BRUNA BEZERRA LINS

**O papel da angiotensina II na doença renal crônica: Contribuição das enzimas
NADPH oxidases e do estresse de retículo endoplasmático**

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: Prof^a Dr^a Maria Oliveira de Souza

Versão corrigida

**São Paulo
2020**

RESUMO

LINS, B. B. **O papel da angiotensina II na doença renal crônica: Contribuição das enzimas NADPH oxidases e do estresse de retículo endoplasmático.** 2020. 87 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A doença renal crônica (DRC) é uma patologia grave e de alta incidência no sistema de saúde. Entre os fatores que contribuem para a progressão da DRC, se destaca a hipertensão arterial associada à atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). No entanto, os mecanismos de ação da angiotensina II (Ang II) na gênese e progressão de lesões renais ainda não foram completamente esclarecidos. A nossa **hipótese** é que a Ang II circulante em concentrações elevadas por um período crônico, poderá ativar o SRA intrarrenal e consequentemente induzir lesões no tecido renal, bem como alterações na expressão dos transportadores de sódio no epitélio tubular. Assim, o **objetivo** deste estudo foi investigar a ação da Ang II via receptor AT1 na modulação de mecanismos celulares responsáveis pela lesão renal crônica, observando a contribuição das espécies reativas de oxigênio - EROs, estresse de retículo endoplasmático (RE), inflamação e fibrose. Utilizou-se ratos Wistar tratados com Ang II (200 ng/kg/min, via mini-bomba osmótica) por 42 dias. A contribuição de AT1 foi monitorada pelo antagonista losartan (10 mg/kg/dia) durante 14 dias. A expressão gênica no tecido renal foi avaliada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A expressão de proteínas foi avaliada por *Western Blotting*, imunohistoquímica e imunofluorescência. Os resultados indicam que a ação da Ang II/AT1, resultou em aumento da expressão de RNAm para Nox2, Nox4, p22^{phox}, p47^{phox}, ATF4, eIF2 α , NF- κ B, IL1 β , α -SMA, Keap1 e redução de Nrf2; aumento da expressão proteica de NOX2, NOX4, p22^{phox}, p47^{phox}, α -SMA, PERK e eIF2 α . Além disso, a Ang II/AT1 induziu aumento da expressão proteica dos trocadores de Na⁺/H⁺ isoformas 1 e 3 (NHE1 e NHE3), co-transportadores NKCC2 e NCC e canal epitelial para Na⁺ isoforma β (ENaC β). Em conclusão, os resultados indicam que o tratamento crônico com Ang II/AT1 foi capaz de induzir estresse oxidativo, estresse de RE, inflamação e fibrose renal, além de regular o manejo de Na⁺ tubular por aumentar a expressão de NHE1, NHE3, NCC, NKCC2 e ENaC β .

Palavras-chave: Angiotensina II, receptor AT1, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, doença renal crônica.

ABSTRACT

LINS, B. B. **The role of angiotensin II in chronic kidney disease: Contribution of NADPH oxidase enzymes and endoplasmic reticulum stress.** 2020. 87 p. Doctorate thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Chronic kidney disease (CKD) is a serious condition with high incidence in the health system. Among the factors that contribute to the progression of CKD include hypertension associated with the renin-angiotensin-aldosterone system (SRAA) activity. However, the mechanisms by which angiotensin II (Ang II) acts in the genesis and progression of renal diseases have not been completely clarified. Our hypothesis is that circulating Ang II at elevated concentrations over a chronic period may activate intrarenal SRAA and consequently induces kidney tissue damage as well as changes in the expression of sodium transporters in the tubular epithelium. Thus, the aim of this study was to investigate the action of Ang II via AT1 receptor (AT1R) on the modulation of cellular mechanisms responsible for chronic kidney injury, observing the contribution of reactive oxygen species - ROS, endoplasmic reticulum stress (RE), inflammation and fibrosis. In the current study, Wistar rats were treated with Ang II (200 ng / kg / min by osmotic mini pump) for 42 days. The contribution of AT1R was monitored by losartan -AT1R antagonist (10 mg / kg / day) for 14 days. Gene expression in renal tissue was assessed by real time polymerase chain reaction (qPCR). Protein expression was evaluated by Western Blotting, immunohistochemistry and immunofluorescence. The results indicate that the action of Ang II/AT1 resulted in increased mRNA expression for Nox2, Nox4, p22^{phox}, p47^{phox}, ATF4, eIF2 α , NF κ B, IL1 β , α -SMA, Keap1 and reduction of Nrf2; increased protein expression of NOX2, NOX4, p22^{phox}, p47^{phox}, α -SMA, PERK and eIF2 α . In addition, Ang II/AT1 induced increased protein expression of Na⁺ / H⁺ isoforms 1 and 3 (NHE1 and NHE3) exchangers, NKCC2 and NCC co-transporters and Na⁺ isoform β epithelial canal (ENaC β). In conclusion, the results indicate that in the chronic treatment, Ang II/AT1 was able to induce oxidative stress, RE stress, inflammation and renal fibrosis, and regulate tubular Na⁺ management by increasing the expression of NHE1, NHE3, NCC, NKCC2 and ENaC β .

Keywords: Angiotensin II, AT1 receptor, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, chronic kidney disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica (DRC) ou Insuficiência Renal Progressiva

A doença renal crônica (DRC) constitui um sério problema de saúde pública, de crescimento alarmante (52). O censo de 2017 da Sociedade Brasileira de Nefrologia apontou que aproximadamente 127.000 pacientes estavam em tratamento dialítico (130). A DRC é caracterizada por perda progressiva da função renal, atrofia tubular, rarefação microvascular, inflamação e deposição de matriz extracelular (MEC) no espaço intersticial entre os néfrons, levando à fibrose tecidual (75).

Independentemente da causa, a DRC é classificada em cinco estágios com base no nível de função renal do paciente (**Tabela 1**) e o índice de mortalidade está diretamente relacionado à gravidade do estágio da doença, sendo maior nos pacientes em estágios 4 e 5, do que nos demais estágios (49).

Tabela 1: Estágios da Doença Renal Crônica

Estágio	Descrição	RFG mL/min/1,73m ²
1	Lesão renal com RFG normal ou aumentado	≥ 90
2	Lesão renal com RFG levemente diminuído	60 - 89
3	Lesão renal com RFG moderadamente diminuído	30 - 59
4	Lesão renal com RFG severamente diminuído	15 - 29
5	Falência renal	< 15 ou diálise

RFG = Ritmo de Filtração Glomerular.

Em linhas gerais, os mecanismos que mais contribuem para o início e a progressão da DRC incluem: 1) *susceptibilidade* - associada à idade, histórico familiar, redução da massa renal e baixo peso ao nascer; 2) *iniciação* - decorrente de

obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças auto-imunes, infecções sistêmicas e drogas; 3) *progressão* - associada à proteinúria decorrente de alterações na barreira de ultrafiltração e injúria de podócitos (26), hipertensão arterial, obesidade e controle inadequado da glicemia em pacientes diabéticos (128). A presença de anemia também pode sinalizar DRC, uma vez que nessa condição os rins apresentam deficiência na síntese de eritropoietina - hormônio que estimula a produção de hemácias na medula óssea.

