LUÍS CELSO MATAVELLI

**A inibição da renina e a estimulação do receptor AT2
reduzem a inflamação e o estresse oxidativo renal em
um modelo experimental de nefropatia diabética**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.**

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

SÃO PAULO

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Matavelli, Luís Celso

A inibição da renina e a estimulação do receptor AT2 reduzem a inflamação e o estresse oxidativo renal em um modelo experimental de nefropatia diabética / Luís Celso Matavelli. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Rim 3.Sistema renina angiotensina
4.Albuminúria 5.Mediadores da inflamação 6.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-115/15

DEDICATÓRIA

A minha querida lara, amor e amiga em tantos momentos de nossas vidas, por mais uma vez ter estado junto nessa nova caminhada com seu apoio e incentivo para a realização e conclusão deste projeto.

Ao meu adorável Nicolás, pelo seu sorriso e alegrias, fonte de inspiração na superação dos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Ivo e Alaíde, presentes em todos os momentos de minha vida, por terem sempre estimulado e promovido a melhor educação de seus filhos, com seu amor, apoio e união.

Aos meus irmãos e toda a minha família pelo apoio e pelos momentos alegres vividos juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz, meu orientador neste projeto de doutoramento, por todo o seu apoio e suporte disponibilizados, incondicionalmente, desde o primeiro momento.

Ao Dr. Hemy M. Siragy, por ter possibilitado a realização deste projeto de pesquisa no seu laboratório de pesquisa experimental no Departamento de Endocrinologia da Universidade da Virginia.

Ao Dr. Jiqian Huang, amigo e grande colaborador neste projeto de pesquisa que ofereceu seus conhecimentos técnicos e científicos na procura das melhores soluções para as adversidades surgidas no decorrer deste estudo.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Burdmann, por ter me recebido como candidato a aluno de pós-graduação na Disciplina de Nefrologia da FMUSP e ter conduzido de modo muito eficiente os processos iniciais de aceitação deste projeto de doutorado.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiopatologia Renal LIM-16 da FMUSP pela amizade e pelo importante suporte e auxílio oferecidos para o processamento e conclusão dos dados deste projeto.

A todos que me apoiaram e confiaram na conclusão desse estudo, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Patogênese da nefropatia diabética.....	2
1.1.1 Podócitos e nefropatia diabética.....	4
1.1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	5
1.1.3 Inflamação renal.....	8
1.1.4 Estresse oxidativo.....	12
1.1.5 Efeitos da aldosterona sobre a função renal no diabetes.....	13
1.2 Inibição da renina: mecanismos de ação e efeitos farmacológicos do alisquireno. 15	
1.2.1 Efeitos da inibição da renina com alisquireno sobre a nefropatia diabética.....	16
1.3 Receptor AT2 da Ang II: mecanismos sinalizadores e atividades fisiológicas.....	18
1.3.1 Expressão gênica e regulação da expressão tecidual do receptor AT2.....	19
1.3.2 Condições patológicas associadas com a atividade reduzida do receptor AT2 da Ang II.....	20
1.3.3 Peptídeos associados com a estimulação direta do receptor AT2.....	22
1.3.4 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre o sistema cardiovascular.....	23
1.3.5 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre o sistema renal.....	24
1.3.6 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre a pressão arterial....	25
1.3.7 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre o sistema nervoso central.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. PROTOCOLO 1.....	31

3.1.1	Grupos experimentais de ratos normoglicêmicos e diabéticos.....	31
3.1.2	Determinação do peso corpóreo, glicemia de jejum, volume urinário e pressão arterial (PA) sistólica.....	33
3.1.3	Coleta de urina de 24 horas e análises das concentrações urinárias de albumina, creatinina e aldosterona.....	33
3.1.4	Coleta do fluido intersticial renal (FIR) <i>in vivo</i> através da técnica de microdiálise renal.....	34
3.1.5	Análises do FIR de Ang II, TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano.....	36
3.1.6	Análise imunohistoquímica renal de NF- κ B.....	38
3.1.7	Análise morfológica renal com ácido periódico de Schiff (PAS).....	38
3.1.8	Análise imunohistoquímica renal de fibronectina.....	39
3.1.9	Determinação das expressões do mRNA renal de TNF- α , IL-6, TGF- β 1 e NF- κ B.....	40
3.1.10	Análise da expressão protéica renal de TGF- β 1 : <i>Western Blotting</i>	41
3.2.	PROTOCOLO 2.....	43
3.2.1	Grupos experimentais de ratos normoglicêmicos e diabéticos.....	43
3.2.2	Determinação do peso corpóreo, glicemia de jejum, urina de 24 horas e PA sistólica.....	44
3.2.3	Coleta do FIR <i>in vivo</i> através da técnica de microdiálise renal.....	44
3.2.4	Análises dos níveis do FIR de TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano.....	45
3.2.5	Determinação das expressões do mRNA renal de TNF- α , IL-6 e do receptor AT2.....	45
3.2.6	Análise da expressão protéica do receptor AT2: <i>Western Blotting</i>	46
3.3	Análise estatística.....	46
4.	RESULTADOS.....	47
4.1	PROTOCOLO 1.....	48
4.2	PROTOCOLO 2.....	64
5.	DISCUSSÃO.....	71
6.	CONCLUSÕES.....	80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8.	PUBLICAÇÕES.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	6
Figura 2: Atividades fisiopatológicas relacionadas com a estimulação do receptor AT2.	22
Figura 3: Concentrações de Ang II no fluido intersticial renal (FIR).....	50
Figura 4: Expressões renais do mRNA e concentrações do fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) e interleucina (IL)-6 no fluido intersticial renal (FIR).....	52
Figura 5: Expressões renais de mRNA e proteína do fator de crescimento transformacional-beta1 (TGF- β 1).....	54
Figura 6 Expressões renais do mRNA de NF-kB.....	55
Figura 7: Representação imunohistoquímica da deposição glomerular renal de NF-kB..	56
Figura 8: Concentrações renais de óxido nítrico, cGMP e 8-isoprostano no fluido intersticial renal (FIR).....	58
Figura 9: Imagens representativas da deposição glomerular renal do Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	59
Figura 10: Imagens representativas da deposição tubular renal de fibronectina.....	60
Figura 11: Excreção urinária de aldosterona.....	62
Figura 12: Relação da excreção urinária de albumina sobre a creatinina: protocolo 1.....	63
Figura 13: Expressão renal do mRNA e níveis do fluido intersticial renal (FIR) do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina (IL)-6 após estimulação do receptor AT2 com C21.....	66
Figura 14: Níveis do fluido intersticial renal (FIR) de óxido nítrico (NO), cGMP e 8-isoprostano após estimulação do receptor AT2 com C21.....	68
Figura 15: Expressões renais do mRNA e proteína do receptor AT2 após estimulação do receptor AT2 com C21.....	69
Figura 16: Relação da excreção urinária de albumina sobre creatinina após estimulação do receptor AT2 com C21.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos animais no período basal e no final do estudo no protocolo 1.....	49
Tabela 2: Características dos animais no período basal e no final do estudo no protocolo 2.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Alisq	Alisquireno
ALTITUDE	<i>The Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardiorenal Endpoints</i>
Amlo	Amlodipina
Ang	Angiotensina
ANOVA	Análise de Variância
AT1	Tipo 1 da angiotensina II
AT2	Tipo 2 da angiotensina II
AVOID	<i>Aliskiren in the Evaluation of Proteinuria in Diabetes</i>
°C	Graus Centígrados
C21	Composto 21
CCL2	Quimiocina CC Ligante 2
CCL5	Quimiocina CC Ligante 5
cGMP	3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
DM	Diabetes
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dr.	Doutor
DRC	Doença Renal Crônica
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EP	Erro padrão

ERK	Quinases reguladoras dos sinais extracelulares
EUA	Estados Unidos da América
FIR	Fluido Intersticial renal
fmol	Femtomol
FSR	Fluxo sanguíneo renal
g	Gramas
Glic	Glicemia
HCTZ	Hidroclorotiazida
ICAM 1	Moléculas celulares de adesão intercelular-1
IDNT	<i>Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial</i>
IL	Interleucina
IMRT	Índice de Massa Renal Total
IP	Intraperitoneal
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
MAPK	Proteína quinase mitógeno ativada
μL	Microlitro
μmol	Micromole
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPK-1	Proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógeno

mRNA	Mensageiro do ácido ribonucléico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappaB
ng	Nanograma
NG	Normoglicêmico
NO	Óxido Nítrico
PA	Pressão Arterial
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PE	Polietileno
pg	Picograma
Prof.	Professor
RAC	Relação da excreção urinária de albumina sobre creatinina
RENAAL	<i>Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
STZ	Streptozotocina
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF-β1	Fator de crescimento transformacional-beta 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
V	Veículo
VCAM1	Moléculas de adesão celular vascular-1
Vol Ur	Volume Urinário
vs.	Versus

RESUMO

MATAVELLI LC. A inibição da renina e a estimulação do receptor AT2 reduzem a inflamação e o estresse oxidativo renal em um modelo experimental de nefropatia diabética [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015.

Introdução. A nefropatia diabética é uma complicação comum do diabetes e uma das causas mais prevalentes da doença renal crônica. A sua patogênese é multifatorial, incluindo o aumento de atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o desenvolvimento de inflamação e estresse oxidativo renais. **Objetivos.** Investigar os efeitos da inibição da renina pelo alisquireno e da estimulação direta do receptor AT2 pelo Composto 21 (C21) sobre a inflamação e o estresse oxidativo renais e sobre o desenvolvimento da albuminúria no diabetes. **Métodos.** Dois protocolos experimentais foram realizados em ratos diabéticos induzidos por streptozotocina. No protocolo 1, ratos diabéticos foram tratados por 6 semanas pelo inibidor da renina plasmática alisquireno ou diurético hidroclorotiazida ou inibidor dos canais de cálcio amlodipina, isolados ou combinados. No início e no final do estudo, a pressão arterial de cada animal foi medida e a urina de 24 horas coletada para a análise da albuminúria e aldosterona. No final, o fluido intersticial renal (FIR) foi coletado para a análise dos níveis renais de Ang II, TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano, e amostras do tecido renal foram utilizadas para as análises de TGF- β 1 e NF- κ B e para a avaliação da deposição renal do ácido periódico de Schiff (PAS) e fibronectina. No protocolo 2, ratos diabéticos foram tratados por 4 semanas pelo agonista do receptor AT2 C21. As medidas da pressão arterial e a coleta de urina de 24 horas, utilizada para a análise da albuminúria, foram realizadas no início e no final do estudo. O FIR de cada animal foi coletado no final do estudo e utilizado na análise das concentrações renais de TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano. Amostras de tecido renal foram utilizadas na análise da expressão renal do receptor AT2. **Resultados.** No final do protocolo 1, alisquireno reduziu as concentrações renais de Ang II, aldosterona urinária e dos marcadores de inflamação renal TNF- α , IL-6, TGF- β 1 e NF- κ B, melhorou os níveis renais de NO e cGMP e reduziu os de 8-isoprostano. Alisquireno também reduziu a deposição renal dos marcadores fibróticos PAS e fibronectina, acompanhado de redução da albuminúria. Estas variáveis não foram alteradas por HCTZ. Amlodipina reduziu os níveis de aldosterona e de alguns marcadores inflamatórios renais e aumentou os níveis renais de NO e cGMP, mas não alterou a albuminúria. A combinação de alisquireno e amlodipina, comparado com alisquireno isolado, potencializou a redução da albuminúria. No protocolo 2, C21 reduziu os marcadores inflamatórios renais TNF- α e IL-6, aumentou os níveis renais de NO e cGMP e reduziu os de 8-isoprostano e a albuminúria. A expressão renal do receptor AT2 foi mais elevada nos ratos diabéticos, mas não foi influenciada pelo tratamento com C21. Nos dois protocolos de estudo, os resultados foram independentes da pressão arterial. **Conclusões.** A modulação do SRAA no diabetes, com alisquireno ou C21, atenua a lesão renal através da redução da inflamação e do estresse oxidativo renal. Nossos dados sugerem que a inibição da renina e a estimulação do receptor AT2 têm um efeito terapêutico potencial na prevenção da nefropatia diabética.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Rim; Sistema renina-angiotensina; Albuminúria; Mediadores da inflamação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

MATAVELLI LC. Renin inhibition and AT2 receptor stimulation reduce renal inflammation and oxidative stress in an experimental model of diabetic nephropathy [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Introduction. Diabetic nephropathy is a common complication of diabetes and one of the most prevalent causes leading to chronic kidney disease. The pathogenesis of diabetic nephropathy is very complex and multifactorial, including the increased activity of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and the development of renal inflammation and oxidative stress.

Objectives. To investigate the effects of renin inhibition with alisquiren and the direct stimulation of AT2 receptor with C21 on renal inflammation and oxidative stress and to development of albuminuria in diabetes.

Methods. Two experimental protocols were performed in streptozotocin-induced diabetic rats. In protocol 1, diabetic rats were treated for 6 weeks with the renin inhibitor alisquiren or the diuretic hydrochlorotiazide or the the calcium channel blocker amlodipine alone or combined. At the beginning and end of study, blood pressure of each animal was measured and the 24-hour urine was collected for albuminuria and aldosterone analysis. At the end, the renal interstitial fluid (RIF) was collected for analysis of Ang II, TNF- α , IL-6, NO, cGMP, and 8-isoprostane, and renal samples were used for TGF- β e NF- κ B analysis, and for evaluation of the renal deposition of periodic acid Schiff (PAS) and fibronectin. In protocol 2, diabetic rats were treated for 4 weeks with the AT2 receptor agonist Compound 21 (C21). Blood pressure was measured and the 24-hour urine was collected at the beginning and end of study. The RIF of each animal was collected at the end of study for analysis of TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostane. Kidney samples were used for AT2 receptor expression analysis. **Results.** At the end of protocol 1, alisquiren reduced the renal levels of Ang II, urinary aldosterone, and the renal inflammatory markers TNF- α , IL-6, TGF- β e NF- κ B, improved the renal levels of NO and cGMP and reduced 8-isoprostane in diabetic rats. Alisquiren also reduced the renal deposition of the fibrotic markers PAS e fibronectin, accompanied by reduction of albuminuria. These variables were not affected by HCTZ treatment. Amlodipine reduced urinary aldosterone and certain renal inflammatory markers, and improved renal levels of NO and cGMP but did not affect albuminuria. The combination of alisquiren and amlopidine, compared with alisquiren alone, potentiated the albuminuria reduction. In protocol 2, C21 reduced the renal inflammatory markers TNF- α and IL-6, increased the renal levels of NO and cGMP and reduced 8-isoprostane and albuminuria in diabetic rats. The renal AT2 receptor expression was increased in diabetic rats but was not affected by C21 treatment. In these study protocols, our findings were independent of blood pressure. **Conclusions.** Modulation of the RAAS in diabetes, with alisquiren or C21, attenuates the kidney injury trough the reduction of renal inflammation and oxidative stress. Our data suggest that renin inhibition and AT2 receptor stimulation could have potential therapeutic effects in the prevention of diabetic nephropathy.

Key-words: Diabetes mellitus; Kidney; Renin-angiotensin system; Albuminuria; Inflammation mediators; Oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes apresenta uma prevalência crescente em várias partes do mundo e se tornou uma das causas mais frequentes para a ocorrência da Doença Renal Crônica (DRC). Diagnóstico e intervenção precoces são críticos para prevenir a evolução da doença renal na maior parte dos pacientes com diabetes tipo 1 ou diabetes tipo 2. A nefropatia diabética é a principal causa de DRC nos Estados Unidos e Europa, correspondendo a aproximadamente 45% dos casos de DRC dialítica nestas regiões (1). No Brasil, segundo dados apurados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, o diabetes é a segunda maior causa de DRC dialítica, com cerca de 30% dos casos, perdendo apenas para a hipertensão arterial (2). No entanto, apesar desta prevalência elevada, dados recentes nos Estados Unidos mostraram que a incidência de novos pacientes com DRC devido ao diabetes declinou pela primeira vez naquele país em 2011 (3).

A nefropatia diabética é caracterizada pela presença de albuminúria persistente, geralmente maior do que 300 mg em 24 horas, e declínio persistente da taxa de filtração glomerular (TFG). Muito frequentemente, esta disfunção renal é acompanhada por elevação da pressão arterial e aumento na incidência de doenças cardiovasculares fatais e não fatais. Estas manifestações clínicas podem ser precedidas pela microalbuminúria, representada pela excreção urinária de albumina entre 30 mg e 300 mg no período de 24 horas. Microalbuminúria é considerada a manifestação clínica mais precoce da nefropatia diabética e um forte preditor para a progressão da doença. Sua análise tem sido amplamente utilizada na prática clínica como um marcador do comprometimento da função renal no diabetes (4).

1. Patogênese da nefropatia diabética.

Existem várias fases distintas dentro do desenvolvimento da nefropatia diabética. Em geral, alterações funcionais de hiperfiltração e hiperperusão glomerular ocorrem antes de qualquer manifestação clínica. Em seguida, alterações histopatológicas renais podem se apresentar na forma de espessamento da membrana basal glomerular, diminuição do número de podócitos, hipertrofia glomerular, expansão mesangial, hialinose glomerular e arteriolar e formação dos nódulos de Kimmelstiel-Wilson (5). Em muitos pacientes diabéticos, especialmente aqueles com diabetes tipo 2 e pobre controle glicêmico e pressórico, a microalbuminúria pode se manifestar precocemente e persistir durante anos como única alteração clínica renal. Eventualmente, esta alteração inicial pode evoluir para macroalbuminúria e redução progressiva da função renal (6).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da nefropatia diabética são complexos e multifatoriais. Eles incluem a hiperglicemia, hipertensão e hiperfiltração glomerular, hipertensão arterial sistêmica, aumento de atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), maior formação renal de moléculas inflamatórias, aumento da produção renal das espécies reativas de oxigênio e da deposição renal dos produtos finais de glicação avançada. Estas alterações hemodinâmicas e metabólicas renais desencadeiam uma série de mecanismos moleculares e celulares que são determinantes para um aumento na produção renal de várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-18, fator de crescimento transformacional-beta 1 (TGF- β 1) e o fator de transcrição nuclear-kappaB (NF- κ B). O aumento da concentração destas moléculas no rim diabético determina um estímulo inflamatório baixo, mas persistente e contínuo, favorecendo o desenvolvimento e a progressão da nefropatia diabética (6-7). Além

disso, a presença de hipertensão arterial sistêmica e o seu controle inadequado, condições bastante comuns no paciente diabético, estão associados com um pior prognóstico renal no diabetes (6).

1.1.1 Podócitos e nefropatia diabética.

Além dos fatores acima citados, os podócitos também desempenham um papel relevante na patogênese da nefropatia diabética. Podócitos são células epiteliais da camada visceral do glomérulo renal que recobrem totalmente a superfície externa da membrana basal glomerular através da extensão de seus processos celulares ou pés dos podócitos. Estas células são importantes componentes da barreira de filtração glomerular. Vários estudos realizados em animais e humanos com nefropatia diabética demonstraram uma diminuição na densidade podocitária e uma perda de função ou alargamento da fenda diafragmática, que corresponde à área de junção entre duas células podocitárias. Estas alterações estão associadas com uma menor capacidade funcional da barreira de filtração glomerular (8-9). A permeabilidade da barreira glomerular é mantida por três camadas: a camada externa, composta pelos podócitos, que recobre totalmente a camada média ou membrana basal glomerular, que se alinha com a camada interna ou endotélio fenestrado.

Uma função essencial dos podócitos na barreira capilar glomerular é prevenir o escape das proteínas plasmáticas para a urina. No diabetes, alterações nos componentes desta barreira, podem favorecer a perda urinária de proteínas. Ainda mais, parte destas proteínas pode ser reabsorvida pelas células dos túbulos proximais ou ser depositada nos podócitos,

agindo então como um componente tóxico para estas células e promovendo estímulos adicionais para a produção de fatores de crescimento e de mediadores inflamatórios (10).

A presença de podocitopenia em pacientes diabéticos está diretamente relacionada com a progressão da doença renal e inversamente relacionada com o controle da hipertensão (11). Além das alterações estruturais dos podócitos, vários fatores metabólicos e endócrinos também podem afetar a função destas células, como os componentes do SRAA, insulina, adiponectina, hormônio do crescimento e vitamina D (12). A descoberta de mecanismos capazes de modular as alterações podocitárias observadas no diabetes tem sido objeto de intensa investigação recente, considerando-se que a manutenção da capacidade funcional dos podócitos poderia gerar enorme contribuição para o melhor controle da nefropatia diabética.

1.1.2 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

As atividades do SRAA estão relacionadas com o adequado controle fisiológico cardiovascular e renal, com efeitos diretos sobre a regulação da pressão arterial sistêmica, hemodinâmica renal, filtração glomerular e excreção tubular renal de sódio. Na descrição da cascata clássica do SRAA, seu processo inicial ocorre pela conversão do angiotensinogênio em angiotensina (Ang) I pela ação da enzima renina, seguido pela conversão da Ang I em Ang II pela enzima conversora da angiotensina (ECA). O octapeptídeo Ang II é o componente efetor mais poderoso do SRAA que atua diretamente na ativação do receptor tipo 1 da Ang II (AT1) e do receptor tipo 2 da Ang II (AT2) e também estimula a produção de aldosterona pelas células da zona glomerulosa do córtex adrenal.

Nos últimos anos, a via clássica do SRAA foi expandida com a descoberta de novos

componentes associados com este sistema. Além do receptor AT2, descrito inicialmente no final dos anos 1980 (13), outros peptídeos bioativos e receptores com atuação direta sobre o SRAA foram recentemente descritos. Estes novos elementos incluem os receptores Mas e da (pró)renina, a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), e os peptídeos Ang (1-9), Ang (1-7), Ang III, Ang IV, Ang A e alamandina. A introdução destes novos componentes proporcionou uma abordagem diferente do SRAA, considerando que a ativação de algumas destas moléculas pode proporcionar efeitos benéficos para diferentes sistemas do organismo. A importância do SRAA para o adequado funcionamento da função renal é reforçada pelo fato de que todos os seus componentes estão presentes nos rins, compreendendo o SRAA intra-renal (14-15).

Figura 1. Esquema representativo do sistema renina-angiotensina-aldosterona.

A atividade do SRAA está aumentada no diabetes. O aumento de sua atividade é considerado uma das principais alterações fisiopatológicas que contribuem para o desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética (14). A maior parte destas alterações é mediada pela ativação do receptor AT1 pela Ang II e incluem a indução de hiperplasia ou hipertrofia celular, ativação das células mesangiais e fibroblastos intersticiais com consequente aumento da expressão e síntese das proteínas da matriz extracelular, e maior estímulo para a formação de citocinas pró-inflamatórias (16). Níveis aumentados de Ang II no diabetes favorecem uma menor capacidade protetora da barreira glomerular por induzirem um aumento da pressão capilar intraglomerular e um rearranjo do citoesqueleto podocitário e dos componentes da fenda diafragmática (8).

As primeiras evidências de que o SRAA apresentava um papel relevante na patogênese da nefropatia diabética surgiram na metade dos anos 1980. Inicialmente, um estudo experimental realizado em ratos com nefropatia diabética induzida por streptozotocina (STZ) demonstrou que o uso crônico do inibidor da ECA enalapril diminuiu a hipertensão capilar glomerular, melhorou as alterações estruturais glomerulares e reduziu a proteinúria (17). Estudos experimentais subsequentes mostraram resultados similares sugerindo que o SRAA poderia ser um fator essencial no desenvolvimento da lesão renal diabética (18). Os resultados destes estudos motivaram, alguns anos mais tarde, a realização de um grande estudo clínico com pacientes diabéticos. No início dos anos 1990, os resultados do *The Collaborative Study Group* demonstraram claramente que o inibidor da ECA captopril, comparado com placebo, melhorou significativamente a função renal de pacientes diabéticos insulino-dependentes após um período de três anos (19). Oito mais tarde, dois estudos clínicos distintos também

demonstraram efeitos benéficos dos antagonistas do receptor da Ang II losartan e irbesartan sobre a doença renal diabética (20-21). No estudo RENAAL, losartan melhorou a função renal e reduziu a proteinúria em pacientes com diabetes tipo 2 e nefropatia após 3,4 anos (20). No estudo IDNT o tratamento com irbesartan por dois anos reduziu a incidência de nefropatia diabética e a excreção urinária de albumina em pacientes com diabetes tipo 2 e microalbuminúria (21). Estes resultados foram independentes dos efeitos de losartan ou irbesartan sobre a pressão arterial sistêmica. Desta forma, amparado nos resultados acima descritos, o bloqueio farmacológico do SRAA tem sido amplamente utilizado na prática clínica há vários anos com o objetivo de prevenir ou lentificar a progressão da doença renal diabética. Apesar disso, a incidência de DRC no diabetes continua bastante elevada (1-3).

1.1.3 Inflamação renal.

Evidências crescentes têm indicado que a inflamação renal é um componente crucial na patogênese da nefropatia diabética (7). Os desarranjos hemodinâmicos e metabólicos renais, verificados no diabetes, agem como fatores de ativação para inúmeras moléculas inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento e progressão de lesões renais funcionais e estruturais. Uma grande gama de vias e moléculas pró-inflamatórias tem direta atuação sobre o espectro fisiopatológico da nefropatia diabética, incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e seus receptores, moléculas de adesão e fatores de transcrição (7,22).

Entre os fatores pró-inflamatórios envolvidos na lesão renal diabética estão as moléculas TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18, TGF- β 1 e NF- κ B. A compreensão crescente do papel funcional destas citocinas demonstrou a presença de efeitos pleiotrópicos importantes que atuam como

efetores dos sistemas inflamatório e imunitário na nefropatia diabética. Estas moléculas estimulam a síntese de várias substâncias envolvidas na progressão da nefropatia diabética como as moléculas celulares de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e as moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), além de estarem associadas com maior recrutamento renal de leucócitos, linfócitos e monócitos e com o aumento da proliferação celular mesangial e da expressão renal de fibronectina (22).

A IL-1 é sintetizada por uma variedade de tipos celulares como macrófagos, células B e fibroblastos e é considerada um mediador potente da inflamação e do sistema imune. A expressão de IL-1 está aumentada no rim diabético e sua presença está relacionada com um aumento da expressão e da síntese renal de ICAM1, VCAM1 e selectina E (23), além de diretamente aumentar a permeabilidade endotelial e estimular a hiper celularidade glomerular (24). Outra importante citocina imunoregulatória que também está elevada nos glomérulos e interstício do rim diabético é a IL-6 (25). Aumento de seus níveis urinários e renais foi diretamente correlacionado com maior excreção urinária de albumina em ratos diabéticos (26) e com o aumento do espessamento da membrana basal glomerular em pacientes com diabetes tipo 2 (27). As ações renais da IL-6 também se relacionam com alterações na permeabilidade endotelial, aumento da proliferação mesangial e da expressão renal de fibronectina (28).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional secretada predominantemente pelos monócitos, macrófagos, células T e adipócitos. A maior atividade do receptor AT1 no diabetes é um fator determinante para a maior expressão de TNF- α no rim diabético (29). Em estudos experimentais com ratos diabéticos, a expressão de TNF- α foi mais elevada nos rins e na urina destes animais, mesmo antes do surgimento da albuminúria (30). Por outro lado, a

inibição de TNF- α com seu inibidor específico infliximab reduziu a excreção urinária de albumina (31). Outros efeitos relevantes do TNF- α no rim diabético estão associados com a indução de apoptose renal, alterações da hemodinâmica glomerular e da permeabilidade endotelial, e uma ação direta estimulatória para a produção de espécies reativas de oxigênio (32-33).

A expressão de TGF- β também está aumentada nos glomérulos e túbulos do rim diabético (34). TGF- β é uma citocina hipertrófica e fibrogênica que atua na nefropatia diabética por promover estímulo da expansão mesangial e maior deposição da matriz extracelular. Suas ações se fazem pelo seu estímulo direto aos genes da matriz protéica e por inibir os fatores de degradação da matriz protéica, através da supressão das proteases e do maior estímulo para a síntese dos inibidores das proteases (35-36). Além disso, estudos experimentais com ratos e camundongos diabéticos mostraram que a infusão de anticorpos monoclonais neutralizantes para TGF- β reduziu a hipertrofia glomerular e a expansão mesangial e melhorou a glomeruloesclerose e a função renal (37-38).

