

Claudia Ferreira dos Santos Ruiz Figueiredo

**EFEITO DA ESPIRONOLACTONA SOBRE  
A FUNÇÃO E MORFOLOGIA RENAL DE  
RATOS HIPERTENSOS POR INFUSÃO  
CRÔNICA DE ANGIOTENSINA II**

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

**Área de concentração: Fisiologia Humana**

**Orientadora: Maria Oliveira de Souza**

**Versão original.**

**São Paulo  
2012**

## **RESUMO**

**FERREIRA-FIGUEIREDO, C. S. R. Efeito da espironolactona sobre a função e morfologia renal de ratos hipertensos por infusão crônica de Angiotensina II. 2012.**  
**83 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.**

O objetivo do atual estudo foi investigar a participação da espironolactona, um antagonista dos receptores MR de aldosterona, sobre as respostas renais induzidas pela hiperatividade do SRAA. Para tal, utilizamos 2 grupos de animais tratados com Ang II (15 e 28 dias). Cada grupo foi subdividido em: controles (Sham), tratados com Ang II (200 ng/kg/min), veículos (tratados com óleo mineral), tratados com espironolactona (100 mg/kg/dia) e tratados com Ang II + espironolactona. O final de cada tratamento, os animais foram submetidos aos experimentos de função renal pelo método de clearance de paraminohipurato de sódio e inulina, para avaliar o fluxo plasmático renal (FPR) e Ritmo de filtração glomerular (RFG), respectivamente. Em seguida, se avaliou os parâmetros eletrolíticos no plasma e na urina, expressão proteica por western blot, e morfologia renal pela técnica de Hematoxilina Eosina (HE). Nossos resultados indicam que, nos dois períodos, a Ang II induziu hipertensão arterial, queda do FPR e do RFG, com consequente aumento da fração de filtração (FF). A Ang II induziu também queda no fluxo urinário e a espironolactona corrigiu os efeitos da Ang II sobre todos os parâmetros acima descritos. A Ang II e/ou espironolactona não modificaram a carga excretada de NH<sub>4</sub>, Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>. No entanto, a Ang II aumentou a expressão de NHE3, resposta corrigida pela espironolactona. A Ang II aumentou a área glomerular e em ambos os períodos de tratamento, a Ang II induziu alterações morfológicas essencialmente no túbulo proximal, incluindo perda da borda em escova e morte celular. A espironolactona corrigiu parcialmente tais alterações. Em conjunto, os resultados indicam que a hiperatividade do SRAA induz aumento na concentração plasmática de aldosterona e esta por sua vez, é em grande parte, a responsável pelos efeitos deletérios do SRAA sobre a função e morfologia renal.

**Palavras chave:** Ang II, Aldosterona, Renina, Hipertensão, Função renal, Eletrólitos.

## ABSTRACT

FERREIRA-FIGUEIREDO, C. S. R **Effect of spironolactone on renal function and morphology of hypertensive rats by Ang II chronic infusion.** 2012. 83 p. [PhD Thesis (Human Physiology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

This study investigated the effect of spironolactone (MR antagonist) on renal function and morphology in hypertensive rats with chronic Ang II infusion for 15 or 28 days. Four-weeks-old male Wistar rats were divided in eight groups and respective controls: Sham or treated with Ang II (200 ng/kg/min) by 15 or 28 days, vehicle or treated with Ang II plus spironolactone (100 mg/kg/dia), using osmotic minipumps (Alzet). Blood pressure (BP) was monitored weekly by tail cuff plethysmography. Renal plasmatic flow (RPF) and glomerular filtration rate (GFR) were determined by para-aminohippurate sodium (PAH) and inulin clearance. Plasmatic levels of renin and aldosterone were analyzed by Enzime Immunoassay Kit (EIA), Urinary excretion of ions were also analyzed. The protein expression was analyzed by Western Blot and renal morphology by Hematoxylin-eosin (HE) method. Our results showed that the dose of Ang II used was enough to induce hypertension in rats treated for 15 and 28 days [ $109 \pm 1,5$  and  $111 \pm 0,8$  (Sham), respectively vs  $142 \pm 2,7$  and  $163 \pm 3,6$  (Ang II)p<0,05] (mmHg). RPF decreased [ $24,89 \pm 0,93$  and  $23,76 \pm 0,78$  (Sham) vs  $14,28 \pm 0,87$  and  $13,91 \pm 0,18$  (Ang II) ml/kg/min p<0,05]. The GFR decreased [ $8,11 \pm 0,29$  and  $8,07 \pm 0,24$  (Sham) vs  $5,77 \pm 0,29$  and  $5,65 \pm 0,25$  (Ang II) ml/kg/min, p < 0,05]. Ang II increased the filtration fraction (FF) and decreased the urinary flux. Spironolactone impaired all effect of Ang II above described. The plasma renin and aldosterone levels increased and spironolactone amplified both. Urinary  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  did not changed in Ang II and/or spironolactone rats treated. Ang II increased the NHE3 expression, induced proximal tubule injury and cellular apoptosis. Spironolactone impaired the effect of Ang II on these parameters. In conclusion, spironolactone has a beneficial effect on renal injury induced by hyperactivity of renin-angiotensin-aldosterone system RAAS).

**Key words:** Angiotensin II, Aldosterone, Renin, Hypertension, Renal function, Electrolytes.

**Financial Support:** CNPq and FAPESP.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais

A hipertensão arterial é uma das doenças com maior prevalência no mundo moderno e é caracterizada pelo aumento da pressão arterial. Considera-se hipertenso o indivíduo que mantém permanentemente uma pressão arterial acima de 140 por 90 mmHg. Em 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) informou que, 20% da população mundial apresentavam hipertensão arterial. No Brasil, 35% da população brasileira acima de 40 anos são de hipertensos Mancia et al. 2009. Desses, cerca de 5% apresentam causas conhecidas para o aumento da pressão arterial, geralmente um distúrbio endócrino como, por exemplo, a resistência à insulina. Esses casos enquadram-se na classificação de hipertensão secundária. Na grande maioria dos pacientes, entretanto, não há uma causa específica que possa justificar a elevação mantida de pressão arterial. Assim, considera-se uma hipertensão primária ou essencial, associada a inúmeros fatores, incluindo os genéticos e ligados aos hábitos de vida (HAMEL et al., 1998). Em ambos os casos, a hipertensão arterial, pode induzir alterações no sistema cardiovascular e aumentar o risco de doenças como: hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e insuficiência renal (FROHLICH, 2001; KAMPER; PEDERSEN; STRANDGAARD, 2009).

