high activity of the renin-angiotensin-aldosterone system, the objective of this study was to assess the role of aldosterone in renal injury in this model by blocking the mineralocorticoid receptor (MR) with spironolactone. Male Wistar rats were submitted to surgery to place a silver clip on the left renal artery and after two weeks of the development of 2K-1C renovascular hypertension they were divided into three groups. The first group was administered no drug (n=8), in the second group spironolactone 20 mg/kg/day was given orally (n=10) and the third group received amiloride 7 mg/kg/day (n=12). Body weight and systolic blood pressure were monitored weekly. Samples of urine (collected for 24 h) and blood were performed in 3 distinct periods: before surgery; 2 weeks after surgery (before treatment) and 6 weeks after surgery (after treatment). The samples were used to analyze creatinine, osmolality, sodium, potassium and albuminuria. At the end of the experiment, the kidneys were perfused and weighed. Histological analysis to assess the extent of tubulointerstitial changes was performed. Additionally, markers of inflammation (ED-1 and p-JNK), production of extracellular matrix (fibronectin), myofibroblasts (α -smooth muscle actin) and tubular transdifferentiation (vimentin) in the area of tubulointerstitial cortical and injury in podocytes (desmin) were evaluated. Treatment with spironolactone was able to attenuate the increase in albumin excretion, the increase in plasma concentration of creatinine and the reduction in creatinine clearance. In the clipped kidney, tubulointerstitial and podocytes injuries, demonstrated by markers studied, were discrete and therapy with spironolactone or amiloride was not able to minimize them. However, in the non-clipped kidney, administration of spironolactone attenuated the increase of extracellular matrix and podocyte injury. The beneficial effects of spironolactone occurred independent of the reduction blood pressure and can be partly dependent

of epithelial sodium channel (ENaC) blockade. These effects bring perspective to espironolactone as a therapeutic tool to be explored in patients with renal artery stenosis.

Keywords: aldosterone, renovascular hypertension, kidney, spironolactone, amiloride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ações genômicas e não genômicas da aldosterona e sua ligação ao receptor mineralocorticóide	21
Figura 2 -	Implicação da aldosterona e do receptor mineralocorticóide nas doenças renais em humanos e/ou modelos experimentais	24
Figura 3 -	Eventos característicos da doença renal estenótica unilateral ..	30
Figura 4 -	Mudanças no peso corporal durante o período experimental	44
Figura 5 -	Mudanças na pressão sanguínea sistólica durante o período experimental	50
Figura 6 -	Cortes histológicos corados com tricromo de Masson do rim esquerdo do grupo sham e do rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para lesões tubulointersticiais para os grupos experimentais	51
Figura 7 –	Cortes histológicos corados com tricromo de Masson do rim esquerdo do grupo sham e do rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para lesões tubulointersticiais para os grupos experimentais	52
Figura 8 –	Imunolocalização de células ED-1-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Quantificação de células ED-1-positivas nos grupos experimentais	54
Figura 9 –	Imunolocalização de células ED-1-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Quantificação de células ED-1-positivas nos grupos experimentais	55

Figura 10 –	Imunolocalização de células p-JNK-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Quantificação de células p-JNK-positivas nos grupos experimentais	56
Figura 11 –	Imunolocalização de células p-JNK-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Quantificação de células p-JNK-positivas nos grupos experimentais	57
Figura 12 –	Imunolocalização de fibronectina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para fibronectina nos grupos experimentais	59
Figura 13 –	Imunolocalização de fibronectina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para fibronectina nos grupos experimentais	60
Figura 14 –	Imunolocalização de α -SM actina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para α -SM actina nos grupos experimentais	62
Figura 15 –	Imunolocalização de α -SM actina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para α -SM actina nos grupos experimentais	63

Figura 16 –	Imunolocalização de vimentina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para vimentina nos grupos experimentais	64
Figura 17 –	Imunolocalização de vimentina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para vimentina nos grupos experimentais	65
Figura 18 –	Imunolocalização de desmina no glomérulo para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para desmina nos grupos experimentais	67
Figura 19 –	Imunolocalização de desmina no glomérulo para o rim esquerdo do grupo sham e para o rim clipado dos grupos 2R-1C, 2R-1C tratados com espironolactona e 2R-1C tratados com amilorida. Escore para desmina nos grupos experimentais	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escore para histologia (lesões tubulointersticiais)	40
Tabela 2 -	Escore para vimentina, α -SM actina, fibronectina e desmina	42
Tabela 3 -	Razão entre peso do rim e peso corporal em cada grupo	45
Tabela 4 -	Creatinina plasmática em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento) ...	46
Tabela 5 -	Depuração de creatinina em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)	46
Tabela 6 -	Osmolalidade plasmática em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)	46
Tabela 7 -	Osmolalidade urinária em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)	47
Tabela 8 -	Potássio plasmático em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento) ...	48
Tabela 9 -	Sódio plasmático em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)	48
Tabela 10 -	Razão entre potássio e sódio urinários (UK/UNa) em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)	48
Tabela 11 -	Albuminúria em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α -SM actina	α - actina de músculo liso
AML	Amilorida
AMP	Adenosina 3',5'-monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ARA	Antagonistas do receptor de angiotensina II
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus Celsius
Dcr	Depuração de creatinina
CORAL	The Cardiovascular Outcomes with Renal Atherosclerotic Lesions
DAB	Diaminobenzidina
dL	Decilitro
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ENaC	Canal epitelial de sódio
EPL	Espironolactona
EPM	Erro padrão médio
ERK1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	Grama
h	Hora(s)
IAP-1	Proteína inibidora de apoptose-1
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IRA	Insuficiência renal aguda
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
Kg	Kilograma
L	Litro
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginina metil éster
mol/L	Mol/Litro

μm	Micrômetro
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
mEq	Miliequivalente
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
mOsm	Miliosmol
NF-κB	Fator nuclear-κ B
P	Concentração de creatinina no plasma
PBS	Tampão fosfato/salina
pH	Potencial hidrogeniônico
p-JNK	Quinase c-Jun N-terminal fosforilada
RALES	Randomized Aldosterone Evaluation Study
RFCE	Receptor de fator de crescimento epidermal
RM	Receptor mineralocorticóide
1R-1C	1 rim-1 clipe
2R-1C	2 rins-1 clipe
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SHRSP	Ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular encefálico
TGF-β	Fator transformador de crescimento-β
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
U	Concentração de creatinina na urina
UK/UNa	Razão entre potássio e sódio urinários
USP	Universidade de São Paulo
V	Taxa de fluxo urinário
vs	Versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	BIOSSÍNTESE DA ALDOSTERONA	20
1.2	MECANISMO DE AÇÃO DA ALDOSTERONA	20
1.3	INIBIÇÃO DA AÇÃO DA ALDOSTERONA	22
1.3.1	Bloqueio do RM	22
1.3.2	Bloqueio do ENaC	22
1.4	ALDOSTERONA E DOENÇAS RENAIS	23
1.4.1	Estudos clínicos	24
1.4.2	Estudos pré-clínicos	25
1.5	MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO RENAL DE GOLDBLATT E SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	27
1.5.1	Correlação entre os modelos de Goldblatt e as formas clínicas de estenose da artéria renal	28
1.5.2	Lesão renal no modelo 2R-1C	29
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	MATERIAIS	35
3.1.1	Soluções utilizadas	35
3.1.2	Fármacos utilizados	36
3.1.3	Equipamentos utilizados	36
3.2	MÉTODOS	36
3.2.1	Animais, procedimento cirúrgico e tratamento	36
3.2.2	Pesagem e coleta de sangue e urina	37
3.2.3	Creatinina, osmolalidade, sódio e potássio	38
3.2.4	Albuminúria	38
3.2.5	Pressão sanguínea sistólica	39
3.2.6	Histologia	39
3.2.7	Imuno-histoquímica	40
3.2.8	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	43

4.1	PESO CORPORAL E PESO DOS RINS	44
4.2	CREATININA, OSMOLARIDADE, SÓDIO E POTÁSSIO	45
4.3	ALBUMINÚRIA	49
4.4	PRESSÃO SISTÓLICA	49
4.5	HISTOLOGIA	50
4.6	IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
4.6.1	Macrófagos/monócitos e p-JNK	53
4.6.2	Fibronectina	58
4.6.3	α-SM actina e vimentina	61
4.6.4	Desmina	66
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOSÍNTESE DA ALDOSTERONA

A aldosterona é um hormônio esteróide da família dos mineralocorticóides, cuja biossíntese é relatada principalmente na zona glomerulosa do córtex das glândulas suprarrenais. Os principais estímulos para sua produção são a elevada concentração plasmática de potássio e a atividade do sistema renina-angiotensina, principalmente a da angiotensina II (RANG et al., 2007). Nesse último aspecto, a distribuição de renina pelas células juxtaglomerulares do rim promove a clivagem do angiotensinogênio para formar a angiotensina I. Essa, por sua vez, é convertida a angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II, via receptor tipo 1, estimula a síntese de aldosterona por regular o gene do CYP11B2. Esse gene codifica o CYP11B2 (também denominado aldosterona sintase) que é uma enzima chave para síntese do hormônio (BREWSTER; PERAZELLA, 2004; TOMASCHITZ et al., 2010).

1.2 MECANISMO DE AÇÃO DA ALDOSTERONA

O mecanismo de ação da aldosterona é mediado pela sua ligação ao receptor mineralocorticóide (RM) (Figura 1). Esse é expresso nas células epiteliais renais (túbulo distal e glomérulo), mas também está presente em órgãos como cérebro (GÓMEZ-SANCHES, 2004), coração (LOMBES et al., 1995) e vasos sanguíneos (GOLESTANEH et al., 2001). A aldosterona e os glicocorticóides possuem afinidade similar pelo RM. Dessa forma, para prevenir a ocupação do RM pelo cortisol, cuja concentração plasmática é de 100 a 1000 vezes maior que a da aldosterona, a enzima 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 converte o cortisol em cortisona que possui uma fraca afinidade pelo RM (FARMAN; RAFESTIN-OBLIN, 2001). O complexo ativado aldosterona-receptor é deslocado para o núcleo, onde aumenta a expressão de genes incluindo os do canal epitelial de sódio (ENaC), bem como aumenta a probabilidade de abertura desse canal. Dessa forma, há reabsorção de sódio e uma consequente mudança no gradiente eletroquímico, a

qual resulta na excreção de potássio. Portanto, a aldosterona tem importante função na homeostase de volume extracelular e pressão sanguínea (BONVALENT, 1998).

Além do mecanismo genômico, recentes estudos têm atribuído um mecanismo rápido e não genômico para a ação da aldosterona (Figura 1). Tal mecanismo é pouco entendido e a literatura disponível se mostra controversa. Sabe-se, nesse contexto, que as ações não genômicas podem ser, em alguns casos, atribuídas ao RM e em outros, a um receptor de membrana distinto. Além disso, as ações são variadas e mediadas por sistemas de segundos mensageiros (BOLDYREFF; WEHLING, 2003; GOOD, 2007; GROSSMAN; GEKLE, 2009). Recentemente, foi demonstrado que através da ação não genômica, a aldosterona via RM aumenta a expressão do receptor de fator de crescimento epidermal (RFCE) e de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) no rim de ratos (SINPHITUKKUL et al., 2011).

Figura 1 - Ações genômicas e não genômicas da aldosterona e sua ligação ao receptor mineralocorticoide. RM: receptor mineralocorticoide; RFCE: receptor de fator de crescimento epidermal; ERK1/2: quinases reguladas por sinal extracelular; ENaC: canal epitelial de sódio. (Adaptada de LASTRA et al., 2010)

1.3 INIBIÇÃO DA AÇÃO DA ALDOSTERONA

1.3.1 Bloqueio do RM

A observação de que algumas espirolactonas bloqueavam o efeito dos mineralocorticóides por Kagawa; Cella e van Arman (1957), possibilitou a síntese de antagonistas do RM. A espironolactona pertence à primeira geração dessa classe de fármacos e é um antagonista competitivo da aldosterona ao RM, impedindo que a expressão de proteínas induzidas por esse hormônio ocorra. Em relação a sua farmacocinética, a espironolactona é extensivamente metabolizada e possui meia-vida de eliminação de aproximadamente 1,6 h. Seu metabólito ativo (canrenona), porém, possui meia-vida de aproximadamente 16,5 h, prolongando os efeitos biológicos (GOODMAN, 2005). Uma segunda geração de antagonistas do RM é representada pela eplerenona (um derivado epóxi da espironolactona), que possui maior seletividade ao RM e pouca afinidade por outros receptores esteróides (EPSTEIN, 2006a). Entretanto, essa droga ainda não se encontra disponível no Brasil.