NF- κ B é o mais importante fator de transcrição nuclear envolvido na fisiopatologia da nefropatia diabética. Parte de sua importância é que esta molécula está sempre presente nas células, ainda que num estado inativo, fazendo com que a sua ativação não exija a síntese de nova proteína, o que permite que esta molécula atue como primeiro mensageiro a estímulos celulares nocivos. NF- κ B é ativado por uma grande variedade de estímulos como as citocinas inflamatórias, radicais livres de oxigênio, Ang II, irradiação ultravioleta, produtos bacterianos e virais, além da própria proteinúria produzida na nefropatia diabética que pode atuar como um fator auto-estimulante celular para a produção de NF- κ B (39-40). NF- κ B interage com fatores

metabólicos e hemodinâmicos na nefropatia diabética, podendo ser diretamente ativado em condições de hiperglicemia pelas células endoteliais, células musculares lisas vasculares e células tubulares proximais renais (41-42). Após sua ativação, NF- κ B induz a transcrição de vários genes, incluindo aqueles relacionados com a promoção de quimiocinas como a quimiocina CC Ligante 2 (CCL2) e CCL5, moléculas de adesão, citocinas, óxido nítrico sintetase e uma variedade de outras proteínas inflamatórias e proliferativas envolvidas na patogênese da nefropatia diabética (39). Além disso, a inibição de NF- κ B por diversos compostos como tiazolidinedionas (43), 1,25-dihidroxivitamina D3 (44) e cilostazol (45) promoveu efeitos benéficos para a lesão renal diabética, sugerindo que esta molécula pode ser considerada um alvo terapêutico na nefropatia diabética.

Além do papel das citocinas inflamatórias, o diabetes também se caracteriza pelo acúmulo de macrófagos em vários tecidos. Esta infiltração de macrófagos, que ocorre por mecanismos de quimiotaxia, tem um papel chave na progressão de patologias diferentes como a aterosclerose e a nefropatia diabética. As ações dos macrófagos estão associadas com a indução de vários mecanismos de lesão celular como a maior produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e proteases (46). Também a expressão renal dos receptores transmembranas *Toll-Like* estão aumentados no diabetes (47). Esses receptores têm um papel central nos mecanismos sinalizadores que controlam a resposta imune inata, sendo suas atividades implicadas no desenvolvimento das complicações vasculares e inflamatórias do diabetes (48).

Portanto, as citocinas inflamatórias e os outros componentes acima descritos exercem uma diversidade de ações que são de essencial importância para a progressão da nefropatia

diabética. O reconhecimento destas moléculas como mediadores patogênicos oferece a possibilidade do uso de novos meios terapêuticos capazes de inibir a sua formação ou o aumento de suas atividades no diabetes.

1.1.4 Estresse oxidativo.

Em condições fisiológicas, as células do organismo produzem espécies reativas de oxigênio de forma constante, seja como produtos finais do metabolismo aeróbio ou captação exógena ou como resposta a um agressor celular (49). As espécies reativas de oxigênio realizam funções essenciais para as células como a sinalização de moléculas e a ativação de leucócitos e macrófagos na defesa contra organismos invasores, sendo sua formação compensada pela ativação de mecanismos de defesa antioxidantes, os quais inibem a toxicidade dos radicais livres (50). Níveis fisiológicos de óxido nítrico (NO) atuam como antioxidantes endógenos ajudando a prevenir o desenvolvimento da inflamação e a fibrose tecidual renal. Alterações neste equilíbrio oxidante/antioxidante podem ser induzidas por diversos fatores, seja pela maior produção de espécies reativas de oxigênio ou pela menor atuação dos sistemas de defesa antioxidantes, resultando no desenvolvimento do estresse oxidativo que pode estar presente em numerosas patologias, inclusive a nefropatia diabética.

Várias evidências produzidas por estudos experimentais anteriores, com animais diabéticos, demonstraram uma relação direta entre a hiperglicemia e o desenvolvimento do estresse oxidativo (51-52). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no diabetes está associado com maior crescimento das células vasculares musculares lisas, vasoconstrição, disfunção endotelial, alteração protéica da matriz extracelular glomerular renal

e aumento da reabsorção tubular renal de sódio (53). A direta relação entre o estresse oxidativo e o desenvolvimento da nefropatia diabética é reforçada ainda pela demonstração, em animais com diabetes experimental, de que a inibição do estresse oxidativo melhorou as manifestações clínicas e patológicas associadas com a nefropatia diabética (54-55).

As espécies reativas de oxigênio também estão diretamente envolvidas na regulação de NF- κ B ao agirem como segundo mensageiros para a ativação desta molécula, além de ativarem a produção renal de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento e de induzirem a formação de proteínas da matriz extracelular renal (56-57). As atividades das espécies reativas de oxigênio no diabetes estão também associadas com a maior produção renal de Ang II e aldosterona (58-59). O desarranjo do SRAA no rim diabético favorece a menor formação de NO e a maior formação de espécies reativas de oxigênio (59). Em estudos anteriores, a aldosterona inibiu a produção de NO (58) e do seu segundo mensageiro 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (60) e elevou a produção renal de 8-isoprostano, um marcador da atividade endógena de um de seus mais importantes agentes oxidativos, a superóxido dismutase (59). Além disso, a inibição da aldosterona por antagonistas do receptor mineralocorticoide suprimiu o estresse oxidativo e também a inflamação e a fibrose tecidual renal (61).

Assim, o aumento do estresse oxidativo no diabetes está associado com maior atividade do SRAA e da inflamação renal e com vários outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão da nefropatia diabética.

1.1.5 Efeitos da aldosterona sobre a função renal no diabetes.

Aldosterona é um hormônio esteróide produzido, primariamente, na zona glomerulosa

da camada externa do córtex adrenal, embora a sua produção também tenha sido detectada em outros locais do organismo. Ela é produzida em resposta a estímulos induzidos pela Ang II ou hormônio corticotrófico ou aumento dos níveis de potássio plasmático e atua em receptores mineralocorticóides localizados nas células principais dos túbulos contornados distais renais, aumentando a reabsorção de sódio e as excreções urinárias de potássio e do íon hidrogênio. Além do seu principal papel fisiológico de regulador da reabsorção iônica tubular renal, a aldosterona também exerce ações fisiopatológicas indutoras de inflamação e fibrose tecidual e de remodelamento do miocárdio (62-64).

Entre os principais mecanismos pelos quais a aldosterona induz inflamação e fibrose está o seu estímulo direto para a produção e atividade das espécies reativas de oxigênio e a promoção de um infiltrado celular inflamatório tecidual (62-63,65). Em estudos com ratos, a infusão *in vivo* de aldosterona aumentou a produção renal de espécies reativas de oxigênio (59) e ativou a produção de NF- κ B e a formação de fibrose renal (66). Por outro lado, em animais tratados cronicamente com aldosterona e com aumento do estresse oxidativo, a infusão de substâncias antioxidantes, além de reduzir o estresse oxidativo, atenuou a inflamação e o acúmulo de colágeno renal (59). As ações inflamatórias e fibróticas da aldosterona também foram prevenidas pelos antagonistas dos receptores mineralocorticóides (67-68) e pelos inibidores da aldosterona sintase (69-70).

As ações da aldosterona também estão envolvidas no processo de lesão dos podócitos. Estudos anteriores com ratos hipertensos e com proteinúria, apresentando lesões severas na arquitetura celular podocitária com redução da expressão de nefrina e podocina, mostraram que a infusão do antagonista do receptor da aldosterona eplerenona melhorou

significativamente a lesão podocitária, aumentou a expressão de nefrina e diminuiu a proteinúria (71-72), sugerindo que a inibição da aldosterona tem efeitos protetores para os podócitos.

Além dos inibidores da ECA e dos antagonistas do receptor da angiotensina, outros agentes farmacológicos utilizados no controle anti-hipertensivo também podem ter atividades diretas sobre a produção de aldosterona, como os antagonistas dos canais de cálcio (73-74). O antagonista dos canais de cálcio diidropiridínico amlodipina foi demonstrado reduzir a síntese de aldosterona através de uma ação inibitória direta sobre a captação de cálcio pelas células da zona glomerulosa do córtex adrenal (75). Os bloqueadores dos canais de cálcio diminuem a pressão arterial por promoverem a redução da concentração de cálcio intracelular nas células vasculares musculares lisas, além de melhorarem o estresse oxidativo através da indução da produção endotelial de NO e redução das espécies reativas de oxigênio (76). Estudos clínicos anteriores demonstraram que os bloqueadores dos canais de cálcio restauraram a disponibilidade de NO em pacientes hipertensos (77) e melhoraram a função endotelial, dependente de NO, em pacientes com coronariopatia (78). No entanto, a relação entre as atividades da amlodipina sobre a aldosterona no diabetes e seus efeitos sobre a nefropatia diabética não são conhecidos.

1.2 Inibição da renina plasmática: mecanismos de ação e efeitos farmacológicos do alisquireno.

Alisquireno é um inibidor competitivo da renina que foi introduzido nos últimos anos no arsenal terapêutico utilizado para a inibição do SRAA. Através de sua ligação ao sítio ativo da

enzima, este agente previne o acesso da renina ao seu substrato angiotensinogênio. Alisquireno é um inibidor potente, de longa duração, altamente específico para a renina e disponível por via oral (79). Como a renina age na fase inicial da cascata do SRAA, catalisando a conversão do angiotensinogênio em Ang I, a sua inibição pode ser considerada o processo ideal para o bloqueio deste sistema, por inibir a atividade de todos os componentes localizados abaixo da renina, como a Ang II e aldosterona.

Pelo fato de ser um inibidor da renina humana, o uso de alisquireno em animais apresenta algumas restrições já que suas propriedades inibitórias sobre a renina são menores em animais do que em humanos (79). Além disso, alisquireno tem uma biodisponibilidade oral diminuída em roedores, tornando sua eficácia menos eficiente nestes animais quando administrado por via oral (80). Estudos experimentais iniciais com ratos transgênicos expressando genes humanos da renina e angiotensinogênio e com hipertensão severa demonstraram que o alisquireno normalizou a pressão arterial sistêmica, reduziu os níveis de albuminúria e de creatinina plasmática, diminuiu os níveis corticais renais de Ang I e Ang II e os níveis renais de colágeno IV, macrófagos e linfócitos (81) e também inibiu a ativação de complemento e a infiltração celular renal (82).

1.2.1 Efeitos da inibição da renina com alisquireno sobre a nefropatia diabética.

Alisquireno demonstrou ter efeitos benéficos sobre o desenvolvimento da nefropatia diabética. Em um estudo com cultura de podócitos de camundongos expostos a altas concentrações de glicose, alisquireno reduziu a formação de renina e de Ang II e também suprimiu a apoptose podocitária, sugerindo um efeito protetor do alisquireno sobre a barreira

capilar glomerular (83). Os efeitos *in vivo* do alisquireno sobre a doença renal diabética foram investigados em ratos transgênicos diabéticos expressando renina de camundongo e em camundongos db/db, utilizados como modelo de diabetes tipo 2. Nestes estudos, alisquireno reduziu a pressão arterial e a expressão renal de colágeno I, TGF- β , colágeno IV e nefrina, acompanhados de atenuação da albuminúria e da glomeruloesclerose (84-85).

Em estudos clínicos, alisquireno demonstrou ser um agente farmacológico eficaz em reduzir a pressão arterial na doença hipertensiva (86) e de promover efeitos renoprotetores no diabetes (87-89). Em um estudo com 15 pacientes com diabetes tipo 2 com micro ou macro albuminúria, tratamento com alisquireno por quatro semanas reduziu a pressão arterial e a albuminúria (87). Em outro estudo com 26 pacientes com hipertensão e diabetes, o tratamento com alisquireno ou irbesartan por dois meses reduziu de forma similar a albuminúria, mas uma redução mais acentuada foi observada nos pacientes tratados com a combinação destas duas drogas (88). O estudo AVOID foi o primeiro grande estudo clínico a investigar os efeitos do alisquireno na nefropatia diabética (89). Ele incluiu 599 pacientes com diabetes tipo 2, hipertensão arterial e nefropatia diabética e demonstrou que a redução de albuminúria foi 20% maior no grupo de pacientes tratados com a combinação de alisquireno e losartan, comparado com a combinação de placebo e losartan, independente da pressão arterial. Estes dados sugeriram que mecanismos distintos de inibição do SRAA podem desencadear respostas diferentes sobre a progressão da nefropatia diabética (89).

Em seguida, o estudo multicêntrico ALTITUDE foi desenhado para avaliar potenciais benefícios cardio-renais e de segurança do alisquireno, com inclusão de mais de oito mil pacientes com diabetes tipo 2 (90). No entanto, este estudo foi interrompido precocemente

após análises preliminares demonstrarem que os riscos associados com piora da função renal, hipotensão e hipercalemia foram significativamente maiores nos pacientes tratados com a combinação de alisquireno com um inibidor da ECA ou com um antagonista do receptor da Ang II do que no grupo placebo (90). Os resultados deste estudo fizeram com que as indicações clínicas do alisquireno fossem bastante limitadas, com o seu uso sendo atualmente contraindicado em combinação com outros antagonistas do SRAA e em pacientes com disfunção renal.

Todavia, a inibição da renina pelo alisquireno se mantém uma ferramenta importante na investigação experimental de mecanismos de renoproteção na nefropatia diabética, inclusive sobre o desenvolvimento da inflamação e do estresse oxidativo renal.

1.3 Receptor AT2 da Ang II: mecanismos sinalizadores e atividades fisiológicas.

A Ang II age, principalmente, através de sua ligação com duas classes de receptores acoplados à proteína G, os receptores AT1 e AT2. Estes receptores têm uma afinidade similar para a Ang II apesar de apresentarem uma sequência homóloga de ácidos nucleicos de somente 34% (91). É importante frisar que os efeitos fisiopatológicos do SRAA são principalmente mediados pelas ações da Ang II em ativar o receptor AT1, determinando vasoconstrição, aumento da pressão arterial sistêmica, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e de aldosterona e indução de inflamação e fibrose teciduais. Em contraste, a estimulação do receptor AT2 antagoniza as atividades do receptor AT1 e, em geral, promove efeitos benéficos como inibição da proliferação e diferenciação celular, vasodilatação e melhora da inflamação e do estresse oxidativo (92). Os efeitos renais da ativação do receptor AT2 também se opõem aos

efeitos vasoconstritores do receptor AT1 por promoverem dilatação das arteríolas aferentes e eferentes e aumento da natriurese (93). Desta forma, o balanço apropriado entre as atividades dos receptores AT1 e AT2 tem um papel chave na regulação das funções fisiológicas dos sistemas cardiovascular e renal. No entanto, o papel que o receptor AT2 desempenha no rim e nas doenças cardiovasculares ainda é motivo de intensa investigação.

Os mecanismos sinalizadores envolvidos nas ações destes dois receptores também são bastante distintos. O receptor AT1 ativa as quinases reguladoras dos sinais extracelulares (ERK) levando a uma resposta mitogênica ou hipertrófica pela ativação do sistema tirosina quinase (92). Por outro lado, o receptor AT2 estimula a proteína fosfatase fosfotirosina e a proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógeno (MPK-1), inibindo as atividades de ERK e reduzindo a concentração da proteína quinase mitógeno ativada (MAPK), levando a inibição do crescimento celular (13,92,94).

Recentemente, as afinidades relativas dos diversos peptídeos do SRAA aos receptores AT1 e AT2 foram investigadas (95). Os resultados deste estudo demonstraram que tanto a Ang II como a Ang III agem como ligantes endógenos para os receptores AT1 e AT2, enquanto a Ang IV e a Ang (1-7) agem como ligantes endógenos somente para o receptor AT2, mas não para o receptor AT1 (95). Por outro lado, a ativação do receptor AT2 foi associada com aumento da secreção de aldosterona e da resposta natriurética via Ang III, mas não via Ang II (96).

1.3.1 Expressão gênica e regulação da expressão tecidual do receptor AT2.

O gene do receptor AT2 está localizado no cromossomo X e compreende três exons, com uma região de códigos sequenciais confinada ao terceiro exon (97). O receptor AT2

corresponde a uma proteína de 363 aminoácidos com um peso molecular de 41 kDa (13). Sua expressão gênica é regulada por múltiplos fatores; é inibida pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular e pela ativação da proteína quinase C (98) e estimulada pelas ações da IL-1 e insulina (99).

A expressão do receptor AT2 é bastante elevada em tecidos embrionários e diminui rapidamente após o nascimento, na maioria dos órgãos, embora sua expressão seja mantida em um nível reduzido nas adrenais, rins, útero, ovários, coração e cérebro (100). No tecido embrionário renal, o receptor AT2 tem um papel essencial nos estágios iniciais da morfogênese do broto ureteral, sendo expresso no epitélio do broto ureteral e nas células mesenquimais durante o desenvolvimento metanéfrico (101). Nos rins adultos, o receptor AT2 está principalmente localizado nos vasos peritubulares, glomérulos e túbulos renais (102-104). Uma característica peculiar do receptor AT2 é o aumento de sua expressão gênica em tecidos em processo de regeneração, como em áreas adjacentes a ferimentos cutâneos, na neoíntima endotelial após lesão vascular e nos tecidos renal e cardíaco após lesão isquêmica (105-106).

A maior expressão do receptor AT2 na regeneração tecidual pode estar relacionada com mecanismos estimuladores para a neovascularização e promoção de crescimento celular, sugerindo que o receptor AT2 tem uma ação essencial na embriogênese e na regeneração tissular.

1.3.2 Condições patológicas associadas com a atividade reduzida do receptor AT2 da Ang II.

Até recentemente, a investigação dos efeitos associados com a ativação do receptor AT2 apresentava limitações devido à falta de um agonista específico para este receptor. Desta

forma, as atividades do receptor AT2 foram principalmente investigadas pelo uso de ferramentas indiretas como: a manipulação ou bloqueio da expressão tecidual do receptor AT2 em animais geneticamente modificados; o uso do composto CGP42112A com atividades agonísticas parciais sobre o receptor AT2; a inibição específica do receptor AT2 pelo seu antagonista PD123319; e também pelo bloqueio do receptor AT1 que por induzir aumento na produção de Ang II pode indiretamente estimular o receptor AT2.

Espécies de camundongos nulos para o receptor AT2 apresentaram elevação da pressão arterial, aumento da resposta vasopressora a Ang II, atenuação do comportamento exploratório, menor temperatura corpórea e inibição da natriurese pressórica (107-108), sugerindo que este receptor contribui para a regulação hemodinâmica e natriurética e para as atividades do sistema nervoso central. O agonista do receptor AT2 CGP42112A tem sido bastante utilizado em experimentos com animais, embora este composto apresente algumas limitações como uma concomitante ligação parcial adicional com o receptor AT1 e não ser disponível por via oral (109). Por outro lado, a inibição do receptor AT2 com o seu inibidor específico PD123319 reduziu os níveis renais de NO, cGMP e bradicinina (110-111), aumentou ainda mais a pressão arterial de ratos Zucker obesos tratados com Ang II (112) e atenuou os efeitos redutores da pressão arterial do antagonista do receptor da Ang II losartan em um modelo animal de hipertensão renovascular (113). O bloqueio do receptor AT2 com PD123319 também potencializou a contração coronária induzida pela Ang II (114), aumentou a severidade da aterosclerose e o aneurisma aórtico abdominal (115) e a resposta contrátil da aorta torácica submetida a uma sobrecarga pressórica (116). Em conjunto, estes dados indicam que o receptor AT2 apresenta um papel relevante em diversas patologias cardiovasculares e renais.

Figura 2. Atividades fisiopatológicas relacionadas com a estimulação do receptor AT2.
FSR: fluxo sanguíneo renal; NO: óxido nítrico.

1.3.3 Peptídeos associados com a estimulação direta do receptor AT2.

A investigação do receptor AT2 sofreu grandes avanços nos últimos anos com a descoberta de que pequenas substituições nos peptídeos nativos da angiotensina poderiam gerar novos compostos com ações potenciais para influenciar as atividades dos receptores AT1 e AT2. Assim, um agonista direto do receptor AT2 foi desenvolvido em 2004 e denominado Composto 21 (C21) (117). C21 é uma molécula não peptídica, ativa por via oral, altamente específica e seletiva para o receptor AT2 e modelada no terminal-C da estrutura pentapeptídica da Ang II (117). C21 apresenta uma seletividade bastante elevada para o receptor AT2 e não

tem afinidade para o receptor AT1, como recentemente demonstrado em um estudo com células renais embrionárias humanas (95).

Este composto tem se mostrado efetivo na promoção de efeitos benéficos para os sistemas cardiovascular e renal, doenças inflamatórias crônicas e doenças neurológicas. No entanto, os efeitos do C21 no diabetes e os mecanismos envolvidos na ativação do receptor AT2 pelo agonista C21 na doença renal diabética não são conhecidos. Além do C21, outros agonistas do receptor AT2 foram recentemente relatados e também apresentaram efeitos indutores sobre o relaxamento vascular (118-120). Entre eles, o lantipeptídeo LP2 reduziu a espessura do septo alveolar e da parede arterial e atenuou a inflamação pulmonar em ratos neonatais (118).

1.3.4 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre o sistema cardiovascular.

Os efeitos *in vivo* da estimulação do receptor AT2 com C21 foram inicialmente avaliados em coração de ratos com infarto do miocárdio induzido pelo clampeamento da artéria coronária (121). Tratamento com C21 melhorou a função ventricular sistólica e diastólica, reduziu o tamanho da cicatriz isquêmica miocárdica e diminuiu os níveis dos marcadores inflamatórios e apoptóticos da região peri-infarto (121). Em ratos espontaneamente hipertensos, C21 reduziu a deposição intersticial de colágeno na parede aórtica e miocárdica e também o conteúdo aórtico de fibronectina (122), enquanto em ratos com insuficiência cardíaca, C21 diminuiu a excreção de norepinefrina através da melhora da sensibilidade barorreflexa (123).

No entanto, um estudo realizado em camundongos com infarto do miocárdio induzido

pelo clampeamento coronário mostrou que o tratamento crônico com C21, comparado com candesartan e placebo, não alterou o tamanho da cicatriz isquêmica miocárdica e teve efeitos adversos sobre o remodelamento ventricular (124). Portanto, os efeitos da estimulação do receptor AT2 sobre o tecido cardíaco ainda não são esclarecidos.

1.3.5 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre o sistema renal.

Nos rins, a estimulação do receptor AT2 com C21 em ratos espontaneamente hipertensos, submetidos a uma dieta rica em sal, preveniu a infiltração celular inflamatória e o acúmulo de colágeno renal, acompanhado por uma ocorrência menor de lesão cerebral e aumento da sobrevida. Estes efeitos foram independentes da pressão arterial e abolidos pela concomitante administração de PD123319 (125). Em um modelo de ratos com hipertensão renovascular 2 rins-1 clipe, o aumento dos níveis renais dos fatores inflamatórios TNF- α , IL-6 e TGF- β 1 e do infiltrado celular inflamatório nos rins isquêmicos do grupo controle foram reduzidos nos rins isquêmicos dos ratos tratados com C21 (126). Ainda mais, nos rins isquêmicos deste grupo de ratos, C21 restaurou ao normal os níveis de NO e cGMP e elevou ainda mais a expressão do receptor AT2, sugerindo que a estimulação direta do receptor AT2 pode promover um mecanismo de *feedback* positivo para a sua expressão gênica. Estes efeitos foram parcialmente inibidos pela inibição do receptor AT2 com PD123319 e independentes da pressão arterial (126). Os efeitos antiinflamatórios do C21 também foram demonstrados *in vitro* em um estudo com fibroblastos dérmicos murinos e humanos (127). Neste estudo, C21 reduziu os níveis de TNF- α induzido por IL-6 através de mecanismos que envolveram a inibição de NF- κ B, ativação de fosfatases protéicas e maior síntese do ácido epoxi-eicosatrienóico, sendo estes

efeitos inibidos pelo antagonismo do receptor AT2 com PD123319 (127).

As atividades do receptor AT2 também podem influenciar as funções hemodinâmicas e tubulares renais. Em estudo com ratos, o bloqueio do receptor AT2 com PD123319 alterou a natriurese pressórica, favoreceu a vasoconstrição e reduziu o fluxo sanguíneo renal (FSR) e a TFG (128). Ao contrário, a estimulação do receptor AT2 com C21 induziu vasodilatação, com aumento do FSR e redução da resistência vascular renal, e aumentou a excreção urinária e fracional de sódio em ratos espontaneamente hipertensos (129-130). Por outro lado, a estimulação do receptor AT2 com CGP42112A, em ratos Zucker obesos, induziu aumento da natriurese e redução da pressão arterial sem alterar o FSR e a TFG, sugerindo um efeito direto do receptor AT2 sobre os túbulos renais em animais obesos (131). Desta forma, a estimulação crônica do receptor AT2 parece trazer benefícios para o funcionamento renal por minimizar o desenvolvimento da inflamação e do estresse oxidativo renal, além de aumentar a vasodilatação glomerular e a excreção tubular renal de sódio.

Além disso, as atividades do receptor AT2 também estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento do estresse oxidativo renal. Estudos prévios realizados em ratos demonstraram que a ativação do receptor AT2 foi associada com a regulação e o aumento da produção renal de NO, cGMP e bradicinina, indicando seu envolvimento como indutor da vasodilatação vascular (110-111). Resultados similares foram demonstrados em cultura de células de vasos de resistência humanos onde a vasodilatação mediada pelo receptor AT2 foi influenciada pela formação de NO (114).

1.3.6 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre a pressão arterial.

Apesar de estudos anteriores mostrarem uma associação direta entre a estimulação do receptor AT2 com vasodilatação em diversos leitos vasculares (109,129,132), o tratamento com C21 não afetou a pressão arterial na maior parte destes estudos. No entanto, em ratos com hipertensão arterial induzida pela infusão de Ang II, a concomitante administração de um antagonista do receptor AT1 com o agonista do receptor AT2 CGP42112A reduziu de modo mais acentuado a pressão arterial do que nos ratos tratados isoladamente com cada uma destas drogas. Ainda mais, outro estudo também demonstrou que os efeitos hipotensores dos antagonistas do receptor AT1 foram bloqueados totalmente pelo antagonismo do receptor AT2 com PD123319 (133-134). Estes dados sugeriram que a ativação do receptor AT2 pode potencializar mecanismos de vasodilatação durante o concomitante bloqueio do receptor AT1.

1.3.7 Efeitos da estimulação direta do receptor AT2 sobre o sistema nervoso central.

Além de seus efeitos sobre os sistemas cardiovascular e renal, vários estudos recentes têm demonstrado que a estimulação do receptor AT2 pode também ter ações diretas sobre o sistema nervoso central. Em um estudo com ratos, a infusão crônica de C21 diretamente na região ventrolateral rostral da medula reduziu a secreção de norepinefrina e a pressão arterial, indicando um papel cerebral para este receptor na regulação da pressão arterial (135). Além disso, em um modelo experimental de doença de Alzheimer em camundongos, a estimulação do receptor AT2 com C21 melhorou a função cognitiva e o fluxo cerebral e aumentou o crescimento neuronal em cultura de células neuronais do hipocampo (136). C21 também

reduziu o tamanho do infarto cerebral em camundongos e em ratos hipertensos com derrame cerebral induzido pela ligadura da artéria cerebral média e melhorou o déficit motor e a sobrevida neuronal (137-138), independentes da pressão arterial.

Portanto, os conhecimentos sobre as atividades do receptor AT₂ para os sistemas cardiovascular, renal e cerebral tiveram uma grande evolução nos últimos anos. Porém, muitos fatores ainda não se encontram esclarecidos. Apesar de intensa investigação recente, os efeitos diretos da ativação do receptor AT₂ no diabetes e na doença renal diabética não são conhecidos.

Em suma, os mecanismos associados com o desenvolvimento de lesão renal no diabetes incluem maior atividade do SRAA e aumento na formação de fatores inflamatórios e oxidativos renais. O detalhamento destes mecanismos e a procura de novos agentes farmacológicos capazes de inibir a sua ativação podem contribuir para um melhor entendimento fisiopatológico e para a prevenção da nefropatia diabética.