Em estágios avançados a DRC é caracterizada pelo desenvolvimento de glomeruloesclerose, infiltração principalmente de leucócitos no interstício renal e fibrose progressiva do interstício renal (1, 116). Por essa razão, o estudo de fibrose intersticial e dos mecanismos envolvidos, tem atraído atenção da comunidade científica especializada. No estágio final da DRC (EFDRC), o RFG atinge valores próximos a 15 mL/min e nessa condição o paciente passa a depender de terapia por hemodiálise (37).

1.2 Pressão Sanguínea

Uma das principais funções do sistema cardiovascular é a manutenção do fluxo sanguíneo adequado para garantir a perfusão tecidual no organismo. Nesse sentido, a pressão sanguínea passa a ser a principal grandeza física responsável pela manutenção de fluxo, e por isso, deve ser rigorosamente controlada. Conceitualmente, a pressão sanguínea é definida como a força que o volume de sangue exerce contra as paredes dos vasos na unidade de tempo, ou força motriz que gera fluxo. De acordo com a Lei de *Poiseuille*, o fluxo é diretamente proporcional à diferença de pressão do sangue nas extremidades de um vaso e inversamente proporcional à resistência vascular. Dessa forma, a pressão sanguínea arterial ou pressão arterial (PA) pode ser definida como o produto entre o débito cardíaco (DC = volume sistólico x frequência cardíaca) e a resistência hidráulica vascular total (RVPT). O termo pressão arterial se deve ao fato de que as artérias e arteríolas conferem uma maior resistência hidráulica ao fluxo sanguíneo (2).

O valor da pressão arterial média (PAM) é obtido pela relação $PAM = [(2PAD) + PAS]/3$, onde “PAD” equivale à diastólica e “PAS” equivale à sistólica. Em condição fisiológica, a PAS é da ordem de 120 mmHg, a PAD de 80 mmHg (onde se lê 120 x

80 mmHg) e portanto a PAM é aproximadamente 93 mmHg. Nessa condição, a PA é regulada em resposta aos mecanismos neurais de curto prazo (segundos ou minutos) e mecanismos de longo prazo (horas ou dias). Em geral, as respostas de longo prazo dependem da síntese e secreção de hormônios, incluindo a angiotensina e vasopressina, e dos mecanismos de ajustes renais e hemodinâmicos, os quais favorecem a excreção de água e sal (2).

1.2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica e Doença Renal Crônica

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença caracterizada por elevados níveis de pressão arterial, sendo igual ou superior a 140 x 90 mmHg e que pode se tornar crônica. A hipertensão arterial é frequente em doenças cardiovasculares e é um importante fator de risco para acidente vascular cerebral (AVC), infarto no miocárdio e doença renal crônica. É considerada um problema grave da saúde pública mundial e no Brasil atinge cerca de 36 milhões de pessoas, sendo 60 % idosos e 5% crianças (24).

A hipertensão arterial pode ser classificada em dois tipos 1) *essencial ou primária* (cerca de 90% dos casos), cujas causas são desconhecidas e podem estar associadas aos fatores genéticos, ambientais e/ou comportamentais, como por exemplo, a ingestão excessiva de sal) (15); e 2) *secundária* (10% dos casos) de causas conhecidas e que podem estar associadas ao hiperaldosteronismo primário, a síndrome de apneia obstrutiva do sono e principalmente à doença renovascular, realçando a estenose da artéria renal.

A hipertensão arterial ocorre principalmente pela combinação do excesso de Na⁺ e água no fluido extracelular, ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (88). Na hipertensão arterial crônica, ocorre também hipertensão glomerular e consequente declínio do ritmo de filtração glomerular (RFG), condição peculiar da doença renal crônica (DRC) (20).

1.3 Sistema renina-angiotensina (SRA)

O SRA sistêmico foi descrito pela primeira vez por Tigerstedt e Bergman no final do século XIX e desde então, vem sendo amplamente estudado. Na cascata de sinalização clássica do SRA, a angiotensina II (Ang II) é um dos principais peptídeos investigados em decorrência de suas múltiplas funções teciduais. Em condições fisiológicas, a Ang II plasmática se encontra em concentrações de 10 a 20 pM (120) e atua em vários tecidos via receptores do tipo AT1 e AT2, ambos pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (89). A ativação do receptor AT1 desencadeia as respostas fisiológicas mais clássicas da Ang II, como por exemplo, a manutenção da pressão arterial e do volume do fluido extracelular (4) (**figura 1**).

Figura 1: Sistema renina-angiotensina sistêmico. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; PA: Pressão Arterial; Na⁺: Sódio.

A interação entre Ang II e o receptor AT1 resulta na ativação de várias vias de sinalização intracelular moduladas pelas proteínas G_i , $G_{q12/13}$ e G_s (38, 43). Além disso, a interação Ang II/AT1 regula vias independentes de proteínas G, como a da proteína associada ao receptor AT1 (ATRAP1) e a da β -arrestina, ambas envolvidas na internalização do AT1; da Janus quinase (JAK) e Src, que ativam respectivamente, as proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STAT), além das cinases como a Erk (do inglês: *extracellular signal-regulated kinases*) (77). O aumento nas concentrações de Ang II no plasma ou aumento na expressão de receptores AT1 nas células dos diferentes tecidos pode resultar em vasoconstrição, liberação de aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal, alterações no transporte de sódio em diversos segmentos do néfron e estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais) (8, 73). Nessa condição, a Ang II passa a ser considerada uma molécula importante na geração e manutenção da hipertensão arterial (55). Além disso, a Ang II induz aumento na produção de EROs associada à produção de citocinas pró-inflamatórias, fatores pró-fibróticos e pró-apoptóticos, o que resulta em injúria tecidual (72).

Contudo, sabe-se que, o bloqueio do sistema renina angiotensina por inibidores das enzimas conversoras de angiotensina ou antagonistas dos receptores AT1 é altamente efetivo em atenuar a progressão de doenças renais em humanos e modelos experimentais.