Os antagonistas do RM são utilizados na terapia anti-hipertensiva e vários estudos (descritos posteriormente) os têm considerado como ferramenta terapêutica para doenças cardíacas, vasculares e renais.

1.3.2 Bloqueio do ENaC

A amilorida foi primeiramente descrita em 1967, por Cragoe et al., como um diurético poupador de potássio. Tal efeito ocorre, pois a amilorida bloqueia a entrada de sódio induzida pela aldosterona ao se ligar diretamente ao ENaC. Embora possa ser capaz de inibir outros canais iônicos como o de troca de Na^+/H^+ e o de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, possui maior especificidade ao ENaC quando administrada em baixas doses (TEIWES; TOTO, 2007). Os parâmetros farmacocinéticos mostram que a amilorida parece não ser metabolizada de forma significativa, apresenta meia-vida

de eliminação entre 6 e 9 h e 50% da dose oral é eliminada na forma inalterada pela urina (SPAHN et al., 1987).

A amilorida também é utilizada na terapia anti-hipertensiva. Em pacientes com hipertensão resistente, a adição desse fármaco ao regime de drogas anti-hipertensivas mostrou-se capaz de reduzir a pressão arterial de forma dose-dependente (EIDE et al., 2004). Além disso, considerando que já é sabido que o ENaC encontra-se presente e funcional em células epiteliais dos rins e do sistema cardiovascular, foi relatado que a amilorida melhorou a fibrose cardíaca em modelos animais com formas de hipertensão sal-dependentes (CAMPBELL et al., 1993; MIRKOVIC et al., 2002), bem como atenuou a proteinúria em outros modelos com lesão renal (SEPEHRDAD et al., 2003; ZHANG et al., 2011). Dessa forma, a amilorida mostra-se atrativa também no estudo de novos alvos terapêuticos e pode ajudar a compreender se o mecanismo pela qual a aldosterona atua nas doenças está relacionado ao bloqueio do ENaC.

1.4 ALDOSTERONA E DOENÇAS RENAIS

Sabe-se hoje, que além de seus efeitos fisiológicos, a aldosterona pode contribuir para a progressão de doenças como a hipertensão arterial e a danos no coração, vasculatura e rins (EPSTEIN, 2006a; TOMASCHITZ et al., 2010). Nesse último aspecto, embora muitos estudos tenham demonstrado a participação da angiotensina II na progressão da doença renal e que a terapia com inibidores da ECA (IECA) ou com antagonistas do receptor de angiotensina II (ARA) possuem um efeito benéfico nesse caso, eles não permitem diferenciar a contribuição da angiotensina II ou da aldosterona (EPSTEIN, 2006a). Por outro lado, como descrito a seguir, ensaios clínicos e pré-clínicos têm mostrado as consequências renais da ativação do RM, bem como de seu antagonismo farmacológico pela espironolactona ou eplerenona (Figura 2).

Figura 2 - Implicação da aldosterona e do receptor mineralocorticoide nas doenças renais em humanos e/ou modelos experimentais (Adaptada de BERTOCCHIO; WARNOCK; JAISSE, 2011)

1.4.1 Estudos clínicos

Estudos clínicos demonstraram que pacientes com aldosteronismo primário apresentam um excesso de albuminúria comparado com pacientes com hipertensão essencial (HALIMI; MIMRAN, 1995; RIBSTEIN et al., 2005). Diversos ensaios clínicos têm também mostrado que o bloqueio do RM em adição ao uso de IECA ou ARA promove redução da albuminúria em pacientes com doença crônica renal associada ou não a diabetes (BIANCHI; BIGAZZI; CAMPESE, 2005; CHRYSOSTOMOU et al., 2006; EPSTEIN, 2006b; GUNEY et al., 2009; RACHMANI et al., 2004; SATO; HAYASHI; SARUTA, 2005; SCHJOEDT et al., 2005; TYLICKI et al., 2008). Além disso, a terapia com espironolactona reduziu a proteinúria em pacientes com rim transplantado (GONZÁLEZ MONTE et al., 2010).

O bloqueio do RM é importante também em pacientes, que apesar de fazerem uso de IECA ou ARA, apresentam valores elevados de aldosterona plasmática, fenômeno denominado de “escape da aldosterona” (MCKELVIE et al., 1999; SATO; SARUTA, 2003; SCHJOEDT et al., 2004).

Além disso, um estudo denominado RALES (Randomized Aldosterone Evaluation Study) mostrou uma redução de 30% na morbidade e mortalidade de pacientes com insuficiência cardíaca, após a administração de 26 mg/dia de espironolactona incluída na terapia convencional com IECA, diuréticos de alça e digoxina (PITT et al., 1999).

Vale considerar que, embora a administração de antagonistas da aldosterona mostre benefícios na progressão da doença renal, seu uso prolongado pode levar a hipercalcemia. Nesse aspecto, deve-se realizar o monitoramento bioquímico do paciente. Além disso, alguns pacientes relatam a presença de efeitos sexuais indesejados, como ginecomastia e impotência em homens e distúrbios menstruais em mulheres na pré-menopausa. Isso é atribuído ao fato da espironolactona também se ligar em receptores de androgênio e progesterona. Nesse caso, a eplerenona mostra-se como alternativa, visto que possui alta seletividade ao RM e pouca afinidade por outros receptores esteróides (EPSTEIN, 2006a).

1.4.2 Estudos pré-clínicos

Em 1998, Rocha et al. observaram que o tratamento com espironolactona em ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular encefálico (SHRSP) preveniu o desenvolvimento de proteinúria e de lesões vasculares, renais e cerebrais, porém não houve redução significativa da pressão arterial. Em um segundo modelo experimental de hipertensão, caracterizado pela administração de L-NAME (bloqueador da sintase de óxido nítrico), angiotensina II e salina 1%, a administração da eplerenona ou a adrenalectomia atenuaram lesões do miocárdio e renais, com prevenção da proteinúria. Tais efeitos também ocorreram independentemente da diminuição da pressão arterial. Além disso, a infusão da aldosterona aos ratos adrenalectomizados reverteu o dano renal nesse modelo (ROCHA et al., 2000). Animais tratados com sal e aldosterona desenvolveram hipertensão arterial grave num modelo descrito por Blasi et al. (2003). Os efeitos induzidos pela aldosterona apareceram na forma de inflamação e necrose renal, os quais foram atenuados pela eplerenona.

Em modelos animais para a nefropatia diabética, o bloqueio do RM também tem se mostrado eficiente em reduzir a lesão renal. Fujisawa et al. (2004) observaram que após três semanas de indução da diabetes por estreptozotocina há um aumento da deposição de colágeno, macrófagos, bem como da expressão de proteína inibidora de apoptose-1 (IAP-1) e fator transformador de crescimento- β (TGF- β) nos glomérulos e tubulointerstício, os quais foram atenuados pelo tratamento com espironolactona. Utilizando o mesmo modelo experimental, Yuan, Jia e Bao (2007) demonstraram que após 30 dias de terapia com espironolactona também houve redução dos níveis do TGF- β no glomérulo, além de menor expressão de IAP-1, de estresse oxidativo e de deposição de matriz extracelular, avaliada pela expressão de fibronectina, no córtex renal. Além disso, Taira et al. (2008) mostraram que o efeito renoprotetor da espironolactona pode estar relacionado com a inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), incluindo a expressão do CYP11B2 renal no mesmo modelo. Em outro estudo, rins de ratos com diabetes tipo 2 apresentaram menor processo inflamatório com a inativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) em consequência do bloqueio do RM com espironolactona (HAN et al., 2006). A associação de eplerenona com enalapril (IECA) aumentou a filtração glomerular e reduziu a presença de colágeno tipo IV, IAP-1 e TGF- β , atenuando a glomeruloesclerose na nefropatia diabética em ratos (KANG et al., 2009). Além disso, o tratamento com espironolactona reduziu a proteinúria e a lesão nos podócitos, demonstrado pela diminuição do marcador desmina e aumento do marcador sinaptopodina, em ratos diabéticos (TOYONAGA et al., 2011).

A aldosterona também tem se mostrado como mediadora da nefrotoxicidade induzida por ciclosporina A em ratos. Nesse contexto, a administração da espironolactona melhorou a fibrose tubulointersticial e a arteriopatía, reduzindo a expressão de TGF- β , fibronectina e colágeno, além de prevenir a insuficiência renal (FERIA et al., 2003). A utilização de eplerenona também preveniu alterações que aparecem nesse modelo, como redução da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, bem como a hipertensão arterial associada (NIELSEN et al., 2008).

Além disso, o antagonismo do RM com espironolactona atenuou a fibrose renal em camundongos submetidos à obstrução ureteral unilateral completa (TRACHTMAN et al., 2004).

Como podemos notar, o papel da aldosterona na lesão renal é descrita em vários modelos animais, inclusive em modelos que estão associados com hipertensão. Entretanto, há escassos trabalhos sobre o papel desse hormônio na hipertensão renovascular (2 rins-1 clipe ou hipertensão de Goldblatt).

1.5 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSÃO RENAL DE GOLDBLATT E SISTEMA RENINA- ANGIOTENSINA- ALDOSTERONA

Em 1934, Goldblatt et al. realizaram uma série de experimentos, na qual a artéria renal de cães era comprimida com um clipe de prata de espessura variável de acordo com o grau de hipertensão desejado. Esse modelo de hipertensão renal foi adaptado para ratos por Schaffenburg (1959). A partir dos estudos iniciais de Goldblatt et al. (1934), dois modelos distintos de hipertensão renal foram descritos: no primeiro realizava-se nefrectomia unilateral seguida de clampeamento do rim contralateral (modelo 1 rim-1 clipe; 1R-1C). No segundo, apenas um rim era clipado enquanto que o contralateral era mantido intacto (modelo 2 rins-1 clipe; 2R-1C). Em ambos os modelos observou-se hipertensão arterial de valores elevados que se desenvolvia cerca de uma semana após o procedimento cirúrgico.

O mecanismo fisiopatológico responsável pelo desencadeamento de hipertensão arterial é distinto nos dois modelos. No modelo 1R-1C há ativação do SRAA nos primeiros dias após a colocação do clipe cirúrgico (BRODY et al., 1983). Em seguida, a ativação desse sistema promove retenção de sal e água, com consequente *feedback* negativo para a produção de renina. Assim, em sua fase crônica o modelo 1R-1C apresenta hipertensão arterial com expansão do volume extracelular à custa de retenção de sódio e baixa atividade de renina plasmática (CARRETERO et al., 1974). Além disso, o uso de IECA ou de ARA não é eficaz em controlar a pressão arterial nesse modelo experimental (GAVRAS et al., 1973).

Por outro lado, a hipertensão no modelo 2R-1C é gerada pela ativação permanente do SRAA. Observa-se um aumento gradual e crônico da pressão arterial, com o platô atingido em duas semanas. Nesse modelo, enquanto houver a manutenção da função renal pelo rim não clipado, não haverá retenção significativa de sódio. A alteração da pressão de perfusão no rim clipado é sentida por

mecanorreceptores da parede da arteríola aferente. Esse sinal é transmitido para a zona justaglomerular e a atividade da renina plasmática torna-se elevada, o que acarreta a formação sistêmica e tecidual de angiotensina II e a secreção de aldosterona (BADER; GANTEN, 2000; WILLIAMS, 2005). A concentração de renina no rim clipado é 3 a 4 vezes maior que o normal dentro de uma semana. Por outro lado, no rim contralateral os níveis de renina são quase indetectáveis, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento da hipertensão, com consequente aumento da pressão de perfusão e do fluxo sanguíneo renal, bem como o aumento de renina circulante (FAZAN; SILVA; SALGADO, 2001). A presença de angiotensina II leva a vasoconstrição periférica, ativação inflamatória e a hipertrofia vascular e cardíaca que são observadas nesse modelo (TOUYZ, 2005).