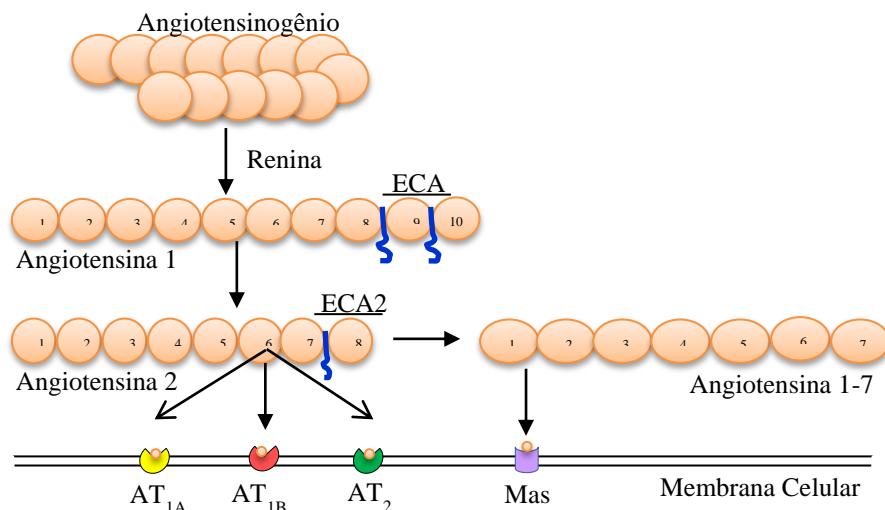
Entre os mecanismos gerais de regulação da pressão arterial, destacam-se: **1)** os controles neurais, feitos pelo sistema nervoso autônomo (SNA), que atua tanto no coração quanto nos vasos periféricos, principalmente nas arteríolas e **2)** os controles humorais feitos essencialmente por uma variedade de hormônios e mediadores químicos, que interferem, principalmente, na modulação do tônus arteriolar. Neste caso, se destaca a importância do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

### 1.2 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é altamente conservado em muitas espécies de vertebrados (TAKEI et al., 2004) e além de ser essencial na regulação da pressão arterial, também participa do controle do volume do fluido extracelular. Este controle depende de diversos efeitos do hormônio angiotensina II (Ang II), incluindo: vasoconstrição e aumento da reabsorção de sódio, tanto por ação direta do hormônio no túbulo proximal renal quanto por ação indireta, através de seus efeitos hemodinâmicos (FENTON; KNEPPER, 2007; PETI-

PETERDI; BELL; WARNOCK, 2002; SUBRAMANYA et al., 2006). O SRA (**Figura 1**) é representado como uma cascata biológica multienzimática, na qual o angiotensinogênio é o substrato mais importante. A síntese de Ang II é iniciada e principalmente regulada pela renina, enzima sintetizada essencialmente pelas células justaglomerulares renais, (MINDEL; MORRISON, 2005; YOO et al., 2007). A renina cliva o angiotensinogênio circulante, produzido principalmente no fígado, para liberar o decapeptídeo angiotensina I, que por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e libera o octapeptídeo ativo, angiotensina II. Esta por sua vez, pode atuar em vários tecidos via receptores específicos (AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>) e pode também ser clivada pela enzima conversora de angiotensina II (ECA2) para liberar a angiotensina 1-7, cujo efeito biológico nos diferentes tecidos depende de sua interação com o receptor do tipo *Mas*.

**Figura 1** - Esquema representativo dos principais componentes do sistema renina-angiotensina.



**ECA:** enzima conversora da angiotensina I, **ECA2:** enzima conversora da angiotensina II, **AT1** e **AT2:** receptores para angiotensina II (isoformas 1 e 2), **Mas:** receptor para angiotensina 1-7.

**Fonte:** O autor.

### **1.2.1 Angiotensinogênio**

O angiotensinogênio é uma alfa-2 globulina com 411 aminoácidos de origem essencialmente hepática e cuja produção é estimulada em resposta aos glicocorticóides, estrogênios e citocinas inflamatórias como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral (MORGAN; BROUGHTON; KALSHEKER, 1996). Além do tecido hepático, sabe-se também que o angiotensinogênio pode ser sintetizado em outros tecidos como o cérebro, o sistema imune e os rins (MATTHEW et al., 2006). Nos rins, a síntese dessa proteína ocorre predominantemente no túbulo proximal, onde é regulada pela angiotensina II (KOBORI et al., 2001; NAVAR et al., 2011). No plasma, o angiotensinogênio circula como um peptídeo biologicamente inativo, cuja concentração é variável e fica muito próxima do valor correspondente à metade da velocidade máxima de atividade (Km) da renina (SEALEY; GERTEN-BANES; LARAGH, 1972).

### **1.2.2 Renina**

A renina é uma *enzima* proteolítica do grupo das aspartil-proteases, que cliva o angiotensinogênio no aminoácido denominado aspartato e foi descrita pela primeira vez por Tigerstedt, Bergman et al., (1898), utilizando extrato de córtex renal de coelho. A transcrição do gene para renina é estimulada essencialmente pela cascata de sinalização celular regulada pelos elementos AMPc/PKA/CREB. A adenosina monofosfato cíclico (AMPc) estimula a proteína quinase A (PKA), que em seguida, é translocada para o núcleo celular e fosforila o fator de transcrição conhecido como *cAMP response element-binding* (CREB). Uma vez ativado, o CREB interage com a sequência *cAMP response element* (CRE), característico da região promotora do gene da renina e modula a transcrição da enzima (KLAR; KURTZ; VITZTHUM, 2002; MONTMINY, 1997, PAN et al., 2001).

Inicialmente, a renina é sintetizada como uma proteína denominada pré-pró-renina, a qual é rapidamente transformada em pró-renina. Esta por sua vez, é armazenada em grânulos das células justaglomerulares renais, de onde pode ser secretada para exercer seus efeitos biológicos (DEINUM, 1999) ou por ação das proteases intracelulares, ser convertida em renina ativa (PRATT et al., 1987). Segundo Toffelmire et al. (1989), a secreção de pró-renina e renina é complexa. Quando o estímulo é agudo predomina-se a exocitose de grânulos contendo apenas renina. Porém, quando o estímulo é crônico, aumentam as concentrações circulantes tanto de pró-renina quanto de renina.

A secreção de renina ativa é regulada basicamente por quatro mecanismos distintos: **1)** os barorreceptores intra-renais localizados na face endotelial das arteríolas aferentes, junto ao aparelho justaglomerular, que detectam alterações na pressão de perfusão renal; **2)** alterações na concentração de cloreto de sódio (NaCl) detectadas pelas células da mácula densa do tubo distal; **3)** estimulação nervosa simpática via receptores adrenérgicos  $\beta$ -1; e **4)** feedback negativo por ação direta da Ang II nas células justaglomerulares (BELL, 2003; BOCK, 1992; BROWN, 2006; HAMEL et al., 1998). Sua concentração plasmática é de 900 a 2.200 ng/mL e sua atividade é bastante variável: de 0.5 a 2.8 ng/ml/hora (quando a excreção de sódio é de 150 mEq/dia) ou cerca de 21 ng/ml/hora (quando a excreção de sódio é de 50 mEq/dia) (SEALEY; GERTEN-BANES; LARAGH, 1972). Uma vez no plasma, a renina cliva 10 aminoácidos no domínio amino-terminal do angiotensinogênio para formar o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) (PAECH, 1977). Esta, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), presente no endotélio, dá origem ao octapeptídeo biologicamente ativo denominado angiotensina II (CAREY; SIRAGY, 2003).

Além da clássica função da renina, estudos realizados por Nguyen et al., (2002) sugerem que vários tecidos (placenta, cérebro, coração, endotélio vascular e rim) expressam receptores de membrana específicos para a pró-renina e renina. Segundo os autores, estes receptores têm uma ação pró-fibrótica e pró-inflamatória, estimulam a proliferação celular e poderão contribuir para o desenvolvimento de nefropatias. Outros estudos mais recentes revelam que em camundongos e humanos, a atividade da renina pode ser diretamente inibida pelo agente farmacológico denominado alisquireno (RASHIKH et al., 2012).

### **1.2.3 *Angiotensina II***

A Ang II é o mais potente dos produtos biologicamente ativos do sistema renina angiotensina (SRA). Em condições fisiológicas, a concentração de Ang II no plasma é de 1-10 pM e sua meia vida é de aproximadamente 2 minutos, devido à rápida clivagem em Ang III e IV, através da remoção de aminoácidos da porção N-terminal por aminopeptidases. Existe ainda um heptapeptídeo [Ang (1-7)] formado a partir da Ang I ou da clivagem da Ang II, por ação de peptidases, uma das quais possui homologias estruturais com a ECA, designando-se ECA2 (REUDELHUBER, 2005).