2. OBJETIVOS

1. Investigar os efeitos da inibição da renina pelo alisquireno sobre a produção renal de Ang II e de fatores inflamatórios e fibróticos, estresse oxidativo renal, produção de aldosterona e excreção urinária de albumina em um modelo experimental de ratos diabéticos induzidos por STZ.
2. Comparar os efeitos do alisquireno com o diurético hidroclorotiazida (HCTZ) e com o antagonista dos canais de cálcio amlodipina, individualmente ou combinados, sobre a produção de aldosterona e sua relação com o desenvolvimento da inflamação e o estresse oxidativo na nefropatia diabética.
3. Avaliar os efeitos da ativação direta do receptor AT₂ pelo C21 sobre o desenvolvimento da inflamação e do estresse oxidativo renal e sobre a excreção urinária de albumina em um modelo experimental de ratos diabéticos induzidos por STZ.
4. Investigar os efeitos da nefropatia diabética e da estimulação direta do receptor AT₂ pelo C21 sobre a expressão renal do receptor AT₂.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROTOCOLO 1.

No protocolo 1, os efeitos da inibição crônica da renina pelo alisquireno foram avaliados em ratos diabéticos através das análises das alterações inflamatórias e oxidativas renais, fibrose renal e excreções urinárias de albumina e aldosterona. Os efeitos do alisquireno foram comparados com placebo e com outras drogas anti-hipertensivas bem estabelecidas, como o diurético HCTZ e o bloqueador dos canais de cálcio amlodipina. Cada um destes agentes farmacológicos foi utilizado em grupos distintos de ratos, de forma individual ou combinada.

Os experimentos foram conduzidos em ratos Sprague-Dawley machos, obtidos de Charles River Laboratories (EUA) com peso corpóreo inicial em torno de 250 gramas. Os animais receberam água *ad libitum* e dieta normal em sódio durante todo o período de estudo e foram mantidos em temperatura ambiente, controlada com termostato, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

Os procedimentos experimentais utilizados em todas as fases do presente estudo foram aprovados pela *Institutional Animal Care & Use Committee, Protocol No. 2379*, da Universidade da Virgínia, Estados Unidos, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo de Pesquisa nº 138/14.

3.1.1 Grupos experimentais de ratos normoglicêmicos e diabéticos.

Os ratos foram divididos, aleatoriamente, em nove grupos:

1. Normoglicêmico controle (n = 10); ratos não diabéticos que receberam veículo.
2. Diabetes (DM) controle (n = 10); ratos diabéticos que receberam veículo.
3. DM + Alisquireno (n = 10); ratos diabéticos tratados com alisquireno.

4. DM + HCTZ (n = 10); ratos diabéticos tratados com HCTZ.
5. DM + Amlodipina (n = 10); ratos diabéticos tratados com amlodipina.
6. DM + HCTZ + Amlodipina (n = 10); ratos diabéticos tratados com HCTZ e amlodipina.
7. DM + Alisquireno + HCTZ (n = 11); ratos diabéticos tratados com alisquireno e HCTZ.
8. DM + Alisquireno + Amlodipina (n = 12); ratos diabéticos tratados com alisquireno e amlodipina.
9. DM + Alisquireno + HCTZ + Amlodipina (n = 11); ratos diabéticos tratados com alisquireno e HCTZ e amlodipina.

Diabetes foi induzido pela injeção intraperitoneal (IP) de 65 mg/kg de STZ (Sigma-Aldrich, EUA). Os ratos do grupo normoglicêmico controle também foram injetados por via IP com veículo (solução salina a 0,9%). Todos os tratamentos foram iniciados no dia subsequente a administração de STZ e mantidos por um período de 6 semanas.

Alisquireno foi cedido pelo laboratório Novartis (EUA) e infundido na dose de 10 mg/kg/dia, continuamente, através de mini-bombas de infusão osmótica modelos 2ML2 e 2ML4 (Alzet, EUA). As mini-bombas de infusão osmótica foram implantadas na área subcutânea da região infraescapular de cada animal, que foram previamente anestesiados pela combinação de cetamina (80 mg/kg, IP) e xilazina (8 mg/kg, IP). HCTZ e amlodipina também foram cedidos por Novartis e administrados via gavagem oral, diariamente, na dose de 3 mg/kg/dia e 10 mg/kg/dia, respectivamente. De forma similar aos grupos de ratos tratados com alisquireno, os ratos normoglicêmicos controles, diabéticos controles e tratados com HCTZ ou amlodipina isolados ou combinados também foram implantados com mini-bombas de infusão osmótica contendo veículo.

3.1.2 Determinação do peso corpóreo, glicemia de jejum, volume urinário e pressão arterial (PA) sistólica.

Peso corpóreo, glicemia de jejum, volume urinário de 24 horas e PA sistólica foram verificados no período imediatamente anterior a indução de diabetes e no final do estudo. Peso corpóreo foi obtido através do uso de uma balança com medidas em gramas. Para a determinação da glicemia de jejum, foi coletado sangue da veia caudal de cada animal, após pelo menos 8 horas de jejum, com a glicemia verificada imediatamente após a coleta através do uso de um glicosímetro (Bayer HealthCare, EUA). A pressão arterial foi medida de forma não-invasiva, na região caudal de ratos acordados, após serem colocados em um ambiente escuro com temperatura ao redor de 36°C. Um manguito de tamanho apropriado foi acoplado à cauda do animal e inflado até 200 mmHg, com a medida da pressão arterial aferida por um aparelho de medida de pressão arterial caudal de ratos da marca IITC Life Sciences (EUA). Os valores da pressão arterial utilizados em nossa análise corresponderam ao valor médio de pelo menos 10 medidas da PA sistólica de cada animal.

3.1.3 Coleta de urina de 24 horas e análises das concentrações urinárias de albumina, creatinina e aldosterona.

Para a coleta de urina de 24 horas, cada rato foi colocado em uma gaiola metabólica individual durante um período de 24 horas, com a urina coletada gravimetricamente. No final, o volume urinário total foi medido em mililitros e uma amostra de urina de cada animal foi congelada e mantida em freezer -80°C até sua análise. Posteriormente, essa amostra de urina

foi utilizada para as análises das excreções urinárias de albumina, creatinina e aldosterona.

A albuminúria foi determinada pela técnica de ensaio imunoenzimático (EIA) através do uso de um kit específico para a detecção de albumina urinária de ratos (número de catálogo A05102; desenvolvido e validado por SPI-BIO, France; comercializado por Cayman Chemical Company, EUA). Este kit tem uma reação cruzada de 0,55% com albumina de camundongos e de <0,01% com albumina sérica bovina. A creatinina urinária foi determinada por um ensaio similar a reação de Jaffé, através do uso de um kit específico para a detecção de creatinina urinária (número de catálogo: 500701; Cayman Chemical). Os valores de albuminúria foram aferidos em ng/ml e os de creatinina urinária em mg/dl. A seguir, estes valores foram convertidos em mg/ml e em g/ml, respectivamente, e então multiplicados pelo volume urinário de 24 horas em mililitros. Os dados relativos a albuminúria foram apresentados, em nosso estudo, como a relação da excreção urinária de albumina sobre creatinina (RAC). A RAC foi considerada como marcador de lesão renal diabética e seus valores calculados através da divisão da concentração de albumina, em miligramas, pela de creatinina, em gramas, sendo apresentados em miligramas por grama (mg/g).

A excreção urinária de aldosterona foi determinada pela técnica de EIA através do uso de um kit específico para a quantificação de aldosterona (número de catálogo: 10004377; Cayman Chemical). Seus resultados foram aferidos em pg/ml e, em seguida, convertidos em ng/ml. Estes valores foram multiplicados pelos seus respectivos volumes urinários de 24 horas, em mililitros, e então apresentadas em nanogramas por dia (ng/dia).

3.1.4 Coleta do fluido intersticial renal (FIR) *in vivo* através da técnica de microdiálise renal.

Para a coleta do FIR de cada animal foi utilizada a técnica de microdiálise renal (110-111,126). Esta técnica permite a passagem livre de pequenas moléculas, com massa molecular menor do que cerca de 40,000 Daltons, através da implantação no córtex renal de uma única fibra de diálise, procedente de um filtro capilar para hemodiálise de alto fluxo. O FIR foi utilizado para a determinação das concentrações renais de Ang II, TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano.

O preparo de cada fibra capilar foi realizado nos dias que precederam o procedimento cirúrgico. Cada fibra capilar mediu cerca de 1,0 cm de comprimento. As extremidades de cada fibra foram coladas a dois tubos individuais de polietileno-10 (PE-10), medindo cerca de 20 cm de comprimento cada. Após a secagem da cola e verificação de ausência de vazamento de líquidos na junção tubo-fibra, o procedimento cirúrgico foi iniciado.

A microdiálise renal foi realizada no final do estudo, com o animal anestesiado com pentobarbital sódico (50 mg/kg, IP; Sigma). Caso necessário, doses adicionais de pentobarbital foram administradas aos animais durante o experimento. Inicialmente, através de uma incisão mediana abdominal, os dois rins foram isolados e submetidos aos procedimentos descritos abaixo. Um dos tubos PE-10 foi conectado à ponta cega de uma agulha de calibre 30. A seguir, a sua ponta oposta e perfurante atravessou o córtex renal de modo a formar um túnel paralelo à superfície renal, carregando consigo o conjunto tubo-fibra. Após a fibra capilar se alojar por inteira no interior do córtex renal, as duas pontas do conjunto tubo-fibra, exteriorizadas do córtex renal, foram imediatamente coladas à superfície renal para evitar seu deslocamento, usando uma cola veterinária cirúrgica Vetbond (3M Animal Care, EUA). A seguir, o tubo PE-10,

que estava conetado à agulha utilizada na penetração renal, foi separado da agulha e então conectado a uma seringa, contendo solução salina a 0,9%, posicionada em uma bomba de infusão. Esta bomba de infusão foi programada para correr a uma taxa de infusão de 3 μ l/min durante todo o experimento.

Após um período de estabilização de 60 minutos, os procedimentos de coleta do FIR foram iniciados. A solução salina, bombeada pela bomba de infusão, atravessou todo o conjunto tubo-fibra, inclusive o interior do córtex renal, até o seu efluente ser coletado na sua extremidade oposta em pequenos tubos plásticos, tipo *Eppendorf*, não-heparinizados, posicionados sobre gelo. As coletas do FIR foram realizadas por cinco períodos consecutivos com duração de 60 minutos cada. Este material foi imediatamente pesado em uma mini balança eletrônica digital, com um montante de FIR aproximado de 180 μ l por hora coletado de cada rim em cada um dos animais, e depois congelado e armazenado em freezer -80°C até sua posterior análise.

No final dos procedimentos de microdiálise renal, os dois rins de cada animal foram removidos e pesados em uma mini balança eletrônica digital. Uma parte do tecido renal foi acondicionada em solução de *Bouin* e posteriormente preparada para análises histológicas e imunohistoquímicas. O tecido renal remanescente foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C. Este tecido renal foi posteriormente analisado pelas técnicas de imunohistoquímica, *real time-PCR* e *Western blot*.

Em seguida, cada animal foi sacrificado pela infusão de uma dose letal de pentobarbital e sua carcaça foi acondicionada em embalagens plásticas próprias para congelamento até serem recolhidas para processo de incineração.

3.1.5 Análises do FIR de Ang II, TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano.

Antes de cada análise, os tubos contendo o FIR de cada animal foram retirados do freezer -80°C e deixados descongelar em temperatura ambiente. Imediatamente após o seu descongelamento foram realizados os procedimentos analíticos. Para a análise da concentração do FIR de Ang II foi utilizada a técnica de EIA através de um kit que utiliza um anticorpo monoclonal específico para a Ang II (número de catálogo A05680; desenvolvido e validado por SPI-BIO; comercializado por Cayman Chemical). Nesse kit, a mínima concentração detectável de Ang II é de 1 pg/ml, com uma reação cruzada de 100% para a Ang II, 4% para a Ang I, 36% para a Ang III, 33% para a Ang (3-8) e < 0,01% para a Ang (1-7). Os níveis do FIR de Ang II foram apresentados em picogramas por mililitro (pg/ml).

As concentrações renais de TNF- α e IL-6 foram analisadas pelo método de ensaio monoclonal imunoenzimático (ELISA) através do uso de kits específicos para cada uma destas citocinas e desenhados para medirem suas concentrações em ratos (R&D Systems, EUA). Estes kits de imunoensaio são específicos para a determinação quantitativa, em ratos, de TNF- α (número de catálogo: RTA00) e IL-6 (número de catálogo: R6000B). Os valores do FIR de TNF- α e IL-6 foram aferidos em pg/ml e depois convertidos em pg/ μ l. Estes valores foram então multiplicados pelo volume de cada amostra, em microlitros, e depois divididos pelo tempo de coleta em minutos. Desta forma, seus valores foram apresentados em picogramas por minuto (pg/min).

Os níveis do FIR de NO foram analisados através do uso de um kit de ensaio fluorimétrico para nitrato/nitrito (número de catálogo: 780051; Cayman Chemical). Nitrito

(NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) são produtos finais e estáveis do NO *in vivo*. A soma total de NO₂⁻ e NO₃⁻ é considerada o melhor índice na análise da produção total de NO, sendo frequentemente utilizado como marcador de NO. Seus valores foram aferidos em µM e depois de multiplicados pelo volume de cada amostra, em microlitros, foram convertidos em µmol e então divididos pelo tempo de coleta, em minutos, com os resultados finais apresentados em micromoles por minuto (µmol/min).

As análises do FIR de cGMP (número de catálogo: 581021; Cayman Chemical) e 8-isoprostano (número de catálogo: 516351; Cayman Chemical) foram realizadas através do uso de kits de EIA competitivos e específicos para a quantificação de cada uma destas moléculas. cGMP e 8-isoprostano foram aferidos em pmol/ml, depois convertidos em fmol/µl e, como nas variáveis acima, foram multiplicados pelo volume de cada amostra, em microlitros, e depois de divididos pelo tempo de coleta foram apresentados em femtomoles por minuto (fmol/min).

3.1.6 Análise imunohistoquímica renal de NF-κB.

Na análise imunohistoquímica de NF-κB, foram utilizadas amostras congeladas do tecido renal. Estas amostras foram adequadamente preparadas em lâminas individuais e, a seguir, incubadas *overnight* na temperatura de 4°C contra anticorpos monoclonais primários de camundongo anti- NF-κB p65 na diluição de 1:100 (número sc-8008, Santa Cruz Biotechnology, EUA). NF-κB p65 é uma das subunidades do complexo protéico transcripcional NF-κB e tem um papel crucial nas suas respostas inflamatórias e imunes. No dia seguinte, cada lâmina foi incubada por 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpos secundários. Controles negativos foram incluídos pela omissão do anticorpo primário. As deposições

imunohistoquímicas renais de NF- κ B p-65 foram analisadas de modo qualitativo e suas imagens representativas verificadas em cada grupo de ratos. Estas deposições imunohistoquímicas adquiriram a coloração rosa e foram capturadas por microscopia óptica, com um aumento final de 200 vezes, através do uso de um microscópio ótico modelo Qimaging Micropublisher 5.0 RTV, acoplado a uma câmera Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Germany).

3.1.7 Análise morfológica renal com ácido periódico de Schiff (PAS).

Os blocos de tecido renal, inicialmente mantidos em solução de *Bouin*, foram preparados para as suas inclusões em blocos de parafina. Estes blocos foram cortados em micrótomo com cortes histológicos de 3 μ m e então montados em lâminas. Para as suas análises, as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 60 minutos e depois foram desparafinizadas através de uma sequência de três banhos de xilol e rehidratadas em concentrações diluídas e decrescentes de etanol. A seguir, as lâminas foram processadas com solução de PAS (Sigma), seguindo procedimento padrão. As deposições renais de PAS foram analisadas de modo qualitativo com o objetivo de se gerar imagens representativas da morfologia glomerular renal em cada grupo de ratos estudados. A solução de PAS adquiriu a coloração rosa escuro e foi principalmente observada nos glomérulos através do uso do microscópio e câmera descritos acima, com aumento final de 200 vezes.

3.1.8 Análise imunohistoquímica renal de fibronectina.

As lâminas parafinizadas, contendo o tecido renal com uma espessura de 3 μ m, foram desparafinizadas em soluções de xilol e etanol conforme protocolo acima. A seguir, as lâminas

foram processadas conforme protocolo específico de imonohistoquímica e então incubadas *overnight* na temperatura de 4°C, com anticorpos primários dirigidos contra anticorpos monoclonais de fibronectina de camundongo com diluição de 1:100 (número sc-18825, Santa Cruz Biothechnology, EUA). No dia seguinte, as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora com anticorpos secundários. As deposições imunohistoquímicas de fibronectina foram analisadas de modo qualitativo com o objetivo de gerarem imagens representativas das regiões túbulo-intersticiais renais de cada grupo de ratos estudados. Suas deposições adquiriram a coloração marrom escura e foram principalmente observadas nos túbulos renais através do uso do microscópio e câmera descrito acima, com aumento final de 200 vezes.

3.1.9 Determinação das expressões do mRNA renal de TNF- α , IL-6, TGF- β 1 e NF- κ B.

O método da transcriptase reversa seguido da reação em cadeia da polimerase (*real-time* RT-PCR) foi usado para a determinação das expressões renais do mRNA de TNF- α , IL-6, TGF- β 1 e NF- κ B. Em cada grupo de estudo, 5 animais foram selecionados para a análise do RNA. Os fragmentos de tecido renal, congelados em freezer -80°C, foram lisados e homogeneizados e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante aquoso formado foi então coletado e novamente centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. Após esta manobra, os materiais de RNA das amostras renais ficaram depositados no fundo de cada tubo e foram extraídos através do uso do reagente Trizol (Invitrogen, EUA). A transcrição reversa do RNA foi realizada pelo uso de um kit com a síntese da primeira cadeia de cDNA (Bio-Rad, EUA). O RT-PCR quantitativo foi analisado usando SYBR Green Supermix (Bio-Rad). As

sequências dos *primers* utilizados foram: TNF- α *forward*, 5'-ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA-3', *reverse*, 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'; IL-6 *forward*, 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', *reverse*, 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3'; TGF- β 1 *forward*, 5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3', *reverse*, 5'-TGGGACTGATCCCATTGATT-3'; NF- κ B *forward*, 5'-CTATAGGGCTCGAGCGGCCGC-3', *reverse*, 5'-AACGGAAACGCATGCCCCGC-3'; 18S rRNA *forward*, 5'-CGAAAGCATTGCCAAGAAT-3', *reverse*, 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'. RT-PCR foi realizado através do uso de iCycler (Bio-Rad), sendo os números de ciclos determinados pela versão 3.0 do software iCycler. As reações foram realizadas em triplicata e os resultados calculados pela média de todos os ciclos. Os resultados de mRNA para cada específico gene-alvo foram calculados pela sua normatização com o gene estrutural 18s rRNA.

3.1.10 Análise da expressão protéica renal de TGF- β 1: *Western Blotting*.

As amostras congeladas dos tecidos renais foram lisadas e homogeneizadas conforme protocolo padrão. Em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C. A incubação primária foi feita com anticorpos de coelho para TGF- β 1 (número 3711; Cell Signaling Technology, EUA). A detecção do sinal foi realizada pelo uso do substrato SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida, as membranas foram tratadas com Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher), seguindo as recomendações padrões do fabricante, e então preparadas com o anticorpo contra o gene estrutural β -actina (Sigma). A avaliação densitométrica das bandas foi feita com o uso do software versão 2.0 da ImageMaster TotalLab (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). As

densidades das bandas da proteína alvo foram normalizadas com as densidades correspondentes das bandas de β -actina. As unidades arbitrárias das densidades de cada banda foram representadas pelo cálculo de suas expressões numéricas.

3.2 PROTOCOLO 2.

Este protocolo de estudo investigou os efeitos da estimulação direta do receptor AT2 pelo C21 sobre a excreção urinária de albumina, produção das moléculas inflamatórias TNF- α e IL-6, formação de NO, cGMP e 8-isoprostano e expressão do receptor AT2 em rins de ratos diabéticos. Os experimentos foram conduzidos em ratos Sprague-Dawley machos (Charles River), com peso corpóreo inicial aproximado de 250 gramas. Os ratos receberam água *ad libitum* e dieta normal em sódio durante todo o transcorrer do estudo.

3.2.1 Grupos experimentais de ratos normoglicêmicos e diabéticos.

Os ratos foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos, contendo um total de 10 animais cada:

1. Normoglicêmico + Veículo; ratos não diabéticos que receberam veículo.
2. Normoglicêmico + C21; ratos não diabéticos tratados com C21.
3. DM + Veículo; ratos diabéticos que receberam veículo.
4. DM + C21; ratos diabéticos tratados com C21.

Diabetes foi induzido pela injeção IP de 65 mg/kg de STZ (Sigma). Ratos controles foram injetados por via IP com um volume igual de veículo (solução salina a 0,9%). Os tratamentos foram iniciados no dia subsequente a injeção de STZ e mantidos por um período total de 4 semanas. C21 foi cedido pela empresa Vicore (Uppsala, Suécia) e infundido, continuamente, através de mini-bombas de infusão osmótica, modelo 2002 (Alzet), na dose de 0,3 mg/kg/dia. A indução de diabetes e o implante das mini-bombas de infusão osmótica seguiram protocolo

similar ao anteriormente descrito no protocolo 1. O grupo normoglicêmico e o diabético que receberam veículo também foram implantados com mini-bombas de infusão osmótica (Alzet) contendo solução salina a 0,9%.

3.2.2 Determinação do peso corpóreo, glicemia de jejum, urina de 24 horas e PA sistólica.

Peso corpóreo, glicemia de jejum, volume urinário de 24 h e medidas da PA sistólica foram avaliados no período imediatamente anterior a indução do diabetes e no final do estudo. As coletas destas variáveis foram realizadas de forma similar aos procedimentos descritos no protocolo 1. As amostras de urina de 24 horas foram utilizadas para a análise das excreções urinárias de albumina (BIO-RAD) e de creatinina (Cayman), com os seus valores utilizados para o cálculo da RAC. A RAC foi utilizada como marcador de albuminúria em nossos experimentos e seus resultados apresentados em miligramas de albumina por grama de creatinina (mg/g).

3.2.3 Coleta do FIR *in vivo* através da técnica de microdiálise renal.

No final do estudo, cada animal foi anestesiado com pentobarbital sódico e submetido à técnica de microdiálise renal. Os procedimentos associados com a microdiálise renal foram similares aos anteriormente detalhados no protocolo 1. O FIR, coletado nestes procedimentos, foi utilizado para a análise das concentrações renais das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 e dos marcadores de estresse oxidativo NO, cGMP e 8-isoprostano.

No final de cada experimento, os dois rins foram removidos e pesados em uma mini balança digital. A seguir, os animais foram sacrificados conforme descrito anteriormente. Os

tecidos renais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para posterior análise pelas técnicas de RT-PCR e *Western blot*.

3.2.4 Análises dos níveis do FIR de TNF- α , IL-6, NO, cGMP e 8-isoprostano.

Após o descongelamento das amostras de urina, o material foi imediatamente utilizado nos procedimentos analíticos de ensaio imunoenzimático de modo similar aos descritos no protocolo 1. Para a análise das concentrações do FIR de TNF- α e IL-6 foram utilizados kits comerciais de EIA específicos para estas moléculas (R&D Systems), com os seus resultados apresentados em picogramas por minuto (pg/min). Os níveis do FIR de NO foram avaliados através do uso de um kit de ensaio fluorimétrico (Cayman Chemical) e apresentados em micromoles por minuto ($\mu\text{mol/min}$). As análises dos níveis do FIR de cGMP e 8-isoprostano foram realizadas através do uso de kits comerciais de EIA (Cayman), específicos para cada uma destas substâncias, e apresentados em femtomoles por minuto (fmol/min).

3.2.5 Determinação das expressões do mRNA renal de TNF- α , IL-6 e do receptor AT2.

Real-time RT-PCR foi utilizado para a verificação das expressões renais do mRNA de TNF- α , IL-6 e do receptor AT2. Os procedimentos aqui realizados foram similares aos anteriormente descritos no protocolo 1. As sequências dos *primers* utilizados foram: TNF- α *forward*, 5'-ACTCCAGAAAAGCAAGCAA-3', *reverse*, 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'; IL-6 *forward*, 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', *reverse*, 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3'; receptor AT2 *forward*, 5'-TTCTTGGGAGCAAACAGACC-3', *reverse*, 5'-CTGGAACTGTGCCAGAAAT-3'; 18S rRNA

forward, 5'-CGAAAGCATTTGCCAAGAAT-3', *reverse*, 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'. As reações foram realizadas em triplicata e os resultados calculados pela média de todos os ciclos. Os resultados de mRNA para cada específico gene-alvo foram quantificados através da sua normatização com o gene estrutural 18s rRNA.

3.2.6 Análise da expressão protéica do receptor AT2: *Western Blotting*.

Os procedimentos aqui realizados para extração protéica do receptor AT2 foram similares às técnicas descritas no protocolo 1. A incubação primária foi realizada *overnight* com anticorpos específicos para o receptor AT2 (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Após a extração de proteínas, as membranas foram preparadas com o anticorpo contra o gene estrutural β -actina (Sigma). As densidades das bandas das proteínas do receptor AT2 foram normatizadas com a correspondente densidade das bandas de β -actina. As unidades arbitrárias das densidades de cada banda foram representadas pelo cálculo de sua expressão numérica.

3.3 Análise estatística

As comparações entre todos os grupos, em cada protocolo de estudo, foram analisadas através do teste de Análise de Variância *one-way* (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Utilizou-se o teste *t* de *Student*, com distribuição bi-caudal, na comparação de variáveis pareadas para avaliar as diferenças entre a média dos resultados de dois grupos distintos. Todos os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 PROTOCOLO 1.

As medidas de peso corpóreo, glicemia de jejum, volume urinário de 24 horas e PA sistólica, avaliadas no período basal e no final do período de seis semanas de estudo, e o índice de massa renal total, obtido no final do estudo, são mostrados na Tabela 1. No período basal, as comparações destas variáveis, entre todos os grupos estudados, não mostraram diferenças estatísticas. No final do estudo, o peso corpóreo foi significativamente reduzido em todos os ratos diabéticos em relação aos normoglicêmicos controles. Entre todos os grupos de ratos estudados, o valor médio da glicemia de jejum foi de 91 ± 1 mg/dl no período basal, enquanto nos grupos de ratos diabéticos foi de 339 ± 4 mg/dl ($P < 0,001$) uma semana após a indução de diabetes. A glicemia de jejum se manteve elevada nos ratos diabéticos durante todo o transcorrer do estudo com valor médio de 482 ± 8 mg/dl no final do estudo. O volume urinário de 24 horas dos ratos diabéticos foi substancialmente mais elevado do que o volume observado no seu período basal ou na comparação com os ratos normoglicêmicos controles. O índice de massa renal total foi quase duas vezes mais elevado nos grupos de ratos diabéticos do que no grupo normoglicêmico controle. As análises da PA sistólica, tanto no período basal como no final do estudo, não mostraram diferenças significativas nas comparações entre o grupo normoglicêmico controle com os grupos de ratos diabéticos e também entre os grupos de ratos diabéticos. É interessante notar que as diferentes terapias farmacológicas utilizadas nos ratos diabéticos não causaram alterações significativas nas variáveis descritas acima, inclusive em relação a PA sistólica.

		DIABETES								
		NG Controle	Veículo	Alisq	HCTZ	Amlo	HCTZ + Amlo	Alisq + HCTZ	Alisq + Amlo	Alisq + HCTZ + Amlo
VARIÁVEIS										
Peso g	basal	248±2	245±2	249±2	245±3	245±2	251±2	249±2	250±2	247±4
	final	480±11	300±20*	297±11*	304±10*	311±13*	285±5*	315±14*	293±11*	287±10*
Glic mg/dL	basal	93±2	94±2	91±2	92±2	92±2	89±4	89±3	91±3	60±2
	final	88±3	499±29*	473±30*	488±12	488±19*	519±24*	490±21*	459±25*	445±18*
Vol Ur ml	basal	13±2	13±2	12±1	14±1	13±1	13±2	10±1	14±2	22±3
	final	24±3	205±16*	183±10*	199±14*	184±9*	168±10*	180±17*	175±10*	188±8*
IMRT mg/g	final	6,3±0,1	11±0,6*	11±0,4*	11±0,3*	11±0,4*	12±0,6*	10±0,3*	10±0,3*	10±0,4*
PAS mmHg	basal	113±0,7	113±0,7	113±0,5	113±0,4	113±0,3	114±0,9	114±0,6	114±0,6	111±1
	final	112±0,4	113±0,5	113±1,6	112±1,1	112±0,5	112±0,4	113±0,7	112±0,3	113±0,9

TABELA 1. Características dos animais no período basal e no final do estudo no protocolo 1. Peso corpóreo, glicemia de jejum (Glic), volume urinário de 24 horas (Vol Ur), índice de massa renal total (IMRT) e pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos no final do estudo. Alisq = alisquireno; HCTZ = hidroclorotiazida; Amlo = amlodipina. Dados apresentados como média ± EP. $P < 0,05$ vs. NG controle.