1.5.1 Correlação entre os modelos de Goldblatt e as formas clínicas de estenose da artéria renal

A hipertensão arterial e a função renal estão intimamente relacionadas, podendo a hipertensão ser tanto a causa como a consequência de uma doença renal. A hipertensão renovascular é uma forma secundária de hipertensão caracterizada pela hipoperfusão renal, sendo a estenose (estreitamento do lúmen) da artéria renal a causa mais comum (KARASH; RUBIN, 1998). Conforme já descrito, a estenose experimental no modelo de Goldblatt ocorre em função do clampeamento da artéria renal. Por outro lado, nos casos clínicos a obstrução do fluxo é ocasionada na maior parte dos casos (70-90%) pela presença de placa de aterosclerose das artérias renais principais. Essa situação é principalmente detectada em pacientes com mais de 50 anos de idade e nesse contexto, a aterosclerose é desencadeada por uma somatória de fatores genéticos e ambientais, os quais destacam-se a hipercolesterolemia, o tabagismo, a presença de hipertensão arterial e do diabetes melito (DE MAST; BEUTLER, 2009; OLIN, 2002).

Em ambas as situações (experimental e clínica), a doença renal crônica (DRC) pode se desenvolver como consequência da estenose das artérias renais. As manifestações clínicas da DRC, nesses casos, são insidiosas e diversas,

dependendo, em parte, do tempo de evolução, do acometimento renal uni ou bilateral, do grau de insuficiência renal, da severidade e persistência da estenose aterosclerótica e da presença de fatores de comorbidade (LÓPEZ-NOVOA et al., 2011).

Um ponto controverso está relacionado ao tratamento de pacientes portadores de estenose das artérias renais. Atualmente, pode-se optar pelo tratamento clínico, através da colocação de *stents*. Entretanto, respostas positivas ou negativas em relação à função renal podem ocorrer depois da revascularização (CHUNG; KIM, 2010). Além disso, o uso de IECA e ARA tem mostrado ser altamente eficaz na prevenção de complicações cardiovasculares e morte em pacientes com alto risco de aterosclerose e em portadores de doenças renais (RUILOPE et al., 2001). Porém, o uso de IECA ou de ARA não é recomendado formalmente pelo risco de insuficiência renal aguda (IRA) (WYNCKEL et al., 1998) observada em alguns pacientes e nos modelos experimentais quando há rim único clipado (1R-1C) ou quando há estenose bilateral das artérias renais (2 rins- 2 cliques; 2R-2C). Assim, o tratamento em pacientes com estenose das artérias renais é ainda incerto e novos ensaios clínicos estão em andamento para a resolução dessa questão, com destaque para o estudo CORAL (The Cardiovascular Outcomes with Renal Atherosclerotic Lesions), no qual é comparado o tratamento endovascular com o tratamento clínico com uso de IECA (COOPER et al., 2006).

1.5.2 Lesão renal no modelo 2R-1C

Sabe-se que no modelo 2R-1C, o rim cuja artéria estiver clipada sofrerá os efeitos da hipoperfusão, como a isquemia (WILSON; BYROM, 1939, 1940) (Figura 3). Os rins são órgãos que realizam intenso trabalho tubular de reabsorção de substâncias filtradas nos glomérulos. Estes processos são em grande parte ativos, ou seja, mediados pela quebra de adenosina trifosfato (ATP). Assim, o tecido renal necessita de grande aporte energético e de oxigênio. Estima-se que na transição córtico-medular haja o maior consumo de oxigênio celular do organismo humano. Dessa forma, o impedimento de aporte adequado de sangue ao tecido renal pela estenose leva à isquemia e morte celular (BREZIS; ROSEN, 1995). Por outro lado, o

rim remanescente apresenta hipertrofia e danos glomerulares, tubulares e vasculares devido à agressão causada pela hipertensão arterial (WILSON; BYROM, 1939, 1940) (Figura 3). Nesse contexto, Mai et al. (1993) relataram que os túbulos e o interstício são os mais importantes sítios de lesão no modelo 2R-1C. Independente de suas causas, a lesão tubulointersticial caracteriza-se por atrofia tubular, infiltrado de células, fibrose e aumento de volume intersticial, de forma que, outras estruturas como o glomérulo são danificadas com a queda progressiva da função renal (BRADEN; O'SHEA; MULHERN, 2005; LÓPEZ-NOVOA et al., 2011).

Figura 3 - Eventos característicos da doença renal estenótica unilateral. (Adaptada de LÓPEZ-NOVOA et al., 2011)

Finalmente, como já descrito acima, a aldosterona participa das lesões renais em vários modelos animais, levando ao desenvolvimento de proteinúria, inflamação, fibrose e lesão de podócitos. Dessa forma, é possível hipotetizar que a aldosterona também possa participar da progressão das lesões renais, especialmente de alterações tubulointersticiais, no modelo 2R-1C.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do bloqueio do receptor mineralocorticóide pela espironolactona nas alterações funcionais e estruturais renais que ocorrem no modelo de hipertensão 2R-1C;
- Avaliar se o efeito da espironolactona na lesão renal é dependente do seu efeito hipotensor;
- Avaliar se um dos mecanismos associados ao efeito da espironolactona é a inibição direta do ENaC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Soluções utilizadas

- Soluções padrões de albumina 0,04, 0,06 e 0,10 mg/mL;
- Tampão tris-acetato pH 8,6;
- Solução de Bouin;
- Tricromo de Masson;
- Azida sódica 10%;
- Água oxigenada 30%;
- PBS (tampão fosfato/salina) pH 7,4 (NaCl 0,15 mol/L e tampão fosfato 0,01 mol/L);
- BSA (albumina sérica bovina) 5%;
- Anticorpos primários (diluídos em PBS+BSA 1% a partir da solução inicial): anti-ED1 (1:1000; Serotec, Reino Unido), anti-p-JNK (quinase c-Jun N-terminal fosforilada) (1:30; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, EUA), anti-fibronectina monoclonal (1:500; Harlan Sera-Lab, Inglaterra), anti- α -actina de músculo liso (α -SM actina) (1:1000; Dako A/S, Dinamarca), anti-vimentina (1:500; Dako A/S, Dinamarca) e anti-desmina (1:100; Dako A/S, Dinamarca);
- Anticorpos secundários (diluídos em PBS+BSA 1% a partir da solução inicial): biotilado monoclonal produzido em camundongo (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e biotilado policlonal produzido em coelho (1:400; Dako A/S, Dinamarca);
- Avidina-Biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA);
- Solução de DAB (diaminobenzidina) (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Solução de cloreto de níquel;
- Metilgreen;
- Hematoxilina.

3.1.2 Fármacos utilizados

- Espironolactona 20 mg/Kg/dia (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA): administrada em suspensão aquosa, por via oral, com agitação prévia;
- Amilorida 7 mg/Kg/dia (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA): administrada em suspensão aquosa, por via oral, com agitação prévia;
- Tribromoetanol 2,5% (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA): administrado por via intra peritoneal.

3.1.3 Equipamentos utilizados

- Banho de aquecimento;
- Espectrofotômetro;
- Osmômetro (Fiske OS Osmometer, Norwood, EUA);
- Fotômetro de chama (Micronal, modelo 262, São Paulo, Brasil);
- Fonte de eletroforese;
- Estufa;
- Pletismógrafo de cauda (CODA- Kent Scientific, Torrington, EUA);
- Micrótoomo;
- Microscópio de luz branca acoplado a câmera fotográfica.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animais, procedimento cirúrgico e tratamento

Para o seguinte estudo foram utilizados ratos Wistar, com peso de 180 g fornecidos pelo Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no Biotério da Clínica Médica, dessa

mesma unidade, com livre acesso a água e ração e sob condições ideais de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (22-25 °C) durante o experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios e procedimentos descritos no Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, e o protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

A hipertensão foi induzida a partir da técnica de produção da hipertensão renovascular 2R-1C desenvolvida por Goldblatt et al. (1934) e adaptada por Schaffenburg (1942). A cirurgia foi feita sob anestesia com tribromoetanol 2,5% (1 mL/100 g de peso corporal) com a colocação de um clipe de prata de 0,20 mm de abertura na artéria renal esquerda do animal. Em um grupo de animais, o procedimento cirúrgico foi realizado de forma semelhante ao descrito acima, entretanto sem a colocação do clipe (grupo sham; n=10). Após duas semanas do procedimento cirúrgico, os animais foram divididos em 3 grupos sendo que para o primeiro grupo nenhuma droga foi administrada (grupo 2R-1C; n=8), para o segundo grupo foi administrado por via oral espironolactona (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA; 20 mg/Kg/dia) (grupo 2R-1C+espironolactona; n=10) e para o terceiro grupo, amilorida (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA; 7 mg/Kg/dia) (grupo 2R-1C+amilorida; n=12). A dose de 20 mg/Kg/dia de espironolactona foi mostrada ser suficiente para bloquear a ação e ligação da aldosterona no RM durante análise cinética *in vivo* (DE GASPARO et al., 1987). Embora a fase aguda do modelo de Goldblatt comece quase imediatamente após a realização do procedimento cirúrgico, o tratamento teve seu início na 2ª semana posterior com a finalidade de aproximar da situação temporal ocorrida com a maioria dos seres humanos que são diagnosticados clinicamente com estenose da artéria renal. Os tratamentos foram administrados aos ratos durante 4 semanas. O bloqueio da ação da aldosterona se faz importante nesse período, pois nele o aumento da pressão sanguínea encontra-se associado à elevada atividade do sistema renina-angiotensina e a retenção de sal e água (MARTINEZ-MALDONADO, 1991).

3.2.2 Pesagem e coleta de sangue e urina

Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas, com livre acesso a água e privados de ração, para a coleta de urina durante o período de 24 h. Tal coleta ocorreu antes do procedimento cirúrgico; na 2ª semana após a cirurgia (antes do início do tratamento) e na 6ª semana após a cirurgia (após o término do tratamento). Após a retirada dos ratos da gaiola foi coletada amostra de sangue através da punção da cauda. As amostras de urina e plasma foram conservadas à temperatura de -20 °C até o uso.

Semanalmente, os ratos foram pesados e ao final do experimento (6ª semana), os rins foram perfundidos e pesados.

3.2.3 Creatinina, osmolalidade, sódio e potássio

A análise de creatinina nas amostras de plasma e urina foi realizada por método colorimétrico utilizando ácido pícrico (HAUGEN, 1953). A depuração renal de creatinina foi calculada pela fórmula padrão $Dcr = UxV/P$, onde U é a concentração na urina, V é a taxa de fluxo urinário e P é a concentração no plasma. A osmolalidade foi determinada em osmômetro (Fiske OS Osmometer, Norwood, EUA), por abaixamento do ponto de congelamento. O sódio (Na^+) e o potássio (K^+) foram quantificados por fotometria de chama (Micronal, modelo 262, São Paulo, Brasil).

3.2.4 Albuminúria

A determinação da excreção de albumina foi realizada nas amostras de urina 24 h. O método utilizado para dosagem foi o eletroimunoensaio em gel de agarose desenvolvido por Laurell (1972) e adaptado por Coimbra; Furtado; Lachat (1983). Foram utilizados nesse processo anticorpo antialbumina de rato, soluções padrões

contendo 0,04, 0,06 e 0,10 mg/mL de albumina, agarose tipo II (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e tampão tris-acetato, pH 8,6.