O receptor AT2 é essencialmente expresso nas células de tecidos embrionários e é importante para a diferenciação celular e o desenvolvimento de órgãos (78, 80). Após o nascimento, a expressão de receptores AT2 decai; contudo, persiste em vários órgãos incluindo o coração, glândula adrenal, rins e vasos, onde medeiam importantes efeitos fisiológicos da Ang II (25). A expressão de receptores AT2 pode aumentar em situações de injúria cardíaca ou vascular e durante os processos de cicatrização do tecido renal, o que sugere sua participação nos mecanismos de remodelamento tecidual (43, 132), respostas vasodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-fibróticas (34, 112, 118). Tais respostas são essenciais para contrabalançar as injúrias teciduais que ocorrem em detrimento dos efeitos mediados pelo receptor AT1. As vias de sinalização celular relativas à ativação dos receptores AT2 dependem de mecanismos associados ou não à proteína G ($G_{i\alpha2}$ e $G_{i\alpha3}$) (103). De maneira geral, as repostas celulares por ativação de AT2 resultam na geração de monofosfato cíclico de

guanosina (GMPc) e óxido nítrico, ativação da peptidil peptidase 2 A (PPA2) e estimulação da fosfolipase A2 (25, 63, 124).

1.3.1 Sistema renina-angiotensina intrarrenal

Diversos estudos demonstram a presença e a importância de SRA locais, em vários tecidos como coração, tecido adiposo, glândulas adrenais, sistema nervoso central e rins. Em condições fisiológicas, a Ang II sistêmica mantém a atividade basal do SRA intrarrenal devido ao mecanismo de retroalimentação positiva pelo qual a Ang II via receptor AT1, ativa a síntese de angiotensinogênio essencialmente pelas células do túbulo proximal, bem como a síntese de renina e da enzima conversora de Ang I (ECA1) no néfron distal (18). Nessa condição, a concentração de Ang II na luz tubular é elevada em relação ao plasma e alcança a faixa de nanomolar (139). Por outro lado, em altas concentrações plasmáticas, a Ang II potencializa a atividade do SRA intrarrenal, o que resulta em maior interação da Ang II intrarrenal com os receptores do tipo AT1 para sustentar a hipertensão arterial e induzir alterações na hemodinâmica e função renal (26).

Inicialmente, as arteríolas aferentes renais respondem ao aumento da pressão arterial com vasoconstrição e consequente queda da perfusão glomerular e do RFG. Na tentativa de assegurar o RFG, o rim lança mão de outro mecanismo que inclui a ação da Ang II via receptor AT1 no aumento da resistência das arteríolas eferentes. Entretanto, a persistente ação da Ang II via receptor AT1 em várias células renais, passa a estimular a síntese de TGF- β 1 (do inglês: *Transforming growth factor beta 1*) (143) e este por sua vez, reduz a capacidade de autorregulação das arteríolas aferentes (122). Em conjunto, a queda na resistência da arteríola aferente e o aumento da resistência da arteríola eferente resultam em elevação da pressão transcápsular glomerular (108) e consequentemente aumento do RFG, condição que favorece inúmeros eventos celulares responsáveis pela progressão da injúria renal.

1.3.2 Angiotensina II e a doença renal crônica

Além de atuar na hemodinâmica renal, a Ang II intrarrenal induz alterações na barreira de ultrafiltração glomerular, aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tecido renal, proliferação de células mesangiais, inflamação, fibrose vascular e glomerular devido ao acúmulo de elementos de matriz extracelular (MEC) e colágenos I, III e IV nos vasos de resistência, glomérulos e interstício renal (51, 69, 96, 105, 146). Por outro lado, não se conhece as vias de sinalização celular pelas quais a Ang II regula tais eventos no tecido renal.

Na barreira de ultrafiltração glomerular, a Ang II induz queda da síntese de proteoglicanos e reduz a transcrição de nefrina - proteína do diafragma podocitário (19, 144), resultando no aumento da permeabilidade da membrana basal glomerular e apoptose de podócitos (108). A membrana basal glomerular mais permeável, permite a passagem de proteínas da luz do capilar para o espaço de Bowman. As proteínas filtradas, incluindo a albumina são reabsorvidas no túbulo proximal por endocitose mediada pelas proteínas receptoras denominadas megalina e cubilina (14). Contudo, na célula do túbulo proximal o metabolismo dessas proteínas endocitadas pode resultar na síntese de citocinas, as quais induzem lesões no epitélio tubular e ao serem liberadas no interstício, estimulam eventos como a migração de macrófagos e linfócitos T, a proliferação de fibroblastos e a produção dos componentes de matriz extracelular (MEC), incluindo colágenos e integrinas (101). Em excesso, as proteínas filtradas e não processadas corretamente pelo túbulo proximal contribuem para a proteinúria. No conjunto, a ação positiva da Ang II sobre a proteinúria associada aos processos inflamatórios, fibróticos e acúmulo de MEC, resulta em expansão glomerular e desenvolvimento de glomeruloesclerose (107), condição que representa o estágio avançado da DRC (47).

1.3.3 Angiotensina II e a geração de espécies reativas de oxigênio no rim

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas pequenas e altamente reativas como resultado da presença de elétrons não pareados. Um exemplo clássico das EROs é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), produzido a partir do oxigênio molecular por ação da NADPH oxidase (do inglês: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-*

oxidase); o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e o peroxinitrito ($\text{ONOO}^\cdot$). Dentre as espécies reativas de oxigênio, o ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) é a molécula mais importante para a indução do estresse oxidativo, condição que potencializa a progressão de várias patologias.

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio na produção de EROs, as quais têm papel importante na sinalização intracelular, cujas vias regulam as respostas biológicas como expressão gênica, crescimento e diferenciação celular, síntese de MEC e estimulação de cinases pró-inflamatórias (133).

A NADPH oxidase é representada por uma família que compreende sete isoformas: Nox1-Nox5, Duox1 e Duox2, as quais são expressas em diversos tecidos (10). O rim expressa Nox1, Nox2 – com funções pouco definidas, e expressa principalmente Nox4 (121). No entanto, sabe-se que a Nox2 é regulada pelas enzimas p22^{phox} e p47^{phox} (42, 121). A Nox4, que também é regulada pela p22^{phox} (**figura 2**), é a mais importante fonte de EROs intrarrenal (121) e está associada aos eventos patológicos que culminam na injúria de mesângio, podócitos e células tubulares renais (42).

Figura 2: Isoformas da NADPH oxidase e suas subunidades regulatórias expressas nos rins. Nox1 e Nox2 requerem associação com subunidades citosólicas para sua ativação. Nox4 não é regulada por nenhuma subunidade regulatória conhecida. Adaptado de Alexander Sirker (2011).

A interação entre Ang II/AT1 resulta na geração de ácido araquidônico, ativação da proteína cinase C (PKC) ou da proteína cinase B (AKT) (50). Uma vez ativadas, essas proteínas modulam a atividade da Rac1 (do inglês: *related C3 botulinum toxin substrate*) - um membro da família Rho GTPases que ativa a isoforma Nox4 da

NADPH oxidase e conseqüentemente, aumenta a geração de EROs (50). Embora tenha ocorrido avanço na caracterização das isoformas de Nox e nos mecanismos de geração de EROs no tecido renal, a função exata da Nox1, Nox2 e Nox4 nos eventos de injúria renal ainda não é clara, e merece atenção visto que a geração de EROs está envolvida na patogênese da insuficiência renal aguda (92) e possivelmente na progressão da DRC.