4.1.1 Concentrações de Ang II no FIR.

Comparados com os ratos normoglicêmicos controles, os níveis de Ang II no FIR (Figura 3) foram 69% mais elevados nos ratos diabéticos controles ($3,8 \pm 0,3$ vs. $6,4 \pm 0,3$ pg/ml, respectivamente; $P < 0,001$). Comparados com os ratos diabéticos controles, os níveis renais de Ang II foram reduzidos em 27% nos ratos diabéticos tratados com alisquireno isolado ($4,7 \pm 0,3$ pg/ml; $P < 0,01$) ou associado com HCTZ ($4,7 \pm 0,3$ pg/ml; $P < 0,01$), 35% nos com alisquireno e amlodipina ($4,2 \pm 0,2$ pg/ml; $P < 0,001$) e 28% naqueles tratados com alisquireno e HCTZ e amlodipina ($4,6 \pm 0,3$ pg/ml; $P < 0,01$), mas seus valores não foram estatisticamente diferentes nos ratos tratados com HCTZ ($5,7 \pm 0,2$ pg/ml) ou amlodipina ($5,5 \pm 0,4$ pg/ml) isolados ou combinados ($5,7 \pm 0,5$ pg/ml). Além disso, comparado com o grupo de ratos diabéticos tratados

com HCTZ isolado, os níveis renais de Ang II foram significativamente reduzidos nos ratos tratados com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos. As comparações com os ratos diabéticos tratados com amlodipina isolado mostraram uma redução significativa dos níveis renais de Ang II nos tratados com a combinação de alisquireno e amlodipina.

Figura 3. Concentrações de Ang II no fluido intersticial renal (FIR). Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo ou alisquireno (Alisq) ou hidroclorotiazida (HCTZ) ou amlodipina (Amlo) isolados ou combinados. Os dados são média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG controle; † $P < 0,05$ vs DM + Veículo; ‡ $P < 0,05$ vs. DM + HCTZ; § $P < 0,05$ vs. DM + Amlo.

4.1.2 Expressões renais de mRNA e concentrações no FIR de TNF- α e IL-6.

As expressões renais de mRNA e as concentrações renais de TNF- α e IL-6 são mostradas na Figura 4. As análises do mRNA renal de TNF- α (A) e IL-6 (B) mostraram um aumento de 2,1 e 2,3 vezes, respectivamente, nos ratos diabéticos controles comparados com os

normoglicêmicos controles. Os mRNAs renais destes marcadores inflamatórios, comparados com os ratos diabéticos controles, foram significativamente reduzidos nos ratos tratados com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos, mas não foram alterados pelos tratamentos com HCTZ ou amlodipina isolados ou combinados.

Os níveis do FIR de TNF- α (C) e IL-6 (D), comparados com os ratos normoglicêmicos controles ($0,061 \pm 0,001$ e $0,638 \pm 0,010$ pg/min, respectivamente), foram significativamente mais elevados nos ratos diabéticos controles ($0,079 \pm 0,002$ e $0,682 \pm 0,004$ pg/min; $P < 0,01$). Comparados com os ratos diabéticos controles, os níveis do FIR de TNF- α e IL-6 foram reduzidos nos ratos tratados com alisquireno isolado ($0,068 \pm 0,003$ e $0,658 \pm 0,007$ pg/min; $P < 0,01$), amlodipina isolado ($0,071 \pm 0,002$ e $0,657 \pm 0,006$ pg/min; $P < 0,02$) ou combinado com HCTZ ($0,070 \pm 0,003$ e $0,654 \pm 0,010$ pg/min; $P < 0,03$), alisquireno combinado com HCTZ ($0,057 \pm 0,002$ e $0,649 \pm 0,003$ pg/min; $P < 0,001$) ou amlodipina ($0,060 \pm 0,002$ e $0,650 \pm 0,002$ pg/min; $P < 0,001$) ou ambos ($0,058 \pm 0,002$ e $0,647 \pm 0,005$ pg/min; $P < 0,001$), mas não foram alterados pelo tratamento com HCTZ isolado ($0,074 \pm 0,002$ e $0,673 \pm 0,007$ pg/min).

Nas comparações com o grupo de ratos diabéticos tratados com HCTZ isolado, tanto a expressão renal de mRNA como os níveis do FIR de TNF- α e IL-6 foram significativamente menores nos ratos diabéticos tratados com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos. Comparados com o tratamento com amlodipina isolado, o mRNA renal e os níveis do FIR de TNF- α foram reduzidos pelos tratamentos combinados de alisquireno e amlodipina ou alisquireno e HCTZ e amlodipina e o mRNA renal de IL-6 também foi reduzido nos ratos tratados com alisquireno e HCTZ e amlodipina, mas tanto o mRNA como o FIR de IL-6 não foram diferentes nas comparações com os outros grupos de ratos.

Figura 4. Expressões renais do mRNA e concentrações no fluido intersticial renal (FIR) do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e interleucina (IL)-6. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) recebendo veículo (V) ou alisquireno (Alisq) ou hidroclorotiazida (HCTZ) ou amlodipina (Amlo) isolados ou combinados. A e B: mRNA de TNF-α e IL-6, respectivamente. C e D: FIR de TNF-α e IL-6. Os dados são média ± EP. * $P < 0,05$ vs. NG controle; † $P < 0,05$ vs DM + V; ‡ $P < 0,05$ vs. DM + HCTZ; § $P < 0,05$ vs. DM + Amlo.

4.1.3 Expressões renais de mRNA e proteína de TGF-β1.

As expressões renais de mRNA e proteína de TGF-β1 (Figura 5) tiveram um aumento significativo de cerca de 1,5 vezes nos ratos diabéticos controles, comparados com os normoglicêmicos controles. Comparado com os ratos diabéticos controles, as expressões renais

de mRNA e proteína de TGF- β 1 foram significativamente reduzidas nos ratos diabéticos tratados com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos, enquanto amlodipina isolado reduziu o mRNA renal de TGF- β 1 mas não a sua expressão protéica. O tratamento com HCTZ isolado ou combinado com amlodipina não alterou as expressões renais de mRNA e proteína de TGF- β 1. As comparações com os ratos diabéticos tratados com HCTZ isolado mostraram que o mRNA renal de TGF- β 1 foi reduzido nos ratos tratados com alisquireno isolado ou combinado com amlodipina ou com HCTZ e amlodipina enquanto que a proteína de TGF- β 1 foi reduzida somente nestes dois últimos grupos de ratos. Comparado com os ratos diabéticos tratados com amlodipina isolado, as expressões renais de mRNA e proteína foram reduzidas nos ratos tratados com a combinação de alisquireno e HCTZ e amlodipina. Os tratamentos com alisquireno e amlodipina também reduziram a expressão protéica de TGF- β 1, mas não o seu mRNA.

Figura 5. Expressões renais do mRNA e proteína do fator de crescimento transformacional-beta 1 (TGF-β1). Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo, alisquireno (Alisq), hidroclorotiazida (HCTZ), amlodipina (Amlo) isolados ou combinados. A, mRNA de TGF-β1. B, *Western blot* de TGF-β1; os resultados quantitativos foram normalizados para β-actina. n = 5, cada grupo. Os dados são média ± EP. *P < 0,05 vs. NG controle; †P < 0,05 vs DM + V; ‡P < 0,05 vs. DM + HCTZ; §P < 0,05 vs. DM + Amlo.

4.1.4 Expressão renal do mRNA e representação imunoquímica de NF-κB.

A expressão renal do mRNA de NF-κB (Figura 6) foi cerca de 2 vezes maior nos ratos diabéticos controles, comparados com os normoglicêmicos controles. Comparada com os ratos

diabéticos controles, sua expressão renal foi significativamente reduzida nos ratos tratados com alisquireno ou amlodipina isolados ou com alisquireno combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos, mas não foi alterada pelos tratamentos com HCTZ isolado ou combinado com amlodipina. Comparado com os ratos diabéticos tratados com HCTZ, o mRNA renal de NF- κ B foi reduzido com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos. A combinação de alisquireno e HCTZ e amlodipina também reduziu o mRNA renal de NF- κ B, comparado com o tratamento com amlodipina isolado.

Figura 6. Expressões renais do mRNA de NF- κ B. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo ou alisquireno (Alisq) ou hidroclorotiazida (HCTZ) ou amlodipina (Amlo) isolados ou combinados. $n = 5$, cada grupo. Os dados são média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG controle; † $P < 0,05$ vs. DM + V; ‡ $P < 0,05$ vs. DM + HCTZ; § $P < 0,05$ vs. DM + Amlo.

As imagens representativas da análise imunohistoquímica qualitativa de NF- κ B p65, coradas em marrom escuro (Figura 7), mostraram a sua deposição renal localizada, predominantemente, no glomérulo renal e esteve de acordo com os dados verificados na

análise do seu mRNA. Comparado com o grupo normoglicêmico controle (A), as deposições glomerulares de NF- κ B p65 foram maiores no grupo diabético controle (B) e nos tratados com HCTZ isolado (D) ou combinado com amlodipina (F). As comparações entre os grupos de ratos diabéticos mostraram que as deposições glomerulares de NF- κ B p-65 foram menores nos ratos tratados com alisquireno isolado (C) ou combinado com HCTZ (G) ou alisquireno (H) ou ambos (I) e nos tratados com amlodipina isolado (E).

Figura 7. Imagens representativas da deposição glomerular renal de NF- κ B p65. Ratos normoglicêmicos controles (A) e diabéticos tratados com veículo (B), alisquireno (C), hidroclorotiazida (HCTZ; D), amlodipina (E), HCTZ + amlodipina (F), alisquireno + HCTZ (G), alisquireno + amlodipina (H) e alisquireno + HCTZ + amlodipina (I). As deposições glomerulares de NF- κ B p65 (marrom escuro) foram maiores nos ratos diabéticos controles e nos tratados com HCTZ isolado e foram reduzidas nos outros grupos de ratos. Ampliação x200.

4.1.5 Níveis do FIR de NO, cGMP e 8-isoprostano.

Os níveis do FIR de NO (Figura 8A) e cGMP (Figura 8B), comparados com os ratos normoglicêmicos controles ($4,3 \pm 0,5$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $4,4 \pm 0,7$ fmol/min , respectivamente), foram reduzidos em 35% e 47%, respectivamente, nos ratos diabéticos controles ($2,8 \pm 0,3$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $2,3 \pm 0,3$ fmol/min ; $P < 0,04$). Comparados com os ratos diabéticos controles, os níveis do FIR de NO e cGMP aumentaram em 36% e 67% com os tratamentos com alisquireno isolado ($3,8 \pm 0,3$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $3,9 \pm 0,6$ fmol/min ; $P < 0,04$), 46% e 84% com amlodipina isolado ($4,1 \pm 0,5$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $4,3 \pm 0,8$ fmol/min ; $P < 0,05$), 50% e 96% com amlodipina e HCTZ ($4,2 \pm 0,4$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $4,6 \pm 0,7$ fmol/min ; $P < 0,03$), 65% e 114% com alisquireno e HCTZ ($4,6 \pm 0,5$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $5,0 \pm 1,0$ fmol/min ; $P < 0,01$), 72% e 162% com alisquireno e amlodipina ($4,8 \pm 0,4$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $6,1 \pm 0,8$ fmol/min ; $P < 0,001$) e 75% e 157% com alisquireno e HCTZ e amlodipina ($4,9 \pm 0,6$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ e $6,0 \pm 0,7$ fmol/min ; $P < 0,01$). Seus valores não foram influenciados pelo tratamento com HCTZ isolado. Comparado com HCTZ isolado, tratamentos com amlodipina isolado ou combinado com HCTZ e alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos aumentaram de modo significativo as concentrações do FIR de NO e cGMP.

As análises dos níveis do FIR de 8-isoprostano (Figura 8C) mostraram um aumento de 49% nos ratos diabéticos controles (162 ± 10 fmol/min) comparados com os normoglicêmicos controles (109 ± 8 fmol/min ; $P < 0,001$). Comparados com os ratos diabéticos controles, as concentrações renais de 8-isoprostano não foram estatisticamente alteradas pelo tratamento com HCTZ (154 ± 3 fmol/min) ou amlodipina (142 ± 6 fmol/min) isolados ou combinados (157 ± 9 fmol/min), mas foram reduzidas em 18% com alisquireno isolado (132 ± 8 fmol/min ; $P <$

0,05), 16% com alisquireno e HCTZ (136 ± 7 fmol/min; $P < 0,05$), 22% com alisquireno e amlodipina (126 ± 8 fmol/min; $P < 0,02$) e 18% com alisquireno e HCTZ e amlodipina (132 ± 5 fmol/min; $P < 0,05$). Comparados com HCTZ isolado, os níveis do FIR de 8-isoprostano foram reduzidos nos ratos tratados com alisquireno isolado (-14%; $P < 0,02$) ou combinado com HCTZ (-12%; $P < 0,04$) ou amlodipina (-14%; $P < 0,01$) ou ambos (-18%; $P < 0,01$).

Figura 8. Concentrações renais no fluido intersticial renal (FIR) de óxido nítrico (NO), cGMP, e 8-isoprostano. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo, alisquireno (Alisq), hidroclorotiazida (HCTZ) e amlodipina (Amlo) isolados ou combinados. Óxido nítrico (A), cGMP (B), e 8-isoprostano (C) Os dados são média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG controle; † $P < 0,05$ vs. DM + veículo; ‡ $P < 0,05$ vs. DM + HCTZ.

4.1.6 Deposição glomerular renal de PAS.

As análises qualitativas de PAS (Figura 9) mostraram as suas deposições renais, visualizadas em rosa escuro, localizadas principalmente nos glomérulos renais. Comparado com os ratos normoglicêmicos controles (A), as deposições renais de PAS foram mais intensas nos glomérulos renais dos ratos diabéticos controles (B) e nos tratados com HCTZ (D) ou amlodipina (E) isolados ou combinados (F). Comparados com os ratos diabéticos controles, as deposições renais de PAS foram menores nos tratados com alisquireno isolado (C) ou combinado com HCTZ (G) ou amlodipina (H) ou ambos (I).

Figura 9. Imagens representativas da deposição glomerular renal do Ácido Periódico de Schiff (PAS). Ratos normoglicêmicos controles (A) e diabéticos tratados com veículo (B), alisquireno (C), hidroclorotiazida (HCTZ; D), amlodipina (E), HCTZ + amlodipina (F), alisquireno + HCTZ (G), alisquireno + amlodipina (H) e alisquireno + HCTZ + amlodipina (I). A deposição de PAS (rosa escuro) foi aumentada nos glomérulos de ratos diabéticos tratados com veículo, HCTZ ou amlodipina isolados ou combinados e foi reduzida com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina. Ampliação x200.

4.1.6 Deposição túbulo-intersticial renal de fibronectina.

As análises qualitativas das deposições renais de fibronectina (Figura 10) mostraram suas deposições renais, visualizadas em marrom escuro, localizadas principalmente na região túbulo-intersticial renal. As deposições renais de fibronectina, comparadas com os ratos normoglicêmicos controles (A), foram maiores nos ratos diabéticos controles (B) e nos tratados com HCTZ (D) ou amlodipina (E) isolados ou combinados (F). Comparadas com os ratos diabéticos controles, as deposições renais de fibronectina foram menores nos ratos tratados com alisquireno isolado (C) ou combinado com HCTZ (G) ou amlodipina (H) ou ambos (I).

Figura 10. Imagens representativas da deposição tubular renal de fibronectina. Ratos normoglicêmicos controles (A) e diabéticos tratados com veículo (B), alisquireno (C), hidroclorotiazida (HCTZ; D), amlodipina (E), HCTZ + amlodipina (F), alisquireno + HCTZ (G), alisquireno + amlodipina (H) e alisquireno + HCTZ + amlodipina (I). As deposições imunohistoquímicas de fibronectina (marrom escuro) foram maiores nos ratos diabéticos controles e nos tratados com HCTZ ou amlodipina isolados ou combinados e foram reduzidas nos outros grupos de ratos diabéticos. Ampliação x200

4.1.7 Excreções urinárias de aldosterona.

No final do período de estudo de seis semanas, as excreções urinárias de aldosterona (Figura 11), comparadas com os ratos normoglicêmicos controles, foram significativamente mais elevadas nos ratos diabéticos controles ($0,13 \pm 0,02$ vs. $1,89 \pm 0,24$ ng/dia, respectivamente; $P < 0,0001$). Comparada com os ratos diabéticos controles, a aldosterona urinária foi reduzida com os tratamentos com alisquireno isolado ($1,07 \pm 0,12$ ng/dia; $P < 0,01$) ou combinado com HCTZ ($1,16 \pm 0,10$ ng/dia; $P < 0,02$) ou amlodipina ($1,06 \pm 0,06$ ng/dia; $P < 0,01$) ou ambos ($1,03 \pm 0,06$ ng/dia; $P < 0,01$) e também com amlodipina isolado ($0,89 \pm 0,08$ ng/dia; $P < 0,001$) ou combinado com HCTZ ($1,14 \pm 0,10$ ng/dia; $P < 0,01$), mas não foram alteradas pelo tratamento com HCTZ isolado ($1,76 \pm 0,19$ ng/dia). Comparadas com os ratos diabéticos tratados com HCTZ isolado, as concentrações urinárias de aldosterona foram menores nos ratos tratados com alisquireno ou amlodipina isolados, amlodipina combinado com HCTZ ou alisquireno combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos.

Figura 11. Excreção urinária de aldosterona. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo, alisquireno (Alisq) ou hidroclorotiazida (HCTZ) ou amlodipina (Amlo) isolados ou combinados. Dados são a média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG controle; † $P < 0,05$ vs. DM + veículo; ‡ $P < 0,05$ vs. DM + HCTZ.

4.1.8 Excreções urinárias de albumina.

No final do período de seis semanas de estudo, todos os grupos de ratos diabéticos, independente do tratamento, apresentaram aumento significativo da albuminúria (Figura 12). Comparada com os ratos normoglicêmicos controles, a RAC aumentou significativamente nos ratos diabéticos controles ($5,5 \pm 0,5$ vs. $57,8 \pm 5$ mg/g; $P < 0,001$). Comparada com os ratos diabéticos controles, a RAC diminuiu nos ratos tratados com alisquireno isolado ($37,5 \pm 0,5$ mg/g; $P < 0,04$) ou combinado com HCTZ ($33,0 \pm 0,5$ mg/g; $P < 0,01$) ou amlodipina ($24,7 \pm 0,5$ mg/g; $P < 0,001$) ou ambos ($27,0 \pm 0,5$ mg/g; $P < 0,01$). A RAC não foi alterada nos grupos de ratos tratados com HCTZ ($48,7 \pm 0,5$ mg/g) ou amlodipina ($47,0 \pm 0,5$ mg/g) isolados ou

combinados ($47,2 \pm 0,5$ mg/g). Comparados com os ratos diabéticos tratados com HCTZ isolado, a RAC foi reduzida com os tratamentos com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ ou amlodipina ou ambos. As comparações com os ratos diabéticos tratados com amlodipina isolado mostraram níveis menores da RAC nos ratos tratados com as combinações de alisquireno e amlodipina (-46%, $P < 0,001$) ou com alisquireno e HCTZ e amlodipina (-41%, $P < 0,001$). As comparações com o grupo de ratos diabéticos tratados com alisquireno isolado mostraram que a RAC foi ainda menor nos ratos tratados com as combinações de alisquireno e amlodipina (-34%, $P < 0,01$) ou alisquireno e HCTZ e amlodipina (-28%, $P < 0,03$).

Figura 12. Relação da excreção urinária de albumina sobre creatinina no protocolo 1. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo, alisquireno (Alisq) ou hidroclorotiazida (HCTZ) ou amlodipina (Amlo) isolados ou combinados no período basal (barras abertas) e após seis semanas da indução do diabetes e do início dos tratamentos (barras sólidas). Os dados são média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG controle; † $P < 0,05$ vs. DM + V; ‡ $P < 0,05$ vs. DM + HCTZ; § $P < 0,05$ vs. DM + Amlo; || $P < 0,05$ vs. DM + Alisk.

4.2 PROTOCOLO 2.

Como observado no protocolo 1, as análises do peso corpóreo, glicemia de jejum, índice de massa renal total, volume urinário de 24 horas e PA sistólica mostraram resultados similares entre os diversos grupos no período basal (Tabela 2). No final do estudo, o peso corpóreo foi substancialmente reduzido e o índice de massa renal total foi maior nos grupos de ratos diabéticos do que nos normoglicêmicos controles. A glicemia de jejum média dos ratos diabéticos foi de 71 ± 3 mg/dl no período basal e de 486 ± 19 mg/dl ($P < 0,001$) após 4 semanas da indução do diabetes. Tanto nos grupos de ratos normoglicêmicos controles como nos diabéticos, tratamento com C21 não promoveu alterações significativas nestas variáveis. Os valores de PA sistólica não foram estatisticamente diferentes nas comparações entre os diferentes grupos estudados.

		NG Controle		Diabetes	
		Veículo	C21	Veículo	C21
Peso <i>gramas</i>	basal	234±3	232±2	236±3	236±3
	final	411±14	389±10	291±10*‡	288±10*‡
Glicemia <i>mg/dl</i>	basal	69±4	70±3	72±4	70±4
	final	83±5	78±2	473±27*‡	499±26*‡
Volume urinário <i>ml</i>	basal	16±2	15±1	14±1	15±1
	final	31±4	40±4	217±12*‡	215±7*‡
IMRT <i>mg/g</i>	final	6,4±0,14	6,6±0,15	11,0±0,36*‡	10,5±0,34*‡
PA sistólica <i>mmHg</i>	basal	108±0,7	112±1,1	110±1,1	111±1,0
	final	111±1,1	115±1,2	112±0,9	120±3

Tabela 2. Características dos animais no período basal e no final do estudo no protocolo 2. Peso corpóreo, glicemia de jejum, volume urinário de 24 horas, índice de massa renal total (IMRT) e pressão arterial (PA) sistólica no período basal e no final do estudo em ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos recebendo veículo ou composto 21 (C21). Os valores são a média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG Controle + Veículo; ‡ $P < 0,05$ vs. NG Controle + C21.

4.2.1 Expressões renais do mRNA e do FIR de TNF- α e IL-6.

As análises das expressões renais do mRNA e dos níveis do FIR de TNF- α e IL-6 são apresentadas na Figura 13. As expressões do mRNA renal destes dois marcadores inflamatórios aumentaram cerca de 2 vezes nos ratos diabéticos recebendo veículo comparados com os normoglicêmicos recebendo veículo. O mRNA renal dos ratos diabéticos recebendo veículo não foi estatisticamente diferente dos ratos diabéticos tratados com C21, embora uma tendência de redução nos mRNAs renais de TNF- α e IL-6 tenham sido observadas neste último grupo de ratos.

Os níveis do FIR de TNF- α e IL-6, comparados com os ratos normoglicêmicos controles recebendo veículo, aumentaram significativamente nos ratos diabéticos recebendo veículo ($0,040 \pm 0,001$ vs. $0,046 \pm 0,001$ pg/min, respectivamente; $P < 0,01$) e IL-6 ($0,61 \pm 0,01$ pg/min vs. $0,65 \pm 0,01$; $P < 0,01$). As comparações entre os grupos de ratos diabéticos mostraram que o tratamento com C21 reduziu de modo significativo os níveis do FIR de TNF ($0,041 \pm 0,001$ pg/min; $P < 0,01$) e IL-6 ($0,62 \pm 0,01$ pg/min; $P < 0,01$). As comparações entre os grupos de ratos normoglicêmicos mostraram que o tratamento com C21 não alterou significativamente o mRNA renal e os níveis do FIR de TNF- α ($0,041 \pm 0,001$ pg/min; $P < 0,01$) e IL-6 ($0,62 \pm 0,01$ pg/min; $P < 0,01$).

Figura 13. Expressões renais do mRNA e níveis do fluido intersticial renal (FIR) do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e interleucina (IL)-6 após estimulação do receptor AT2 com C21. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) recebendo veículo ou composto C21 (C21). A e B: mRNA de TNF-α e IL-6, respectivamente. C e D: FIR de TNF-α e IL-6. Os dados são média $\pm$ EP. * $P < 0,05$ vs. NG Controle + Veículo; ‡ $P < 0,05$ vs. NG Controle + C21; † $P < 0,05$ vs. DM + Veículo.

4.2.2 Concentrações do FIR de NO, cGMP e 8-isoprostanos.

As comparações entre os ratos normoglicêmicos recebendo veículo com os ratos diabéticos recebendo veículo mostraram uma redução de 39% e 56%, respectivamente, nos níveis do FIR de NO ($7,0 \pm 0,3$ vs. $4,3 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/min}$; $P < 0,01$) e cGMP ($3,8 \pm 0,4$ vs. $1,7 \pm 0,2$

fmol/min; $P < 0,01$) (Figura 14). Entre os ratos diabéticos, tratamento com C21 aumentou de forma significativa em 46% e 60% os níveis do FIR de NO ($6,2 \pm 0,8 \mu\text{mol/min}$; $P < 0,04$) e cGMP ($2,7 \pm 0,4 \text{ fmol/min}$; $P < 0,04$). Comparado com os ratos normoglicêmicos recebendo veículo, os níveis do FIR de NO ($6,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/min}$; $P < 0,04$) e cGMP ($3,7 \pm 0,5 \text{ fmol/min}$) dos ratos normoglicêmicos recebendo C21 não foram estatisticamente diferentes.

As concentrações do FIR de 8-isoprostano, comparados com os ratos normoglicêmicos recebendo veículo, aumentaram em 17% nos rins dos ratos diabéticos recebendo veículo ($0,135 \pm 0,005$ vs. $0,158 \pm 0,007 \text{ fmol/min}$, respectivamente; $P < 0,02$). Na comparação entre os grupos de ratos diabéticos, tratamento com C21 reduziu significativamente em 14% os níveis do FIR de 8-isoprostano ($0,135 \pm 0,007$; $P < 0,01$). Porém, tratamento com C21 não promoveu alterações nas concentrações renais de 8-isoprostano na comparação entre os grupos de ratos normoglicêmicos ($0,134 \pm 0,010 \text{ fmol/min}$).

Figura 14. Níveis do fluido intersticial renal (FIR) de óxido nítrico (NO), cGMP e 8-isoprostanol após estimulação do receptor AT2 com C21. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo (V) ou composto C21 (C21). Dados são média $\pm$ EP. ^{*} $P < 0,05$ vs. NG Controle + V; [‡] $P < 0,05$ vs. NG Controle + C21; [†] $P < 0,05$ vs. DM + V.

4.2.3 Expressões renais do mRNA e proteína do receptor AT2.

Comparados com os ratos normoglicêmicos recebendo veículo, o mRNA renal do receptor AT2 nos ratos diabéticos recebendo veículo ou C21 aumentou 2 e 3 vezes ($P < 0,04$),

respectivamente, e a sua expressão protéica também foi 4 e 5 vezes mais elevada ($P < 0,04$) (Figura 15). As comparações entre os dois grupos de ratos diabéticos não mostraram diferenças estatísticas tanto para o mRNA renal como para a proteína do receptor AT2, embora uma tendência de aumento nas suas expressões renais tenha sido observada nos ratos diabéticos tratados com C21. Na comparação entre os grupos de ratos normoglicêmicos, tratamento com C21 também não alterou a expressão renal do receptor AT2.

Figura 15. Expressões renais do mRNA e proteína do receptor AT2 após estimulação do receptor AT2 com C21. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo (V) ou composto C21 (C21). A, mRNA do receptor AT2. B, *Western blot* do receptor AT2; os resultados quantitativos foram normalizados para β-actina. Os dados são média ± EP. * $P < 0,05$ vs. NG Controle + V; ‡ $P < 0,05$ vs. NG Controle + C21.