3.2.5 Pressão sanguínea sistólica

A pressão sanguínea sistólica foi medida semanalmente através do método indireto de pletismografia de cauda (CODA- Kent Scientific, Torrington, EUA). Antes de tal procedimento, os ratos foram colocados em tubos de contenção e mantidos em caixa térmica previamente aquecida. A pressão sistólica considerada foi a média de 9 medidas. Apenas os ratos cuja pressão sistólica foi superior a 160 mmHg na 2ª semana após a cirurgia foram incluídos no protocolo experimental.

3.2.6 Histologia

O rim esquerdo dos ratos sham (n=6) e os rins clipado e não clipado dos ratos hipertensos (para cada rim: n=6 no grupo 2R-1C; n=7 no grupo 2R-1C+espironolactona; n=8 no grupo 2R-1C+amilorida) removidos foram cortados transversalmente, fixados em paraformol 4%, pós-fixados em solução de Bouin por 4 h, lavados em álcool 70% e incluídos em parafina. Cortes com 3 µm de espessura foram corados com tricromo de Masson. A análise histológica foi realizada sem conhecimento prévio dos grupos. A extensão da lesão tubulointersticial foi avaliada de acordo com o escore de Shih; Hines e Nielasen (1988), que refletia o grau da lesão, descrito na tabela abaixo (Tabela 1). A presença de necrose tubulointersticial, infiltrado inflamatório, alteração vascular, dilatação e atrofia tubular foram consideradas na análise.

Tabela 1 - Escore para histologia (lesões tubulointersticiais)

Escore	Característica do tubulointerstício
0	Normal
0,5	Com lesões discretas e focais
1	Com < 10% da área lesada
2	Com < 10-25% da área lesada
3	Com 25-75% da área lesada
4	Com > 75% da área lesada

3.2.7 Imuno-histoquímica

Cortes dos rins foram colocados em três banhos consecutivos de xilol, para a eliminação da parafina e em seguida colocados em três banhos de álcool em concentrações decrescentes para a hidratação do corte. Os cortes foram então incubados por 10 minutos em solução contendo 2 mL de azida sódica 10% e 2 mL de água oxigenada 30%, diluídas para 200 mL de água destilada, para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Logo após, foram lavados em banho de tampão fosfato/salina (PBS) pH 7,4 (NaCl 0,15 mol/L e tampão fosfato 0,01 mol/L) por 5 min e incubados com os seguintes anticorpos primários:

- Para avaliação do processo inflamatório:
 - anti-ED1: monoclonal (Serotec, Reino Unido), incubação a 60 min em temperatura ambiente (1:1000). Esse anticorpo reage com antígenos presentes no citoplasma de macrófagos e monócitos.
 - anti-p-JNK: monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, EUA), incubação overnight a temperatura ambiente de 4-8 °C (1:30). A JNK e seu substrato c-jun têm importantes funções nos processos inflamatórios e na regulação das vias de apoptose.
- Para avaliação da produção de matriz extracelular:
 - anti-fibronectina: monoclonal (Harlan Sera-Lab, Inglaterra), incubação overnight a temperatura ambiente de 4-8 °C (1:500).

- Para avaliação das alterações nos túbulos e interstício:
 - anti- α -SM actina: monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), incubação overnight a temperatura ambiente de 4-8 °C (1:1000). A actina é um componente do citoesqueleto das células do músculo liso dos vasos renais. Células tubulares e intersticiais só expressam α -SM actina quando estão em fase de transdiferenciação ou diferenciação.
 - anti-vimentina: monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), incubação a 60 min em temperatura ambiente (1:500). Células tubulares em condições normais não expressam vimentina. A presença da reação para vimentina é sugestiva de lesão tubular recente ou falta de diferenciação das células tubulares.
- Para avaliação das alterações nos podócitos:
 - anti-desmina: monoclonal (Dako A/S, Dinamarca), incubação a 60 min em temperatura ambiente (1:100). A desmina é um componente do citoesqueleto, cuja expressão nas células epiteliais dos glomérulos tem sido relacionada à lesão nos podócitos.

Após a incubação do anticorpo primário e lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado monoclonal produzido em camundongo (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para macrófagos, p-JNK, α -SM-actina, vimentina e desmina ou policlonal produzido em coelho (1:400; Dako A/S, Dinamarca) para fibronectina, diluídos em solução de PBS + BSA 1%, por 30 min em temperatura ambiente. Após incubação e lavagem em PBS, os cortes foram incubados em solução contendo Avidina-Biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e PBS + BSA 1%, por 30 min em cuba úmida à temperatura ambiente. A cor foi desenvolvida pela adição de solução de DAB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) com ou sem cloreto de níquel na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A contracoloração foi feita com metilgreen ou hematoxilina, de acordo com o anticorpo utilizado.

Para a análise de macrófagos e p-JNK foram contados o número de células imunomarcadas por campo no tubulointerstício cortical. O número total obtido na contagem foi dividido pelo número de campos contados e determinado o número médio de células/campo/rim. Para avaliar a imunomarcção para α -SM actina,

vimentina e fibronectina, o córtex renal foi examinado semiquantitativamente em 50 campos, sob aumento de 40x, e o escore médio por campo/rim foi calculado. Para desmina, 100 glomérulos foram examinados, sob aumento de 40x, e o escore médio por glomérulo/rim foi calculado. Os escores refletem a extensão da área marcada e foram julgados de acordo com a tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Escore para vimentina, α -SM actina, fibronectina e desmina

Escore	% do campo com marcação
0	≤ 5
1	> 5 – 25
2	> 25 – 50
3	> 50 – 75
4	> 75

3.2.8 Análise estatística

Os dados relativos a peso corporal, peso dos rins e pressão arterial sistólica foram analisados utilizando-se análise de variância-ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. Os dados bioquímicos, de histologia e de imuno-histoquímica foram analisados por ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Os resultados estão expressos como mediana e percentis (25; 75%).

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL E PESO DOS RINS

A figura 4 mostra um aumento progressivo na média de ganho de peso corporal entre os grupos submetidos à cirurgia sham e 2R-1C. Até a 3ª semana pós-cirurgia, as médias de peso corporal dos grupos não apresentaram diferença. Entretanto, na 4ª semana, o grupo 2R-1C não tratado apresentou média de peso corporal inferior a do grupo sham ($p < 0,01$), enquanto os tratamentos medicamentosos puderam minimizar a perda de peso nesta semana. Nas 5ª e 6ª semanas, os animais do grupo 2R-1C e 2R-1C+amilorida ganharam menos peso comparado com o grupo sham ($p < 0,001$). Nesse mesmo período, a média do peso corporal dos animais do grupo 2R-1C+espironolactona foi similar a do grupo sham.

Figura 4 - Mudanças no peso corporal durante o período experimental. ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni. Valores como média $\pm$ EPM. ** $P < 0,01$ vs Sham. *** $P < 0,001$ vs Sham.

Como característica dos animais submetidos à cirurgia 2R-1C, ocorreu uma atrofia do rim esquerdo em consequência da inserção do clipe na artéria renal correspondente e uma hipertrofia do não clipado para compensar a função renal (Tabela 3). Há uma redução significativa na média do peso dos rins clipados

($p < 0,05$) e um discreto aumento na do peso dos rins não clipados quando comparada com a dos rins do grupo sham.

Tabela 3 - Razão entre peso do rim e peso corporal em cada grupo

Grupo	Peso do rim (g)/Peso corporal (g) ($/10^3$)	
	Esquerdo (Clipado)	Direito (Não clipado)
Sham	4,60 $\pm$ 0,25	4,60 $\pm$ 0,25
2R-1C	3,45 $\pm$ 0,23*	5,61 $\pm$ 0,31
2R-1C+Espironolactona	3,36 $\pm$ 0,35*	5,03 $\pm$ 0,24
2R-1C+Amilorida	3,37 $\pm$ 0,21*	4,83 $\pm$ 0,24

ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni. n: 8 a 12. Valores como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ vs Sham.

4.2 CREATININA, OSMOLALIDADE, SÓDIO E POTÁSSIO

As medianas de creatinina plasmática (Tabela 4) e da depuração de creatinina (Tabela 5) não apresentaram diferenças entre os grupos na semana pré-cirurgia. Tais valores não se modificaram na 2ª semana pós-cirurgia e diferenças nas medianas entre os grupos também não foram encontradas. Na 6ª semana, houve uma significativa elevação na creatinina plasmática e redução da depuração de creatinina no grupo 2R-1C em relação ao grupo sham ($p < 0,05$). O tratamento com amilorida não preveniu essas mudanças ($p < 0,05$), enquanto a espironolactona atenuou a elevação na creatinina plasmática e a redução da depuração de creatinina.

Tabela 4 - Creatinina plasmática em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Creatinina plasmática (mg/dL)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	0,62 (0,39;0,69)	0,73 (0,59;0,77)	0,43 (0,37;0,52)
2R-1C	0,48 (0,34;0,69)	0,65 (0,29;0,87)	0,87 (0,49;1,26)*
2R-1C+Espironolactona	0,29 (0,25;0,41)	0,55 (0,45;0,61)	0,55 (0,37;1,09)
2R-1C+Amilorida	0,33 (0,27;0,40)	0,36 (0,29;0,61)	0,74 (0,69;1,07)*

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham

Tabela 5 - Depuração de creatinina em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Depuração de creatinina (mL/min/100g)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	0,14 (0,11;0,31)	0,16 (0,14;0,24)	0,46 (0,40;0,55)
2R-1C	0,17 (0,11;0,42)	0,19 (0,10;0,40)	0,26 (0,22;0,32)*
2R-1C+Espironolactona	0,40 (0,23;0,52)	0,29 (0,22;0,48)	0,38 (0,27;0,50)
2R-1C+Amilorida	0,24 (0,20;0,48)	0,43 (0,15;0,60)	0,28 (0,24;0,35)*

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham

As osmolalidades plasmática e urinária, representadas pelas medianas nas tabelas 6 e 7 respectivamente, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos nos três períodos de tempo avaliados. Pode-se observar, porém, uma elevação da osmolalidade plasmática na 6ª semana similar em todos os 4 grupos. Além disso, nessa semana, o grupo 2R-1C comparado ao grupo sham apresenta uma discreta redução na osmolalidade urinária, a qual não foi revertida pelos tratamentos medicamentosos.

Tabela 6 - Osmolalidade plasmática em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Osmolalidade plasmática (mOsm/KgH ₂ O)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	295 (288;298)	289 (287;296)	308 (304;313)
2R-1C	296 (290;310)	291 (285;312)	309 (303;313)
2R-1C+Espironolactona	297 (295;299)	293 (287;303)	317 (303;323)
2R-1C+Amilorida	309 (298;313)	299 (296;303)	314 (308;317)

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75)

Tabela 7 - Osmolalidade urinária em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Osmolalidade urinária (mOsm/KgH ₂ O)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	672 (430;954)	762 (577;965)	752 (653;1157)
2R-1C	705 (487;1164)	760 (511;910)	441 (277;769)
2R-1C+Espironolactona	743 (561;1087)	820 (545;948)	526 (309;680)
2R-1C+Amilorida	813 (599;1186)	1002 (560;1208)	519 (463;832)

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75)

A concentração de potássio e sódio no plasma (Tabelas 8 e 9), bem como a razão entre potássio e sódio urinário (UK/UNa) (Tabela 10) também não foram diferentes estatisticamente entre os grupos. Além disso, não variaram com o tempo pós-cirurgia ou com os tratamentos.