É importante ressaltar que o estresse oxidativo está constantemente presente em todas as formas de DRC, especialmente quando a geração de EROs excede a capacidade do sistema de defesa antioxidante (106). Esse aumento da produção de EROs no rim é impulsionado principalmente pela ativação da NADPH oxidase, disfunção mitocondrial e estresse de retículo endoplasmático (21, 85).

1.3.4 Espécies reativas de oxigênio e estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela com função essencial na biossíntese, enovelamento e modificações estruturais de proteínas, além de atuar como reservatório de cálcio intracelular (114). Considerando que o enovelamento de proteínas no RE é um processo químico em que a estrutura da proteína assume a sua configuração funcional na dependência de fatores como a temperatura e as moléculas que a rodeiam, é pertinente ressaltar que o aumento das EROs pode dificultar o enovelamento proteico no RE (32). Nessa condição, o acúmulo de proteínas mal enoveladas compromete a homeostase da organela, o que caracteriza o estresse de RE (85). Em resposta à disfunção do RE as células tentam restabelecer a função da organela, ativando um mecanismo conhecido como resposta às proteínas mal enoveladas - *Unfolded protein response* - UPR (17, 83). Este mecanismo por sua vez, é mediado por três proteínas cinases localizadas na membrana do RE: PERK (do inglês: *protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*), ATF6 (do inglês: *activating transcription factor 6*) e IRE1 (do inglês: *inositol-requiring kinase 1*) (119).

Em condições normais, essas proteínas são mantidas no estado inativo devido às interações com a Chaperona (Bip ou GRP78) (64). Entretanto, quando há proteínas mal enoveladas (**figura 3**), a GRP78 se dissocia dessas proteínas e estas são ativadas por autofosforilação (11). A proteína PERK fosforilada ativa os fatores Nrf2 (do inglês: *nuclear factor erythroid 2*) e eIF2 α (do inglês: *eukaryotic translation initiation*

factor alpha). O eIF2 α quando fosforilado na serina 51 diminui sua atividade, reduzindo as taxas de início da tradução e de síntese protéica (54) e consequentemente ativando o ATF4 (do inglês: *activating transcription factor 4*) (104). Os fatores ATF4 e Nrf2 induzem aumento na expressão de genes que facilitam a adaptação das células ao estresse (74), incluindo os genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações do tipo redox e secreção de proteínas (53, 54). Vale ressaltar que nem todos os genes regulados por ATF4 são anti-apoptóticos. Quando o estresse de RE persiste e a quantidade de proteínas mal enoveladas aumenta, a via PERK/eIF2 α /ATF4 é potencializada e nessa condição, o ATF4 induz a transcrição de CHOP (do inglês: *CCAAT- enhancer-binding protein homologous protein*), o qual induz aumento da produção de EROs no RE e ativa proteínas apoptóticas em resposta ao estresse de RE (95).

Além disso, a liberação de GRP78 também permite a dimerização de IRE1 α , aumentando sua atividade através de autofosforilação. A IRE1 α então remove um íntron de 26 bases do RNAm da XBP1. O RNAm de XBP1 conjugado codifica um potente fator de transcrição que é translocado para o núcleo, ativando a expressão de genes alvo de UPR, que tem propriedades de pró-sobrevivência ou pró-apoptótica (6). Por fim, a liberação do GRP78 a partir do ATF6 permite que o ATF6 migre para o complexo de Golgi, onde é clivado pelas proteases S1P e S2P, produzindo um fragmento de ATF6 citosólico ativo (ATF6 p50). Este fragmento migra para o núcleo, ativando também a transcrição dos genes alvo da UPR (148). Há evidências que o estresse de RE tem papel importante na progressão de patologias como a progressão de fibrose renal (40), porém os mecanismos não são bem conhecidos.

É importante ressaltar que o estresse oxidativo e o estresse de retículo endoplasmático podem induzir apoptose - morte celular programada (95), monitorada pela expressão das proteínas Bax (15) e caspases 3, 9 e 12.

Figura 3: Vias da UPR em mamíferos. Durante o estresse de RE, o GRP78 liga-se preferencialmente a proteínas desdobradas ou mal dobradas, afastando assim o equilíbrio da ligação entre GRP78 e IRE1 α , PERK e ATF6. A liberação de GRP78 resulta na ativação da PERK, IRE1 α e ATF6 através de autofosforilação desencadeando uma cascata de ativações para os genes alvo da UPR. Adaptado de Kezhong Zhang (2008).

1.3.5 Espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante.

O sistema de defesa antioxidante consiste de inúmeras moléculas, incluindo o Nrf2 (do inglês: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), cujo papel central é a indução de genes que codificam enzimas desintoxicantes e proteínas associadas. Portanto, o Nrf2 é um fator regulador das respostas adaptativas celulares frente ao estresse oxidativo (94). Em condições fisiológicas, o Nrf2 interage com a proteína Keap1 (do inglês: *Kelch-like ECH-associated protein 1*) e o complexo proteico permanece no citosol associado ao citoesqueleto (57). Tal organização proteica favorece a inativação do Nrf2 pela Keap1 (57). Nesta condição, os resíduos de cisteínas da Keap1 atuam como sensores do estado redox intracelular (106). Assim, o aumento das EROs induz alterações conformacionais nestes resíduos de cisteínas,

o que resulta na dissociação do complexo proteico Nrf2/Keap1 (71). Nessa condição, a modificação de Keap1 e a translocação nuclear de Nrf2 pode ocorrer via fosforilação de seus resíduos de treonina ou serina por cinases a montante, como a proteína cinase C (PKC), a proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK), a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3 cinase)/Akt e a PERK.

O Nrf2 livre é translocado para o núcleo e interage com os elementos de respostas antioxidantes (AREs) localizados nas regiões promotoras de genes que atuam nas respostas citoprotetoras contra o estresse oxidativo. Essa associação Nrf2/AREs resulta na regulação da transcrição de genes antioxidantes, incluindo as enzimas heme oxigenase -1 (HO-1), superóxido dismutase 1 (SOD1), NAD(P)H desidrogenase [quinone] 1 (NQO1), sulfiredoxina (SRXN), tioredoxina (TRX), ferritina (Ft), além de genes relacionados com o metabolismo da glutathiona, como a glutamato-cisteína ligase (GCL) e a glutathiona peroxidase (GPX) (3, 9, 29, 136).

Entretanto, sabe-se que na DRC a disfunção de Nrf2 induz aumento da inflamação renal levando ao acúmulo de hidroperóxidos e lipoperóxidos, que são potentes ativadores do NFκB no tecido renal. Além disso, Zoja e colaboradores sugeriram um envolvimento do complexo Nrf2/Keap1 na degradação do NFκB (150) e outros estudos sugerem que o Nrf2 também tem função anti-inflamatória (31, 79).