A Ang II sistêmica atua como vasoconstritor em células da musculatura lisa vascular, aumenta a contratilidade miocárdica, estimula a síntese de aldosterona e de catecolaminas na glândula adrenal, aumenta a atividade do sistema nervoso simpático (SNS), estimula o apetite

ao sal, a sede, a liberação de AVP e o transporte de sódio em células epiteliais do intestino e do rim (BADER, 2010; KOBORI et al., 2007). O conceito de que o SRA é puramente endócrino tem sido motivo de discussão nas últimas décadas. Hoje se sabe que o cérebro, coração, vasos, tecido adiposo e rim são capazes de produzir angiotensinogênio, renina, ECA e Ang II, indicando a presença de SRA locais. (BADER, 2010 ; DZAU et al., 1987, KLICKSTEIN ; KAEMPFER, 1982 ; LOMEZ et al., 2002 ; MULLER et al., 1995 ; PINTEROVA ; KRIZANOVA ; ZORAD, 2000).

Os rins são os órgãos que mais contribuem para a formação de Ang II sistêmica, uma vez que as células justaglomerulares possuem alta capacidade de síntese e liberação de renina. No entanto, em humanos, ratos e camundongos, as células dos túbulos proximais e dos ductos coletores também sintetizam e secretam todos os elementos do SRA, sugerindo a presença deste nos distintos segmentos do néfron, o que justifica a concentração do hormônio na urina ( $\approx 1\text{nM}$ ) ser superior à do plasma (DARBY; SERNIA, 1995; KOBORI et al., 2007).

As múltiplas ações da Ang II dependem de sua interação com receptores específicos do tipo AT1 e AT2 e são mediadas por complexas vias de sinalização intracelular (GRIENDLING; LASSEGUE; ALEXANDER, 1996). O receptor AT1 é sensível a vários inibidores como losartan e candesartan (DAHLOF; DEVEREUX; KJELDSEN, 2002; JULIUS; KJELDSEN; WEBER, 2004) e a interação da Ang II com o AT1 estimula a proteína Gq, que por sua vez, modula inúmeras vias de sinalização celular. Os efeitos da Ang II via AT1, são classificados como eventos de *curto ou longo prazo*. Entre os eventos de *curto prazo*, incluem: 1) ativação da fosfolipase C (PLC) que por sua vez, induz a formação de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), promovendo subsequente liberação de cálcio dos estoques intracelulares e ativação da PKC, respectivamente; 2) ativação da fosfolipase A2 - PLA<sub>2</sub>, enzima que cliva os fosfolipídios da membrana celular em ácidos graxos, liberando ácido aracídônico (AA) e 3) ativação da fosfolipase D (PLD), tirosina quinase (TK) fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e MAP quinases (MAPKs). Já nos eventos de *longo prazo*, a Ang II permite a amplificação dos eventos de curto prazo acima descritos e, além disso, ao estimular a PLA<sub>2</sub> e PLD, induz aumento de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), os quais estimulam o crescimento, diferenciação e migração celular, apoptose, deposição de matriz extracelular e hipertrofia, além de regular a expressão gênica e síntese proteíca (CASTROP et al., 2010; NAVAR et al., 2000; RHIAN; ERNESWT, 2000; TIMMERMANS et al., 1993).

Os receptores AT2 são abundantes em vários tecidos durante o período fetal, mas o seu número é reduzido após o nascimento (SHANMUGAN; SANDBERG, 1996). A ativação

desses receptores produz efeitos benéficos, como a vasodilatação, anti-proliferação (fibroblastos, endotélio e miócitos), melhora da função cardíaca e queda na reabsorção de sódio pelo túbulo proximal renal (HERNADEZ; ZHOU, 2007). A atividade dos receptores AT2 é eficientemente bloqueada pelo antagonista denominado PD 123177. Contudo, o próprio AT2, por dimerização, pode atuar como antagonista do receptor AT1 (ABDALLA et al., 2001).

#### **1.2.4 Angiotensina 1-7**

Santos et al., (1988) caracterizaram a Ang 1-7 como um peptídeo derivado da clivagem da Ang II pela ECA2. Além disso, o mesmo grupo passou a investigar os principais efeitos biológicos da Ang 1-7 sobre os tecidos cardiovascular e cerebral (CAMPAGLIONE-SANTOS et al., 1989; SCHIAVONE et al., 1988). A partir desses estudos, a Ang 1-7 se tornou alvo de pesquisas, essencialmente por ter sido observado que os seus efeitos biológicos se opõem aos efeitos deletérios induzidos por altas concentrações plasmáticas de Ang II (FERRARIO et al., 1997; SANTOS; ANDRADE; CAMPAGLIONE-SANTOS, 2000). Em condições fisiológicas, a concentração plasmática de Ang 1-7 encontra-se na faixa de picomolar como a Ang II. Além disso, a Ang 1-7 pode também ser encontrada em concentrações elevadas nos diferentes segmentos do néfron, incluindo os túbulos proximais, distais e ductos coletores e é excretada pela urina (DILAURO; BURNS, 2009).

Os efeitos da Ang 1-7 dependem de sua interação com o receptor do tipo *Mas* o qual é acoplado à proteína G e sensível ao antagonista A-(779) (CHAPPELL et al., 2004). O receptor *Mas* é amplamente distribuído no cérebro, coração, vasos e rins (CHRISTENSEN; BIRN, 2002, ZIMPELMANN; BURNS, 2009) e quando está sob efeito da Ang 1-7, induz a geração de óxido nítrico (NO) e vasodilatação (HEITSCH et al., 2001), atenua a hipertrofia cardíaca, processos inflamatórios e o estresse oxidativo (BROSNIHAN; FERRARIO, 1996). Sobre a hemodinâmica renal, os efeitos da Ang 1-7 são bastante conflitantes, uma vez que a vasculatura renal é muito sensível a Ang II (DILAURO; BURNS, 2009). Contudo, a Ang 1-7 apresenta um efeito “dose-dependente” sobre o transporte de Na<sup>+</sup> no túbulo proximal renal. Ou seja, em baixas concentrações estimula e em altas concentrações inibe a reabsorção do íon (GARCIA; GARVIN, 1994).

### **1.2.5 Aldosterona**

É um mineralocorticóide sintetizado e secretado pelas células glomerulosas localizadas no córtex da glândula adrenal. Seu efeito fisiológico sobre a função renal foi descrito por Simpson et al. (1953), ano em que a aldosterona foi oficialmente integrada ao SRA, que passou a se chamar sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Estudos com ratos indicam que em condições fisiológicas, a concentração plasmática de aldosterona é cerca de 1 nM (GEERING et al., 1985). Os principais fatores estimuladores da síntese e secreção de aldosterona são potássio ( $K^+$ ) e Ang II. Assim, o aumento do íon  $K^+$  no meio extracelular induz despolarização da membrana das células glomerulosas e consequentemente, a abertura de canais de  $Ca^{2+}$ . O aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  estimula a síntese e secreção de aldosterona, que por sua vez, modula a reabsorção renal de  $Na^+$  e secreção de  $K^+$  no néfron distal (GIEBISH, 2002). A Ang II se liga ao receptor AT1 na membrana das células glomerulosas e via ativação da PG $\alpha_q$ /PLC/DAG-IP<sub>3</sub>/ $Ca^{2+}_i$  ou  $Ca^{2+}$ /calmodulina, estimula a secreção de aldosterona (SPAT; HUNYADY, 2004). Além das células glomerulosas, outros tecidos como miócitos cardíacos, células da musculatura lisa vascular e células mesangiais glomerulares também podem sintetizar aldosterona (HATAKEYAMA et al., 1994; NISHIKAWA et al., 2005; SILVESTRE et al., 1999).