Tabela 8 - Potássio plasmático em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Potássio plasmático (mEq/L)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	5,90 (5,55;6,50)	5,10 (4,85;5,65)	5,55 (4,95;5,85)
2R-1C	5,85 (5,38;6,15)	6,05 (5,13;6,60)	5,50 (4,83;5,70)
2R-1C+Espironolactona	6,15 (5,30;7,10)	5,50 (5,25;6,40)	5,55 (4,85;5,90)
2R-1C+Amilorida	6,20 (5,95;6,70)	5,60 (5,35;6,00)	5,30 (4,85;5,70)

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75)

Tabela 9 - Sódio plasmático em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Sódio plasmático (mEq/L)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	136 (127;137)	128 (120;136)	135 (133;137)
2R-1C	136 (127;144)	136 (122;146)	135 (132;142)
2R-1C+Espironolactona	143 (138;146)	139 (130;144)	135 (129;136)
2R-1C+Amilorida	138 (134;144)	136 (135;139)	134 (131;137)

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75)

Tabela 10 - Razão entre potássio e sódio urinários (UK/UNa) em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2° e 6° semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	UK/UNa		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	1.59 (1.25;1,69)	1,28 (1,17;1,93)	1,59 (1,24;1,90)
2R-1C	1.09 (0,85;1,17)	1,37 (1,03;2,11)	1,42 (0,76;2,24)
2R-1C+Espironolactona	1.54 (1,00;2,42)	1,44 (1,36;1,62)	1,67 (1,34;2,59)
2R-1C+Amilorida	1.69 (0,95;2,21)	1,76 (1,35;2,15)	2,14 (0,73;2,57)

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75)

4.3 ALBUMINÚRIA

Antes da realização da cirurgia, a concentração de albumina na urina dos ratos foi praticamente ausente (Tabela 11). Após duas semanas, um aparecimento discreto, porém significativo de albuminúria pode ser observado nos animais submetidos a cirurgia 2R-1C em relação ao sham. Na 6ª semana, ocorre um significativo aumento na excreção de albumina no grupo 2R-1C não tratado comparado ao sham ($p < 0,05$). Embora a espironolactona ou a amilorida não tenham retornado a concentração de albuminúria ao valor basal, foi possível reduzi-la significativamente com a administração de ambas as drogas.

Tabela 11 - Albuminúria em cada grupo na semana pré-cirurgia e na 2ª e 6ª semanas pós-cirurgia (antes e após o tratamento)

Grupo	Albuminúria (mg/24h)		
	Pré-cirurgia	2ª semana	6ª semana
Sham	0,00 (0,00;0,02)	0,00 (0,00;0,03)	0,00 (0,00;0,10)
2R-1C	0,00 (0,00;0,11)	2,48 (0,28;8,33)**	42,80 (31,54;77,30)***
2R-1C+Espironolactona	0,00 (0,00;0,18)	2,13 (0,18;9,77)**	13,86 (4,30;28,58)*†
2R-1C+Amilorida	0,00 (0,00;0,11)	1,30 (0,34;4,92)**	18,13 (9,02;34,91)**†

ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. n: 8 a 12. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham; ** $P < 0,01$ vs. Sham; *** $P < 0,001$ vs. Sham; † $P < 0,05$ vs. 2R-1C

4.4 PRESSÃO SISTÓLICA

A linha de base da pressão sanguínea sistólica foi similar em todos os grupos. Após a cirurgia, os grupos nos quais foi colocado o clipe apresentaram aumento da pressão sanguínea sistólica comparado com o grupo sham ($p < 0,001$). A partir da 2ª semana, quando os tratamentos foram iniciados, até o fim do experimento, o grupo de animais que recebeu espironolactona ou amilorida teve um aumento da pressão sanguínea sistólica similar ao do grupo 2R-1C não tratado (Figura 5).

Figura 5 - Mudanças na pressão sanguínea sistólica durante o período experimental. ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni. Valores como média $\pm$ EPM. *** $P < 0,001$ vs Sham.

4.5 HISTOLOGIA

A avaliação semi-quantitativa dos cortes histológicos, dos rins clipado e não clipado dos ratos hipertensos e no rim esquerdo do rato normotenso, corados com tricromo de Masson está demonstrada nas figuras 6 e 7. Nenhuma anormalidade foi observada no tubulointerstício do rim nos ratos sham (Figuras 6A, E e 7A, E). Por outro lado, o rim não clipado dos ratos 2R-1C apresentou alterações tubulointersticiais significativas em relação ao grupo sham, sendo caracterizadas por necrose tubulointersticial, infiltrado inflamatório, alteração vascular, dilatação e atrofia tubular e perda da borda em escova dos túbulos (Figuras 6B, E). As características da lesão tubulointersticial no rim clipado dos ratos 2R-1C, do presente estudo, foram predominantemente focais nos túbulos, os quais apresentavam dilatação e atrofia (Figuras 7B, E). Os tratamentos com espironolactona ou amilorida não foram capaz de atenuar as alterações histológicas observadas no rim não clipado e no clipado (Figuras 6C, D, E e 7C, D, E).

Figura 6 – Cortes histológicos corados com tricromo de Masson do rim esquerdo do grupo sham (A) e do rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para lesões tubulointersticiais para os grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75). ** $P < 0,01$ vs. Sham

Figura 7 – Cortes histológicos corados com tricromo de Masson do rim esquerdo do grupo sham (A) e do rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para lesões tubulointersticiais para os grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.6.1 Macrófagos/monócitos e p-JNK

No presente estudo, em ambos os rins dos ratos hipertensos e no rim esquerdo do rato normotenso, foram avaliados dois marcadores de inflamação: a presença de células ED-1 positivas, que caracterizam macrófagos e monócitos (Figuras 8 e 9), e a presença de células imunorreativas para p-JNK (Figuras 10 e 11). A infiltração renal de macrófagos e monócitos foi raramente detectada nos ratos sham. Por outro lado, foi possível observar que a lesão característica nos ratos 2R-1C ocorre de forma focal no córtex renal e se mostra associada com um infiltrado de macrófagos no tubulointerstício, mas não nos glomérulos. A mediana do número de macrófagos apresentou-se mais elevada nos rins não clipados do que nos clipados. Nossos achados também mostram um aumento de células imunorreativas para p-JNK no tubulointerstício do córtex renal dos ratos 2R-1C em comparação aos ratos sham, principalmente do rim não clipado. Estudos demonstram que a JNK e seu substrato c-jun têm importantes funções na regulação das vias de apoptose (BOKEMEYER; SOROKIN; DUNN, 1996; VERHEIJ et al., 1996; XIA et al., 1995) e nos processos inflamatórios (FRANCESCATO et al., 2007). Nas lesões observadas em ambos os rins nos ratos 2R-1C, não se observou uma redução do número de macrófagos e de células imunorreativas para p-JNK em consequência dos tratamentos com espironolactona ou amilorida.

Figura 8 – Imunolocalização de células ED-1-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Quantificação de células ED-1-positivas nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham

Figura 9 – Imunolocalização de células ED-1-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Quantificação de células ED-1-positivas nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

Figura 10 – Imunolocalização de células p-JNK-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Quantificação de células p-JNK-positivas nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

Figura 11 – Imunolocalização de células p-JNK-positivas no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Quantificação de células p-JNK-positivas nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

4.6.2 Fibronectina

A produção de matriz extracelular, através da expressão de fibronectina, também foi avaliada (Figuras 12 e 13). A imunomarcação dessa proteína foi observada nos rins dos ratos 2R-1C, sendo presente no tubulointerstício cortical. O aumento de sua expressão também se mostrou maior nos rins não clipados do que nos clipados. O tratamento com espironolactona mostrou uma tendência em atenuar a expressão de fibronectina no rim não clipado, pois o escore não apresentou diferença significativa com o grupo sham, enquanto tal diferença foi observada para os ratos 2R-1C não tratados ou tratados com amilorida. Para o rim clipado não foi observada diferença significativa de expressão de fibronectina para qualquer um dos grupos de ratos hipertensos em relação aos normotensos (sham).

Figura 12 – Imunolocalização de fibronectina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para fibronectina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham

Figura 13 – Imunolocalização de fibronectina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para fibronectina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

4.6.3 α -SM actina e vimentina

A imuno-histoquímica para α -SM actina está apresentada nas figuras 14 e 15. A expressão dessa proteína nos rins dos ratos sham mostra-se presente em células da musculatura lisa vascular como relatado em estudos prévios para ratos normais (JOHNSON et al., 1991). Entretanto, nos ratos 2R-1C a expressão de α -SM actina foi discretamente elevada no tubulointerstício cortical do rim não clipado e raramente detectada no clipado. A administração com espironolactona ou amilorida não alterou a expressão de α -SM actina em ambos os rins dos ratos hipertensos.

Além disso, foi avaliado neste estudo um marcador de desdiferenciação em células tubulares renais, denominado vimentina (Figuras 16 e 17). Nos rins dos ratos normotensos, a vimentina foi encontrada nas células epiteliais glomerulares e vasculares como descrito em outros trabalhos para ratos normais (FLOEGE et al., 1992). Por outro lado, nos ratos hipertensos 2R-1C, a expressão de vimentina também ocorreu no interstício, bem como nos túbulos e em seus arredores. Tal expressão foi discretamente aumentada no rim não clipado e raramente foi detectada no rim clipado. A terapia com espironolactona ou amilorida não alterou a expressão de vimentina em ambos os rins dos ratos hipertensos.

Figura 14 – Imunolocalização de α -SM actina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para α -SM actina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

Figura 15 – Imunolocalização de α -SM actina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para α -SM actina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins- 1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

Figura 16 – Imunolocalização de vimentina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para vimentina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

Figura 17 – Imunolocalização de vimentina no tubulointerstício cortical para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para vimentina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

4.6.4 Desmina

Os resultados de imuno-histoquímica para desmina estão apresentados nas figuras 18 e 19. Nos ratos sham, a expressão de desmina encontrou-se restrita as células mesangiais e as do músculo liso como descrito para ratos normais em prévios estudos (YAOITA et al., 1990). Por outro lado, sua expressão ocorreu nos podócitos dos rins dos ratos 2R-1C. Os podócitos são as principais células da barreira de filtração glomerular e na lesão renal, sua disfunção encontra-se caracterizada por uma maior expressão de desmina e associada com a proteinúria (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2009). No presente estudo, a expressão de desmina nos podócitos foi significativamente elevada no rim não clipado e discreta no clipado dos ratos hipertensos. O tratamento com espironolactona, mas não com amilorida, atenuou o aumento da expressão de desmina nos podócitos.

Figura 18 – Imunolocalização de desmina no glomérulo para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim não clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para desmina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins- 1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75). * $P < 0,05$ vs. Sham

Figura 19 – Imunolocalização de desmina no glomérulo para o rim esquerdo do grupo sham (A) e para o rim clipado dos grupos 2R-1C (B), 2R-1C tratados com espironolactona (C) e 2R-1C tratados com amilorida (D). Escore para desmina nos grupos experimentais (E). 2R-1C=2 rins-1 clipe; EPL= espironolactona; AML= amilorida. ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida de pós-teste Dunn. Valores como mediana e percentis (25; 75).

5 DISCUSSÃO

Como já descrito, a aldosterona participa da progressão das doenças renais demonstrado em estudos clínicos e experimentais, através de um efeito proteinúrico e por aumentar a expressão de marcadores de inflamação, fibrose e as espécies reativas de oxigênio (EROs). Baseado nessa informação, o modelo 2R-1C, no qual o SRAA encontra-se bastante ativado é interessante para avaliar a eficácia de bloqueadores da ação da aldosterona sobre as lesões renais. As características clínicas e patológicas observadas nesse modelo em ratos se mostram semelhantes às aquelas apresentadas na estenose de artéria renal unilateral em humanos (GALLEGO et al., 2001).

Utilizando-se do modelo experimental 2R-1C no presente trabalho, os resultados apresentados mostram que o bloqueio do RM com espironolactona atenuou a perda de peso dos ratos submetidos à cirurgia 2R-1C. Além disso, como característica do modelo, ocorreu uma atrofia do rim esquerdo em consequência da inserção do clipe na artéria renal correspondente e uma hipertrofia do não clipado para compensar a função renal.

Em relação aos dados bioquímicos, o tratamento com espironolactona atenuou a redução na função renal ao apresentar uma tendência em reduzir a creatinina plasmática e elevar a depuração de creatinina dos ratos 2R-1C. Portanto, o bloqueio do RM previne a diminuição na taxa de filtração induzida no modelo. Tal benefício também foi observado em ratos com nefrotoxicidade por ciclosporina A tratados com 20 mg/Kg de espironolactona por 21 dias (FERIA et al., 2003).