1.3.6 Espécies reativas de oxigênio, inflamação e fibrose.

O NFκB (do inglês: *factor nuclear kappa B*) é a molécula chave para a transcrição de fatores pró-inflamatórios em todos os tecidos, incluído o tecido renal (48, 111). A ativação do NFκB resulta em aumento da expressão de citocinas inflamatórias como TNFα, IL-1, IL-6 (131), moléculas de adesão e quimiocinas, aumento da infiltração de neutrófilos, produção de EROs e injúria endotelial microvascular (131). O NFκB está também associado aos eventos celulares como apoptose, proliferação e desdiferenciação (111). Na ausência de estímulos inflamatórios, o NFκB permanece em estado inativo por estar suprimido pelo IκB (do inglês: *inhibitor of kappa B*). Na presença de estímulos, o IκB é fosforilado e degradado, expondo o NFκB que por sua vez é translocado para o núcleo celular para induzir transcrição de genes inflamatórios (148).

Na clínica, as terapias para modular a ativação de NF κ B nas doenças renais são pouco conhecidas e são limitadas ao uso de antagonistas dos receptores AT1 ou receptores de mineralocorticóides (111). Por outro lado, já é bem descrito em outros tecidos incluindo o vascular, que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) regula a transcrição do NF κ B (91). Além do estresse oxidativo, foi demonstrado que a ativação de NF κ B pode estar associada ao estresse de retículo endoplasmático (RE) (45, 99).

Na progressão da doença renal as citocinas transcritas pelo NF κ B atuam nas células renais (células tubulares, mesangiais e fibroblastos) para induzir proliferação e alterações fenotípicas. Essas células, principalmente os fibroblastos, tornam-se miofibroblastos (principais mediadores celular de fibrose) e passam a expressar a α -actina de musculo liso (α SMA) e aumentar a produção de colágeno e outros componentes da MEC (147). Assim, a α SMA passa a ser um bom marcador do processo fibrótico renal.

Além disso, o TGF β é um importante regulador de fibrose (41), em vários modelos experimentais de DRC. Sabe-se que a Ang II pode promover a síntese de TGF β e dessa forma atuar na fibrogênese (76, 129). Portanto, o uso de inibidores do SRA poderá suprimir a fibrogênese induzida por Ang II/ TGF β .

1.3.7 Efeito da Ang II no transporte de sódio ao longo do néfron

Considerando a importância da Ang II na injúria tubular renal, a relevância do transporte de íons nos diferentes segmentos do néfron para o balanço hidroeletrolítico no meio interno e a geração de ânion superóxido em segmentos específicos do néfron em resposta a Ang II, é pertinente investigar a expressão proteica dos principais transportadores de sódio na DRC associada à exposição crônica de Ang II.

O sódio (Na⁺) é um íon essencial para o meio interno porque entre inúmeras funções, permite a manutenção do volume do fluido extracelular. A energia para a reabsorção renal de Na⁺ é proveniente da Na⁺/K⁺ ATPase - proteína integral de membrana, localizada na membrana basolateral das células epiteliais, cuja função é criar e manter o gradiente favorável para a entrada de sódio na célula (2). Em síntese, a Na⁺/K⁺ ATPase transporta três íons Na⁺ para fora da célula e dois íons K⁺ para dentro, em consequência da hidrólise de uma molécula de ATP, assim a Na⁺/K⁺ ATPase promove um gradiente químico e elétrico, pois bombeia mais íons positivos

para fora da célula que para dentro, fazendo com que o ambiente intracelular fique mais negativo em relação ao meio extracelular. Por isso, a Na^+/K^+ ATPase é eletrogênica.

Entre os vários transportadores de Na^+ no néfron destaca-se a importância dos trocadores Na^+/H^+ (Isoformas 1 e 3), co-transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) Na^+/Cl^- (NCC) e os canais epiteliais para Na^+ (ENaCs) que serão descritos a seguir e apresentados na **figura 4**.

Trocador Na^+/H^+ isoforma 1 (NHE1): O NHE1 é essencial para a regulação do pH intracelular. O domínio N-terminal, denominado unidade de transporte, é altamente sensível ao amiloride e o domínio C-terminal (ou citoplasmático regulatório) apresenta grande sensibilidade a vários sinais extracelulares, como: fatores de crescimento, hormônios e alterações osmóticas (137, 138). Possui distribuição ubíqua em todas as células de vertebrados, e nas células de epitélios esses transportadores localiza-se, preferencialmente, na membrana basolateral (33, 134). Deste modo, no rim, o NHE1 encontra-se na membrana basolateral de todas as células dos múltiplos segmentos do néfron (12).

Trocador Na^+/H^+ isoforma 3 (NHE3): O NHE3 está presente preferencialmente nas células epiteliais do intestino e rins (23). No rim, o NHE3 é expresso preferencialmente na membrana luminal das células do túbulo proximal e segmento espesso da alça de Henle (13), onde apresenta papel essencial no balanço ácido-base e regulação da pressão arterial (97).

Co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2): O NKCC2 é expresso na membrana apical de células epiteliais da porção espessa ascendente da alça de Henle e em células da mácula densa (7), onde apresenta papel importante na modulação do mecanismo de “*feedback*” tubuloglomerular. É igualmente importante para a reabsorção de Na^+ e Cl^- e, por isso, contribui para a manutenção da pressão arterial (27).

Co-transportador Na^+/Cl^- (NCC) e Canal de Na^+ epitelial sensível à amiloride (ENaC): O NCC é expresso no túbulo convoluto distal (102), enquanto que o ENaC é predominantemente expresso no túbulo conector e ducto coletor cortical (81). Tanto o NCC como o ENaC são proteínas alvos para a ação da aldosterona na regulação da excreção de Na^+ .

Figura 4: Reabsorção renal diária de sódio ao longo do néfron. Adaptada de Vander (2003).

Todos esses transportadores são modulados por fatores hormonais e apresentam alterações funcionais na hipertensão arterial associada à Ang II (117). Entretanto, suas funções na DRC são pouco conhecidas.

1.4 Modelo animal de hipertensão arterial induzida por Ang II.

Vários estudos demonstram que a infusão crônica de Ang II por uma ou duas semanas induz hipertensão arterial, redução nos parâmetros hemodinâmicos renais, aumento na atividade do SRA intrarrenal e injúria no tecido renal (126, 140). No

entanto, recentemente o nosso grupo observou que ratos tratados com Ang II por seis semanas apresentaram hipertensão arterial, remodelamento renovascular associado ao aumento do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário, além de intenso processo inflamatório, glomeruloesclerose, proteinúria e perda de podócitos na urina (26), o que sugere um quadro de DRC decorrente da ação de Ang II. Os efeitos deletérios da Ang II sobre tais parâmetros foram corrigidos por losartan, antagonista do receptor AT1. Porém, no estudo anterior nós não investigamos o efeito da Ang II via receptor AT1 na manifestação de genes associados à DRC e nem na expressão dos transportadores de Na⁺ renais.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II por 42 dias, via receptor AT1, foi capaz de estimular:

- A expressão gênica e/ou proteica para moléculas associadas:
 - Ao estresse oxidativo;
 - Ao estresse de RE;
 - À inflamação;
 - À fibrose renal.
- Regular o manejo de Na⁺ tubular por induzir aumento na expressão de:
 - NHE1;
 - NHE3 total e fosforilado;
 - NKCC2;
 - NCC; e
 - Subunidade β do ENaC (córtex).