O efeito da aldosterona nos diferentes tecidos depende de sua interação com receptores de membrana (mAR) e receptores nucleares de alta afinidade, como os de mineralocorticóides (MR, com  $K_d$  de 0,5 – 3 nM) ou de baixa afinidade, como os de glicocorticóides (GR, com  $K_d$  de 20 – 65 nM) (ARRIZA et al., 1987). Os receptores do tipo mAR estão associados aos efeitos não genômicos e genômicos da aldosterona, que através das vias de sinalização celular moduladas por AC/AMPc/PKA; RhoA (família das pequenas GTPases); phosphoinositide 3-quinase (PI3K) e PKC, podem modular o deslocamento e atividade do ENaC (Canal epitelial de sódio), da subunidade alfa da  $Na^+/K^+$ -ATPase (WARREN; BRIAN, 2011), da  $H^+$ -ATPase do tipo vacuolar e do trocador  $Na^+/H^+$  (BRAGA-SOBRINHO; LEITE-DELOVA; MELLO-AIRES, 2012; LEITE-DELLOVA; MALNIC; MELLO-AIRES, 2011). Os receptores MR e GR são preferencialmente associados aos efeitos genômicos da aldosterona. Neste caso, a ativação da via AC/AMPc/PKA/CREB modula a transcrição gênica para a síntese proteica (WARREN; BRIAN, 2011). Contudo, foi observado recentemente, um efeito genômico da aldosterona sobre a atividade da isoforma 1 do trocador  $Na^+/H^+$  (NHE1) (BRAGA-SOBRINHO; LEITE-DELOVA; MELLO-AIRES, 2012).

No rim, os receptores MR são expressos nas células mesangiais, células justaglomerulares, podócitos e nos diferentes segmentos do néfron, incluindo o túbulo proximal, segmento espesso da alça de Henle, túbulo distal e ducto coleto (LEITE-DELLOVA et al., 2008; WARREN; BRIAN et al., 2011). O receptor GR é ubliquamente distribuído em todo o tecido renal (ACKERMANN et al., 2010). Em doses fisiológicas, a aldosterona modula o transporte renal de Na<sup>+</sup> e a secreção de K<sup>+</sup> tubular (GIEBISCH, 2002, NISHIKAWA et al., 2005). Em doses supra-fisiológicas decorrentes, por exemplo, de uma hiperatividade crônica do SRAA, a interação da aldosterona com o receptor MR pode induzir um aumento na expressão do receptor para o fator de crescimento epidermal (EGFR) e do fator-alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), condição que favorece a expressão de citocinas pró-inflamatórias (WARREN; BRIAN, 2011). Estudos “*in vitro*” complementam esses achados e indicam que a aldosterona via ativação do EGFR pode estimular a proliferação de células mesangiais por ativar a ERK1/2 (NISHIYAMA et al., 2005).

As repostas biológicas da aldosterona podem ser atenuadas com espironolactona, um potente antagonista do receptor MR (FUNDER et al., 1988). No rim, a espironolactona entra na célula através da membrana basolateral, liga-se aos receptores MR e atua como inibidor competitivo, interrompendo a translocação dos MRs para o núcleo (COURETTE et al., 1992; FANESTIL, 1988) e portanto, impedindo a transcrição gênica induzida por aldosterona via MR. Em doses de até 100 mg/dia), a espironolactona apresenta uma discreta ação natriurética, por estimular levemente a excreção de sódio (1% – 2%) (KAGAWA, 1960; LIDDLE, 1966). Por isso, é utilizada na clínica para corrigir a pressão arterial de pacientes com moderada hipertensão arterial (LIEW; KRUN, 2003). Em doses acima de 150 mg/dia, a espironolactona pode no entanto, induzir queda na excreção de potássio e hidrogênio (BRADLEY; MARON, 2008).

Sabe-se também que no hiperaldosteronismo primário ou secundário (ex. síndrome nefrótica ou cirrose), a espironolactona induz uma melhora na sobrevida, embora os mecanismos celulares envolvidos com tal resposta ainda não sejam conhecidos (PITT; ZANNAD; REMME, 1999). Estudos atuais revelam que a espironolactona corrigiu a hipertrofia cardíaca de ratos tratados com o beta-adrenérgico isoproterenol (MARTÍN-FERNÁNDEZ et al., 2012), por reduzir a expressão da proteína “Serum and glucocorticoid regulated kinase type 1” (SGK-1), aumentada por aldosterona. O efeito da espironolactona sobre o reparo de lesões no tecido renal ainda não foi elucidado.

### 1.3 Justificativa

Considerando o exposto acima, pode-se afirmar que em condições fisiológicas, o eixo renina-angiotensina-aldosterona tem função essencial na regulação da pressão arterial e do volume do fluido extracelular, principalmente por conduzir respostas celulares através de receptores específicos.

Contudo, sabe-se também que inúmeras patologias são associadas às irregularidades funcionais de um ou de todos os elementos do SRAA, que de uma maneira ou de outra, afeta a função de células, tecidos e consequentemente, de vários órgãos vitais. Estudos clínicos demonstram que além de contribuir com a hipertensão arterial, a Ang II em altas concentrações plasmáticas, também induz lesões no tecido renal, levando o rim a uma condição de gerador e mantenedor da hipertensão arterial (NAVAR, 2005; PAUL; MEHR; KREUTZL, 2006). Outros achados com modelos animais demonstram que, em ratos, a infusão crônica de Ang II induz a ativação do SRA intrarenal, hipertensão arterial, aumento da síntese e liberação de aldosterona e proteinúria, sendo esta última associada às alterações da expressão de nefrina e apoptose de podócitos (KOBORI; HARRISON-BERNARD; NAVAR, 2001; JUNYA et al., 2008; PRIETO-CARRASQUERO et al., 2004). O efeito intrarenal da Ang II nesse modelo animal pode contribuir com a freqüente queda na excreção de  $\text{Na}^+$ , devido às alterações na expressão e atividade dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , cotransportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , canal epitelial de sódio (ENaC),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e canais de  $\text{K}^+$ , proteínas que podem ser moduladas tanto por Ang II, via AT1 ou AT2, quanto por aldosterona (FENTON; KNEPPER, 2007; McENEANEY; HARVEY; THOMAS, 2008; PETI-PETERDI; WARNOCK; BELL, 2002; SUBRAMANYA et al., 2006; WELLING et al., 1993). Por outro lado, a participação da aldosterona nos processos celulares envolvidos com o desenvolvimento de doenças renais, ainda é pouco conhecida.

Nas últimas décadas, os estudos sobre o SRAA, foram enriquecidos com abordagens sobre a eficácia dos diversos antagonistas, incluindo: Alisquireno (para renina), losartan e cadesartan (para AT1) e ramipril (para ECA). Tais antagonistas, além de bloquear etapas específicas do SRAA, podem induzir o reparo de lesões geradas por esse sistema no tecido cardíaco ou renal. Por outro lado, pouco se sabe a respeito do possível efeito protetor da espironolactona (antagonista do MR) sobre esses tecidos.