Além disso, o bloqueio do RM não alterou de forma significativa as osmolalidades plasmática e urinária. Nenhuma alteração nesses parâmetros foi observada também quando ratos com nefrotoxicidade induzida por ciclosporina A foram tratados com 100 mg/Kg/dia de eplerenona (NIELSEN et al., 2008).

No presente estudo, não foi observada alteração no nível plasmático de potássio em nenhum dos dois grupos tratados, embora a inibição da aldosterona, seja pelo bloqueio do RM com espironolactona ou pelo bloqueio do ENaC pela amilorida, possa induzir a hipercalemia, especialmente na insuficiência renal, sendo uma causa de morbidade/mortalidade (JUURLINK; MAMDANI; LEE, 2004). Similarmente, o tratamento com 10 mg/Kg/dia de espironolactona em SHRSP ou com 50 mg/Kg/dia desse medicamento a camundongos com obstrução ureteral unilateral ou a ratos com nefropatia diabética não alterou de forma significativa a

concentração de sódio e potássio no sangue e na urina (FUJISAWA et al., 2004; ROCHA et al., 1998; TRACHTMAN et al., 2004). Além disso, nenhuma alteração nesses parâmetros foi observada quando ratos normais (controle) ou com nefrotoxicidade induzida por ciclosporina A foram tratados com 100 mg/Kg/dia de eplerenona (NIELSEN et al., 2008). Em relação à amilorida, o tratamento agudo de ratos SHRSP, com doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, não alterou a razão sódio/potássio urinário durante um período de 24 h (SEPEHRDAD et al., 2003).

Uma redução significativa da albuminúria foi observada no grupo 2R-1C tratado com espironolactona em comparação ao grupo não tratado. A proteinúria é um importante marcador do risco de doenças renais, e também contribui para os danos renais. As proteínas presentes na urina são tóxicas aos túbulos e podem resultar em lesão e inflamação tubulointersticial (ABBATE et al., 1999). A aldosterona tem se mostrado envolvida com a presença de proteinúria. Nesse aspecto, os bloqueadores do RM em conjunto com os IECA ou ARA têm apresentado efeito antiproteinúrico em pacientes com doença crônica renal associada ou não a diabetes, demonstrado por diversos ensaios clínicos (BIANCHI; BIGAZZI; CAMPESE, 2005; CHRYSOSTOMOU et al., 2006; EPSTEIN, 2006b; GUNEY et al., 2009; RACHMANI et al., 2004; SATO; HAYASHI; SARUTA, 2005; SCHJOEDT et al., 2005; TYLICKI et al., 2008). Além disso, a redução da proteinúria também tem sido demonstrada em modelos animais de nefropatia hipertensiva (BLASI et al., 2003; HAO et al., 2004; NARIAI et al., 2012; ROCHA et al., 1998, 2000) e nefropatia diabética (HAN et al., 2006; KANG et al., 2009; TAIRA et al., 2008; YUAN et al., 2007). Em um estudo anterior, no qual ratos 2R-1C foram tratados com eplerenona, a redução da proteinúria foi associada a uma diminuição da pressão intraglomerular (HAO et al., 2004).

A redução da excreção urinária de albumina com a administração de espironolactona aos ratos 2R-1C ocorreu sem que fosse observada uma redução na pressão sanguínea sistólica. A literatura se mostra controversa a esse respeito. Muitos estudos têm demonstrado que a administração de antagonistas da aldosterona ou a adrenalectomia atenua a lesão renal em ratos hipertensos independente da redução da pressão sanguínea (ROCHA et al., 1998, 2000; ZHOU et al., 2004). Além disso, tem-se mostrado uma dissociação entre mudança na pressão sanguínea sistólica e atenuação da proteinúria em ratos com nefropatia

diabética tratados com espironolactona ou eplerenona (HAN et al., 2006; KANG et al., 2009; TAIRA et al., 2008). Por outro lado, outros trabalhos têm mostrado que a redução na pressão sanguínea pode contribuir para proteção renal. No modelo de lesão renal induzida por aldosterona e sal, o tratamento com uma dose de 100 mg/Kg/dia de eplerenona ou espironolactona ou com uma dose de 10 mg/Kg/dia de um novo antagonista do RM, denominado SM-368229, atenuou a hipertensão arterial grave desenvolvida, bem como reduziu a albuminúria (BLASI et al., 2003; NARAI et al., 2012; NISHIYAMA et al., 2004). Hao et al. (2004) observaram reduções significativas na excreção de proteína urinária e na pressão sanguínea sistólica ao iniciar um tratamento com losartan ou eplerenona logo após a cirurgia 2R-1C. Entretanto, quando o tratamento se deu tardiamente, tais benefícios não foram observados. No presente estudo, foi utilizado esse mesmo modelo experimental e uma droga com mesmo mecanismo, entretanto os resultados foram diferentes. Tais diferenças podem ser justificadas pela dose utilizada (100 vs 20 mg/Kg/dia), pelo início do tratamento pós-cirurgia (4° vs 2° semana) e tempo de tratamento (6 e 4 semanas).

Além disso, o efeito antiproteinúrico obtido com a terapia com espironolactona pode estar, em parte, relacionado às alterações iônicas promovidas pelo ENaC. Estudos prévios já demonstraram que a amilorida possui efeito antiproteinúrico em ratos submetidos à nefrectomia 5/6, em camundongos tratados com lipopolissacarídeo que desenvolvem proteinúria transitória (ZHANG et al., 2011) e em SHRSP. Nesse último caso, a amilorida reduziu a proteinúria sem nenhum efeito sobre a pressão sistólica (SEPEHRDAD et al., 2003).

O rim não clipado e o clipado sofrem diferentes tipos de alterações no modelo 2R-1C, sendo no primeiro caso, consequência da hipertensão e no segundo, consequência da hipóxia decorrente da estenose da artéria renal. Alterações tubulointersticiais significativas no rim não clipado dos ratos 2R-1C em relação ao grupo sham foram observadas, as quais se caracterizaram por necrose tubulointersticial, infiltrado inflamatório, alteração vascular, dilatação e atrofia tubular e perda da borda em escova dos túbulos. Sobre esse aspecto, Mai et al., 1993 relataram que as lesões tubulointersticiais precedam as glomerulares e têm uma importante função patofisiológica na nefroesclerose presente no modelo. As características da lesão tubulointersticial no rim clipado dos ratos 2R-1C, do

presente estudo, foram predominantemente focais nos túbulos, os quais apresentavam dilatação e atrofia. O rim não clipado, bem como o clipado mostram alterações morfológicas consistentes com as reportadas por outros autores em ratos com hipertensão renovascular (KOBAYASH et al., 1999; MAI et al., 1993; WENZEL et al., 2002, 2003). Os tratamentos com espironolactona ou amilorida não foram capazes de atenuar as alterações histológicas observadas no rim não clipado e no clipado. Diferentemente, num modelo de predominante lesão renal tubulointersticial relacionado à obstrução ureteral unilateral em camundongos, o bloqueio do RM com 50 mg/Kg/dia de espironolactona atenuou a fibrose renal (TRACHTMAN et al., 2004).

Os monócitos/macrófagos são importantes mediadores da lesão renal e a quantidade dessas células é fortemente associada com o grau de lesão tubulointersticial (WENZEL et al., 2002). O rim não clipado dos ratos 2R-1C apresentou um aumento significativo e focal do infiltrado de monócitos/macrófagos no tubulointerstício cortical, mas não nos glomérulos. O influxo de macrófagos e linfócitos no rim não clipado já ocorre na fase inicial da lesão tubulointersticial (7º dia) e continua aumentando durante as semanas seguintes (MAI et al., 1993). A presença de monócitos/macrófagos no rim clipado ocorreu também de forma focal, porém discreta. Sabe-se que nesse rim o desenvolvimento de inflamação e a geração de EROs são proeminentes (CHADE et al., 2002; LERMAN; TEXTOR; GRANDE, 2009). Além disso, um infiltrado de células inflamatórias, bem como um aumento de fatores inflamatórios como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e TGF- β já são observados no rim isquêmico 4 dias após a colocação do clipe na artéria renal (MATAVELLI; HUANG; SIRAGY, 2011). No presente estudo, a terapia com espironolactona ou amilorida não reduziu o número de monócitos/macrófagos em ambos os rins. Diferentemente, em rins de ratos com lesão induzida pelo diabetes, a utilização de espironolactona foi capaz de inibir a infiltração de macrófagos, bem como a expressão das citocinas pró-inflamatórias fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (FUJISAWA et al., 2004; HAN et al., 2006). Além disso, ratos que receberam infusão de aldosterona e foram tratados com salina exibiram hipertensão e lesão renal caracterizada pelo aumento do número de monócitos/macrófagos no interstício e da expressão de MCP-1, IL-6 e interleucina-1 β (IL-1 β) (BLASI et al., 2003; SUN et al.,

2006). A atenuação da inflamação em consequência da terapia com 100 mg/Kg/dia de eplerenona foi relatada (BLASI et al., 2003).

A família JNK possui três membros, dos quais dois, JNK 1 e JNK 2, são expressos em vários tecidos, incluindo os rins. Uma variedade de estressores celulares, como EROs, citocinas inflamatórias e estresse osmótico, ativa (fosforila) a JNK, que por sua vez pode se deslocar ao núcleo da célula e fosforilar proteínas-alvo específicas que induzem respostas celulares como inflamação e apoptose (BOGOYEVITCH et al., 2004; BOKEMEYER; SOROKIN; DUNN, 1996; FRANCESCATO et al., 2007; MANNING; DAVIS, 2003; VERHEIJ et al., 1996; XIA et al., 1995). Considerando essas respostas, a ativação da JNK tem sido relatada em alguns modelos experimentais de doenças renais (FRANCESCATO et al., 2007; STAMBE et al., 2003). Além disso, outro estudo também relatou que as vias de sinalização da JNK têm importante função na fibrose renal (MA et al., 2007). Nossos achados mostram um aumento do número de células imunorreativas para p-JNK nos túbulos e interstício do córtex renal dos ratos 2R-1C em comparação aos ratos sham, principalmente do rim não clipado. Tal aumento, embora não significativo, foi moderado e os tratamentos com espironolactona ou amilorida não foram capazes de revertê-lo. Diferentemente, Nishiyama et al. (2004) demonstraram que a lesão renal em ratos hipertensos, induzida pela elevação crônica de aldosterona e sal, está associada com o aumento dos níveis renais corticais de EROs e da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Assim, o tratamento com eplerenona ou tempol normalizou a atividade das MAPKs, incluindo a JNK.

A produção de matriz extracelular foi avaliada através da expressão de fibronectina. Um aumento significativo de sua expressão foi observado no tubulointerstício do rim não clipado dos animais 2R-1C. Um acúmulo discreto e focal de fibronectina e de colágenos I, II, IV e V foi detectado no interstício do rim não clipado já no 7º dia após a cirurgia 2R-1C. Tal acúmulo foi tempo-dependente, aparecendo de forma mais pronunciada no período de 3 a 4 semanas pós-cirurgia. Além disso, é possível que o acúmulo de macrófagos e linfócitos possa ter estimulado o acúmulo intersticial desses componentes da matriz extracelular (MAI et al., 1993). O tratamento com espironolactona, mas não com amilorida, atenuou a expressão de fibronectina no rim não clipado dos ratos hipertensos do presente trabalho. Dessa forma, é possível sugerir que a espironolactona pode através de um

efeito direto diminuir a produção de componentes da matriz extracelular como a fibronectina. Além disso, foi descrito, em cultura de células mesangiais renais, que a aldosterona aumenta a expressão de fibronectina através de um mecanismo que possui o TGF- β na via de sinalização (LAI et al., 2006). Utilizando-se um modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina A, Feria et al. (2003) demonstraram ainda que a administração de espironolactona foi capaz de prevenir a expressão de proteínas da matriz extracelular como colágeno I e IV e fibronectina. Para o rim clipado não foi observada diferença significativa de expressão de fibronectina para qualquer um dos grupos de ratos hipertensos em relação aos normotensos (sham).