8 REFERÊNCIAS*

1. **Abbate M, Zoja C, and Remuzzi G.** How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17: 2974-2984, 2006.
2. **Aires.** *Fisiologia*. 2012.
3. **Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, and Cook JL.** Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274: 26071-26078, 1999.
4. **Allen AM, Zhuo J, and Mendelsohn FA.** Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S23-29, 1999.
5. **Aminzadeh MA, Nicholas SB, Norris KC, and Vaziri ND.** Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28: 2038-2045, 2013.
6. **Aminzadeh MA, Sato T, and Vaziri ND.** Participation of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of spontaneous glomerulosclerosis--role of intra-renal angiotensin system. *Transl Res* 160: 309-318, 2012.
7. **Ares GR, Caceres PS, and Ortiz PA.** Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F1143-1159, 2011.
8. **Bader M.** Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 439-465, 2010.
9. **Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, and Brigelius-Flohe R.** The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 25: 4914-4923, 2005.
10. **Bedard K, Lardy B, and Krause KH.** NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89: 1107-1112, 2007.
11. **Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, and Ron D.** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326-332, 2000.
12. **Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, and Aronson PS.** Immunocytochemical characterization of Na(+)-H+ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am J Physiol* 263: F833-840, 1992.
13. **Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, and Aronson PS.** Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol* 273: F289-299, 1997.
14. **Birn H, and Christensen EI.** Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int* 69: 440-449, 2006.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

15. **Bolívar JJ.** Essential Hypertension: An Approach to Its Etiology and Neurogenic Pathophysiology. *Int J Hypertens* 2013: 547809, 2013.
16. **Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, and Runge MS.** Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 212: 155-169, 2000.
17. **Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, and Lavandero S.** Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 301: 215-290, 2013.
18. **Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL, Hsieh TJ, Guo DF, Hébert MJ, Ingelfinger JR, Filep JG, and Chan JS.** Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 69: 1977-1985, 2006.
19. **Brinkkoetter PT, Holtgrete S, van der Woude FJ, and Yard BA.** Angiotensin II type 1-receptor mediated changes in heparan sulfate proteoglycans in human SV40 transformed podocytes. *J Am Soc Nephrol* 15: 33-40, 2004.
20. **Buckalew VM, Berg RL, Wang SR, Porush JG, Rauch S, and Schulman G.** Prevalence of hypertension in 1,795 subjects with chronic renal disease: the modification of diet in renal disease study baseline cohort. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Am J Kidney Dis* 28: 811-821, 1996.
21. **Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, and Luno J.** Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* S4-9, 2008.
22. **Cai H, Griendling KK, and Harrison DG.** The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24: 471-478, 2003.
23. **Cano A, Miller RT, Alpern RJ, and Preisig PA.** Angiotensin II stimulation of Na-H antiporter activity is cAMP independent in OKP cells. *Am J Physiol* 266: C1603-1608, 1994.
24. **Cardiologia SBd.** 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial.
25. **Carey RM, and Padia SH.** Role of angiotensin AT(2) receptors in natriuresis: Intrarenal mechanisms and therapeutic potential. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40: 527-534, 2013.
26. **Casare FA, Thieme K, Costa-Pessoa JM, Rossoni LV, Couto GK, Fernandes FB, Casarini DE, and Oliveira-Souza M.** Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. *Am J Physiol Renal Physiol* ajprenal.00471.02015, 2016.
27. **Castrop H, and Schießl IM.** Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F991-F1002, 2014.
28. **Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, and Wilcox CS.** Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH

oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R117-124, 2003.

29. **Chan JY, and Kwong M.** Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 1517: 19-26, 2000.

30. **Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, and Ravanan P.** A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8: 213, 2014.

31. **Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, and Kunsch C.** Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1862-1870, 2006.

32. **Cheng YC, Chen CA, Chang JM, and Chen HC.** Albumin overload down-regulates integrin- β 1 through reactive oxygen species-endoplasmic reticulum stress pathway in podocytes. *J Biochem* 158: 101-108, 2015.

33. **Cho JH, Musch MW, Bookstein CM, McSwine RL, Rabenau K, and Chang EB.** Aldosterone stimulates intestinal Na⁺ absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am J Physiol* 274: C586-594, 1998.

34. **Chow BS, Kocan M, Bosnyak S, Sarwar M, Wigg B, Jones ES, Widdop RE, Summers RJ, Bathgate RA, Hewitson TD, and Samuel CS.** Relaxin requires the angiotensin II type 2 receptor to abrogate renal interstitial fibrosis. *Kidney Int* 86: 75-85, 2014.

35. **Cingolani OH, Perez NG, Ennis IL, Alvarez MC, Mosca SM, Schinella GR, Escudero EM, Console G, and Cingolani HE.** In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy. *Pflugers Arch* 462: 733-743, 2011.

36. **Colognato H, Winkelmann DA, and Yurchenco PD.** Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* 145: 619-631, 1999.

37. **Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, and Levey AS.** Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298: 2038-2047, 2007.

38. **Costa-Pessoa JM, Figueiredo CF, Thieme K, and Oliveira-Souza M.** The regulation of NHE1 and NHE3 activity by angiotensin II is mediated by the activation of the angiotensin II type I receptor/phospholipase C/calcium/calmodulin pathway in distal nephron cells. *Eur J Pharmacol* 2013.

39. **Cullinan SB, and Diehl JA.** PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279: 20108-20117, 2004.

40. **Cybulsky AV.** Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 13: 681-696, 2017.

41. **D'Agati VD, Kaskel FJ, and Falk RJ.** Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 365: 2398-2411, 2011.
42. **Datla SR, and Griendling KK.** Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension* 56: 325-330, 2010.
43. **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, and Unger T.** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472, 2000.
44. **Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, Harding HP, and Ron D.** Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 24: 10161-10168, 2004.
45. **Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, and Brenner C.** Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27: 285-299, 2008.
46. **Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, and Knepper MA.** Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol* 171: 227-234, 2001.
47. **El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, Burtin M, Broueilh M, Heidet L, Mollet G, Druilhe A, Antignac C, Knebelmann B, Friedlander G, Bienaimé F, Gallazzini M, and Terzi F.** Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun* 7: 10330, 2016.
48. **Gilmore TD.** The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844, 1999.
49. **Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, and Hsu CY.** Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351: 1296-1305, 2004.
50. **Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, and Abboud HE.** Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F219-229, 2003.
51. **Granger JP, and Schnackenberg CG.** Renal mechanisms of angiotensin II-induced hypertension. *Semin Nephrol* 20: 417-425, 2000.
52. **Hallan SI, Øvrehus MA, Romundstad S, Rifkin D, Langhammer A, Stevens PE, and Ix JH.** Long-term trends in the prevalence of chronic kidney disease and the influence of cardiovascular risk factors in Norway. *Kidney Int* 90: 665-673, 2016.
53. **Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, and Ron D.** Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5: 897-904, 2000.
54. **Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, and Ron D.** An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11: 619-633, 2003.