O efeito da infusão crônica de Ang II vem sendo investigado em modelos animais, cujo tratamento varia de 7 a 15 dias, porém com doses muito variadas do hormônio (80 a 400 ng/kg/min, respectivamente) (JUNYA et al., 2008; KOBORI; HARRISON-BERNARD;

NAVAR, 2001; PRIETO-CARRASQUERO et al., 2004), o que gera conflitos entre os resultados obtidos. Um fato interessante é que independente da dose de tratamento observa-se um aumento na síntese de renina, independentemente do grau de hipertensão (PRIETO-CARRASQUERO et al., 2005; PRIETO-CARRASQUERO et al., 2008). Tais fatos nos levaram escolher uma dose intermediária (200 ng/kg/min) e estender o período de tratamento (15 a 28 dias), condições que nos permitiria investigar os parâmetros associados à função renal no período em que a pressão arterial está se deslocando (15 dias de infusão) e no período em que os animais já estão definitivamente hipertensos (28 dias de infusão).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que:

O tratamento crônico com Ang II na dose de 200 ng/kg/min induziu um acentuado deslocamento da pressão sanguínea nos primeiros 15 dias e manteve a hipertensão arterial até o 28º dia de tratamento. A espironolactona reduziu o efeito pressórico da Ang II, indicando a participação da aldosterona via receptores MR sobre este parâmetro.

O tratamento com Ang II por 15 dias aumentou a concentração plasmática de renina e com 28 dias não alterou este parâmetro, indicando um possível início de mecanismo de “feedback” negativo para a secreção de renina ao final do tratamento. A espironolactona amplificou o efeito estimulatório da Ang II sobre a liberação de renina, indicando a participação dos receptores MR nesse processo modulatório.

Nos dois períodos de tratamento (15 e 28 dias), a Ang II reduziu o fluxo plasmático renal, o ritmo de filtração glomerular e o fluxo urinário. A espironolactona reverteu os efeitos da Ang II sobre todos os parâmetros acima citados, indicando uma participação da aldosterona, via receptor MR no controle da hemodinâmica renal.

No grupo de 28 dias, a Ang II reduziu a fração de excreção do  $\text{Na}^+$ , indicando reabsorção do íon. Por outro lado, não alterou a fração de excreção do  $\text{K}^+$ , fato que pode ser justificado pela queda do fluxo urinário observado nesse grupo. A espironolactona não alterou a resposta da Ang II sobre este parâmetro.

O tratamento com Ang II nos dois períodos não mudou显著mente os níveis de aldosterona no plasma. No entanto, a espironolactona induziu um grande aumento do mineralocorticóide no plasma, indicando uma resposta compensatória do organismo pela falta de receptores MR funcionais.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; AHMED, M. A.; QUITTERER, U. The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. **J. Biol. Chem.** V. 276, n. 43, p. 39721 – 39726, 2001.

ACKERMANN, D.; GRESKO, N.; CARREL, M.; LOFFING-CUENI, D.; HABERMEHL, D.; GOMEZ-SANCHEZ, C.; BERNARD, C.; LOFFING, J. *In vivo* nuclear translocation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat kidney: differential effect of corticosteroids along the distal tubule. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 299, n. 6, p. F1473 - F1485, 2010.

ANDREW, S.; BREM, A. S.; MORRIS, D. J.; GONG, R. Aldosterone-Induced Fibrosis in the Kidney: Questions and Controversies. **Am J. Kidney Dis.** v. 58, n. 3, p. 471 - 479, 2011.

ARRIZA, J. L.; WEINBERGER, C.; CERELLI, G.; GLASER, T. M.; HANDELIN, B. L.; HOUSMAN, D. E.; EVANS, R. M. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. **Science**, v. 237, p. 268 - 275, 1987.

BADER, M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, p. 439 – 65, 2010.

BELL, P. D.; LAPOINTE, J. Y.; SABIROV, R.; HAYASHI, S.; PETI-PETERDI, J.; MANABE, K.; KOVACS, G.; OKADA, Y. Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion Channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 7, p. 4322 - 4327, 2003.

De acordo com:  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS  
TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e  
documentação: referências: elaboração. Rio  
de Janeiro, 2002.

BEUTLER, K. T.; MASILAMANI, S.; TURBAN, S.; NIELSEN, J.; BROOKS, H. L. AGELOF, S.; FENTON, R. A.; PACKER, R. K.; KNEPPER, M. A. Long-term regulation of ENaC expression in kidney by angiotensin II. **Hypertension**, v. 41, p. 1143 – 1150, 2003.

BLATZ, R. C.; KONNEN, K. S.; TUCKER, B. J.; Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 57, n. 2, p. 419 - 434, 1976.

BOCK, H. A. Pressure dependente modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. **Kidney Int.** v. 41, n. 2, p. 275 - 280, 1992.

BRAGA-SOBRINHO, C.; LEITE-DELLOVA, D. C.; MELLO-AIRES, M. Action of ANP on the nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on NHE1 in proximal S3 segment. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 128, n. 3, p. 89 - 97, 2012.

BRADLEY, A.; MARON, M. D.; JANE, A.; LEOPOLD, M. D. Mineralocorticoid receptor antagonists and endothelial function. **Curr. Opin. Investig. Drugs.** v. 9, n. 9, p. 963 – 969, 2008.

BRENNER, B. M.; COOPER, M. E.; DE ZEEUW, D.; KEANE, W. F.; MITCH, W. E.; PARVING, H. H.; REMUZZI, G.; SNAPINN, S. M.; ZHANG, Z.; SHAHINFAR, S. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 12, p. 861 - 869, 2001.

BROSNIHAN, K. B.; LI, P.; FERRARIO, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, v. 27, p. 523 – 528, 1996.

BROWN, N. J. Aldosterone and end-organ damage. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 14, n. 3, p. 235 – 241, 2005.

BROWN, N. J. Direct renin inhibition-a new way of targeting the renin system. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 7, suppl. 2, p. S7 - S11, 2006.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M.; Newly recognized components of the renin- angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocr. Rev.**, p. 261 - 271, 2003.

CAMPAGLIONE-SANTOS, M. J.; DIZ, D. I.; SANTOS, R. A.; KHOSLA, M. C.; BROSNIHAN K. B.; FERRARIO, C. M. Cardiovascular effects of angiotensin 1-7 injected into the dorsal medulla of rats. **Am. J. Physiol.**, 257, H324 - H329, 1989.

CARMINES, P. K., NAVAR, L. G. Disparate effects of calcium channel blockade on afferent and efferent arteriolar responses to Ang II. **Am. J. Physiol.**, v. 256, n. 6 pt 2, p. F1015 - F1020, 1989.

CASTROP, H.; HO CHERL. K.; KURTZ, A.; SCHWEDA, F.; TODOROV, V.; WAGNER, C. Physiology of Kidney Renin. **Physiol. Rev.** v. 90, p. 607 – 673, 2010.

DAHLÖF, B.; DEVEREUX, R. B.; KJELDSEN, S. E.; JULIUS, S.; BEEVERS, G.; DE FAIRE, U.; FYHRQUIST, F.; IBSEN, H.; KRISTIANSSON, K.; LEDERBALLE-PEDERSEN, O.; LINDHOLM, L. H.; NIEMINEN, M. S.; OMVIK, P.; OPARIL, S.; WEDEL, H. LIFE Study Group: Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension study (LIFE): A randomised trial against atenolol. **Lancet**, v. 359, p. 995 - 1003, 2002.

CHAPPELL, M .C.; MODRALL, J. G.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: angiotensin-(1-7), ACE2 and blood pressure regulation. **Contrib. Nephrol.** v. 143, p. 77 – 89, 2004.

CHRISTENSEN, E. I.; BIRN, H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, p. 256 – 266, 2002.

COURETTE, B.; LOMBES, M.; BAULIEU E. E.; RAFESTIN-OBLIN M. E. Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticoid receptor. **Biochem. J.** v. 282, p. 697 - 702, 1992. COWLEY, A. W.; ROMAN, R. J.; FENOY, F. J.; MATTSON, D. L. Effect of renal medullary circulation on arterial pressure. **J. Hypertension. Suppl.**, v. 10, n.7, S187 - S193, 1992.