O aumento da expressão de α -SM actina mostra-se como um marcador de mudanças fenotípicas intersticiais nas doenças renais, ocorrendo especificamente nos miofibroblastos intersticiais (KOBORI et al., 2005; SHIMIZU et al., 2003). Nos ratos 2R-1C a expressão de α -SM actina foi discretamente elevada no tubulointerstício cortical do rim não clipado e raramente detectada no clipado, como já reportado (ENG et al., 1994). Após a administração de aldosterona, a expressão desse marcador se mostrou aumentada no miocárdio (CAMPBELL; JANICKI; WEBER, 1995) e nos rins de ratos. Nesse último caso, a ativação da Rho-quinase mostrou contribuir para maior expressão de α -SM actina e, portanto para a transformação miofibrosblática nas células renais (SUN et al., 2006). No presente estudo, a administração com espironolactona, bem como a de amilorida não alterou a expressão de α -SM actina em ambos os rins dos ratos hipertensos.

A vimentina mostra-se como um marcador de lesão tubular recente. Nos ratos 2R-1C, sua expressão ocorreu no interstício, bem como nos túbulos e em seus arredores. Tal expressão foi discretamente aumentada no rim não clipado e raramente foi detectada no rim clipado. Esses dados corroboram com o estudo realizado por Eng et al. (1994). Entretanto, Kobayashi et al. (1999) descreveram que, no rim clipado, a vimentina foi predominantemente encontrada no interstício, em particular adjacente aos túbulos dilatados. A terapia com espironolactona ou amilorida não alterou a expressão de vimentina em ambos os rins dos ratos hipertensos.

A lesão em podócitos foi avaliada pelo aumento da expressão de desmina. Sua expressão foi significativamente elevada nos podócitos do rim não clipado e bastante discreta nos do clipado dos ratos hipertensos. Estudo anterior demonstrou

que a aldosterona, juntamente com uma dieta rica em sal, induz o dano em podócitos e a proteinúria. Além disso, foi detectada a presença de RM nos podócitos, sugerindo que essas células possam ser outro alvo para os efeitos deletérios da aldosterona. Dessa forma, o efeito antiproteinúrico da eplerenona pode ser atribuído, em parte, ao bloqueio do RM nos podócitos (SHIBATA et al., 2007). Além disso, o tratamento com espironolactona reduziu a proteinúria e a lesão nos podócitos, demonstrado pela diminuição do marcador desmina e aumento do marcador sinaptopodina, em ratos diabéticos. A lesão nos podócitos nesses ratos mostrou-se como resultado do aumento das EROs, mediada através do RM (TOYONAGA et al., 2011). É desconhecido, entretanto, se esse efeito antiproteinúrico dos bloqueadores do RM é primário ou secundário à lesão na barreira de filtração glomerular. Nesse aspecto, Nagase et al. (2006) e Nakhoul et al. (2008) sugerem que aldosterona, por meio de MR, pode causar disfunção primária da barreira de filtração glomerular em doenças renais caracterizadas por proteinúria. A amilorida também demonstrou efeito benéfico na disfunção de podócitos e na proteinúria em ratos submetidos à nefrectomia 5/6 e em camundongos tratados com lipopolissacarídeo que desenvolvem proteinúria transitória (ZHANG et al., 2011). No presente estudo, a redução da proteinúria se mostrou associada a melhora da lesão podocitária em consequência do antagonismo do RM pela espironolactona. Por outro lado, embora a administração de amilorida tenha atenuado a excreção de albumina, ela não foi capaz de reduzir a lesão presente nos podócitos em 4 semanas de tratamento, o que pode sugerir que o efeito proteinúrico relacionado ao ENaC não esteja relacionado a melhora da lesão podocitária nesse modelo animal.

Em suma, o tratamento com espironolactona atenuou a produção de matriz extracelular e a lesão nos podócitos no rim não clipado dos ratos 2R-1C. Por outro lado, a administração de espironolactona ou amilorida não foi capaz de atenuar o processo inflamatório e as alterações nos túbulos e interstício desse rim. Alguns trabalhos mostraram uma atenuação dos danos tubulointersticiais e da expressão de vimentina no rim não clipado de ratos 2R-1C em consequência do uso de IECA e de ARA (KOBAYASHI et al., 1999; WENZEL et al., 2003), entretanto nesses casos a melhora da lesão renal pode ser decorrente da redução da pressão sanguínea. Quanto ao rim clipado, parece improvável que a aldosterona, bem como a angiotensina II tenham alguma função dominante na lesão tubulointersticial

secundária a isquemia. No presente trabalho, as lesões tubulointersticiais e podocitárias no rim clipado, demonstrada pelos diversos marcadores aqui estudados, foram discretas e a terapia com espironolactona ou amilorida não foi capaz de minimizá-las. Além disso, outros estudos demonstraram que a administração de IECA ou ARA a ratos 2R-1C, ao contrário da administração do tempol (inibidor de EROs), mostrou-se ineficiente em melhorar o fluxo sanguíneo e a oxigenação no rim clipado (PALM et al., 2010; WELCH et al., 2003) e também não reduziu os danos tubulointersticiais e a expressão de vimentina (KOBAYASHI et al., 1999; WENZEL et al., 2003).

Esse estudo apresenta algumas limitações, as quais podem ser consideradas. Vale ressaltar, por exemplo, que a avaliação por escores que refletem a extensão da lesão é semi-quantitativa e pode não ter sensibilidade para detectar modificações de menor intensidade (SHIH; HINES; NIELASEN, 1988). Além disso, é possível especular que o tempo de tratamento curto (4 semanas) e/ou a dose baixa de espironolactona (20 mg/Kg/dia) tenham sido insuficientes para um melhor efeito sobre as lesões tubulointersticiais. Nesse último aspecto, embora já tenha sido demonstrado que a dose de 20 mg/Kg/dia de espironolactona é suficiente para bloquear a ação e ligação da aldosterona no RM durante análise cinética *in vivo* (DE GASPARO et al., 1987), a maioria dos trabalhos com modelos animais utiliza doses de 50 e 100 mg/Kg/dia.

Finalmente, a melhora na função e atenuação na excreção de albuminúria e em danos no rim não clipado indicam que a aldosterona participa do desenvolvimento da lesão renal no modelo 2R-1C e que o RM pode ser um alvo terapêutico a ser explorado em pacientes com estenose de artéria renal.

6 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o bloqueio do RM com espironolactona foi capaz de atenuar as mudanças fisiopatológicas na excreção de albumina e na concentração plasmática e depuração de creatinina

O rim clipado apresentou lesões, em decorrência da hipoperfusão, caracterizadas por um processo inflamatório, produção de matriz extracelular e alterações tubulointersticiais e podocitárias discretas. A terapia com espironolactona ou amilorida não foi capaz de minimizá-las.

O rim não clipado dos ratos 2R-1C apresentou lesões, em decorrência da hipertensão, caracterizadas por um aumento significativo do processo inflamatório, da produção de matriz extracelular e da lesão nos podócitos. Além disso, uma expressão discreta de α -SM actina e vimentina foi observada. O tratamento com espironolactona foi capaz de atenuar a produção de matriz extracelular e da lesão nos podócitos nesse rim.

Os efeitos benéficos do tratamento com espironolactona ocorreram independente da redução na pressão sanguínea sistólica e pode ser em parte, dependente do bloqueio do ENaC. Além disso, tais efeitos trazem perspectiva para a espironolactona como uma ferramenta terapêutica a ser explorada em pacientes com estenose de artéria renal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ABBATE, M. et al. Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 14, p. 304-312, 1999.
- BADER, M.; GANTEN, D. Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. **Journal of Molecular Medicine**, Heidelberg, v. 78, p. 130-139, 2000.
- BERTOCCIO, J-P.; WARNOCK, D. G.; JAISSE, F. Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. **Kidney International**, New York, v. 79, p. 1051-1060, 2011.
- BIANCHI S.; BIGAZZI R.; CAMPESE V. M. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. **American Journal of Kidney Diseases**, Washington, v. 46, n. 1, p. 45-51, 2005.
- BLASI E. R. et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. **Kidney International**, New York, v. 63, p. 1791-1800, 2003.
- BOGOYEVITCH, M. A. et al. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta**, Frankfurt, v. 1697, p. 89-101, 2004.
- BOKEMEYER, D.; SOROKIN, A.; DUNN, M. J. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. **Kidney International**, New York, v. 49, p. 1187–1198, 1996.
- BOLDYREFF, B.; WEHLING, M. Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Oberschleissheim, v. 85, p. 375-381, 2003.
- BONVALENT, J. P. Regulation of sodium transport by steroid hormones. **Kidney International Supplements**, New York, v. 65, p. S49-S56, 1998.
- BRADEN, G. L.; O'SHEA, M. H.; MULHERN, J. G. Tubulointerstitial diseases. **American Journal of Kidney Diseases**, Washington, v. 46, p. 560-572, 2005.
- BREWSTER, U. C.; PERAZELLA, M. A. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 116, p. 263-272, 2003.
- BREZIS, M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla – its implications for disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 9, p. 647-655, 1995.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas

BRODY, M. J. et al. Neurogenic mechanisms of experimental hypertension. In: Genest, J.; Kuchel, O.; Hamet, P.; Cantim, M. **Hypertension: Physiopathology and Treatment**. Montreal: Clinical Research institute of Montreal, p. 117-140, 1983.

CAMPBELL, S. E.; JANICKI, J. S.; WEBER, K. T. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Manchester, v. 27, p. 1545–1560, 1995.

CAMPBELL, S. E. et al. Myocardial fibrosis in the rat with mineralocorticoid excess. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 6, p. 961-968, 1993.

CARRETERO, O. A. et al. Renal tissue kallikrein plasma renin and plasma aldosterone in renal hypertension. **Acta Physiologica Latino Americana**, Argentina, v. 24, p. 448-452, 1974.

CHADE, A. R. et al. Distinct renal injury in early atherosclerosis and renovascular disease. **Circulation**, Boston, v. 106, p. 1165-1171, 2002.

CHRYSTOSTOMOU, A. et al. Double-blind, placebo-controlled study on the effect of the aldosterone receptor antagonist spironolactone in patients who have persistent proteinuria and are on long-term angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, with or without an angiotensin II receptor blocker. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 1, p. 256-262, 2006.

CHUNG, W.; KIM, S. Atherosclerotic renovascular hypertension: lessons from recent clinical studies. **Electrolyte & Blood Pressure**, v. 8, p. 87-91, 2010.

COIMBRA, T. M., FURTADO, M. R., LACHAT, J. J. Effects of administration of cationic and native homologous albumin on the kidney. **Nephron**, Basel, v. 33, p. 208-215, 1983.

COOPER, C. et al. Stent revascularization for the prevention of cardiovascular and renal events among patients with renal artery stenosis and systolic hypertension: Rationale and design of the CORAL trial. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 152, p. 59-66, 2006.

CRAGOE Jr., E. J. et al. Pyrazine diuretics. II. N-amidino-3-amino-5-substituted 6-halopyrazinecarboxamides. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 10, p. 66-75, 1967.

DE GASPARO, M. et al. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 240, p. 650-656, 1987.

DE MAST, Q.; BEUTLER, J. J. The prevalence of atherosclerotic renal artery stenosis in risk groups: a systematic literature review. **Journal of Hypertension**, London, v. 27, p. 1333-1340, 2009.

EIDE, I. K. et al. Low-renin status in therapy-resistant hypertension: a clue to efficient treatment. **Journal of Hypertension**, London, v. 22, p. 2217-2226, 2004.

ENG, E. et al. Renal proliferative and phenotypic changes in rats with two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 7, p. 177-185, 1994.

EPSTEIN, M. Aldosterone blockade: an emerging strategy for abrogating progressive renal disease. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 119, p. 912-919, 2006.

EPSTEIN, M. et al. Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 1, p. 940-951, 2006.

FARMAN, N.; RAFESTIN-OBLIN, M. E. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, Bethesda, v. 280, p. F181-F192, 2001.

FAZAN, Jr. R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 19-29, 2001.

FERIA, I. et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. **Kidney International**, New York, v. 63, p. 43-52, 2003.