4.2.4 Excreção Urinária de Albumina.

No final do período de 4 semanas de estudo (barras sólidas), a RAC aumentou de forma significativa nos ratos diabéticos recebendo veículo ($60,0 \pm 3,0$; $P < 0,001$) ou C21 ($49,9 \pm 3,3$; $P < 0,001$) comparada com os ratos normoglicêmicos recebendo veículo ($13,9 \pm 2,1$ mg/g) ou C21 ($15,7 \pm 2,1$ mg/g) (Figura 16). A comparação entre os grupos de ratos diabéticos mostrou que o tratamento com C21 reduziu significativamente a RAC em 17% ($P < 0,04$). Porém, o tratamento com C21 não promoveu alterações na RAC na comparação entre os dois grupos de ratos normoglicêmicos. As comparações da RAC entre os diferentes grupos estudados, no período basal (barras abertas), não mostraram diferenças estatísticas.

Figura 16. Relação da excreção urinária de albumina sobre creatinina após estimulação do receptor AT2 com C21. Ratos normoglicêmicos (NG) controles e diabéticos (DM) tratados com veículo (V) ou composto C21 (C21) no período basal (barras abertas) e após quatro semanas da indução do diabetes e do início dos tratamentos (barras sólidas). Dados são média $\pm$ EP. * $P < 0,001$ vs. NG Controle + V; † $P < 0,001$ vs. NG Controle + C21; ‡ $P < 0,04$ vs. DM + V.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a inibição da renina pelo alisquireno e a estimulação do receptor AT2 pelo C21 promoveram efeitos benéficos renais por induzirem diminuição da inflamação e do estresse oxidativo renal, acompanhado de redução da albuminúria em um modelo experimental de nefropatia diabética em ratos com diabetes induzido por STZ, independente de variações da pressão arterial.

No diabetes, a presença de maior atividade do SRAA tem um papel crucial na patogênese da nefropatia diabética (14). Os efeitos benéficos da inibição do SRAA no diabetes foram demonstrados em estudos experimentais (17-18) e por grandes estudos clínicos realizados nas duas últimas décadas (19-21). Estes estudos foram determinantes para que a inibição farmacológica do SRAA fosse extensivamente recomendada como importante opção terapêutica na prevenção da nefropatia diabética em pacientes diabéticos.

Estudos anteriores demonstraram que a inibição da renina pelo alisquireno reduziu a pressão arterial (86) e também os níveis de proteinúria em estudos experimentais com ratos diabéticos transgênicos (84-85) e em estudos clínicos com pacientes diabéticos (87-89). No entanto, os mecanismos associados com os efeitos benéficos do alisquireno na nefropatia diabética não são totalmente esclarecidos. No presente estudo, os efeitos do alisquireno foram comparados com outros agentes anti-hipertensivos bem estabelecidos como o diurético HCTZ e o antagonista dos canais do cálcio amlodipina. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ e/ou amlodipina reduziram os níveis renais de Ang II, as excreções urinárias de aldosterona e de albumina, os marcadores inflamatórios renais TNF- α , IL-6 e TGF- β 1, e o fator de transcrição nuclear NF- κ B, acompanhado de menor deposição renal dos marcadores fibróticos PAS e fibronectina. Ao contrário,

tratamento com HCTZ isolado não promoveu alterações em nenhuma destas variáveis, mas também não reverteu os efeitos renoprotetores do alisquireno nos ratos tratados pela combinação destas duas drogas. Tratamento com amlodipina isolado não alterou as concentrações renais de Ang II e de 8-isoprostano e também não diminuiu a albuminúria e a deposição renal dos marcadores fibróticos PAS e fibronectina, mas reduziu a concentração de aldosterona urinária e promoveu redução parcial da inflamação renal e melhora dos níveis renais de NO e cGMP.

Alisquireno é um potente inibidor da renina e, conseqüentemente, promove uma redução na atividade da maior parte dos componentes do SRAA. Apesar do alisquireno ter reduzido a pressão arterial de pacientes hipertensos (86), a pressão arterial dos ratos diabéticos utilizados em nosso estudo não foi alterada pelo alisquireno ou pelos outros agentes anti-hipertensivos, como HCTZ ou amlodipina. É possível que a ausência de efeitos redutores destes agentes sobre a pressão arterial, em nossos grupos de ratos diabéticos, esteja relacionada ao fato de termos utilizado um modelo de rato diabético normotenso. Além disso, a estimulação do receptor AT₂ com C21 também não promoveu variações na pressão arterial, tanto nos ratos normoglicêmicos como nos diabéticos. Esta ausência de resposta do C21 sobre a pressão arterial é consistente com os resultados da maior parte dos estudos anteriores que utilizaram este composto *in vivo*, os quais também não verificaram efeitos redutores do C21 sobre a pressão arterial (121,125-126).

No diabetes, a maior concentração renal de Ang II está diretamente relacionada com aumento na formação de citocinas inflamatórias (16,29). Como discutido anteriormente, estas moléculas inflamatórias são importantes componentes na patogênese da nefropatia diabética

(7,22). Em nosso presente estudo, demonstramos aumento dos níveis de Ang II acompanhado de elevação dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-6, TGF- β 1 e NF- κ B nos rins dos ratos diabéticos. Entre estes fatores, o aumento na produção de NF- κ B está também associado com maior estímulo para a produção de citocinas inflamatórias. Assim, o aumento na expressão renal de NF- κ B, observado nos ratos diabéticos, pode ter contribuído ainda mais para a maior produção renal de TNF- α , IL-6 e TGF- β 1. Desta forma, os efeitos benéficos da inibição da renina com alisquireno sobre a inflamação renal na nefropatia diabética podem estar inicialmente relacionados aos seus efeitos inibidores sobre a produção renal de NF- κ B. Estudos experimentais prévios com ratos diabéticos transgênicos expressando renina de camundongo também demonstraram redução de marcadores de inflamação e de fibrose renal com alisquireno (85), porém este modelo experimental de diabetes se caracterizou pelo desenvolvimento de hipertensão severa que foi atenuada pela administração de alisquireno. Esta condição hipertensiva não foi verificada em nosso modelo experimental atual, demonstrando então que os efeitos renoprotetores do alisquireno foram independentes da pressão arterial. Também a ativação direta do receptor AT2 pelo C21 promoveu reduções nas expressões renais de TNF- α e IL-6. Estas reduções foram observadas a nível protéico no fluido intersticial renal, mas não no mRNA renal, embora uma tendência para uma menor expressão do mRNA renal destes marcadores inflamatórios tenha sido observada nos ratos diabéticos tratados com C21.

Maior produção de NF- κ B no diabetes pode também estar relacionado com aumento na produção de aldosterona. Níveis elevados de aldosterona podem favorecer o aumento na produção das espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, se associa a uma maior produção

de NF- κ B. Estas alterações foram demonstradas em estudos experimentais anteriores realizados em ratos nos quais a infusão de aldosterona aumentou a produção renal das espécies reativas de oxigênio (59) e ativou a produção de NF- κ B e a fibrose renal de ratos hipertensos induzidos por Ang II (65). Ao contrário, a administração de drogas antioxidativas a animais tratados cronicamente com aldosterona reduziu o estresse oxidativo renal e atenuou a inflamação e o acúmulo de colágeno renal (59). A importância da aldosterona como promotora de inflamação e fibrose também foi demonstrada por estudos que utilizaram antagonistas dos receptores mineralocorticóides (66-67) ou inibidores da aldosterona sintase (68-69). Nestes estudos, o uso destes agentes farmacológicos inibiu o desenvolvimento da inflamação e da fibrose tecidual.

Em nosso estudo, os ratos diabéticos apresentaram aumento dos níveis de aldosterona acompanhado de piora do estresse oxidativo. Ao contrário, os ratos tratados com alisquireno ou amlodipina apresentaram redução dos níveis de aldosterona e melhora concomitante dos níveis renais de NO e cGMP, sugerindo que a aldosterona pode diretamente modular a produção renal de NO e cGMP e o desenvolvimento do estresse oxidativo. As concentrações renais de 8-isoprostano também foram reduzidas com alisquireno, mas não foram alteradas por amlodipina. Desta forma, podemos inferir que, além da aldosterona, a produção de 8-isoprostano também foi influenciada por outros fatores como as atividades da Ang II e das citocinas inflamatórias (139). A produção de aldosterona e o estresse oxidativo não foram influenciados pelo tratamento com HCTZ. Além disso, o aumento do estresse oxidativo observado nos ratos diabéticos também foi atenuado pela ativação direta do receptor AT₂ pelo C21. C21 melhorou os níveis renais de NO e cGMP e diminuiu a produção renal de 8-

isoprostano nos ratos diabéticos, sugerindo que a estimulação do receptor AT2 também tem influência direta sobre a produção das espécies reativas de oxigênio.

Fibrose é o último estágio no desenvolvimento da doença renal crônica. Para a verificação da fibrose tecidual, alguns métodos de coloração tissular têm sido utilizados como o PAS e a pesquisa de fibronectina. PAS é um método de coloração que detecta a presença de glicogênio e outros polissacarídes nos tecidos. Fibronectina é um dos principais componentes da matriz extracelular renal. Tanto a deposição de PAS como a de fibronectina estão elevadas no processo fibrótico da nefropatia diabética. Como esperado, nossos ratos diabéticos apresentaram um aumento na deposição renal de PAS e de fibronectina no final do estudo. Suas deposições renais foram reduzidas com alisquireno, um efeito provavelmente relacionado com a menor formação de Ang II e aldosterona, mas não foram alteradas pelos tratamentos com HCTZ e amlodipina. Embora a amlodipina tenha promovido uma redução da aldosterona, é possível que a ausência de alterações adicionais sobre outros componentes do SRAA tenha colaborado para que a amlodipina não tenha influenciado o desenvolvimento da fibrose renal em nossos ratos diabéticos.

As diferenças nos efeitos observados entre os tratamentos com alisquireno e amlodipina podem estar relacionados a mecanismos distintos de ação destas duas drogas. O bloqueio da renina pelo alisquireno reduz todos os componentes do SRAA abaixo da renina enquanto que a amlodipina promove a redução da síntese de aldosterona através de sua ação inibitória direta sobre a captação de cálcio pelas células glomerulosas da adrenal (74), mas sem afetar diretamente a produção de Ang II. Desta forma, diferentemente da inibição da renina, o antagonista dos canais de cálcio amlodipina não afeta as atividades do SRAA, mas pode

influenciar a produção de aldosterona, explicando então seus efeitos parciais sobre a inflamação e o estresse oxidativo renal observado em nossos ratos diabéticos. Estes achados estão de acordo com relatos de estudos prévios que demonstraram que a amlodipina apresenta propriedades antioxidativas e antiinflamatórias, independente de seus efeitos sobre a pressão arterial (75-77,140-141).

Nossos resultados também demonstraram que a maior excreção urinária de albumina, verificada nos ratos diabéticos, foi atenuada pelos tratamentos com alisquireno isolado ou combinado com HCTZ e/ou amlodipina. No entanto, tratamentos com HCTZ ou amlodipina isolados ou combinados não promoveram alterações sobre a albuminúria. Interessante, a redução da albuminúria foi ainda mais acentuada nos ratos tratados pelas combinações de alisquireno e amlodipina ou alisquireno e HCTZ e amlodipina do que com qualquer outro esquema terapêutico, sugerindo que a administração concomitante de alisquireno e amlodipina pode potencializar os efeitos benéficos do alisquireno sobre a nefropatia diabética. Como os nossos ratos diabéticos tratados com amlodipina isolado evoluíram com melhora dos níveis renais de NO e cGMP e redução parcial dos marcadores inflamatórios renais, é possível então que estes efeitos da amlodipina tenham contribuído para intensificar a redução da albuminúria nos ratos tratados com a combinação de alisquireno e amlodipina.

O uso combinado dos agentes anti-hipertensivos HCTZ e amlodipina em nosso estudo também foi motivado pelo fato destes agentes serem frequentemente utilizados na prática clínica com o objetivo de se atingir um adequado controle pressórico no paciente hipertenso. Alguns estudos clínicos prévios utilizaram estas combinações medicamentosas e demonstraram efeitos benéficos sobre a pressão arterial. Um estudo clínico recente com pacientes

hipertensos demonstrou que a combinação de alisquireno e amlodipina foi mais efetiva em reduzir a pressão arterial inicial do que a monoterapia com qualquer um destes agentes (142). Em outro estudo clínico com pacientes hipertensos, os efeitos do alisquireno sobre a pressão arterial foram comparados com HCTZ, sendo demonstrado que o alisquireno foi mais efetivo em reduzir a pressão arterial do que a monoterapia com HCTZ (143).

Os efeitos da direta estimulação do receptor AT₂ sobre a albuminúria também foram investigados em nosso presente estudo. A estimulação do receptor AT₂ com C21 não alterou a albuminúria dos ratos normoglicêmicos, mas reduziu a albuminúria dos ratos diabéticos após um período de somente 4 semanas. É provável que a melhora da inflamação e do estresse oxidativo renal, induzidos pela administração do C21, tenham contribuído para a melhora da albuminúria observada nos ratos diabéticos. Porém, estudos com duração mais prolongada deveriam ser considerados na avaliação dos efeitos benéficos da estimulação do receptor AT₂ sobre a nefropatia diabética. Estudos anteriores demonstraram que a estimulação do receptor AT₂ com C21 induziu uma redução do processo inflamatório miocárdico, renal e dérmico (121,125-127), aumentou a formação de NO e cGMP acompanhado de vasodilatação (109,144) e aumentou o FSR em ratos (128). Estes resultados sugerem que a estimulação isolada do receptor AT₂, mesmo mantendo as atividades do receptor AT₁ patentes, pode desencadear efeitos benéficos sobre a nefropatia diabética.

Demonstramos também que a expressão renal do receptor AT₂ foi mais elevada nos ratos diabéticos. Este achado é consistente com relatos prévios da literatura (145-146), embora outros estudos não tenham verificado esta alteração (147-148). É possível que os dados discrepantes sobre a expressão renal do receptor AT₂ no diabetes estejam relacionados a

variações no tempo de duração do diabetes em cada um destes estudos e ao uso de modelos experimentais diversos (146-147). No entanto, em nosso estudo, a estimulação do receptor AT2 com C21 não promoveu aumentos adicionais na expressão renal deste receptor, tanto nos ratos diabéticos como nos controles, embora uma tendência de aumento na sua expressão tenha sido observada nos ratos diabéticos tratados com C21. Em um estudo prévio com ratos hipertensos, C21 promoveu aumento adicional na expressão renal do receptor AT2 (126), tendo sido sugerido que a estimulação do receptor AT2 pode ter um mecanismo de *feedback* positivo sobre sua atividade gênica, porém este efeito não foi corroborado em nosso presente modelo experimental de diabetes. Interessante, apesar de termos verificado uma maior expressão renal do receptor AT2 nos animais diabéticos, esta elevação não correspondeu a um aumento de suas atividades, já que os animais diabéticos apresentaram aumento na produção renal de fatores inflamatórios e aumento do estresse oxidativo. Provavelmente, os efeitos concomitantes da maior produção de Ang II e do aumento de atividade do receptor AT1 nos ratos diabéticos tenham sido determinantes para a piora da inflamação e do estresse oxidativo renal. Futuras investigações experimentais poderão ajudar a esclarecer os efeitos renais e os mecanismos sinalizadores associados com as atividades do receptor AT2 no diabetes.

6. CONCLUSÕES

1. A inibição da renina pelo alisquireno reduziu as concentrações renais de Ang II, a inflamação e o estresse oxidativo renal, acompanhado de redução da albuminúria em ratos diabéticos induzidos por STZ, independente da pressão arterial.
2. Os tratamentos com alisquireno e amlodipina isolados induziram uma menor produção de aldosterona, o que também contribuiu para a melhora da inflamação e do estresse oxidativo nos rins dos ratos diabéticos.
3. Os efeitos benéficos da inibição da renina pelo alisquireno, observados na nefropatia diabética, foram mantidos durante sua combinação com HCTZ e potencializados pela concomitante administração com amlodipina, sugerindo que mecanismos variados e sinérgicos podem contribuir para uma melhora da lesão renal diabética.
4. A estimulação direta do receptor AT2 com C21 reduziu a inflamação e o estresse oxidativo renal, acompanhado de redução da albuminúria em um modelo experimental de nefropatia diabética. Estes dados sugerem um papel renoprotetor do receptor AT2 e que a sua estimulação farmacológica tem um efeito terapêutico potencial na prevenção da nefropatia diabética.
5. A expressão renal do receptor AT2 foi mais elevada nos ratos diabéticos do que nos normoglicêmicos, porém a ativação direta do receptor AT2 não causou alterações significativas na expressão renal deste receptor.

6. Coletivamente, nossos dados sugerem que a inibição da renina e a ativação do receptor AT₂ promovem efeitos benéficos renais que podem prevenir o desenvolvimento da nefropatia diabética, suportando o conceito de que a modulação do SRAA é uma arma terapêutica importante e eficaz na prevenção da nefropatia diabética.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United States Renal Data System. Excerpts from the USRDS 2009 annual data report: Atlas of end-stage renal disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2010;55(Suppl 1):S1.
2. Censo de Diálise da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) 2013. Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2013_publico_leigo.pdf.
3. US Renal Data System. USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, MD, 2013. Disponível em: <http://www.usrds.org/atlas.aspx>.
4. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving HH, et al; Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis.* 2003;42:617-22.
5. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4:444-52.
6. Nielsen S, Schmitz A, Rehling M, Mogensen CE. The clinical course of renal function in NIDDM patients with normo- and microalbuminuria. *J Intern Med.* 1997;241:133-41.
7. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:433-42.
8. Díez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder. *Am J Kidney Dis.* 2011;58:637-46.
9. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin

- excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia*. 1999;42:1341-44.
10. Perico N, Benigni A, Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidney diseases: evolving targets in renoprotection. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:936-53.
 11. White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, Piras G, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes*. 2002;51:3083-89.
 12. Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, Kim JJ, Yoo TH, Ryu DR, et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2007;(106):S36-S42.
 13. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem*. 1993;268:24543-46.
 14. Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14:274-81.
 15. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11:180-6.
 16. Mezzano AS, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*. 2001;38[part 2]:635-8.
 17. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest*. 1986;77:1925-30.

18. Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med.* 1988;318:140-5.
19. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1993;329:1456-62.
20. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al; RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345:861-9.
21. Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. Irbesartan in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria study group. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001;345:870-8.
22. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. The inflammatory process in type 2 diabetes. The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:89-117.
23. Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, Shibayama Y, Ienaga K, et al. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1991;40:1007-12.
24. Royall JA, Berkow RL, Beckman JS, Cunningham MK, Matalon S, Freeman BA. Tumor necrosis factor and interleukin 1 increase vascular endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1989;257:L339-L410.

25. Suzuki D, Miyazaki M, Naka R, Koji T, Yagame M, Jinde K, et al. In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1995;44:1233-8.
26. Navarro JF, Milena FJ, Mora C, Leon C, Garcia J. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. *Am J Nephrol*. 2006;26:562-70.
27. Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, Brueghin M, Cernigoi AM, Saller A, et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16[Suppl 1]:S78-S82.
28. Ruef C, Budde K, Lacy J, Northemann W, Baumann M, Sterzel RB, et al. Interleukin-6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int*. 1990;38:249-57.
29. Siragy HM, Awad A, Abadir P, Webb R. The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor- α in diabetic rats. *Endocrinology*. 2003;144:2229-33.
30. Kalantarinia K, Awad AS, Siragy HM. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- α increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int*. 2003;64:1208-13.
31. Moriwaki Y, Inokuchi T, Yamamoto A, Ka T, Tsutsumi Z, Takahashi S, et al. Effect of TNF- α inhibition on urinary albumin excretion in experimental diabetic rats. *Acta Diabetol*. 2007;44:215-18.
32. Koike N, Takamura T, Kaneko S. Induction of reactive oxygen species from isolated rat glomeruli by protein kinase C activation and TNF- α stimulation, and effects of a phosphodiesterase inhibitor. *Life Sci*. 2007;80:1721-8.
33. Raedke HH, Meier B, Topley N, Fluge J, Habermehl GG, Resch K. Interleukin 1-alpha and

- tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int.* 1990;37:767-75.
34. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1814-8.
 35. Ziyadeh FN, Han DC. Involvement of transforming growth factor-beta and its receptors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1997;60:S7-S11.
 36. Border WA, Yamamoto T, Noble NA. Transforming growth factor beta in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Rev.* 1996;12:309-39.
 37. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes.* 1996;45:522-30.
 38. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8015-20.
 39. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:2505-12.
 40. Lee FT, Cao Z, Long DM, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper ME, et al. Interactions

- between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2139-51.
41. Pieper GM. Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30:528-32.
 42. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999;48:855-64.
 43. Ohga S, Shikata K, Yozai K, Okada S, Ogawa D, Usui H, et al. Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kB activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F1141-50.
 44. Zhang Z, Yuan W, Sun L, Szeto FL, Wong KE, Li X, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 targeting of NF-kB suppresses high glucose-induced MCP-1 expression in mesangial cells. *Kidney Int*. 2007;72:193-201.
 45. Lee WC, Chen HC, Wang CY, Lin PY, Ou TT, Chen CC, et al. Cilostazol ameliorates nephropathy in type 1 diabetic rats involving improvement in oxidative stress and regulation of TGF- β and NF-kB. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74:1355-61.
 46. Ninichuk V, Khandoga AG, Segerer S, Loetscher P, Schlapbach A, Revesz L, et al. The role of interstitial macrophages in nephropathy of type 2 diabetic db/db mice. *Am J Pathol*. 2007;170:1267-76.
 47. Li F, Yang N, Zhang L, Tan H, Huang B, Liang Y, et al. Increased expression of toll-like

- receptor 2 in rat diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2010;32:179-86.
48. Jialal I, Kaur H. The role of Toll-like receptors in diabetes-induced inflammation: implications for vascular complications. *Curr Diab Rep*. 2012;12:172-9.
 49. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002;192:1-15.
 50. Kultz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:225-57.
 51. Ishii N, Patel KP, Lane PH, Taylor T, Bian K, Murad F, et al. Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:1630-9.
 52. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288:F1144-52.
 53. Son SM, Whalin MK, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep*. 2004;4:247-52.
 54. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2005;67:1890-8.
 55. Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, et al. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes*. 2008;57:460-9.
 56. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely

- used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;10:2247-58.
57. Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int.* 1998;53:367-81.
 58. Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1B. *Eur J Pharmacol.* 1995;290:69-73.
 59. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative estresse in the profibrotic action of aldosterone. Interaction wtih the renin-angiotension system. *Am J Hypertens.* 2004;17:597-603.
 60. Maron BA, Zhang YY, Handy DE, Beuve A, Tang SS, Loscalzo J, et al. Aldosterone increases oxidant estresse to impair guanylylcyclase activity by cysteinylthiol oxidation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2009;284:7665-72.
 61. Onozato ML, Tojo A, Kobayashi N, Goto A, Matsuoka H, Fujita T. Dual blockade of aldosterone and angiotensin II additively suppresses TGF-beta and NADPH oxidase in the hypertensive kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:1314-22.
 62. Siragy HM, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation band matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol.* 2008;93:817-24.
 63. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int.* 2003;63:1791-1800.

64. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6:261-73.
65. Nagase M, Matsui H, Shibata S, Gotoda T, Fujita T. Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. *Hypertension.* 2007;50:877-83.
66. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension.* 2004;43:841-8.
67. Neves MF, Amiri F, Virdis A, Diep QN, Schiffrin EL; CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hyperthrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83:999-1006.
68. Susic D, Varagic J, Ahn S, Matavelli LC, Frohlich ED. Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H175-9.
69. Lea WB, Kwak ES, Luther JM, Fowler SM, Wang Z, Ma J, et al. Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt. *Kidney Int.* 2009;75:936-44.
70. Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, Rong S, Hilfenhaus G, Al-Saadi N, et al. Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation.* 2005;111:3087-94.
71. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T, Fujita T. Podocyte injury underlies

- the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension*. 2006;47:1084-93.
72. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*. 2007;49:355-64.
 73. Nadler JL, Hsueh W, Horton R. Therapeutic effect of calcium channel blockade in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60:896-9.
 74. Aguilera G, Catt KJ. Participation of voltage-dependent calcium channels in the regulation of adrenal glomerulosa function by angiotensin II and potassium. *Endocrinology*. 1986;118:112-8.
 75. Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*. 1998;97:576-80.
 76. Brovkovich V, Kalinowski L, Muller-Peddinghaus R, Malinski T. Synergistic antihypertensive effects of nifedipine on endothelium: concurrent release of NO and scavenging of superoxide. *Hypertension*. 2001;37:34-9.
 77. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Favilla S, Pompella A, et al. Restoration of nitric oxide availability after calcium antagonist treatment in essential hypertension. *Hypertension*. 2001;37:943-8.
 78. ENCORE Investigators. Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease: ENCORE I study (Evaluation of

- Nifedipine and Cerivastatin On Recovery of coronary Endothelial function). *Circulation*. 2003;107:422-8.
79. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen NC, Rasetti V, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *BiochemBiophys Res Commun*. 2003;308:698-705.
 80. Feldman DL. New insights into the renoprotective actions of the renin inhibitor aliskiren in experimental renal disease. *Hypertens Res*. 2010;33:279-87.
 81. Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, Fiebeler A, Dechend R, Gratz P, et al. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension*. 2005;46:569-76.
 82. Shagdarsuren E, Wellner M, Braesen JH, Park JK, Fiebeler A, Henke N, et al. Complement activation in angiotensin II-induced organ damage. *Circ Res*. 2005;97:716-24.
 83. Phillips LM, Wang Y, Dai T, Feldman DL, LaPage J, Adler SG. The renin inhibitor aliskiren attenuates high-glucose induced extracellular matrix synthesis and prevents apoptosis in cultured podocytes. *Nephron Exp Nephrol*. 2011;118:e49-59.
 84. Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, Naik G, Gilbert RE. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. *Diabetologia*. 2007;50:2398-404.
 85. Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. *Hypertension*. 2008;52:130-6.
 86. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP. Aliskiren, a

- novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation*. 2005;111:1012-18.
87. Persson F, Rossing P, Schjoedt KJ, Juhl T, Tarnow L, Stehouwer CD, et al. Time course of the antiproteinuric and antihypertensive effects of direct renin inhibition in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2008;73:1419-25.
 88. Persson F, Rossing P, Reinhard H, Juhl T, Stehouwer CD, Schalkwijk C, et al. Renal effects of aliskiren compared with and in combination with irbesartan in patients with type 2 diabetes, hypertension, and albuminuria. *Diabetes Care*. 2009;32:1873-9.
 89. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK; AVOID Study Investigators. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2008;358:2433-46
 90. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al; ALTITUDE Investigators. Cardiorenal endpoints in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2012;367:2204-13.
 91. Siragy HM. AT1 and AT2 receptor in the kidney: role in health and disease. *Semin Nephrol*. 2004;24:93-100.
 92. Matsubara H, Inada M. Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors- Expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists. *Endocr J*. 1998;45:137-50.
 93. Endo Y, Arima S, Yaoita H, Omata K, Tsunoda K, Takeuchi K, et al. Function of angiotensin II type 2 receptor in the postglomerular efferent arteriole. *Kidney Int Suppl*. 1997;63:S205-7.

94. Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor-Role in mediating signal transduction and cellular function. *J Biol Chem.* 1996;271:21985-92.
95. Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, Aguilar, MI, Thomas WG, Widdop RE. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci.* 2011;121:297-303.
96. Padia SH, Howell NL, Siragy HM, Carey RM. Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor-blocked rat. *Hypertension.* 2006;47:537-544.
97. Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Mukoyama M, Nakajima M, Dzau VJ. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203:1842-50.
98. Kijima K, Matsubara H, Murasawa S, Maruyama K, Ohkubo N, Mori Y, et al. Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene by the protein kinase C-calcium pathway. *Hypertension.* 1996;27:529-34.
99. Kambayashi Y, Ichild T, Inagami T. Insulin and insulin-like growth factors induce expression of angiotensin type-2 receptor in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem.* 1996;239:558-65.
100. Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA, Libby P, Dzau VJ, Pratt RE. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation.* 2005;112:3328-36.
101. Song R, Spera M, Garrett C, El-Dahr SS, Yosypiv IV. Angiotensin II AT2 receptor regulates

- ureteric bud morphogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298:F807-17.
102. Myiata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999;277:F437-46.
 103. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. 1997;30:1238-46.
 104. Siragy HM. The angiotensin II type 2 receptor and the kidney. *J Renin Angiotensin Syst*. 2010;11:33-6.
 105. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, et al. Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl*. 2003;86:S21-6.
 106. Xu Y, Hu X, Wang L, Jiang Z, Liu X, Yu H, et al. Preconditioning via angiotensin type 2 receptor activation improves therapeutic efficacy of bone marrow mononuclear cells for cardiac repair. *PLoS One*. 2013;8(12):e82997.
 107. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Inagawa Y, Fogo A, et al. Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. 1995;377:748-50.
 108. Gross V, Schunck WH, Honeck H, Milia AF, Kärger E, Walther T, et al. Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT2 receptor. *Kidney Int*. 2000;57:191-202.
 109. Whitebread SE, Taylor V, Bottari SP, Kamber B and de Gasparo M. Radioiodinated CGP 42112A: a novel high affinity and highly selective ligand for the characterization of angiotensin AT receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181:1365-71.