DARBY, I. A.; SERNIA, C. In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. **Cell Tissue Res.**, v. 281, p. 197 – microalbuminuria in 206, 1995.

DEINUM, J. Increase in serum prorenin precedes onset of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 42, n. 8, p. 1006 - 1010, 1999.

DILAURO, M.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) and Its Effects in the Kidney. **The Scientific World J.**, v. 9, p. 522 – 535, 2009.

DWORKIN, L. D.; ICHIKAWA, I.; BRENNER, B. M.; Hormonal modulation of glomerular function. **Am. J. Physiol.**, v. 244, n. 2, F95 - F104, 1983.

DZAU, V. J.; ELLISON, K. E.; BRODY, T.; INGELFINGER, J.; PRATT, R. E. Expression of renin and angiotensin-converting enzyme in human hearts. **Heart Vessels**, v. 10, p. 285 – 93, 1987.

EHRLICH, P. Fragekasten. **Z. Wiss. Mikrosk.** v. 3; p. 150, 1886.

FANESTIL, D. D. Mechanism of action of aldosterone blockers. **Sem. Nephrol.**, v. 8, p. 249 - 263, 1988.

FENTON, R. A; KNEPPER, M. A; Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium; **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 1083 – 1112, 2007.

FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C.; TALLANT, E. A.; BROSNIHAN, K. B.; DIZ, D. I. Counter regulatory actions of angiotensin 1-7. **Hypertension**, v. 30, p. 535 - 541, 1997.

FROHLICH E.D. Fibrosis and ischemia: the real risks in hypertensive heart disease. **Am. J. Hypertens.**, v. 14, p. 194S - 199S, 2001.

FUNDER, J. W.; PEARCE, P. T.; SMITH, R.; SMITH, A. I.; Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. **Science**, v. 242, p. 583 – 585, 1988.

GARCIA, N. H.; GARVIN, J. L. Angiotensin 1-7 has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, p. 1133 – 1138, 1994.

GEERING, K.; CLAIRE, M.; GAEGGLER, H. P.; ROSSEIR, B. C. Receptor occupancy vs induction of Na-K-Atpase and Na transport by aldosterone. **Am. J. Physiol.**, v. 248, p. C102 - C108, 1985.

GIEBISCH, G.; WINDHAGER, E. Transport of acid and bases. In Medical Physiology, boron W.F. and Boulpaep E. L. (Ed), **Saunders**, NY, p. 845-860, 2005.

GIEBISCH, G. H. A trail of research on potassium. **Kidney Int.**, v. 62, p. 1498 – 512, 2002.

GRIENDLING, K. K.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R. W.; Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 281–306, 1996.

GROSS, E.; ROTHSTEIN, M.; DOMBEK, S.; JUKNIS, H. I. Effect of spironolactone on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system in oligo-anuric hemodialysis patients. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 46, p. 94 – 101, 2005.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C.; BRANDS, M. W. Control of sodium excretion and arterial pressure by intrarenal mechanisms and the renin-angiotensin system. In: Laragh J, H.; Brenner, B. M. eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. New York, NY: **Raven Press**; 1451–1475, 1990.

HAMEL, P.; PAUSAVA, Z.; ADARICHEVA, K.; TREBALAY, J. Hypertension: genes and environment. **J. Hypertens.**, v. 16, p. 397 - 418, 1998.

HARRISON BERNARD, L. M.; EL-DAHR, S. S.; O'LEARY, D. F.; NAVAR, L. G. Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensinII-induced hypertension. **Hypertension**, v. 33, p. 340 – 346, 1999.

HEITSCH, H.; BROVKOVYCH, S.; MALINSKI, T.; WIEMER, G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. **Hypertension**, v. 37, p. 72 – 76, 2001.

HATAKEYAMA, H.; MIYAMORI, I.; FUJITA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, R.; YAMAMOTO H. Vascular aldosterone: Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 24316 – 24320, 1994.

HERNADEZ SCHULMAN I.; ZHOU, M. S.; RAIJ, L. Cross-talk between angiotensin II receptor types 1 and 2: Potential role in vascular remodeling in humans. **Hypertension**, v. 49, p. 270 - 271, 2007.

ISHIGURO, K.; SASAMURA, H.; SAKAMAKI, Y.; ITOH, H.; SARUTA, T.; Developmental activity of the renin-angiotensin system during the "critical period" modulates later L-NAME-induced hypertension and renal injury. v.30, n. 1, p. 63 - 75, 2007.

JAN, B. New Therapeutic Options in Patients Prone to Hypertension: A Focus on Direct Renin Inhibition and Aldosterone Blockade. **Am. J. Med. Sci.**, v. 337, n. 6, p. 438 - 444, 2009.

JERMYN, M. A. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature**, v. 177, p. 38 - 39, 1956.

JULIUS, S.; KJELDSEN, S. E.; WEBER, M.; BRUNNER, H. R.; EKMAN S.; HANSSON, L.; HUA, T.; LARAGH, J.; MCINNES, G. T.; MITCHELL, L.; PLAT F.; SCHORK, A.; SMITH, B.; ZANCHETTI, A. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: The VALUE randomised trial. **Lancet**, v. 363, p. 2022 - 2031, 2004.

JUNYA, J.; GUOHUA, D.; JILI, Z.; CHENG, C.; WEI, L.; NICHOLAS, F. P.; SINGHAL, C. Angiotensin II Infusion Induces Nephrin Expression Changes and Podocyte Apoptosis. **Am. J. Nephrol.**, v.28, p. 500 – 507, 2008.

KAGAWA, C. M. Blocking the renal electrolyte effects of mineralocorticoids with a orally active steroid spironolactone. **Endocrinology**, v. 65, p. 125 - 132, 1960.

KAMPER, A. L.; PEDERSEN, E. B.; STRANDGAARD, S. Hypertension and renal disease. **Ugeskr Laeger**, v. 171, n. 25, p. 2109-2113, 2009.

KAWADA, N.; IMAI, E.; KARBER, A.; WELCH, W. J.; WILCOX, C. S. A mouse model of angiotensin II slow pressor response: role of oxidative stress. **J Am Soc Nephrol**. v. 13, p. 2860 – 2868, 2002.

KELLY, D. J.; COX, A. J.; GOW, R. M.; ZHANG, Y.; KEMP, B. E.; GILBERT, RE. Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. **Hypertension**, v. 44, n. 2, p. 195 - 202, 2004.

KLanke, B.; CORDASIC, N.; HARTNER, A.; SCHMIEDER, R. E.; VEELKEN, R.; HILGERS, K. F. Blood pressure versus direct mineralocorticoid effects on kidney inflammation and fibrosis in DOCA-salt hypertension. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 23, n. 11, p. 3456 – 3463, 2008.

KLAR, J.; SANDNER, P.; MULLER, M. W.; KURTZ, A. cAMP stimulates rennin gene transcription in juxtaglomerular cells. **Pflügers Arch.**, v. 444, p. 335 – 344, 2002.

KLICKSTEIN, L. B.; KAEMPFER, C. E.; WINTROUB, B. U. The granulocyte-angiotensin system: Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 15042 – 46, 1982.

KIM, H. Y. Renal Handling of Ammonium and Acid Base Regulation. **Electrolyte Blood Press.**, v. 7, p. 9 - 13, 2009.

KOBORI, H.; HARRISON-BERNARD, L. M.; NAVAR, L. G. Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.12, p. 431 – 439, 2001.

KOBORI, H.; NANGAKU, M. L.; NAVAR, G.; NISHIYAMA, A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. **Pharmacol. Rev.**, v. 59, p. 251 – 287, 2007.