FLOEGE, J. et al. Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo: Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. **Laboratory Investigation**, New York, v. 67, p. 486–497, 1992.

FRANCESCATO, H. D. C. et al. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 22, p. 2138-2148, 2007.

FUJISAWA, G. et al. Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. **Kidney International**, New York, v. 66, p. 1493-1502, 2004.

GALLEGO B. et al. Renal fibrosis in diabetic and aortic-constricted hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 280, p. R1823-1829, 2001.

GAVRAS, H. et al. Angiotensin-sodium interaction in blood pressure maintenance of renal hypertensive and normotensive rats. **Science**, New York, v. 180, p. 1369-1371, 1973.

GOLDBLATT, H. et al. Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 59, p. 347-379, 1934.

GOLESTANEH, N. et al. Mineralocorticoid receptor- mediated signaling regulates the ion gates sodium channel in vascular endothelial cells and requires an intact cytoskeleton. **Biochemical and Biophysical Research**, San Diego, v. 280, p. 1300-1306, 2001.

GÓMEZ-SANCHES, E. P. Brain mineralocorticoid receptors: orchestrators of hypertension and end-organ disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, Philadelphia, v. 13, p. 191-196, 2004.

GONZÁLEZ MONTE, E. Addition of spironolactone to dual blockade of renin angiotensin system dramatically reduces severe proteinuria in renal transplant patients: an uncontrolled pilot study at 6 months. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 42, p. 2899-2901, 2010.

GOOD, D. W. Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule. **Hypertension**, Dallas, v. 49, p. 728-739, 2007.

GOODMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. 1647 p.

GROSSMAN, C.; GEKLE, M. New aspects of rapid aldosterone signaling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 308, p. 53-62, 2009.

GUNEY, I. et al. Antifibrotic effects of aldosterone receptor blocker (spironolactone) in patients with chronic kidney disease. **Renal Failure**, London, v. 31, p. 779–784, 2009.

HALIMI, J. M.; MIMRAN, A. Albuminuria in untreated patients with primary aldosteronism or essential hypertension. **Journal of Hypertension**, London, v. 13, p. 1801-1802, 1995.

HAN S-Y, et al. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 17, p. 1362-1372, 2006.

HAO, L. et al. Effects of eplerenone on heart and kidney in two-kidney, one-clip rats. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 24, p. 54-60, 2003.

HAUGEN, H. N. The determination of “endogenous creatinine” in plasma and urine. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, Oxford, v. 5, p. 48-57, 1953.

JOHNSON, R. J. et al. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis: alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 87, p. 847–858, 1991.

JUURLINK, D. N.; MAMDANI, M. M.; LEE, D. S. Rates of hypercalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 351, p. 543-551, 2004.

KAGAWA, C. M.; CELLA, J. A.; VAN ARMAN, C. G. Action of new steroids in blocking effects of aldosterone and deoxycorticosterone on salt. **Science**, New York, v. 126, p. 1015-1016, 1957.

KANG, Y. S. et al. Effect of eplerenone, enalapril and their combination treatment on diabetic nephropathy in type II diabetic rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 24, p. 73-84, 2009.

KARASCH, T.; RUBIN, J. Diagnosis of renal artery stenosis and renovascular hypertension. **European Journal of Ultrasound**, Shannon, v. 7, p. S27-S39, 1998. Supplement 3.

KOBAYASHI, S. et al. Angiotensin II receptor blockade limits kidney injury in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats with special reference to phenotypic changes. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 133, n. 2, p. 134-143, 1999.

KOBORI, H. et al. Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 16, p. 2073-2080, 2005.

LAI L. et al. Aldosterone promotes fibronectin production through a Smad2-dependent TGF- β 1 pathway in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 348, p. 70-75, 2006.

LASTRA, G. et al. Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system. **Nature Reviews/ Cardiology**, London, v. 10, p. 577-584, 2010.

LAURELL, C. B. Electroimmuno assay. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, Oxford, v. 124, p. 21-23, 1972.

LERMAN, L. O.; TEXTOR, S. C.; GRANDE, J. P. Mechanisms of tissue injury in renal artery stenosis: ischemia and beyond. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Philadelphia, v. 52, p. 196-203, 2009.

LOMBES, M. et al. P. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human heart. **Circulation**, Boston, v. 92, p. 175-182, 1995.

LÓPEZ-NOVOA, J. M. et al. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 9, p. 13, 2011.

MA, F. Y. et al. A pathogenic role for c-jun amino-terminal kinase signaling in renal fibrosis and tubular cell apoptosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 18, p. 472-484, 2007.

MAI, M. et al. Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury. **Hypertension**, Dallas, v. 22, p. 754-765, 1993.

MANNING, A. M.; DAVIS, R. J. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?. **Nature Reviews/Drug Discovery**, London, v. 2, p. 554-565, 2003.

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 17, p. 707-719, 1991.

MATAVELLI, L. C.; HUANG, J.; SIRAGY, H. M. Angiotensin AT₂ receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 57, p. 308-313, 2011.

MCKELVIE, R. S. et al. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: a randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. **Circulation**, Boston, v. 100, p. 1056-1064, 1999.

MIRKOVIC, S. et al. Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 135, p. 961-968, 2002.

NAGASE, M. et al. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. **Hypertension**, Dallas, v. 47, p. 1084 -1094, 2006.

NAKHOUL, F. et al. Eplerenone potentiates the antiproteinuric effects of enalapril in experimental nephrotic syndrome. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 294, p. F628-F637, 2008.

NARAI, T. et al. Antihypertensive and cardiorenal protective effects of SM-368229, a novel mineralocorticoid receptor antagonist, in aldosterone/salt-treated rats. **Pharmacology**, Basel, v. 89, p. 44-52, 2012.

NIELSEN, F. T. et al. Inhibition of mineralocorticoid receptors with eplerenone alleviates short-term cyclosporin A nephrotoxicity in conscious rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 23, p. 2777-2783, 2008.

NISHIYAMA, A. et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. **Hypertension**, Dallas, v. 43, p. 841-848, 2004.

OLIN, J. W. Atherosclerotic renal artery disease. **Cardiology Clinics**, San Francisco, v. 20, p. 547-562, 2002.

PALM, F. et al. Blood pressure, blood flow and oxygenation in clipped kidney of chronic 2K,1C rats; effects of tempol and angiotensin blockade. **Hypertension**, Dallas, v. 55, p. 298-304, 2010.

PATRAKKA, J.; TRYGGVASON, K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. **Nature Reviews/Nephrology**, London, v. 5, p. 463–468, 2009.

PITT, B. et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, p. 709-717, 1999.

RANG, M. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829 p.

RACHMANI, R. et al. The effect of spironolactone, cilazapril and their combination on albuminuria in patients with hypertension and diabetic nephropathy is independent of

blood pressure reduction: a randomized controlled study. **Diabetic Medicine**, Chichester, v. 21, p. 471-475, 2004.

RIBSTEIN, J. et al. Relative glomerular hyperfiltration in primary aldosteronism. . **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 16, p. 1320-1325, 2005.

ROCHA, R. et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke prone hypertensive rats. **Hypertension**, Dallas, v. 31, p. 451-458, 1998.

ROCHA, R. et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. **Endocrinology**, Springfield, v. 141, p. 3871-3878, 2000.

RUILOPE, L. M. et al. Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of the hypertension optimal treatment (HOT) study. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 12, p. 218-225, 2001.

SATO, A.; SARUTA, T. Aldosterone breakthrough during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 16, p. 781-788, 2003.

SATO, A.; HAYASHI K.; SARUTA T. Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 18, p. 44-49, 2005.

SCHAFFENBURG, C. A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 101, p. 676-677, 1959.

SCHJOEDT, K. J. et al. Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. **Diabetologia**, Berlin, v. 47, p. 1936-1939, 2004.

SCHJOEDT, K. J. et al. Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. **Kidney International**, New York, v. 68, p. 2829-2836, 2005.

SEPEHRDAD, R. et al. Amiloride Reduces Stroke and Renal Injury in Stroke-Prone Hypertensive Rats. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 16, p. 312-318, 2003.

SHAFFERNBURG, C. A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 101, p. 676-677, 1959.

SHIBATA, S. et al. Podocyte as the target for aldosterone. **Hypertension**, Dallas, v. 49, p. 355-364, 2007.

SHIH, W.; HINES, W. H.; NIELASEN, E. G. Effects of cyclosporin A on the development of incubated with the antibody immunemediated interstitial nephritis. **Kidney International**, New York, v. 33, p. 1113-1118, 1988.

SHIMIZU, H. et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 14, p. 1496-1505, 2003.

SINPHITUKKUL, K. et al. Nongenomic effects of aldosterone on renal expressions of pEGFR and pERK1/2 in rat kidney. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 33, p. 111-120, 2011.

SPAHN, H. et al. Pharmacokinetics of amiloride in renal and hepatic disease. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 33, p. 493– 498, 1987.

STAMBE, C. et al. Activation and cellular localization of the p38 and JNK MAPK pathways in rat crescentic glomerulonephritis. **Kidney International**, New York, v. 64, p. 2121-2132, 2003.

SUN, G-P. et al. Involvements of Rho-kinase and TGF- β pathways in aldosterone-induced renal injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 17, p. 2193-2201, 2006.

TAIRA, M. et al. Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 589, p. 264-271, 2008.

TEIWES, J.; TOTO, R. D. Epithelial sodium channel inhibition in cardiovascular disease. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 20, p. 109-117, 2007.

TOMASCHITZ, A. et al. Aldosterone and arterial hypertension. **Nature Reviews/Endocrinology**, London, v. 6, p. 83-93, 2010.

TOUYZ, R. M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 90, p. 449-455, 2005.

TOYONAGA, J. et al. Spironolactone inhibits hyperglycemia-induced podocyte injury by attenuating ROS production. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 26, p. 2475-2484, 2011.

TRACHTMAN, H. et al. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. **The Journal of Urology**, New York, v. 172, p. 1590-1592, 2004.

TYLICKI, L. et al. Triple pharmacological blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in nondiabetic CKD: an open-label crossover randomized controlled trial. **American Journal of Kidney Diseases**, Washington, v. 52, n. 3, p. 486-493, 2008.

VERHEIJ, M. et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. **Nature**, London, v. 380, p. 75–79, 1996.

WELCH, W. J. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. **Hypertension**, Dallas, v. 41, p. 692-696, 2003.

WENZEL, U. O. et al. Chronic anti-Thy-1 nephritis is aggravated in the nonclipped but not in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. **Kidney International**, New York, v. 61, p. 2119-2131, 2002.

WENZEL, U. O. et al. Beneficial and adverse renal and vascular effects of the vasopeptidase inhibitor omapatrilat in renovascular hypertensive rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, p. 2005-2013, 2003.

WILLIAMS, G. H. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. **Heart Failure Reviews**, Norwell, v. 10, p. 7-13, 2005.

WILSON, C.; BYROM, F. B. Renal changes in malignant hypertension. **Lancet**, London, v. 1, p. 136-139, 1939.

WILSON, C.; BYROM, F. B. The vicious circle in chronic Bright's disease: experimental evidence from the hypertensive rat. **Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 10, p. 65-96, 1940.

WYNCKEL, A. et al. Long term follow-up of acute renal failure caused by angiotensin converting enzyme inhibitors. **American Journal of Hypertension**, New York, v. 11, p. 1080-1086, 1998.

XIA, Z. et al. Opposing effects of ERK and JNK- p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, New York, v. 270, p. 1326–1331, 1995.

YAOITA, E. et al. Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 136, p. 899–908, 1990.

YUAN, J.; JIA, R.; BAO, Y. Beneficial effects of spironolactone on glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, Birmingham, v. 8, n. 3, p. 118-126, 2007.

ZHANG, B. et al. Amiloride off-target effect inhibits podocyte urokinase receptor expression and reduces proteinuria. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 0, p. 1-9, 2011. In press.

ZHOU, X. et al. Aldosterone antagonism ameliorates proteinuria and nephrosclerosis independent of glomerular dynamics in L-NAME/SHR model. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 24, p. 242-249, 2004.