55. **Harrison-Bernard LM, Zhuo J, Kobori H, Ohishi M, and Navar LG.** Intrarenal AT(1) receptor and ACE binding in ANG II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F19-25, 2002.
56. **Helms MN, Jain L, Self JL, and Eaton DC.** Redox regulation of epithelial sodium channels examined in alveolar type 1 and 2 cells patch-clamped in lung slice tissue. *J Biol Chem* 283: 22875-22883, 2008.
57. **Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, and Yamamoto M.** Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13: 76-86, 1999.
58. **Jernigan NL, Speed J, LaMarca B, Granger JP, and Drummond HA.** Angiotensin II regulation of renal vascular ENaC proteins. *Am J Hypertens* 22: 593-597, 2009.
59. **Jia Z, Zhuang Y, Hu C, Zhang X, Ding G, Zhang Y, Rohatgi R, Hua H, Huang S, He JC, and Zhang A.** Albuminuria enhances NHE3 and NCC via stimulation of mitochondrial oxidative stress/angiotensin II axis. *Oncotarget* 7: 47134-47144, 2016.
60. **Jin Y, Wang Y, Wang ZJ, Lin DH, and Wang WH.** Inhibition of angiotensin type 1 receptor impairs renal ability of K conservation in response to K restriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1179-1184, 2009.
61. **Juncos R, and Garvin JL.** Superoxide enhances Na-K-2Cl cotransporter activity in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F982-987, 2005.
62. **Juncos R, Hong NJ, and Garvin JL.** Differential effects of superoxide on luminal and basolateral Na⁺/H⁺ exchange in the thick ascending limb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R79-83, 2006.
63. **Jöhren O, Dendorfer A, and Dominiak P.** Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res* 62: 460-467, 2004.
64. **Kaufman RJ.** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-1233, 1999.
65. **Kelly DJ, Cox AJ, Gow RM, Zhang Y, Kemp BE, and Gilbert RE.** Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension* 44: 195-202, 2004.
66. **Kim HJ, Sato T, Rodriguez-Iturbe B, and Vaziri ND.** Role of intrarenal angiotensin system activation, oxidative stress, inflammation, and impaired nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 activity in the progression of focal glomerulosclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 337: 583-590, 2011.
67. **Kim HJ, and Vaziri ND.** Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F662-671, 2010.

68. **Kim JO, Kwon EJ, Song DW, Lee JS, and Kim DH.** miR-185 inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by targeting Na⁺/H⁺ exchanger-1 in the heart. In: *BMB Rep. Korea (South)*: 2016, p. 208-213.
69. **Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Wada T, Ishimura Y, and Chatani F.** Contribution of renal angiotensin II type I receptor to gene expressions in hypertension-induced renal injury. *Kidney Int* 46: 1346-1358, 1994.
70. **Kim SW, Wang W, Kwon TH, Knepper MA, Frøkiaer J, and Nielsen S.** Increased expression of ENaC subunits and increased apical targeting of AQP2 in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F957-968, 2005.
71. **Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, and Yamamoto M.** Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol* 26: 221-229, 2006.
72. **Kobori H, Nangaku M, Navar LG, and Nishiyama A.** The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59: 251-287, 2007.
73. **Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, and Pollock DM.** Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. In: *Physiol Rev. United States*: 2011, p. 1-77.
74. **Koromilas AE.** Roles of the translation initiation factor eIF2 α serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. *Biochim Biophys Acta* 1849: 871-880, 2015.
75. **Lan HY, and Chung AC.** TGF- β /Smad signaling in kidney disease. *Semin Nephrol* 32: 236-243, 2012.
76. **Leask A.** TGF β , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 74: 207-212, 2007.
77. **Lefkowitz RJ, and Shenoy SK.** Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science* 308: 512-517, 2005.
78. **Levy BI.** How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens* 18: 134S-141S, 2005.
79. **Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, and Kong AN.** Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 76: 1485-1489, 2008.
80. **Li Y, Li XH, and Yuan H.** Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther* 2: 56-62, 2012.
81. **Loffing J, Loffing-Cueni D, Macher A, Hebert SC, Olson B, Knepper MA, Rossier BC, and Kaissling B.** Localization of epithelial sodium channel and aquaporin-2 in rabbit kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F530-539, 2000.

82. **Lohmeier TE, and Hildebrandt DA.** Renal nerves promote sodium excretion in angiotensin-induced hypertension. *Hypertension* 31: 429-434, 1998.
83. **Ma Y, and Hendershot LM.** ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 28: 51-65, 2004.
84. **Magyar CE, Zhang Y, Holstein-Rathlou NH, and McDonough AA.** Proximal tubule Na transporter responses are the same during acute and chronic hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F358-369, 2000.
85. **Malhotra JD, and Kaufman RJ.** Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 9: 2277-2293, 2007.
86. **McDonough AA.** Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R851-861, 2010.
87. **McDonough AA, and Nguyen MT.** Maintaining Balance Under Pressure: Integrated Regulation of Renal Transporters During Hypertension. *Hypertension* 66: 450-455, 2015.
88. **Metcalf W.** How does early chronic kidney disease progress? A background paper prepared for the UK Consensus Conference on early chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 9: ix26-30, 2007.
89. **Miura SI, and Saku K.** Recent progress in the treatment of cardiovascular disease using olmesartan. *Clin Exp Hypertens* 2013.
90. **Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griendling K, and Munzel T.** Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90: E58-65, 2002.
91. **Morigi M, Macconi D, Zoja C, Donadelli R, Buelli S, Zanchi C, Ghilardi M, and Remuzzi G.** Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol* 13: 1179-1189, 2002.
92. **Nath KA, and Norby SM.** Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 109: 665-678, 2000.
93. **Nguyen MT, Lee DH, Delpire E, and McDonough AA.** Differential regulation of Na⁺ transporters along nephron during ANG II-dependent hypertension: distal stimulation counteracted by proximal inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F510-519, 2013.
94. **Nguyen T, Nioi P, and Pickett CB.** The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284: 13291-13295, 2009.
95. **Nishitoh H.** CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem* 151: 217-219, 2012.