110. Siragy HM, Carey RM: The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cycle guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest.* 1996;97:1978-82.
111. Siragy HM, Carey RM: The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997;100:264-9.
112. Siddiqui AH, Ali Q, Hussain T. Protective role of the angiotensin II subtype 2 receptor in blood pressure increase in obese Zucker rats. *Hypertension.* 2009;53:256-61.
113. Siragy HM, Carey RM. Protective role of the AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension.* 1999;33:1237-42.
114. Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, et al. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation.* 2004;109:2296-301.
115. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Antagonism of AT₂ receptors augments Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2001;134:865-70.
116. Yayama K, Horii M, Hiyoshi H, Takano M, Okamoto H, Kagota S, et al. Up-regulation of angiotensin type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressure-overload. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308:736-43.
117. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J Med Chem.* 2004;47:5995-6008

118. Wagenaar GT, Laghmani el H, Fidder M, Sengers RM, de Visser YP, de Vries L, et al. Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305:L341-51.
119. Jones ES, Del Borgo MP, Kirsch JF, Clayton D, Bosnyak S, Welungoda I, et al. A single beta-amino acid substitution to angiotensin II confers AT2 receptor selectivity and vascular function. *Hypertension*. 2011;57:570-6.
120. Rosenström U, Sköld C, Plouffe B, Beaudry H, Lindeberg G, Botros M, et al. New selective AT2 receptor ligands encompassing a gamma-turn mimetic replacing the amino acid residues 4-5 of angiotensin II act as agonists. *J Med Chem*. 2005;48:4009-24.
121. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardium infarction? *Circulation*. 2008;118:2523-32.
122. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2012;59:291-9.
123. Gao J, Zucker IH, Gao L. Activation of central angiotensin type 2 receptors by compound 21 improves arterial baroreflex sensitivity in rats with heart failure. *Am J Hypertens*. 2014;27:1248-56.
124. Jehle AB, Xu Y, Dimaria JM, French BA, Epstein FH, Berr SS, et al. A nonpeptide angiotensin II type 2 receptor agonist does not attenuate postmyocardial infarction left ventricular remodeling in mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59:363-8.

125. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, et al. Stimulation of AT₂ receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens*. 2009;27:2444-51.
126. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension*. 2011;57:308-13.
127. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*. 2010;55:924-31.
128. Hilliard LM, Nematbakhsh M, Kett MM, Teichman E, Sampson AK, Widdop RE, et al. Gender differences in pressure natriuresis and renal autoregulation: role of the Angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*. 2011;57:275-82.
129. Brouwers S, Smolders I, Massie A, Dupont AG. Angiotensin II type 2 receptor-mediated and nitric oxide-dependent renal vasodilator response to compound 21 unmasked by angiotensin-converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*. 2013;62:920-6.
130. Hilliard LM, Chow CL, Mirabito KM, Steckelings UM, Unger T, Widdop RE, et al. Angiotensin type 2 receptor stimulation increases renal function in female, but not male, spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2014;64:378-83.
131. Ali Q, Wu Y, Hussain T. Chronic AT₂ receptor activation increases renal ACE2 activity, attenuates AT₁ receptor function and blood pressure in obese Zucker rats. *Kidney International*. 2013;84:931-9.

132. Bosnyak S, Welungoda IK, Hallberg A, Alterman M, Widdop RE, Jones ES. Stimulation of angiotensin AT₂ receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2010;159:709-16.
133. Carey RM, Howell NL, Jin X-H, Siragy HM. Angiotensin type-2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor blocked rats. *Hypertension*. 2001;38:1272-7.
134. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT₂ receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT₁ receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:1112-6.
135. Gao L, Wang WZ, Wang W, Zucker IH. Imbalance of angiotensin type 1 receptor and angiotensin II type 2 receptor in the rostral ventrolateral medulla: potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension*. 2008;52:708-14.
136. Jing F, Mogi M, Sakata A, Iwanami J, Tsukuda K, Ohshima K, et al. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor enhances spatial memory. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:248-55.
137. Min LJ, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Nakaoka H, et al. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage. *Am J Hypertens*. 2014;27:1036-44.
138. McCarthy CA, Vinh A, Miller AA, Hallberg A, Alterman M, Callaway JK, et al. Direct angiotensin AT₂ receptor stimulation using a novel AT₂ receptor agonist, compound 21, evokes neuroprotection in conscious hypertensive rats. *PLoS One*. 2014;9:e95762.
139. Practico D, Lawson JA, Roakach J, Fitzgerald GA. The isoprostanes in biology and

- medicine. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:243-7.
140. Chou T-C, Yang S-P, Pei D. Amlodipine inhibits pro-inflammatory cytokines and free radical production and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide/interferon-[gamma]-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002;89:157-63.
 141. Matsumori A, Ono K, Nishio R, Nose Y, Sasayama S. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. *Cytokine.* 2000;12:294-7.
 142. Brown MJ, McInnes GT, Papst CC, Zhang J, MacDonald TM. Aliskiren and the calcium channel blocker amlodipine combination as an initial treatment strategy for hypertension control (ACCELERATE): a randomised, parallel-group trial. *Lancet.* 2011;377:312-20.
 143. Schmieder RE, Philipp T, Guerediaga J, Gorostidi M, Smith B, Weissbach N, et al. Long-term antihypertensive efficacy and safety of the oral direct renin inhibitor aliskiren. A 12-month randomized, double-blind comparator trial with hydrochlorothiazide. *Circulation.* 2009;119:417-25.
 144. Savoia C, Touyz RM, Volpe M, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. *Hypertension.* 2007;49:341-6.
 145. Hakam AC, Hussain T. Renal AT2 receptors are upregulated and mediate the candesartan induced natriuresis/diuresis in obese Zucker rats. *Hypertension.* 2005;45:270-5.
 146. Hakam AC, Siddiqui AH, Hussain T. Renal angiotensin II AT2 receptors promote natriuresis in STZ-induced diabetes rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F503-8.

147. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD. Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT₂ receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F254-65.
148. Bonnet F, Candido R, Carey RM, Casley D, Russo LM, Osicka TM, et al. Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade. *J Hypertens.* 2002;20:1615-24.

8 PUBLICAÇÕES

Combined Aliskiren and Amlodipine Reduce Albuminuria via Reduction in Renal Inflammation in Diabetic Rats

Luis C. Matavelli, MD, Jiqian Huang, PhD, MD, and Helmy M. Siragy, MD

Abstract: We hypothesized that compared with hydrochlorothiazide (HCTZ), the renin inhibitor aliskiren (ALISK) or amlodipine (AMLO) and their combination reduce albuminuria via reduction in renal inflammation, independent of blood pressure (BP) changes. We studied normal and streptozotocin-induced diabetic (DM) Sprague-Dawley rats treated for 6 weeks with vehicle, ALISK, HCTZ, or AMLO individually and combined and evaluated the effects of treatments on BP, urine albumin to creatinine ratio, renal interstitial fluid levels of angiotensin II, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interleukin 6 (IL-6) and renal expression of TNF- α , IL-6, transforming growth factor beta 1, and nuclear factor kappa B. There were no differences in BP between treatments. Only ALISK and its combinations reduced renal interstitial fluid angiotensin II. Urine albumin to creatinine ratio increased in DM rats and decreased with ALISK alone or combined with HCTZ or AMLO. HCTZ or AMLO individually and combined did not influence urine albumin to creatinine ratio. Renal interstitial fluid TNF- α and IL-6, and the renal expression of TNF- α , IL-6, transforming growth factor beta 1, and nuclear factor kappa B were increased in DM rats. These renal inflammatory markers were reduced only with ALISK or AMLO individually or combined with other treatments. We conclude that ALISK alone and combined with HCTZ or AMLO reduced albuminuria in diabetes via reduction in renal inflammation, independent of BP changes.

Key Words: aliskiren, inflammation, cytokines, diabetes, kidney, renin-angiotensin system

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2012;59:281–287)

INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) activity is increased in diabetes. This pathophysiological change contributes to the development and progression of diabetic nephropathy.¹ The pharmacological blockade of the RAS was demonstrated to reduce renal injury in diabetes.^{2,3} However, although the blockade of the RAS is widely used, diabetic nephropathy remains the major cause leading to end-stage renal disease.⁴ Increased RAS activity is associated

with enhanced renal inflammation in diabetes.⁵ The transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity is increased in diabetes, which may further induce pro-inflammatory cytokines production in diabetic kidney.^{6,7} Previous studies from our and other laboratories reported increased renal levels of Ang II in diabetes associated with enhanced production of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL) 1 β , IL-6, and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1).^{8–10}

Aliskiren (ALISK) is a potent and highly specific long-acting inhibitor of renin activity.¹¹ As renin catalyzes the conversion of angiotensinogen to angiotensin I (Ang I), inhibition of renin by ALISK promotes a reduced activity of all downstream components of the RAS.¹² ALISK is an effective drug to reduce blood pressure (BP) in hypertension.¹³ In addition, ALISK was shown to reduce albuminuria in both clinical^{14,15} and experimental studies.^{12,16–18} However, the mechanisms by which ALISK protects from renal injury in diabetes are not well understood.

Combined antihypertensive therapy is often required to optimize BP control.¹⁹ Recently, the effects of combined ALISK with hydrochlorothiazide (HCTZ) or the calcium channel blocker amlodipine (AMLO) were explored in hypertensive patients.^{20,21} In these studies, combined ALISK and AMLO was reported to cause greater reduction of BP than each individual treatment. However, the effects of combined therapy of ALISK with either HCTZ or AMLO in diabetic kidney disease are unknown.

The current study was performed to evaluate the hypothesis that compared with HCTZ, ALISK alone or combined with HCTZ, AMLO, or both reduce albuminuria in diabetes via reduction in renal inflammation, independent of their effects on BP.

METHODS

Animal Preparation

The University of Virginia Animal Care and Use Committee approved all study protocols. Experiments were conducted in male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) weighing 230–260 g. Animals were given normal-sodium diet and tap water ad libitum for the whole experiment, and a minimum of 1 week was allowed to adjust to our animal care facility. Rats were randomly allocated into 9 groups: control (n = 10), diabetes groups receiving vehicle (DM + V; n = 10), ALISK (DM + ALISK; n = 10), HCTZ (DM + HCTZ, n = 10), AMLO (DM + AMLO; n = 10), HCTZ and AMLO

Received for publication October 5, 2011; accepted October 31, 2011.

From the Department of Medicine, University of Virginia Health System, Charlottesville, VA.

Supported by grants from Novartis Institutes for Biomedical Research, Inc., and NIH NIDDK-078757 and NIH HL091535 to H. M. Siragy.

Reprints: Helmy M. Siragy, MD, Department of Medicine, University of Virginia Health Sciences Center, PO Box 801409, Charlottesville, VA 22908-1409 (e-mail: hms7a@virginia.edu).

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

(DM + HCTZ + AMLO; $n = 10$), ALISK and HCTZ (DM + ALISK + HCTZ; $n = 11$), ALISK and AMLO (DM + ALISK + AMLO; $n = 12$), and ALISK combined with HCTZ and AMLO (DM + ALISK + HCTZ + AMLO; $n = 11$). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of 65 mg/kg of streptozotocin (STZ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Normoglycemic control rats were injected with an equal volume of vehicle (0.9% NaCl). This DM rat model is characterized by normal BP and allows for evaluation of direct effects of different treatments on the kidney. Treatments were initiated the day after STZ injection and given for a period of 6 weeks. ALISK (Novartis, East Hanover, NJ) was infused at a rate of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ via osmotic minipump (models 2ML2 and 2ML4; Alzet, Cupertino, CA). HCTZ and AMLO were provided by Novartis and administered by oral gavage at a dose of 3 and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. The controls and non-ALISK-treated groups were implanted with a sham osmotic minipump containing 0.9% NaCl. For minipump implantation, 1 day after STZ or vehicle injection, rats were anesthetized with the combination of ketamine (80 mg/kg IP) and xylazine (8 mg/kg IP). The osmotic minipumps were surgically implanted subcutaneously in the subscapular region of all rats. Insulin was not given to any of the animals utilized in this study.

Body Weight, Blood Glucose, 24-Hour Urine Measurements, and Systolic BP Monitoring

Body weight, blood glucose, 24-hour urine collections, and systolic blood pressure (SBP) were obtained at baseline and at the end of study. For blood glucose determination, blood was collected from tail vein after overnight fasting and glucose was measured using a glucometer (Bayer HealthCare, Mishawaka, IN). For urine collections, rats were placed in individual metabolic cages for a period of 24 hours. The volume of urine collected was determined gravimetrically, and a urine sample was kept at -80°C until assayed. Urinary albumin was determined by using a sensitive rat albumin enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI). Urine creatinine was determined by creatinine assay kit (Cayman Chemical). Urinary albumin to creatinine ratio (UACR) was used as a marker for diabetic nephropathy. UACR was calculated and presented as albumin in milligrams divided by creatinine in grams. SBP was measured in non-anesthetized rats using a tail-cuff noninvasive multichannel BP system (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA). The mean values of the recorded SBP were calculated.

In Vivo Renal Interstitial Fluid Collections

To determine the renal interstitial fluid (RIF) levels of Ang II, TNF- α , and IL-6, we constructed a microdialysis probe as previously described.^{5,10,22} In this technique, substances with a molecular mass $>40,000 \text{ Da}$ cannot cross the dialysis membrane but the free passage of smaller molecules is allowed. At the end of the study, RIF collections were performed in each animal under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg IP; Sigma-Aldrich). In this procedure, a dialysis probe was placed in the renal cortex of both kidneys through a midline laparotomy. In brief, a 30-gauge needle

was tunneled approximately 1–2 mm from the outer renal surface for about 0.5 cm before it exited by penetrating the capsule again. The tip of the needle was then inserted into one end of the dialysis probe, and the needle was pulled together with the dialysis tube until the dialysis fiber was situated into the renal cortex. To prevent dislodging, the dialysis probe was glued to the surface of the kidney using Vetbond (3M Animal Care Products, Saint Paul, MN). Thereafter, the inflow tube of the dialysis probe was connected to a gas-tight syringe filled with saline. Perfusion was done at a rate of $3 \mu\text{L}/\text{min}$ using an infusion pump. After a 60-minute period for stabilization after completion of surgical procedures, the effluent was collected from the outflow tube in nonheparinized plastic tubes over ice through 5 periods of 60 minutes each with an amount of around $180 \mu\text{L}$ in each sample. At the end of each experiment, animals were killed and kidneys were harvested and weighed. Kidney mass indexes were calculated as kidney weight in milligrams divided by body weight in grams. For histological analyses, a part of one kidney was immersed in Bouin fixative solution (Sigma-Aldrich). The remaining kidney tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

RIF Storage and Assays

The RIF collections were immediately stored at -80°C until assayed. RIF TNF- α and IL-6 were measured using an enzyme immunoassay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). RIF Ang II samples were measured using an Ang II enzyme immunoassay kit (SPI-BIO, France). In this kit, the minimal detectable concentration of Ang II is $1 \text{ pg}/\text{mL}$ and has cross-reactivity of 100% for Ang II, 4% for Ang I, 36% for Ang III, 33% for Ang III–VIII, and $<0.01\%$ for Ang I–VII.

Determination of mRNA Expression

Quantitative real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction was used to determine changes in renal expression of TNF- α , IL-6, TGF- β 1, and NF- κ B mRNAs. RNA ($n = 5$, each group) was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcription of the RNA was performed by the first-strand cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA). The PCR was analyzed using SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences were as follows: TNF- α forward, 5'-ACTCCAGAAAAGCAAGCAA-3', reverse, 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'; IL-6 forward, 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', reverse, 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3'; TGF- β 1 forward, 5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3', Reverse, 5'-TGGGACTGATCCCATTGATT-3'; NF- κ B forward, 5'-CTATAGGGCTCGAGCGGCCGC-3', reverse, 5'-AACGGAAACGCATGCCCCGC-3'; and 18S rRNA forward, 5'-CGAAAGCATTGCGCAAGAAT-3', Reverse, 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'. reverse transcriptase–polymerase chain reaction was performed using iCycler (Bio-Rad), and threshold cycle number was determined using iCycler software version 3.0 (Bio-Rad). Reactions were performed in triplicate, and threshold cycle numbers were averaged. The mRNA results for specific target genes were calculated with normalization to 18S rRNA.

Western Blot Analysis

TGF- β 1 rabbit antibody #3711 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) was used in the Western blot. Signal detection was carried out by using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). The blots were treated using Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendation followed by reprobing with a monoclonal antibody against β -actin (Sigma-Aldrich). Densitometry evaluation of the bands was done using ImageMaster TotalLab software version 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The bands densities of target proteins were normalized to the corresponding density of β -actin. The arbitrary unit of band densities was represented as the expression level.

Renal Histopathology and Immunohistochemistry

This method was performed as previously described.^{23,24} After standard procedures, frozen sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against mouse anti-NF- κ B p65 monoclonal antibody (1:100 dilution; sc-8008; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). In the next day, sections were incubated for 1 hour with secondary antibody at room temperature. Negative controls were included by omitting the primary antibody. The immunostaining images were captured by light microscopy using a Qimaging Micropublisher 5.0 RTV camera coupled to a Zeiss Axiophot microscopy (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Statistical Analyses

Comparisons among different treatment groups were assessed by analysis of variance followed by a Tukey test for post hoc comparisons. Data are expressed as mean $\pm$ standard error. $P < 0.05$ is considered statistically significant.

RESULTS

Body weight, blood glucose, urine output, kidney mass indexes, and systolic BP data of all rats at the end of study are presented in Table 1. At baseline, there were no significant differences in these parameters between all groups. There was significant reduction in body weight in all DM rats. Fasting blood glucose of DM rats at baseline was 91 ± 1 mg/dL and

increased to 339 ± 4 mg/dL ($P < 0.001$) 1 week after STZ injection. There were no significant changes in body weight and blood glucose in response to any drug treatment in DM rats. Urine volume substantially increased in DM rats during the whole period of study. There were no significant differences in SBP levels between normoglycemic controls and DM rats receiving different drug treatments.

RIF Ang II in Normal and DM Rats

Compared with normoglycemic controls, RIF Ang II recovery levels significantly increased (69%, $P < 0.001$) in DM + V rats (Fig. 1). RIF Ang II significantly reduced in DM rats receiving ALISK (−27%, $P < 0.01$), ALISK + HCTZ (−27%, $P < 0.01$), ALISK + AMLO (−35, $P < 0.001$), and ALISK + HCTZ + AMLO (−28%, $P < 0.001$). In contrast, there were no significant differences in RIF Ang II levels between DM + V and DM rats treated with HCTZ, AMLO, or HCTZ + AMLO.

Renal Expressions of TNF- α , IL-6, TGF- β 1, and NF- κ B

Renal TNF- α (Fig. 2A) and IL-6 (Fig. 2C) mRNA and the renal expression of TGF- β 1 (Fig. 3) and NF- κ B mRNA (Fig. 4) significantly increased in DM + V rats compared with normoglycemic controls. Compared with DM + V, these inflammatory markers were significantly reduced in DM rats treated with ALISK, ALISK + HCTZ, ALISK + AMLO, and ALISK + HCTZ + AMLO. TNF- α , IL-6, and NF- κ B mRNA did not change in DM rats treated with HCTZ or AMLO individually and combined. TGF- β 1 mRNA did not change with HCTZ individually or combined with AMLO and reduced with AMLO individually. TGF- β 1 protein did not change with HCTZ or AMLO treatment.

RIF TNF- α and IL-6 in Normal and DM Rats

Figures 2B, D show the RIF TNF- α and RIF IL-6 of normoglycemic controls and DM rats. RIF TNF- α and RIF IL-6 were significantly increased in DM + V ($P < 0.01$) compared with control animals. However, compared with DM + V, both RIF TNF- α and RIF IL-6 were significantly reduced in DM rats receiving ALISK ($P < 0.01$), ALISK + HCTZ ($P < 0.001$), ALISK + AMLO ($P < 0.001$), ALISK + HCTZ + AMLO ($P < 0.001$), AMLO

TABLE 1. Body Weight (BW), Blood Glucose (BG), 24-Hour Urine Volume (UV), Kidney Mass Indexes (KMI), and SBP of Sham and DM Rats at the End of Study

Variable	Sham	Diabetes							
		Vehicle	ALISK	HCTZ	AMLO	HCTZ + AMLO	ALISK + HCTZ	ALISK + AMLO	ALISK + HCTZ + AMLO
BW (g)	480 $\pm$ 11	300 $\pm$ 20*	297 $\pm$ 11*	304 $\pm$ 10*	311 $\pm$ 13*	285 $\pm$ 5*	315 $\pm$ 14*	293 $\pm$ 11*	287 $\pm$ 10*
BG (mg/dL)	88 $\pm$ 3	499 $\pm$ 29*	473 $\pm$ 30*	488 $\pm$ 12*	488 $\pm$ 19*	519 $\pm$ 24*	490 $\pm$ 21*	459 $\pm$ 25*	445 $\pm$ 18*
UV (mL/d)	24 $\pm$ 3	205 $\pm$ 16*	183 $\pm$ 10*	199 $\pm$ 14*	184 $\pm$ 9*	168 $\pm$ 10*	180 $\pm$ 17*	175 $\pm$ 10*	188 $\pm$ 8*
KMI (mg/g)	6.3 $\pm$ 0.1	11.4 $\pm$ 0.6*	11.3 $\pm$ 0.4*	11.1 $\pm$ 0.4*	11.2 $\pm$ 0.4*	11.8 $\pm$ 0.6*	10.3 $\pm$ 0.3*	10.2 $\pm$ 0.3*	10.2 $\pm$ 0.4*
SBP (mm Hg)	112 $\pm$ 1	114 $\pm$ 1	113 $\pm$ 2	112 $\pm$ 1	112 $\pm$ 1	112 $\pm$ 1	113 $\pm$ 1	112 $\pm$ 1	114 $\pm$ 1

Data are mean $\pm$ standard error of the mean.

* $P < 0.05$ versus sham.

FIGURE 1. RIF levels of Ang II in kidneys of sham and STZ-induced DM rats treated with vehicle (V), ALISK, HCTZ, AMLO, and their combination. Data are mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$ versus control; † $P < 0.05$ versus DM + V; ‡ $P < 0.05$ versus DM + HCTZ; § $P < 0.05$ versus DM + AMLO.

($P < 0.01$), and HCTZ + AMLO ($P < 0.03$). RIF TNF- α and RIF IL-6 did not change in DM rats treated with HCTZ.

NF- κ B Expression in Normal and DM Rat Kidneys

Renal NF- κ B mRNA was increased in DM + V rats compared with normoglycemic controls (Fig. 4). HCTZ individually or combined with AMLO treatments did not change NF- κ B mRNA in DM rats. AMLO or ALISK individually and ALISK combined with HCTZ or AMLO significantly reduced NF- κ B mRNA in DM rats (Fig. 4). NF- κ B immunostaining was mainly expressed in renal glomeruli. Compared with normoglycemic controls (Fig. 5A), renal immunostaining for NF- κ B increased in glomeruli of DM + V rats (Fig. 5B). Treatment with ALISK individually (Fig. 5C) and combined with HCTZ (Fig. 5G), AMLO (Fig. 5H), or both (Fig. 5I) significantly reduced the renal immunostaining of NF- κ B. Immunostaining for NF- κ B was also reduced in DM rats treated with AMLO (Fig. 5E) individually or com-

bined with HCTZ (Fig. 5F) and was not influenced by HCTZ alone (Fig. 5D).

UACR in Normal and DM Rats

Compared with normoglycemic control rats, UACR significantly increased in all DM rats (5.5 ± 0.5 vs. 43 ± 5 mg/g; $P < 0.001$). At the end of study, UACR levels were significantly decreased in DM rats treated with ALISK (–35%, $P < 0.04$), ALISK + HCTZ (–43%, $P < 0.01$), ALISK + AMLO (–57%, $P < 0.001$), and ALISK + HCTZ + AMLO (–53%, $P < 0.01$). There were no significant reductions in UACR levels in DM animals treated with HCTZ (–16%) or AMLO (–19%) individually and combined (–18%). Compared with DM + ALISK, UACR levels were significantly reduced in DM rats treated with ALISK + AMLO (–34%, $P < 0.01$) and ALISK + HCTZ + AMLO (–28%, $P < 0.03$). Compared with DM + HCTZ, UACR levels were reduced in DM rats treated with ALISK + HCTZ (–32%, $P < 0.04$) and ALISK + HCTZ + AMLO (–45%, $P < 0.001$). Similarly, compared with DM + AMLO, UACR levels were reduced in DM rats treated with ALISK + AMLO (–46%, $P < 0.001$) and ALISK + HCTZ + AMLO (–41%, $P < 0.001$) (Fig. 6).

DISCUSSION

The renin inhibitor ALISK reduces BP and the urine albumin excretion in diabetes.^{12,13} However, the mechanisms by which ALISK improves diabetic nephropathy are not fully known. The results of this study demonstrated that ALISK alone or ALISK combined with either HCTZ or AMLO reduced albuminuria in STZ-induced diabetes rats. The renal effects of ALISK and its combination with HCTZ or AMLO were associated with reduced production of the renal inflammatory markers TNF- α , IL-6, and TGF- β 1 and the transcription factor NF- κ B. In contrast, HCTZ did not change albuminuria or renal levels of the inflammatory markers. AMLO alone also had no effect on albuminuria, although it

FIGURE 2. Renal mRNA expression and RIF levels of TNF- α and IL-6 in kidneys of sham and STZ-induced DM rats treated with vehicle (V), ALISK, HCTZ, AMLO, and their combination. A and C, mRNA levels of TNF- α and IL-6, respectively. B and D, RIF levels of TNF- α and IL-6, respectively. Data are mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$ versus control; † $P < 0.05$ versus DM + V; ‡ $P < 0.05$ versus DM + HCTZ; § $P < 0.05$ versus DM + AMLO.

FIGURE 3. Renal expression of TGF-β1 in kidneys of sham and STZ-induced DM rats treated with vehicle (V), ALISK, HCTZ, AMLO, and their combination. A, mRNA levels of TGF-β1. B, Western blot analyzes of TGF-β1. Representative blots (top). Quantitative results normalized to β-actin (bottom). *n* = 5, each group. Data are mean ± standard error of the mean. **P* < 0.05 versus control; †*P* < 0.05 versus DM + V; ‡*P* < 0.05 versus DM + HCTZ; §*P* < 0.05 versus DM + AMLO.

partially reduced renal inflammation. The renoprotective effects of ALISK alone and combined with HCTZ or AMLO were independent of BP changes.

In diabetes, the increased activity of RAS plays a crucial role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. The blockade of the RAS with Ang-converting enzyme inhibitors or Ang receptor antagonists is widely used in diabetes to slow the progression of diabetic nephropathy.^{2,3} The renin inhibitor ALISK was recently demonstrated to reduce renal injury in diabetes. ALISK treatment reduced albuminuria in diabetic patients independent of its BP-lowering effects.^{14,15} In addition, ALISK lowered urinary albumin excretion in transgenic and DM rats expressing the mouse renin.^{16–18} ALISK is a highly potent inhibitor of renin ultimately leading to

reduction of the RAS activity and BP in hypertension. Our current data demonstrated that ALISK treatment reduced renal levels of Ang II in STZ-induced diabetes rats. Because these experiments were performed in normotensive animals, BP was not affected by ALISK treatment.