KRUM, H.; GILBERT, R. E. Novel therapies blocking the renin-angiotensin aldosterone system in the management of hypertension and related disorders. **J. Hypertens.**, v. 25, p. 25 – 35, 2007.

LANE, D. A.; BEEVERS, D. G. Amiloride 10mg is less effective than spironolactone 25mg in patients with hypertension resistant to a multidrug regime including an angiotensin-blocking agent. **J. Hypertens.**, v. 25, p. 2515 – 2516, 2007.

LEITE-DELLOVA, D. C.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H<sup>+</sup>-ATPase in proximal S3 segments. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 300, n. 3, F682 – F691, 2011.

LEITE-DELLOVA, D. C.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G.; MELLO-AIRES, M. Genomic and nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic calcium. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v. 295, n. 5, F1342 – F1352, 2008.

LIEBERTHAL, W.; LEVINE, J. S. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, n. 12, p. 2493 – 2502, 2009.

LIDDLE, G. W. Aldosterone antagonists and triamterene. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 134, p. 466 - 460, 1966.

LIEW, D.; KRUN, H. Aldosterone receptor antagonists for hypertension: what do they offer? **Drugs**, v. 63, p. 1963 - 1972, 2003.

LOMEZ, E. S. L.; ARAUJO, R. C.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; PESQUERO, J. L; Tonin and kallikrein in the brain of transgenic rat line expressing human tissue kallikrein. **Hypertension**, v. 39, p. 229 - 232, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265 - 275, 1951.

LU, M.; WANG, J.; JONES, K. T.; IVES, H. E.; FELDMAN, M. E.; YAO, L. J.; SHOKAT, K. M.; ASHRAFI, K.; PEARCE, D. mTOR complex-2 activates ENaC by phosphorylating SGK1. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 21, n. 5, p. 811 – 818, 2010.

MALNIC, G.; MATHEW, A. B.; GIEBISCH, G. Control of renal potassium excretion. The Kidney, Brenner B.M. (Ed) 7th. Ed. Saundres Philadelphia, Chap 10, p. 453-496, 2004.

MANCIA, G.; BOMBELLI, G.; FACCHETTI, R.; MADOTTO, F.; QUARTI-TREVANO, F.; FRIZ, H. P.; GRASSI, G.; SEGA, R. Long-Term Risk of Sustained Hypertension in White-Coat or Masked Hypertension. **Hypertension**, v. 54, n. 2, p. 226 – 232, 2009.

MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.; DE LAS HERAS, N.; MIANA, M.; BALLESTEROS, S.; VALERO-MUÑOZ, M.; VASSALLO, D.; DAVEL, A. P.; ROSSONI, L. V.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, V. Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of SGK-1. **Exp. Physiol.**, [Inpress], 2012.

MATTHEW, E. D.; CURT, D. S. Genetic Basis of Hypertension: Revisiting Angiotensinogen. **Hypertension**, v. 48, p. 14 - 20, 2006.

McENEANEY, V.; HARVEY, B. J.; THOMAS, W. Aldosterone regulates rapid trafficking of epithelial sodium channel subunits in renal cortical collecting duct cells via protein kinase D activation. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, p. 881 – 892, 2008.

MELLO-AIRES, M.; FISIOLOGIA, 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 934 p., 2008.

MENDELSON, F. A.; DUNBAR, M.; ALLEN, A.; CHOU, S. T.; MILLAN, M. A.; AGUILERA, G.; CATT K. J. Angiotensin II receptors in the kidney. **Fed. Proc.**, v. 45, p. 1420 - 1425, 1986.

MINDEL, G.; MORRISON, A. R. Is hypertension a disorder of volume control? What is the evidence?. **Nephron. physiol.**, v. 101, n. 3, p. 63 - 71, 2005.

MIYATA, K.; RAHMAN, M.; SHOKOJI, T.; NAGAI, Y.; ZHANG, G. X.; SUN, G. P.; KIMURA, S.; YUKIMURA, T.; KIYOMOTO, H.; KOHNO, M.; ABE, Y.; NISHIYAMA, A. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, n. 10, p. 2906 – 2912, 2005.

MONTMINY, M. Transcriptional regulation by cAMP. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 807 – 822, 1997.

MORGAN, L.; BROUGHTON, P. F.; KALSHEKER, N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 28, p. 1211-1222, 1996.

MULLER, D. N.; HILGERS, K. F.; BOHLENDER, J.; LIPPOLDT, A.; WAGNER, J. Angiotensin formation in the isolated rat hindlimb. **J. Hypertens.**, v. 7, p. 789 – 98, 1995.

NAVAR, L. G.; VON THUN, A. M.; ZOU, L.; el-DAHR, S. S.; MITCHELL, K. D. Enhacement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension. **Blood Press. Suppl.**, v. 2, p. 88 – 92, 1995.

NAVAR, L. G. Paracrine regulation of the renal microcirculation. **Physiol. Ver.**, v. 76, n. 2, p. 425 - 536, 1996.

NAVAR, L. G.; HARRISON-BERNARD, L. M.; IMIG, J. D.; CERVENKA, L.; MITCHELL, K. D. Renal responses to AT1 receptor blockade. **Am. J. Hypertens.**, v. 13, p. 45S – 54S, 2000.

NAVAR, L. G. The role of the kidneys in hypertension. **J. Clin. Hypertens.**, v. 7, p. 542 – 549, 2005.

NAVAR, L. G.; PRIETO, M. C.; SATOUAND. R.; KOBORI, H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. **Pharmacology**, v. 11, p. 1 – 7, 2011.

NGUYEN, G.; DELARUE, F.; BURCKLE, C.; BOUZHIR, L.; GILLER, T.; SRAER, J. D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J. Clin. Invest.** v. 109, p. 1417 - 1427, 2002.

NISHIKAWA, T.; SUEMATSU, S.; SAITO, J.; SOYAMA, A; ITO, H.; KINO, T.; CHROUSOS, G. Human renal mesangial cells produce aldosterone in response to low-density lipoprotein (LDL). **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 96, p. 309 - 316, 2005.

NISHIYAMA, A.; YAO, L.; FAN, Y.; KYAW, M.; KATAOKA, N. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. **Hypertension**, v. 45, p. 710 – 716, 2005.

PAECH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiol. Rer.**, v. 57, n. 2, p. 313 - 370, 1977.

PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R.; Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol. Rev.**, v.86, p. 747 – 803, 2006.

PAN, L.; BLACK, T. A.; SHI, Q.; JONES, C. A.; PETROVIC, N.; LOUDON, J.; KANE, C.; SIGMUND, C. D.; GROSS, K. W. Critical roles of a cAMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 45530 – 45538, 2001.

PIETER, M.; JANSEN, A. H.; JAN D.; BEN P. I.; ANTON H. VAN DEN MEIRACKER. Aldosterone-receptor antagonism in hypertension, **J. Hypertens.**, v. 27; p. 680 – 691, 2009.

PITT, B.; ZANNAD, F.; REMME, W. J.; CODY, R.; CASTAIGNE, A.; PEREZ, A.; PALENSKY, J.; WITTES, J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 10, p. 709 - 717, 1999.

PRATT, R. E. ; CARLETON, J. E.; RICHIE, J. P. ; HEUSSER, C. ; DZAU, V. J. Human renin biosynthesis and secretion in normal and ischemic kidneys. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 7837 – 7840, 1987.

PETI-PETERDI, J.; WARNOCK, D. G.; BELL, P. D.; Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT(1) receptors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 1131 – 1135, 2002.

PINTEROVA, L.; KRIZANOVA, O.; ZORAD, S. Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. **Gen. Physiol. Biophys.** v.19, p. 329 - 334, 2000.