96. **Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, and Abe Y.** Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension* 37: 77-83, 2001.
97. **Noonan WT, Woo AL, Nieman ML, Prasad V, Schultheis PJ, Shull GE, and Lorenz JN.** Blood pressure maintenance in NHE3-deficient mice with transgenic expression of NHE3 in small intestine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R685-691, 2005.
98. **Ortiz RM, Graciano ML, Seth D, Awayda MS, and Navar LG.** Aldosterone receptor antagonism exacerbates intrarenal angiotensin II augmentation in ANG II-dependent hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F139-147, 2007.
99. **Pahl HL, and Baeuerle PA.** Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett* 392: 129-136, 1996.
100. **Panico C, Luo Z, Damiano S, Artigiano F, Gill P, and Welch WJ.** Renal proximal tubular reabsorption is reduced in adult spontaneously hypertensive rats: roles of superoxide and Na⁺/H⁺ exchanger 3. *Hypertension* 54: 1291-1297, 2009.
101. **Perico N, Codreanu I, Schieppati A, and Remuzzi G.** Pathophysiology of disease progression in proteinuric nephropathies. *Kidney Int Suppl* S79-82, 2005.
102. **Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JW, Lee WS, Brown D, Poch E, Gullans SR, and Hebert SC.** Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1 in the rat kidney. *Kidney Int* 50: 174-183, 1996.
103. **Pratt RE, and Dzau VJ.** Pharmacological strategies to prevent restenosis: lessons learned from blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation* 93: 848-852, 1996.
104. **Rajesh K, Krishnamoorthy J, Kazimierczak U, Tenkerian C, Papadakis AI, Wang S, Huang S, and Koromilas AE.** Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α at serine 51 determines the cell fate decisions of Akt in response to oxidative stress. *Cell Death Dis* 6: e1591, 2015.
105. **Remuzzi G, Perico N, Macia M, and Ruggenenti P.** The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* S57-65, 2005.
106. **Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, and Vaziri ND.** Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int* 83: 1029-1041, 2013.
107. **Ruiz-Ortega M, Esteban V, Ruprez M, Snchez-Lpez E, Rodrguez-Vita J, Carvajal G, and Egido J.** Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15: 159-166, 2006.
108. **Rster C, and Wolf G.** Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 2985-2991, 2006.
109. **Sachse A, and Wolf G.** Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 18: 2439-2446, 2007.

110. **Sandberg MB, Riquier AD, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA, and Maunsbach AB.** ANG II provokes acute trafficking of distal tubule Na⁺-Cl⁻ cotransporter to apical membrane. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F662-669, 2007.
111. **Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, and Ortiz A.** NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 21: 1254-1262, 2010.
112. **Sayeski PP, Ali MS, Semeniuk DJ, Doan TN, and Bernstein KE.** Angiotensin II signal transduction pathways. *Regul Pept* 78: 19-29, 1998.
113. **Schelling JR, and Abu Jawdeh BG.** Regulation of cell survival by Na⁺/H⁺ exchanger-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F625-632, 2008.
114. **Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, and Kaufman RJ.** Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7: 1165-1176, 2001.
115. **Schild L.** The epithelial sodium channel and the control of sodium balance. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1159-1165, 2010.
116. **Schlondorff DO.** Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int* 74: 860-866, 2008.
117. **Schmidt C, Höcherl K, Schweda F, Kurtz A, and Bucher M.** Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol* 18: 1072-1083, 2007.
118. **Schmitz U, and Berk BC.** Angiotensin II signal transduction: Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Trends Endocrinol Metab* 8: 261-266, 1997.
119. **Schröder M, and Kaufman RJ.** The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74: 739-789, 2005.
120. **Schulz A, Jankowski J, Zidek W, and Jankowski V.** Absolute quantification of endogenous angiotensin II levels in human plasma using ESI-LC-MS/MS. *Clin Proteomics* 11: 37, 2014.
121. **Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, and Hébert RL.** NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *J Am Soc Nephrol* 24: 1512-1518, 2013.
122. **Sharma K, Cook A, Smith M, Valancius C, and Inscho EW.** TGF-beta impairs renal autoregulation via generation of ROS. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1069-1077, 2005.
123. **Silva GB, Ortiz PA, Hong NJ, and Garvin JL.** Superoxide stimulates NaCl absorption in the thick ascending limb via activation of protein kinase C. *Hypertension* 48: 467-472, 2006.
124. **Siragy HM, and Carey RM.** The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100: 264-269, 1997.

125. **Snyder PM**. Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology* 146: 5079-5085, 2005.
126. **Stevenson KM, Edgley AJ, Bergström G, Worthy K, Kett MM, and Anderson WP**. Angiotensin II infused intrarenally causes preglomerular vascular changes and hypertension. *Hypertension* 36: 839-844, 2000.
127. **Sun P, Yue P, and Wang WH**. Angiotensin II stimulates epithelial sodium channels in the cortical collecting duct of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F679-687, 2012.
128. **Tesauro M, Mascali A, Franzese O, Cipriani S, Cardillo C, and Di Daniele N**. Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. *Int J Hypertens* 2012: 943605, 2012.
129. **Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, and Thomas PE**. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278: 12384-12389, 2003.
130. **Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, and Martins CT**. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol* 41: 208-214, 2019.
131. **Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, and Franzoso G**. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol* 22: 557-566, 2012.
132. **Touyz RM, and Berry C**. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35: 1001-1015, 2002.
133. **Touyz RM, and Schiffrin EL**. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122: 339-352, 2004.
134. **Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, and Donowitz M**. Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem* 267: 9340-9346, 1992.
135. **van Delft MF, and Huang DC**. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 16: 203-213, 2006.
136. **Venugopal R, and Jaiswal AK**. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14960-14965, 1996.
137. **Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, and Shigekawa M**. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *J Biol Chem* 269: 13710-13715, 1994.
138. **Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, and Pouyssegur J**. The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2424-2428, 1992.

139. **Wallner EI, Wada J, Tramonti G, Lin S, and Kanwar YS.** Status of glucose transporters in the mammalian kidney and renal development. *Ren Fail* 23: 301-310, 2001.
140. **Wang CT, Chin SY, and Navar LG.** Impairment of pressure-natriuresis and renal autoregulation in ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F319-325, 2000.
141. **Wassmann S, Wassmann K, and Nickenig G.** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44: 381-386, 2004.
142. **Welch WJ.** Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 52: 51-56, 2008.
143. **Wolf G.** Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie* 19: 451-456, 1998.
144. **Wolf G, Butzmann U, and Wenzel UO.** The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93: P3-13, 2003.
145. **Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi S, Morito N, Nakano T, Ojima M, Shimohata H, Itoh K, Takahashi S, and Yamamoto M.** Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells* 13: 1159-1170, 2008.
146. **Yoshioka K, Tohda M, Takemura T, Akano N, Matsubara K, Ooshima A, and Maki S.** Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen. *J Pathol* 162: 141-148, 1990.
147. **Zhang G, Moorhead PJ, and el Nahas AM.** Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 3: 308-318, 1995.
148. **Zhang K, and Kaufman RJ.** From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454: 455-462, 2008.
149. **Zhao D, Seth DM, and Navar LG.** Enhanced distal nephron sodium reabsorption in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension* 54: 120-126, 2009.
150. **Zoja C, Benigni A, and Remuzzi G.** The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 29 Suppl 1: i19-i24, 2014.