Increased formation of Ang II enhances the release of renal inflammatory cytokines.^{25,26} The observed increase in these inflammatory factors is believed to contribute to the development and progression of diabetic nephropathy.⁸ Previous studies from our and other laboratories reported enhanced production of renal inflammatory cytokines in diabetes.^{8–10} Our current findings are in agreement with these studies as demonstrated by increased renal production of the inflammatory markers TNF-α, IL-6, and TGF-β1, and the transcription factor NF-κB in diabetes. We also demonstrated that ALISK alone and combined with either HCTZ or AMLO substantially reduced the renal levels of these inflammatory markers. NF-κB promotes the expression of inflammatory cytokines. Increased renal expression of NF-κB in diabetes explains the observed increase in renal TNF-α and IL-6. The reduction in NF-κB with ALISK suggests involvement of RAS in this process.^{6,7} Because ALISK reduces RAS activity, our findings suggest that the beneficial effects of ALISK in diabetic nephropathy could be related to its effects in reducing renal NF-κB expression. Previous studies investigating the effects of ALISK in diabetic nephropathy also reported reduced levels of markers of inflammation and fibrosis with ALISK.¹⁸ These studies were done in transgenic rats expressing mouse renin, a rat model that develops hypertension and severe nephropathy after induction of diabetes. In the present work, BP was not affected by diabetes or by any of the employed pharmacological treatments and suggests that the observed results were independent of BP.

FIGURE 4. Renal expression of NF-κB p65 mRNA in kidneys of sham and STZ-induced DM rats treated with vehicle (V), ALISK, HCTZ, AMLO, and their combination. *n* = 5, each group. Data are mean ± standard error of the mean. **P* < 0.05 versus control; †*P* < 0.05 versus DM + V; ‡*P* < 0.05 versus DM + HCTZ; §*P* < 0.05 versus DM + AMLO.

FIGURE 5. Representative NF- κ B p65 immunostaining of renal glomeruli (brown). A, Sham, (B–I) STZ-induced DM rats treated with (B) vehicle (V), (C) ALISK, (D) HCTZ, (E) AMLO, (F) HCTZ + AMLO, (G) ALISK + HCTZ, (H) ALISK + AMLO, and (I) ALISK + HCTZ + AMLO. NF- κ B p65 immunostaining was increased in glomeruli of vehicle-treated DM group. It was reduced with ALISK and AMLO treatments, and not affected by HCTZ. Magnification, $\times 200$.

Our results also demonstrated that the increased albuminuria in DM rats was attenuated by ALISK treatment. The albuminuria reduction was superior with combined ALISK and AMLO or combined ALISK and AMLO and HCTZ than each individual treatment. These data suggest that concomitant administration of ALISK and AMLO may potentiate the beneficial effects of ALISK to diabetic kidney. Although previous studies demonstrated reduction of albuminuria with ALISK,^{16–18} the effects of combined ALISK and AMLO on diabetic kidney were not studied. AMLO was reported to possess anti-inflammatory properties independent of its BP-lowering effects.^{27–29} The anti-inflammatory effects of AMLO may have contributed to intensify the reduction of albuminuria in animals receiving ALISK and AMLO

concomitantly. These data suggest that the beneficial effects of ALISK in diabetic nephropathy may be potentiated by its combination with AMLO.

Combined antihypertensive therapy is frequently used in hypertension for optimum BP control. Although our present data did not demonstrate differences in BP between different treatment groups, the beneficial effects of combined ALISK and AMLO on BP were recently reported in hypertensive patients.²¹ In our current study, HCTZ alone did not promote any beneficial effect in diabetic kidney. Interestingly, HCTZ when combined with ALISK did not reverse the renoprotective effects of ALISK in diabetes as demonstrated by reduced albuminuria and renal inflammation.

FIGURE 6. UACR of sham and STZ-induced DM rats treated with vehicle (V), ALISK, HCTZ, AMLO, and their combination at baseline (open bars) and after 6 weeks of STZ induction of diabetes and drug treatments (solid bars). Data are mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$ versus control; † $P < 0.05$ versus DM + V; ‡ $P < 0.05$ versus DM + HCTZ; § $P < 0.05$ versus DM + AMLO; || $P < 0.05$ versus DM + ALISK.

CONCLUSIONS

We conclude that ALISK treatment reduced albuminuria in STZ-induced diabetes rats via reduction in renal inflammation. The beneficial effects of ALISK in diabetic nephropathy and renal inflammation were maintained during its combination with HCTZ and were potentiated by concomitant administration of AMLO. The renoprotective effects of ALISK alone or combined with HCTZ or AMLO were independent of BP changes. The results of the present study support the concept that blockade of the RAS, including the inhibition of renin by ALISK, is an important therapeutic tool to prevent the development of diabetic nephropathy. The effects of ALISK in reducing albuminuria could be related to its direct effects in reducing renal inflammation in diabetes. The observed synergistic effects of combined ALISK, HCTZ, and AMLO suggest involvement of multiple mechanisms in development of diabetic kidney disease. Our data suggest that ALISK either alone or combined with HCTZ or AMLO may be beneficial in the prevention of renal damage in diabetes.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Mr. William Pitkin for his technical assistance.

REFERENCES

- Carey RM, Siragy HM. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14:274–281.
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, et al. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1993;329:1456–1462.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345:861–869.
- KDOQI. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2007;49(suppl 2):S12–S154.
- Siragy HM, Awad A, Abadir P, et al. The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor- α in diabetic rats. *Endocrinology.* 2003;144:2229–2233.
- Lee FT, Cao Z, Long DM, et al. Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2139–2151.
- Starkey JM, Haidacher SJ, LeJeune WS, et al. Diabetes-induced activation of canonical and noncanonical nuclear factor- κ B pathways in renal cortex. *Diabetes.* 2006;55:1252–1259.
- Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:433–442.
- Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, et al. The inflammatory process in type 2 diabetes. The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:89–117.
- Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37:277–282.
- Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:698–705.
- Feldman DL. New insights into the renoprotective actions of the renin inhibitor aliskiren in experimental renal disease. *Hypertens Res.* 2010;33:279–287.
- Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, et al. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation.* 2005;111:1012–1018.
- Persson F, Rossing P, Schjoedt KJ, et al. Time course of the antiproteinuric and antihypertensive effects of direct renin inhibition in type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2008;73:1419–1425.
- Parving HH, Persson F, Lewis JB, et al. AVOID Study Investigators. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2008;358:2433–2446.
- Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, et al. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension.* 2005;46:569–576.
- Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, et al. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. *Diabetologia.* 2007;50:2398–2404.
- Feldman DL, Jin L, Xuan H, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2) 27 rats. *Hypertension.* 2008;52:130–136.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003;42:1206–1252.
- Schmieder RE, Philipp T, Guerediaga J, et al. Long-term antihypertensive efficacy and safety of the oral direct renin inhibitor aliskiren: a 12-month randomized, double-blind comparator trial with hydrochlorothiazide. *Circulation.* 2009;119:417–425.
- Brown MJ, McInnes GT, Papst CC, et al. Aliskiren and the calcium channel blocker amlodipine combination as an initial treatment strategy for hypertension control (ACCELERATE): a randomised, parallel-group trial. *Lancet.* 2011;377:312–320.
- Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997;100:264–269.
- Xue C, Siragy HM. Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension.* 2005;46:584–590.
- Siragy HM, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol.* 2008;93:817–824.
- Han Y, Runge MS, Braiser AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Circ Res.* 1999;84:695–703.
- Granger JP. An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H923–H924.
- Chou T-C, Yang S-P, Pei D. Amlodipine inhibits pro-inflammatory cytokines and free radical production and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide/interferon- γ -stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002;89:157–163.
- Matsumori A, Ono K, Nishio R, et al. Amlodipine inhibits the production of cytokines induced by ouabain. *Cytokine.* 2000;12:294–297.
- Siragy HM, Xue C, Webb RL. Beneficial effects of combined benazepril-amlodipine on cardiac nitric oxide, cGMP, and TNF α production after cardiac ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47:636–642.

Reduction of Aldosterone Production Improves Renal Oxidative Stress and Fibrosis in Diabetic Rats

Luis C. Matavelli, MD and Helmy M. Siragy, MD

Abstract: Aldosterone is increased in diabetes and contributes to the development of diabetic nephropathy. The authors hypothesized that reduction in aldosterone production in diabetes by amlodipine or aliskiren improves diabetic kidney disease by attenuating renal oxidative stress and fibrosis. Normoglycemic and streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats were given vehicle, amlodipine, or aliskiren alone and combined for 6 weeks. At the end of study, we evaluated blood pressure (BP), 24-hour urinary sodium ($U_{Na}V$) and aldosterone excretion rates, renal interstitial fluid (RIF) levels of nitric oxide (NO), cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP), and 8-isoprostane, and renal morphology. BP was not significantly different between any of experimental groups. $U_{Na}V$ increased in diabetic animals and was not affected by different treatments. Urinary aldosterone excretion increased in diabetic rats receiving vehicle and decreased with amlodipine and aliskiren alone or combined. RIF NO and cGMP levels were reduced in vehicle-treated diabetic rats and increased with amlodipine or aliskiren given alone and combined. RIF 8-isoprostane levels and renal immunostaining for periodic acid-Schiff and fibronectin were increased in vehicle-treated diabetic rats and decreased with aliskiren alone or combined with amlodipine. The authors conclude that inhibition of aldosterone by amlodipine or aliskiren ameliorates diabetes induced renal injury via improvement of NO-cGMP pathway and reduction in oxidative stress and fibrosis, independent of BP changes.

Key Words: diabetes, kidney, aldosterone, oxidative stress, amlodipine, renal fibrosis

(*J Cardiovasc Pharmacol*TM 2013;61:17–22)

INTRODUCTION

Diabetes is associated with an increase of the renin-angiotensin system (RAS) activity, including aldosterone production.^{1,2} In addition to its physiological role in regulating renal sodium and water reabsorption and potassium secretion in the distal nephron, aldosterone promotes tissue inflammation, remodeling, and fibrosis.^{3,4}

Aldosterone also plays a direct role in the production and activity of reactive oxygen species, an important component for the development of tissue injury. Aldosterone was demonstrated to inhibit the production of nitric oxide (NO)⁵ and its second messenger cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP)⁶ and to enhance the renal production of 8-isoprostane, a marker for endogenous superoxide activity.^{7,8} In contrast, the inhibition of aldosterone with mineralocorticoid receptor antagonists suppressed oxidative stress and inflammation.^{9,10} NO acts as an endogenous antioxidant that helps to prevent the development of fibrosis. However, the relation between NO-cGMP pathway, oxidative stress, and the profibrotic actions of aldosterone in diabetic kidney is not well elucidated.

The blockade of RAS with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers is widely used to prevent or delay the development of diabetic nephropathy. The therapeutic effects of these agents are mainly attributed to the reduction in angiotensin II (Ang II) generation or activity.^{11,12} However, it is not clear if other pharmacologic agents, such as drugs, used in the management of hypertension and reduce aldosterone production could reduce renal injury in diabetes. In the present study, we compared the effects of the direct renin inhibitor aliskiren that decreases Ang II and aldosterone production¹³ and the dihydropyridine-type calcium channel blocker (CCB) amlodipine that directly reduces aldosterone,^{14,15} individually and combined, independent of changes in blood pressure (BP), on NO-cGMP pathway, oxidative stress, and renal fibrosis. Recent studies suggested that the combination of CCBs and RAS inhibitors have further beneficial effects on reduction of BP and proteinuria and improvement of endothelial function by enhancing NO production.^{16,17} Amlodipine was demonstrated to reduce inflammation and fibrosis in different rat models.^{18,19} However, the effects of amlodipine in slowing the progression of albuminuria and its role on aldosterone production in diabetes are unclear.

In the present study, we evaluated the hypothesis that reduction of aldosterone production in diabetes, induced by amlodipine or aliskiren treatment, directly enhances the renal production of NO-cGMP and reduces diabetes-induced renal oxidative stress and fibrosis, independent of changes in BP.

METHODS

Animal Preparation

The University of Virginia Animal Care and Use Committee approved all study protocols. Twenty-four-hour

Received for publication July 25, 2012; accepted September 17, 2012.
From the Department of Medicine, University of Virginia Health System, Charlottesville, VA.

Supported by grants from Novartis Institutes for Biomedical Research, Inc, and NIH NIDDK-078757 and NIH HL091535 (H.M.S.).

The authors report no conflicts of interest.

Reprints: Helmy M. Siragy, MD, Department of Medicine, University of Virginia Health Sciences Center, PO Box 801409, Charlottesville, VA 22908-1409 (e-mail: hms7a@virginia.edu).

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

urine and renal interstitial fluid (RIF) collections, and kidneys tissues²⁰ were used in the present study. In brief, male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) weighing 230–260 g were randomly allocated into groups ($n = 10$ each group) of control (normal) and diabetes groups receiving vehicle, amlodipine, or aliskiren alone and combined. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of 65 mg/kg of STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Normoglycemic control rats were injected with an equal volume of sterile saline. Treatments were initiated the day after STZ injection and given for a period of 6 weeks. Amlodipine (Novartis, East Hanover, NJ) was administered by oral gavage at a dose of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Aliskiren (Novartis) was infused at a rate of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ via osmotic minipump (models 2ML2 and 2ML4; Alzet, Cupertino, CA). The control and diabetic (DM) rats treated with amlodipine were implanted with a sham osmotic minipump containing saline. For minipump implantation, one day after STZ or vehicle injection, rats were anesthetized with the combination of ketamine (80 mg/kg intraperitoneally) and xylazine (8 mg/kg intraperitoneally). The osmotic minipumps were surgically implanted subcutaneously in the subscapular region of all rats.

Body Weight, Blood Glucose, 24-Hour Urinary Sodium and Aldosterone Excretions, and Systolic Blood Pressure Monitoring

Body weight, blood glucose, 24-hour urine collections, and systolic blood pressure (SBP) were obtained at baseline and at the end of study. For blood glucose determinations, blood was collected from tail vein after overnight fasting and glucose was measured using a glucometer (Bayer HealthCare, Mishawaka, IN). For urine collections, rats were placed in individual metabolic cages for 24 hours. The volume of urine collected was determined gravimetrically, and a urine sample was kept at -80°C until assayed. Urinary sodium concentration of each sample was measured using flame photometer IL 943 (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA). Urinary aldosterone excretion was determined by an aldosterone enzyme immunoassay (EIA) kit-monoclonal (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI). SBP was measured in nonanesthetized rats using a tail-cuff noninvasive multichannel BP system (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA). The mean values of the recorded SBP were calculated.

In Vivo RIF NO, cGMP, and 8-Isoprostane Collections

To determine the RIF levels of NO, cGMP, and 8-isoprostane, we constructed a microdialysis probe as described elsewhere.^{19,21} At the end of study, RIF collections were performed in each animal under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg intraperitoneally; Sigma-Aldrich) and a dialysis probe was placed in the renal cortex as previously described.^{20,21}

RIF Storage and Assays

The RIF collections were immediately stored at -80°C until assayed. RIF NO recovery levels were measured using its

stable metabolic products nitrate/nitrite fluorometric assay kit (Cayman Chemical) and presented as micromoles per minute. RIF cGMP recovery levels were measured using a cGMP EIA kit (Cayman Chemical). RIF 8-isoprostane recovery levels were measured using a 8-isoprostane EIA kit (Cayman Chemical). Both RIF cGMP and RIF 8-isoprostane are presented as femtomoles per minute.

Renal Immunohistochemical Staining

At the end of each experiment, animals were euthanized and kidneys were harvested. For histological analyses, kidney was immersed in Bouin fixative solution (Sigma-Aldrich). The kidney tissue blocks were embedded in paraffin and cut into $3\text{-}\mu\text{m}$ slices. After being deparaffinized using xylene and ethanol dilutions and rehydration, the sections were processed with periodic acid-Schiff (PAS; Sigma) to evaluate renal fibrosis. For immunohistochemical staining, kidney sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed against mouse fibronectin monoclonal antibody (1:100 dilution; sc-18825; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). In the next day, sections were incubated for 1 hour with secondary antibody at room temperature. Negative controls were included by omitting the primary antibody. The immunostaining images were captured by light microscopy using a Qimaging Micropublisher 5.0 RTV camera coupled to a Zeiss Axiophot microscopy (Carl Zeiss, Jena, Germany). Immunostaining quantification was performed according to the previously published protocol.²²

Statistical Analysis

Comparisons among different treatment groups were assessed by analysis of variance followed by a Tukey test for post hoc comparisons. Data are expressed as mean $\pm$ SE. $P < 0.05$ is considered statistically significant.

RESULTS

Body Weight, BP, Blood Glucose, and 24-Hour Urine

At baseline, there were no significant differences in body weight, blood glucose, urine output, and SBP between all groups. At the end of study, compared with normoglycemic control group, body weight was significantly reduced in all diabetic groups. Compared with baseline, fasting blood glucose and 24-hour urine volume of DM rats were significantly increased. There were no significant differences in fasting blood glucose or 24-hour urine volume between different treatments of the diabetic rats. At the end of study (Table 1), 24-hour urinary sodium (U_{NaV}) was significantly increased in DM rats compared with normoglycemic controls. However, there were no significant differences in U_{NaV} between different treatments of DM rats. Levels of SBP in normoglycemic controls at the end of study were not significantly different from those of vehicle-treated DM rats. There were no significant differences in SBP levels between different diabetic groups treated with amlodipine ($112 \pm 1 \text{ mm Hg}$) or aliskiren ($113 \pm 2 \text{ mm Hg}$) alone and combined ($112 \pm 0.3 \text{ mm Hg}$).

TABLE 1. Body Weight, Blood Glucose, 24-Hour Urine Output, U_{NaV} , and SBP at the End of Study in Normoglycemic Control and DM Rats Given Vehicle or Treated With Amlodipine (DM + Aml) or Aliskiren (DM + Alisk) Alone and Combined (DM + Alisk + Aml) (n = 10 Each Group)

	Control	DM	DM + Aml	DM + Alisk	DM + Aml + Alisk
Body weight (g)	480 ± 11	300 ± 20*	311 ± 13*	297 ± 11*	293 ± 11*
Blood glucose (mg/dL)	88 ± 3	499 ± 29*	488 ± 19*	473 ± 30*	459 ± 25*
Urine output (mL/d)	24 ± 3	205 ± 16*	184 ± 9*	183 ± 10*	175 ± 10*
U_{NaV} (mmol/d)	2.68 ± 0.12	4.05 ± 0.25*	3.93 ± 0.16*	3.71 ± 0.29*	3.61 ± 0.22*
SBP (mm Hg)	112 ± 0.4	113 ± 0.5	112 ± 0.5	113 ± 1.6	112 ± 0.3

* $P < 0.05$ versus normoglycemic control.

Urinary Aldosterone Excretion in Normal and DM Rats

At the end of study, compared with normoglycemic control group, urinary aldosterone excretion rate was significantly higher in vehicle-treated DM rats (0.13 ± 0.02 ng/d vs. 1.89 ± 0.27 ng/d; $P < 0.0001$). There was a significant reduction in urinary aldosterone excretion in DM rats treated with amlodipine (-53% , $P < 0.001$) or aliskiren (-43% , $P < 0.01$) alone and combined (50% , $P < 0.001$) (Fig. 1).

RIF NO, cGMP, and 8-Isoprostane in Normal and DM Rats

RIF NO (Fig. 2A) and RIF cGMP (Fig. 2B) levels were significantly reduced (-35% and -37% respectively, $P < 0.04$) in vehicle-treated DM rats compared with normoglycemic controls. In DM rats, RIF NO and RIF cGMP levels were significantly increased in response to amlodipine (46% and 67% , respectively, $P < 0.05$), aliskiren (36% and 57% , respectively, $P < 0.04$), or their combination (72% and 115% , respectively, $P < 0.01$). Compared with aliskiren alone, combined aliskiren and amlodipine caused further increase in RIF NO and RIF cGMP (26% and 37% , respectively, $P < 0.05$). Compared with normoglycemic controls, RIF 8-isoprostane levels (Fig. 2C) were increased (49% , $P < 0.01$) in vehicle-treated DM rats. 8-Isoprostane levels did not show significant changes with amlodipine but were significantly decreased with aliskiren (-18% , $P < 0.05$) alone or combined with amlodipine (-22% , $P < 0.02$).

FIGURE 1. Urinary aldosterone excretion at the end of study of sham and streptozotocin-induced diabetic (DM) rats treated with vehicle, amlodipine, or aliskiren alone and combined. Data are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ versus control; † $P < 0.05$ versus DM + vehicle.

PAS and Fibronectin Immunostaining in Normal and DM Rat Kidneys

Renal PAS and fibronectin immunostaining were mainly localized to renal glomeruli and tubules, respectively. Compared with normoglycemic controls (Fig. 3A), renal PAS staining increased in kidney sections of vehicle-treated DM rats (Fig. 3B). Renal PAS staining was reduced in DM rats treated with aliskiren alone (Fig. 3C) or combined with amlodipine (Fig. 3E). Amlodipine alone did not influence PAS staining (Fig. 3D). Compared with normoglycemic controls (Fig. 4A), renal fibronectin immunostaining increased in vehicle-treated DM rats (Fig. 4B). Renal fibronectin was reduced in DM rats treated with aliskiren (Fig. 4C) alone or combined with amlodipine (Fig. 4E) but was not influenced by treatment with amlodipine (Fig. 4D).

DISCUSSION

Diabetes is associated with an increase of the RAS activity, including the production of Ang II and aldosterone.¹

FIGURE 2. RIF levels of NO (A), cGMP (B), and 8-isoprostane (C) at the end of study in sham and streptozotocin-induced diabetic (DM) rats treated with vehicle, amlodipine, or aliskiren alone and combined. Data are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ versus control; † $P < 0.05$ versus DM + vehicle.

FIGURE 3. Representative images of PAS staining in renal glomeruli (dark red). Sham (A) and streptozotocin-induced diabetic rats treated with vehicle (B), amlodipine (C), or aliskiren (D) alone and combined (E). PAS staining was increased in glomeruli of vehicle-treated diabetic rats, reduced with aliskiren alone or combined with amlodipine and not affected by amlodipine alone treatment (magnification $\times 200$).

In the kidney, aldosterone is a proinflammatory factor that induces inflammation, fibrosis, mesangial cell proliferation, and podocyte injury.^{4,23,24} In the course leading to development of diabetic nephropathy, a major diabetes complication,

aldosterone plays a pivotal role in the pathophysiology of renal inflammation and fibrosis.^{23,24} However, the influence of commonly used antihypertensive agents, such as the CCB amlodipine, on the mechanisms involving aldosterone and

FIGURE 4. Representative images of fibronectin (FN) immunostaining in renal tubular area (stained dark brown). Sham (A) and streptozotocin-induced diabetic rats treated with vehicle (B), amlodipine (C), or aliskiren (D) alone and combined (E). FN immunostaining was increased in vehicle-treated diabetic rats, reduced with aliskiren alone or combined with amlodipine and not affected by amlodipine alone treatment (magnification $\times 200$).

lead to development of diabetic nephropathy is not fully elucidated. In the present study, we compared the effects of the CCB amlodipine and the direct renin inhibitor on aldosterone production, renal production of NO-cGMP, 8-isoprostane, and fibrosis in STZ-induced diabetes rat model. This rat model is characterized by normotensive levels of BP that was not influenced by different treatments used in this study. Absence of changes in BP throughout this study eliminated the contribution of the antihypertensive effects of these drugs on diabetes-induced renal injury. Our results demonstrated that increased aldosterone production in STZ-induced diabetic rats was associated with reduced NO-cGMP and increased 8-isoprostane levels and fibrosis in diabetic kidney. Reduction of aldosterone production in diabetes induced by amlodipine or aliskiren alone or combined improved renal interstitial levels of NO and cGMP. In addition, reduction of aldosterone with aliskiren alone or combined with amlodipine reduced renal levels of 8-isoprostane and fibrosis.

CCBs, including amlodipine, lower BP by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells. In addition, these drugs have several pleiotropic effects, such as inhibition of oxidative stress and aldosterone production.^{14,15} In animal models, CCBs affected oxidative stress by increasing endothelial NO production and the superoxide scavenging activity.^{25,26} They also attenuated plasma levels of isoprostanes and restored NO availability in essential hypertensive patients²⁷ and improved NO-mediated endothelial function in coronary artery disease patients.²⁸ However, the effects of amlodipine on diabetic kidney pathology are not well established.

Our current results demonstrated that increased aldosterone levels in diabetes were associated with worsening of renal oxidative stress. In contrast, reduction in levels of aldosterone, induced by amlodipine or aliskiren treatments, led to increased renal levels of NO and cGMP. These observed changes in aldosterone production were independent of variations in BP or sodium concentration considering that $U_{Na}V$, although elevated in diabetic rats, was not affected by either amlodipine or aliskiren treatments. The role of aldosterone in modulating the renal production of NO and cGMP was previously demonstrated in studies using vascular smooth muscle cells.^{5,6} In addition, both amlodipine and aliskiren were previously reported to improve impaired NO production.^{29,30} We also demonstrated that inhibition of renin activity reduced renal levels of 8-isoprostane. However, its production was not affected by treatment with amlodipine. 8-Isoprostane is widely used as a marker for endogenous superoxide activity and its production is directly stimulated by multiple mechanisms, including Ang II, inflammatory cytokines, and aldosterone.⁸ The differences between amlodipine and aliskiren treatments on renal production of 8-isoprostane could be related to their different effects on Ang II production. The effects of aliskiren are mainly mediated by reduction in angiotensin II formation and AT1 receptor stimulation. Amlodipine, in addition to reducing aldosterone production, has direct effects on inhibiting tissue oxidative stress and inflammation.^{19,25,26}

Increased oxidative stress is directly related to the development of renal fibrosis.³¹ In diabetic kidney, increased

levels of reactive oxygen species activate the production of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) that in turn stimulates the production of the inflammatory cytokines leading to fibrosis.³² Recently, we demonstrated that enhanced levels of renal Ang II in STZ-induced diabetic rats were associated with increased renal expression of the transcription factor NF- κ B and the renal levels of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin 6. These changes were accompanied by increased urinary albumin excretion.²⁰ The influence of aldosterone on oxidative stress was previously demonstrated in vivo. In these studies, aldosterone infusion increased the production of reactive oxygen species in rat kidney and activated NF- κ B and renal fibrosis in Ang II-infused rats.^{7,33} In contrast, administration of antioxidant drugs to aldosterone-treated animals reduced oxidative stress and attenuated inflammation and collagen accumulation in the kidney.⁷ In addition, the blockade of aldosterone action with mineralocorticoid receptor antagonists^{34,35} or aldosterone synthase inhibitors^{36,37} prevented the development of inflammation and fibrosis in different tissues, including the kidney.

The main mechanisms by which aldosterone induces inflammation include promotion of inflammatory cell infiltration and adhesion molecules and stimulation of reactive oxygen species formation.^{4,37} The involvement of aldosterone in modulating inflammation leading to fibrosis and remodeling was demonstrated in different tissues, including the heart, vasculature, and kidney.^{4,10,24} Fibrosis is a major contributor to development of end-stage renal disease in diabetes. In our current study, elevated aldosterone levels were associated with increased PAS and fibronectin immunostaining in diabetic kidneys. These factors were reduced in diabetic rats treated with aliskiren alone or combined with amlodipine. The lack of effects of amlodipine alone on preventing increases in renal 8-isoprostane in this diabetic animal model may have contributed to the absence of beneficial effects of this drug on renal fibrosis.

CONCLUSIONS

We demonstrated that in diabetic kidney, reduction in the production of aldosterone induced by the antihypertensive agents amlodipine or aliskiren improved renal oxidative stress by increasing NO-cGMP production. Combination therapy of amlodipine and aliskiren further improved renal NO-cGMP levels. In addition, aliskiren alone or combined with amlodipine reduced renal 8-isoprostane levels and fibrosis. These findings were independent of BP changes. Our results suggest that reduction of aldosterone by amlodipine or aliskiren is an important beneficial effect of these drugs to prevent the development of diabetic kidney disease.

REFERENCES

1. Hollenberg NK, Stevanovic R, Agarwal A, et al. Plasma aldosterone concentration in the patient with diabetes mellitus. *Kidney Int.* 2004; 65:1435–1439.
2. Siragy HM, Awad A, Abadir P, et al. The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor- α in diabetic rats. *Endocrinology.* 2003;144:2229–2233.
3. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int.* 2003;63: 1791–1800.