PRIETO-CARRASQUERO, M. C.; HARRISON-BERNARD, L. M.; KOBORI, H.; OZAWA, Y.; HERING-SMITH, K. S.; HAMM, LL.; NAVAR, L. G. Enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. **Hypertension**, v. 44, p. 223 – 229, 2004.

PRIETO-CARRASQUERO, M. C.; KOBORI, H.; OZAWA, Y.; GUTIERREZ, A.; SETH, D.; NAVAR, L. G. AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, p. F632 – F637, 2005.

PIETER, M.; JANSEN, A. H.; JAN D.; BEN P. I.; ANTON, H.; VAN DEN, M. Aldosterone-receptor antagonism in hypertension, **J. Hypertens.**, v. 27, p. 680 – 691, 2009.

PRATT, J. H.; ECKERT, G. J., NEWMAN, S.; AMBROSIUS, W. T. Blood pressure responses to small doses of amiloride and spironolactone in normotensive subjects. **Hypertension**, V. 38, P. 1124 – 1129, 2001.

PRIETO-CARRASQUERO, M. C.; BOTROS, F. T.; PAGAN, J.; KOBORI, H.; SETH, D. M.; CASARINI, D. E.; NAVAR, L. G. Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. **Hypertension**, v. 51, p. 1590 – 1596, 2008.

RASHIKH, A.; AHMAD, S. J.; PILLAI, K.K.; NAJMI, A. K. Aliskiren as a novel therapeutic agent for hypertension and cardio-renal diseas. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 64, n. 4, p. 470 - 481, 2012.

REUDELHUBER, T. L. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 14, p. 155 - 159, 2005.

RHIAN, M. T.; ERNEST, L. S. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 639 – 672, 2000.

SANDBERG, M. B.; RIQUIER, A. D.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; McDONOUGH, A. A.; MAUNSBACH, A. B. ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na<sub>+</sub>-Cl<sup>-</sup> cotransporter to apical membrane. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 293, F662 – F669, 2007.

SEALEY, J. E.; GERTEN-BANES, J.; LARAGH. J. H. The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay. **Kidney International**, v. 1, p. 240 - 253, 1972.

SELYE, H. Anticortisol action of aldosterone. **Science**, v. 121, p. 368 - 369, 1955.

SHANMUGAM, S.; SANDBERG, K. Ontogeny of angiotensin II receptors. **Cell. Biol. Int.**, v. 20, p. 169 – 176, 1996.

SILVESTRE, J. S.; HEYMES, O.; ROBERT, A. C.; AUPETIT-FAISANT, V. B.; CARAYON, A.; SWYNGHEDAUW, B.; DELCAYRE, C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. **Circulation**, v. 99, p. 2694 – 2701, 1999.

SMITH, H. W.; FINKELSTEIN, N.; ALIMINOSA, L.; CRAWFORD, B.; GRABER M. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dogs and men. **J. Clin. Invest.**, v. 24, p. 388 – 404, 1945.

SANTOS, R.A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUEIRO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, 11, 1153-157, 1988.

SANTOS, R.A.; CAMPAGLIONE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin 1-7: na update. **Regul. Pept.**, v. 91, p. 45 - 62, 2000.

SCHIAVONE, M. T.; SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; KROSLA, M. C.; FERRÁRIO, C. M. Release of vasopressin from the rat hypotalamu-neurohypophysial system by angiotensin 1-7 heptapeptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 4095 -98, 1988.

SIMPSON, S. A.; TAIT, J. F.; WETTSTEIN, A.; NEHER, R.; VON EUW, J.; REICHSTEIN, T. Isolation from the adrenalsof a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism. **Experientia**, v. 9, p. 333 – 35, 1953.

SPAT, A.; HUNYADY, L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 489 - 539, 2004.

SUBRAMANYA, A. R.; YANG, C. L.; MCCORMICK, J. A.; ELLISON, D. H. WNK kinases regulate sodium chloride and potassium transport by the aldosterone sensitive distal nephron. **Kidney Int.**; v. 70, p. 630 – 634, 2006.

TAKEI, Y.; JOSS, J. M.; KLOAS, W.; RANKIN, J. C. Identification of angiotensin I in several vertebrate species: its structural and functional evolution. **Gen. Comp. Endocrinol.**. v. 135, n. 3, p. 286 - 92, 2004.

TIGERSTED, T. R.; BERGMAN, P. G. Niere und Krieslauf. **Scand. Arch. Physiol.**, v. 8, p. 223 - 271, 1898.

TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C.; CHIU, A. T.; HERBLIN, W. F.; BENFIELD, P.; CARINI, D. J.; LEE, R. J.; WEXLER, R. R.; SAYE, J. A.; SMITH, R. D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 205 – 251, 1993.

TOFFELMIRE, E. B.; SLATER, K.; CORVOL, P.; MENARD, J.; SCHAMBELAN, M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans; Studies using a direct immunoradiometric assay. **J. Clin. Inves.**, v. 83, p. 679 – 687, 1989.

VAN DER MARK, J.; KLINE, R. L. Altered pressure natriuresis in chronic angiotensin II hypertension in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. R739 – R748, 1994.

WAKUI H.; TAMURA K.; MATSUDA, M.; BAI, Y.; DEJIMA, T.; SHINEGANA, A.; TOYA, Y.; YBANA M.; MINAMISAWA, S.; UMAMURA, S.; Intrarenal suppression of angiotensin II type receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice; **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 299, p. F991 - F1003, 2010.

WARREN, T.; BRIAN, J. H. Mechanisms Underlying Rapid Aldosterone Effects in the Kidney. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 17, n. 73, p. 335 – 357, 2011.

WELLING, P. A.; CAPLAN, M.; SUTTERS, M.; GIEBISCH, G. Aldosterone-mediated Na/K-ATPase expression is alpha 1 isoform specific in the renal cortical collecting duct. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 23469 – 23476, 1993.

WILKINSON-BERKA, J. L.; TAN, G. J. A.; WORSKI, K.; MILLER, A. G. Identification of retinal aldosterone system and the protective effects of mineralocorticoid receptor antagonism on retinal vascular pathology. **Circ. Res.**, v. 104, n. 1, p. 124 - 133, 2009.

WU, R.; LAPLANTE, M. A.; DE CHAMPLAIN, J. Prevention of angiotensin II-induced hypertension, cardiovascular hypertrophy and oxidative stress by acetylsalicylic acid in rats. v. 22, n. 4, p. 793 - 801, 2004.

YAMAMOTO, T.; HAYASHI, K.; MARSUD, H.; KUBOTA, E.; TANAKA, H.; OGASAWARA, Y.; NAKAMOTO, H.; SUZUKI, H.; SARUTA, T.; KAJIYA, F. In vivo visualization of angiotensin II and tubuloglomerular feedback-mediated renal vasoconstriction. **Kidney Int.**, (60): 864 - 869, 2001.

YOO, T. H.; LI J. J.; KIM J. J.; JUNG D. S.; KWAK S.; J.; RYU D. R.; CHOI H. Y.; KIM J. S.; KIM H. J.; HAN S. H.; LEE J. E.; HAN D. S.; KANG S. W.; Activation of renin-angiotensin system within podocytes in diabetes. **Kidney Int.**, v. 71, p. 1019 – 1027, 2007.

ZHANG, A.; JIA, Z.; GUO, X.; YANG, T. Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 293, n. 3, p. F723 – F731, 2007.

ZHAO, D.; SETH, D. M.; NAVAR, L. G. Enhanced distal nephron sodium reabsorption in chronic angiotensin II-infused mice. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 120 - 126, 2009.

ZIMPELMANN, J.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) activates growth-stimulatory pathways in human mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 296, n. 2, F337 – F346, 2009.