4. Gilbert KC, Brown NJ. Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17:199–204.
5. Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, et al. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1B. *Eur J Pharmacol*. 1995;290:69–73.
6. Maron BA, Zhang YY, Handy DE, et al. Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2009;284:7665–7672.
7. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, et al. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2004;17:597–603.
8. Practico D, Lawson JA, Roakach J, et al. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:243–247.
9. Onozato ML, Tojo A, Kobayashi N, et al. Dual blockade of aldosterone and angiotensin II additively suppresses TGF-beta and NADPH oxidase in the hypertensive kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:1314–1322.
10. Huang S, Zhang A, Ding G, et al. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296:F1323–F1333.
11. Staessen J, Lijnen P, Fagard R, et al. Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J Endocrinol*. 1981;91:457–465.
12. Schjoedt KJ, Andersen S, Rossing P, et al. Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. *Diabetologia*. 2004;47:1936–1939.
13. Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, et al. Impact of aliskiren treatment on urinary aldosterone levels in patients with type 2 diabetes and nephropathy: an AVOID substudy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2012;13:118–121.
14. Nadler JL, Hsueh W, Horton R. Therapeutic effect of calcium channel blockade in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60:896–899.
15. Aguilera G, Catt KJ. Participation of voltage-dependent calcium channels in the regulation of adrenal glomerulosa function by angiotensin II and potassium. *Endocrinology*. 1986;118:112–118.
16. Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. Benazepril combined with either amlodipine or hydrochlorothiazide is more effective than monotherapy for blood pressure control and prevention of end-organ injury in hypertensive Dahl rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;48:857–861.
17. Mohler ER III, Herrington D, Ouyang P, et al; EXPLORE Investigators. A randomized, double-blind trial comparing the effects of amlodipine besylate/benazepril HCl vs amlodipine on endothelial function and blood pressure. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8:692–698.
18. Toblli JE, Ferder L, Angerosa M, et al. Effects of amlodipine on tubulointerstitial lesions in normotensive hyperoxaluric rats. *Hypertension*. 1999;34:254–258.
19. Siragy HM, Xue C, Webb RL. Beneficial effects of combined benazepril-amlodipine on cardiac nitric oxide, cGMP, and TNF-alpha production after cardiac ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47:636–642.
20. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Combined aliskiren and amlodipine reduce albuminuria via reduction in renal inflammation in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59:281–287.
21. Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*. 1997;100:264–269.
22. Kokolakis G, Panagis L, Stathopoulos E, et al. From the protein to the graph: how to quantify immunohistochemistry staining of the skin using digital imaging. *J Immunol Methods*. 2008;331:140–146.
23. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:261–273.
24. Siragy HM, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol*. 2008;93:817–824.
25. Brovkovich V, Kalinowski L, Muller-Peddinghaus R, et al. Synergistic antihypertensive effects of nifedipine on endothelium: concurrent release of NO and scavenging of superoxide. *Hypertension*. 2001;37:34–39.
26. Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*. 1998;97:576–580.
27. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Restoration of nitric oxide availability after calcium antagonist treatment in essential hypertension. *Hypertension*. 2001;37:943–948.
28. ENCORE Investigators. Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease: ENCORE I study (Evaluation of Nifedipine and Cerivastatin On Recovery of coronary Endothelial function). *Circulation*. 2003;107:422–428.
29. Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, et al. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension*. 2008;52:563–572.
30. Ikeda U, Shimpo M, Ohki R, et al. Amlodipine increases nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2000;18:1597–1604.
31. Kim J, Seok YM, Jung KJ, et al. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F461–F470.
32. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:433–442.
33. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*. 2004;43:841–848.
34. Neves MF, Amiri F, Virdis A, et al; CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005;83:999–1006.
35. Susic D, Varagic J, Ahn S, et al. Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H175–H179.
36. Lea WB, Kwak ES, Luther JM, et al. Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt. *Kidney Int*. 2009;75:936–944.
37. Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, et al. Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation*. 2005;111:3087–3094.

VASCULAR

A NONPEPTIDE ANGIOTENSIN II TYPE 2 RECEPTOR AGONIST PREVENTS RENAL INFLAMMATION IN EARLY DIABETES

Luis C. Matavelli, MD^{1,2}; Roberto Zatz, MD, PhD¹; Helmy M. Siragy, MD²

Renal Division, Department of Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil¹. Department of Medicine, University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, USA².

Running Title: AT2R stimulation and diabetic nephropathy

Sources of Funding: This study was supported by National Institutes of Health grants DK078757 and HL091535 to H.M. Siragy.

Corresponding Author:

Helmy M. Siragy, MD
Department of Medicine
University of Virginia Health Sciences Center
P.O. Box 801409
Charlottesville, VA 22908-1409
Tel. (434)924-5629 Fax (434)982-3626
E-mail: hms7a@virginia.edu

Abstract

We hypothesized that direct AT2R stimulation improves albuminuria in diabetes by preventing renal inflammation and improving oxidative stress. Normoglycemic controls (NC) and streptozotocin-induced diabetes Sprague-Dawley rats (DM) were treated for 4 weeks with vehicle (V) or the AT2R agonist Compound 21 (C21). At the end of study, we evaluated BP, urinary albumin to creatinine ratio (UACR), renal interstitial fluid (RIF) levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO), cGMP, and 8-isoprostane, and renal expression of TNF- α , IL-6, and AT2R. There were no significant differences in BP between different treatments. DM rats demonstrated increased UACR, RIF TNF- α , IL-6 and 8-isoprostane, and mRNA for TNF- α and IL-6. DM rats also had reduced RIF NO and cGMP. C21 treatment of DM rats limited the increase in UACR, normalized RIF TNF- α , IL-6 and 8-isoprostane, and in mRNA for TNF- α and IL-6, and increased RIF NO and cGMP. In NC rats, C21 treatment did not change these parameters. AT2R mRNA and protein expressions increased in DM rats compared to NC but were not influenced by C21 treatment. We conclude that direct AT2R stimulation in diabetic rats improves diabetic albuminuria through the prevention of renal inflammation and improved production of NO and cGMP.

Key words: AT2 receptor; C21, inflammation; diabetes; kidney; oxidative stress.

INTRODUCTION

Diabetes is the most common cause of end-stage renal disease (ESRD), accounting for nearly half of new cases in the United States (1). Diabetes is associated with increased renal activity of the renin-angiotensin system (RAS), leading to enhanced angiotensin (Ang) II generation (2) and stimulation of the Ang II type 1 receptor (AT1R) (3). Accordingly, suppression of the RAS by angiotensin I converting enzyme inhibitors (4-6) or AT1R blockers (7-9) exert renoprotective effects, and have become a mainstay in the treatment of diabetic nephropathy. However, despite wide utilization of RAS inhibitors, the progression of diabetic kidney disease to ESRD remains common (1).

Several pathophysiologic mechanisms may contribute to the development of diabetic kidney disease including renal inflammation (10-11), reduction in vasodilatory factors, and increased oxidative stress (12). While most of the known Ang II effects in the diabetic kidney are mediated by AT1R, the role of the Ang II type 2 receptor (AT2R) in this disease still needs to be elucidated. The AT2R counteracts most of the AT1R effects by inhibiting cell growth, promoting cell differentiation, stimulating apoptosis and the renal production of nitric oxide (NO), cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP), and bradykinin (13-16). Recent reports from our laboratory and others demonstrated that in non-diabetic rodents, AT2R activation with its nonpeptide agonist Compound 21 (C21) (17) reduced inflammation and fibrosis, and improved renal production of NO-cGMP (18-20).

The current study was conducted to evaluate the effects of AT2R stimulation with C21 on renal inflammation, NO-cGMP generation, oxidative stress and albuminuria in diabetic rats.

METHODS

Animal preparation. The University of Virginia Animal Care and Use Committee approved all study protocols. Experiments were conducted in male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) weighing 230 to 260g. Animals were given normal-sodium diet and tap water ad libitum for the whole experiment and a minimum of one week was allowed to adjust to our animal care facility. Rats were randomly allocated into four groups: control groups receiving vehicle (C+V; $n = 10$) or the AT2R agonist C21 (C+C21; $n = 10$), and diabetes groups receiving vehicle (DM+V; $n = 10$) or C21 (DM+C21; $n = 10$). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of 65 mg/kg of streptozotocin (STZ; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Control rats (C+V and DM+V) were injected with an equal volume of vehicle (0.9% NaCl). Treatments were initiated the day after STZ injection and lasted for a period of 4 weeks. Insulin was not given to any of the animals utilized in this study. C21 (Vicore, Uppsala, Sweden) was infused at a rate of 0.3 mg/kg/day via osmotic minipump (model 2004; Alzet, Cupertino, CA, USA). The control groups of rats were implanted with a sham osmotic minipump containing 0.9% NaCl. For minipump implantation, one day after STZ or vehicle injection, rats were anesthetized with a combination of ketamine (80 mg/kg; I.P.) and xylazine (8 mg/kg; I.P.). The osmotic minipumps were surgically implanted subcutaneously in the subscapular region of all rats.

Body weight, blood glucose, kidney mass index, 24-h urine measurements, and systolic blood pressure monitoring. Body weight, blood glucose, 24-h urine collections, and systolic blood pressure (SBP) were obtained at baseline and at the end of study. For blood glucose determination, blood was collected from a tail vein after overnight fasting, and glucose was measured using a glucometer (Bayer HealthCare, Mishawaka, IN, USA). For urine collections, rats were placed in individual metabolic cages for a period of 24-h. The volume of collected urine was determined gravimetrically and urine samples were kept at -80°C until assayed. Urinary albumin concentration was determined by using a sensitive rat albumin enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA). Urine creatinine was determined by a creatinine assay kit (Cayman). Urinary albumin to creatinine ratio (UACR) was used as a marker for diabetic nephropathy. UACR was calculated and presented as albumin in

milligrams divided by creatinine in grams. SBP was measured in non-anesthetized rats using a tail-cuff non-invasive multi channel blood pressure system (IITC Life Sciences, Woodland Hills, CA, USA). The mean values of the recorded SBP were calculated.

In vivo renal interstitial fluid (RIF) collections and kidney mass indexes. To determine the RIF levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6, NO, cGMP, and the oxidative stress marker 8-isoprostane we utilized a microdialysis technique as previously described (13-14). In this technique, substances with a molecular mass > 40,000 Da cannot cross the dialysis membrane, which nevertheless allows the free passage of smaller molecules. At the end of the study, RIF collections were performed in each animal under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg I.P.; Sigma). A dialysis probe was placed in the renal cortex of both kidneys through a midline laparotomy. In brief, a 30-gauge needle was tunneled approximately 1-2 mm from the outer renal surface for about 0.5 cm before it exited by penetrating the capsule again. The tip of the needle was then inserted into one end of the dialysis probe, and the needle was pulled together with the dialysis tube until the dialysis fiber was situated into the renal cortex. To prevent dislodging, the dialysis probe was glued to the surface of the kidney using Vetbond (3M Animal Care Products, Saint Paul, MN, USA). Thereafter, the inflow tube of the dialysis probe was connected to a gas-tight syringe filled with saline. Perfusion was done at a rate of 3 μ l/min using an infusion pump. After a 60-min period for stabilization following completion of surgical procedures, the effluent was collected from the outflow tube in non-heparinized plastic tubes over ice through five periods of 60-min each with an amount of around 180 μ l in each sample. At the end of each experiment, animals were euthanized and kidneys were harvested and weighed. Total kidney mass index was calculated as kidney weights in milligrams divided by body weight in grams. Kidney tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

RIF storage and assays. The RIF collections were immediately stored at -80°C until assayed. RIF TNF- α and IL-6 were measured using an EIA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). RIF NO recovery levels were measured using a nitrate/nitrite fluorometric assay kit (Cayman) and presented as μ mol/min. RIF cGMP recovery levels were measured using a cyclic GMP EIA

kit (Cayman). RIF 8-isoprostane recovery levels were measured using a 8-isoprostane EIA kit (Cayman). Both RIF cGMP and RIF 8-isoprostane are presented as fmol/min.

Determination of mRNA expression. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine changes in renal expression of TNF- α , IL-6, and AT2R mRNAs. RNA (n = 5, each group) was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reverse transcription of the RNA was performed by the first strand cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The PCR was analyzed using SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences were: TNF- α forward, 5'-ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA-3', reverse, 5'-CGAGCAGGAATGAGAAGAGG-3'; IL-6 forward, 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3', reverse, 5'-ACAGTGCATCATCGCTGTTC-3'; and AT2R forward, 5'-TTCTTGGGAGCAAACAGACC-3', reverse, 5'-CTGGAAGTGTGCCAGAAAT-3'. RT-PCR was performed using iCycler (Bio-Rad) and threshold cycle number was determined using iCycler software version 3.0 (Bio-Rad). Reactions were performed in triplicate, and threshold cycle numbers were averaged. The mRNA results for specific target genes were calculated with normalization to 18S rRNA.

Western blot analysis. Preparations of kidney tissue lysate and protein quantitation were performed as previously described (21). Antibody to AT2R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used in the Western blot. Signal detection was carried out by using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). The blots were treated using Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher) according to the manufacturer's recommendation and followed by reprobing with a monoclonal antibody against β -actin (Sigma). Densitometry evaluation of the bands was done using ImageMaster TotalLab software version 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). The bands densities of target proteins were normalized to the corresponding density of β -actin. The arbitrary unit of band densities was represented as the expression level.

Statistical analysis. Comparisons among different treatment groups were assessed by ANOVA followed by a Tukey test for post-hoc comparisons. Data are expressed as mean $\pm$ SE. $P < 0.05$ is considered statistically significant.

RESULTS

Body weight, blood glucose, total kidney mass index, urine output, and SBP data of all rats at the end of study are presented in Table 1. At baseline there were no significant differences in these parameters among groups. At four weeks, body weight was significantly reduced and the total kidney mass index was increased in diabetic rats. Fasting blood glucose of all diabetic rats at baseline was 71 ± 3 mg/dl and increased to 486 ± 19 mg/dl ($P < 0.001$) four weeks after STZ injection. There were no significant changes in any of these parameters in response to C21 treatment in both control and diabetic groups. There were no significant differences in SBP levels between groups of normoglycemic controls and STZ-induced diabetes rats.

Renal expressions of TNF- α and IL-6 mRNA. Renal TNF- α (Figure 1A) and IL-6 (Figure 1B) mRNA significantly increased in vehicle-treated DM rats compared to normoglycemic rats. The comparison between both groups of DM rats showed no statistical difference in the renal expression of TNF- α and IL-6 mRNA, although a trend towards reduced expression of these inflammatory markers was observed in C21-treated DM rats. There were no significant differences in renal expression of TNF- α and IL-6 mRNA between the vehicle- and C21 treated normoglycemic groups of rats.

RIF TNF- α and IL-6 in normal and diabetic rats. RIF TNF- α (Figure 1C) and RIF IL-6 (Figure 1D) were significantly increased in DM rats receiving vehicle ($P < 0.01$) compared to normoglycemic control animals treated with vehicle or C21. Compared to vehicle treated DM rats, RIF TNF- α and RIF IL-6 were significantly reduced in DM rats receiving C21 ($P < 0.01$). There were no differences in RIF TNF- α and RIF IL-6 between both groups of normoglycemic control rats receiving vehicle or C21.

RIF NO, cGMP, and 8-isoprostane in normal and DM rats. RIF NO (Figure 2A) and RIF cGMP (Figure 2B) levels were significantly reduced in vehicle treated DM rats compared to normoglycemic controls receiving vehicle (-39% and -56% respectively, $P < 0.01$) or C21 (-36% and -54%, $P < 0.01$). C21 treatment significantly increased RIF NO and RIF cGMP levels in diabetic rats by 46% and 60%, respectively ($P < 0.04$). Conversely, compared to normoglycemic controls receiving vehicle, RIF 8-isoprostane levels (Figure 2C) increased by 17% ($P < 0.02$) in

vehicle treated DM rats. Compared with this group of animals, C21 treatment significantly reduced RIF 8-isoprostane levels by 14% in diabetic rats ($P < 0.03$). However, C21 treatment did not cause significant changes in levels of RIF NO, RIF cGMP, and RIF 8-isoprostane in the control group.

AT2R expression in normal and diabetic rat kidneys. Figure 3 shows that compared to vehicle treated normoglycemic control rats, renal AT2R mRNA and protein expressions were significantly increased in both groups of diabetic rats ($P < 0.04$). Compared to C21 treated normoglycemic controls, renal AT2R mRNA increased significantly in C21 treated DM rats ($P < 0.05$) but the comparison with the vehicle treated DM rats was not significant, despite a trend to increased AT2R mRNA and protein expressions in C21 treated DM rats.

UACR in normal and diabetic rats. Compared to normoglycemic control rats receiving vehicle or C21, UACR was significantly increased in DM rats receiving vehicle (13.9 ± 2.1 and 15.7 ± 2.1 respectively vs. 60.0 ± 3.0 ; $P < 0.001$) (Figure 4). C21 treatment reduced UACR in DM rats by about 17% to 49.9 ± 3.3 mg/g ($P < 0.04$) but did not affect UACR in normoglycemic controls.

DISCUSSION

The present investigation was designed to evaluate the effects of AT2R stimulation on renal inflammation, production of NO-cGMP and 8-isoprostane, and albuminuria in the development of diabetic nephropathy. Our results demonstrated in diabetic rats that direct stimulation of AT2R by the nonpeptide agonist C21 reduced renal inflammatory markers TNF- α and IL-6 and the oxidative stress marker 8-isoprostane; and increased renal NO-cGMP production. These changes were accompanied by reduction of albuminuria. All these effects were independent of changes in blood pressure.

Renal RAS activity is increased in diabetes (2-3). Both clinically and experimentally, it is well demonstrated that renal injury in diabetes can be slowed by the blockade of RAS with angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor antagonists (4-9). Although these pharmacological tools have been widely used for several years, diabetes is still the leading cause of ESRD (1). Thus the finding of new therapies that could lead to further improvement of diabetic nephropathy is of great interest. Recently, the renal and cardiovascular benefits of AT2R stimulation by C21 were reported in several different disease models (18-20). Overall, these studies have consistently demonstrated that direct stimulation of AT2R reduces inflammation and fibrosis in the kidneys and heart. The selectivity of C21 to AT2R was well demonstrated in these in vivo studies through the effective blockade of its actions by the AT2R antagonist PD123319 (18-20). In addition, studies in vitro also demonstrated a high selectivity of this compound to AT2R (17,22). However, the benefits of AT2R stimulation in diabetic kidney disease still need to be elucidated.

In diabetes, increased formation of Ang II enhances oxidative stress and the release of renal inflammatory cytokines (23-24) contributing to the development and progression of diabetic nephropathy (10). These changes can be improved by RAS inhibition (25-29). Our current results demonstrated a reduction in renal inflammation and improvement of oxidative stress and albuminuria in diabetic rats treated with the AT2R agonist C21. Interestingly, in C21 treated diabetic animals, there were significant reductions in renal TNF- α and IL-6 expressions at the protein but not at the mRNA levels, although a trend towards reduced expression of the mRNA levels of these inflammatory markers was noted. This observation could be due to the limited number of animals used in this study. In addition, the finding that blood pressure was not

affected by treatment with the AT2R agonist C21 is consistent with most previous studies exploring the effects of this compound on the cardiovascular system (18-20).

AT2R stimulation did not affect albuminuria in normal control animals but attenuated it in the diabetic rats. This beneficial response was noted after a short 4 weeks period of drug administration that was initiated during the onset and development of diabetes. This short duration study was not associated with significant renal histopathological changes (data not shown). Future long duration experiments should be considered to evaluate the effects of C21 treatment on established diabetic kidney disease. It is highly likely that the anti-inflammatory and anti-oxidant effects of AT2R stimulation contributed to amelioration of albuminuria in diabetic animals. In addition, increased formation of NO-cGMP due AT2R stimulation was previously demonstrated to induce vasodilation in human resistance vessels (30-31) and to enhance renal blood flow in rats (32). These hemodynamic changes may have played a role in attenuating renal injury in the diabetic rats. Although the current study was not designed to explore signaling mechanisms associated with AT2R activation, a previous study using human primary dermal fibroblasts demonstrated that C21 reduced TNF- α and IL-6 production by inhibition of the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor-kappa B (33). Our study results are in agreement with these findings.

Our current data also demonstrated that AT2R expression was increased in diabetic kidney, which is consistent with previous reports (34-35). However, other studies failed to show similar findings (36-37). It is possible that these discrepancies are related to variations in duration of diabetes, differential expression among diverse renal cells, and the use of different animal models (35-36). We also demonstrated that AT2R stimulation did not cause significant changes in renal AT2R expression in both non-diabetic and diabetic rats. In contrast to these findings, we previously reported in non-diabetic hypertensive rats that AT2R stimulation further enhanced AT2R expression (20), which may suggest that AT2R stimulation may have a positive feedback on its gene activity in non-diabetic state. Despite the increased renal AT2R expression observed in our diabetic animals, its function is reduced as suggested by the observed reductions in NO and cGMP production. A possible explanation could be related to decrease in its stimulating agonists. This possibility is supported by the observed improvements in AT2R

function with the administration of the C21. The exact mechanisms underlying this reduction in AT2R activity in diabetes need to be elucidated.

CONCLUSIONS

We conclude that direct stimulation of AT2R improves albuminuria in diabetic nephropathy through the reduction of renal inflammation, stimulation of the renal NO and cGMP production, and improvement of oxidative stress. These effects are independent of blood pressure changes. Our findings suggest a protective role for AT2R, and that its stimulation is a potential therapeutic tool to prevent kidney injury in diabetes.

REFERENCES

1. U.S. Renal Data System, USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.
2. Awad AS, Webb RL, Carey RM, Siragy HM. Increased renal production of angiotensin II and thromboxane B₂ in conscious diabetic rats. *Am J Hypertens*. 2005;18:544-548.
3. Ruggenti P, Cravedi P, Remuzzi G. The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:319-330.
4. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest*. 1986;77:1925-1930.
5. Anderson S, Rennke HG, Garcia DL, Brenner BM. Short and long term effects of antihypertensive therapy in the diabetic rat. *Kidney Int*. 1989;36:526-536.
6. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1993;329:1456-1462.
7. Teles F, Machado FG, Ventura BH, Malheiros DM, Fujihara CK, Silva LF, Zatz R. Regression of glomerular injury by losartan in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2009;75:72-79.
8. Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P; Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2001;345:851-860.
9. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2001;345:861-869.
10. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:433-442.

11. Siragy HM, Awad A, Abadir P, Webb R. The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor- α in diabetic rats. *Endocrinology*. 2003;144:2229-2233.
12. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther*. 2012;30:49-59.
13. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin (PG) E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest*. 1996;97:1979-1982.
14. Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest*. 1997;100:264-269.
15. Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1996;271:R1090-1095.
16. Morrissey JJ, Klahr S. Effect of AT₂ receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999;276:F39-F45.
17. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, Johansson B, Holm M, Botoros M, Karlén A, Pettersson A, Nyberg F, Fändriks L, Gallo-Payet N, Hallberg A, Alterman M. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J Med Chem*. 2004;47:5995-6008.
18. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*. 2008;118:2523-2532.
19. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L. Stimulation of AT₂ receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J Hypertens*. 2009;27:2444-2451.
20. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension*. 2011;57:308-313.

21. Huang J, Siragy HM. Glucose promotes the production of interleukine-1beta and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (Pro)renin receptor expression. *Endocrinology*. 2009;150:5557-5565.
22. Verdonk K, Durik M, Abd-Alla N, Batenburg WW, van den Bogaardt AJ, van Veghel R, Roks AJ, Danser AH, van Esch JH. Compound 21 induces vasorelaxation via an endothelium- and angiotensin II type 2 receptor-independent mechanism. *Hypertension*. 2012; 60:722-729.
23. Han Y, Runge MS, and Braiser AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Circ Res*. 1999;84:695-703.
24. Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:2439- 2446.
25. Awad AS, Webb RL, Carey RM, Siragy HM. Renal nitric oxide production is decreased in diabetic rats and improved by AT1 receptor blockade. *J Hypertens*. 2004;22:1571-1577.
26. Siragy HM, Xue C. Local renal aldosterone production induces inflammation and matrix formation in kidneys of diabetic rats. *Exp Physiol*. 2008;93:817-824.
27. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37:277-282.
28. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Combined aliskiren and amlodipine reduce albuminuria via reduction in renal inflammation in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59:281-287.
29. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Reduction of aldosterone production improves renal fibrosis in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;61:17-22.
30. Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*. 2004;109:2296-2301.
31. Savoia C, Touyz RM, Volpe M, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. *Hypertension*. 2007;49:341-346.
32. Hilliard LM, Jones ES, Steckelings UM, Unger T, Widdop RE, Denton KM. Sex-specific influence of angiotensin type 2 receptor stimulation on renal function: a novel therapeutic target for hypertension. *Hypertension*. 2012;59:409-414.

33. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck WH, Unger T, Steckelings UM. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappa B. *Hypertension*. 2010;55:924-931.
34. Hakam AC, Hussain T. Renal AT2 receptors are upregulated and mediate the candesartan induced natriuresis/diuresis in obese Zucker rats. *Hypertension*. 2005;45:270-275.
35. Hakam AC, Siddiqui AH, Hussain T. Renal angiotensin II AT2 receptors promote natriuresis in STZ-induced diabetes rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290:F503-F508.
36. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD. Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F254-F265.
37. Bonnet F, Candido R, Carey RM, Casley D, Russo LM, Osicka TM, Cooper ME, Cao Z. Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade. *J Hypertens*. 2002;20:1615-1624.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Renal mRNA expression and RIF levels of transforming growth factor- α (TNF- α) and interleukine-6 (IL-6) in kidneys of normoglycemic controls and STZ-induced diabetes rats treated with vehicle (V) or compound 21 (C21). A, mRNA levels of TNF- α . B, mRNA levels of IL-6. C, RIF levels of TNF- α . D, RIF levels of IL-6. Data are mean $\pm$ SEM. * P < 0.05 vs. control+V; ‡ P < 0.05 vs. control+C21; † P < 0.05 vs. DM+V.

Figure 2. Renal interstitial fluid (RIF) levels of nitric oxide (NO, A), cGMP (B), and 8-isoprostane (C) in kidneys of normoglycemic control rats treated with vehicle (V) or compound 21 (C21), and STZ-induced diabetes rats treated with V and C21. Data are mean $\pm$ SEM. * P < 0.05 vs. control+V; ‡ P < 0.05 vs. control+C21; † P < 0.05 vs. DM+V.

Figure 3. Renal mRNA and protein expressions of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in kidneys of normoglycemic control rats treated with vehicle (V) or compound 21 (C21), and STZ-induced diabetes rats treated with V or C21. A, mRNA levels of AT2R. B, Western blot analyzes of AT2R. Top, Representative blots. Bottom, Quantitative results normalized to β -actin. Data are mean $\pm$ SEM. * P < 0.05 vs. control+V; ‡ P < 0.05 vs. control+C21; † P < 0.05 vs. DM+V.

Figure 4. Urinary albumin to creatinine ratio (UACR) of normoglycemic control rats treated with vehicle (V) or compound 21 (C21), and STZ-induced diabetes rats treated with V or C21. Data are mean $\pm$ SEM. * P < 0.001 vs. control+V; ‡ P < 0.001 vs. control+C21; † P < 0.04 vs. DM+V.

TABLE 1

Body weight, blood glucose, total kidney mass index, urinary volume, and systolic blood pressure (SBP) of control + vehicle, control + compound 21 (C21), diabetes + vehicle, and diabetes +C21 rats at the end of study.

	Control		Diabetes	
	Vehicle	C21	Vehicle	C21
Body Weight (g)	411±14	389±10	291±10 ^{*‡}	288±10 ^{*‡}
Blood Glucose (mg/dl)	83±5	78±2	473±27 ^{*‡}	499±26 ^{*‡}
Total Kidney Mass Index (mg/g)	3.18±0.05	3.28±0.06	5.51±0.13 ^{*‡}	5.27±0.10 ^{*‡}
Urinary Volume (ml)	31±4	40±4	217±12 ^{*‡}	215±7 ^{*‡}
SBP (mmHg)	115±3	120±2	119±2	120±3

Values are mean ± SEM. **P* < 0.05 vs. control+vehicle; ‡*P* < 0.05 vs. control+C21.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4