Simone da Costa Alarcon Arias

**O tratamento da nefropatia avançada com
losartan-hidroclorotiazida no modelo de
ablação renal de 5/6**

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

Programa de Nefrologia
Orientadora: Dra. Clarice Kazue Fujihara

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Arias, Simone da Costa Alarcon

O tratamento da nefropatia avançada com losartan-hidroclorotiazida no modelo de ablação renal de 5/6 / Simone da Costa Alarcon Arias. -- São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Clarice Kazue Fujihara.

Descritores: 1.Losartan 2.Hidroclorotiazida 3.Insuficiência renal crônica
4.Ablação renal 5/6

USP/FM/DBD-206/12

Dedico esta tese aos meus pais, Jorge e Ivete, meu marido Thiago, ao meu irmão Murilo e sua esposa Marilene. Vocês são minhas referências de vida, um exemplo de dedicação e respeito. Vocês, cada um ao seu jeito, sempre apoiaram e deram base para minha formação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Clarice Kazue Fujihara, a quem devo muito de minha formação como bióloga e também como pessoa. Durante todos esses anos só tenho a agradecer os momentos que você compartilhou comigo, como orientadora, amiga e conselheira. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Roberto Zatz, cujo entusiasmo com a Ciência impressiona e instiga todos à sua volta. Você é um exemplo de como uma pessoa grandiosa pode também ser simples. Obrigada por toda a paciência e disponibilidade!

À Carla Perez Valente a quem devo muito deste trabalho. Você foi meu braço direito e esquerdo em muitos momentos desta tese. Você é parte integrante não só das práticas aqui realizadas, mas também teve um papel muito especial no meu crescimento. Muito obrigada pela companhia de cada dia, pelos questionamentos, pela diversão e por me ajudar em tudo!

À Dra Denise Malheiros por todos os momentos de discussão e colaboração que foram indispensáveis para a conclusão deste projeto.

À Flavia Gomes Machado que sempre esteve ao meu lado e me ajudou de todas as formas possíveis, sem palavras para agradecer tudo o que você fez por mim, colega, amiga e madrinha... Você é uma pessoa impar! Obrigada por tudo, sempre!

À Camilla Fanelli por todas as sugestões, discussões e disponibilidade para ajudar nos meus experimentos. Sem contar todos os momentos de alegria e descontração que passamos. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Tales de Brito pela colaboração e por ceder os anticorpos que permitiram a realização das duplas marcações.

À Dra Daisa David pela colaboração e apoio ao longo do meu estudo.

À Cristiene Okabe que sempre esteve presente nos momentos em que precisei de ajuda, paciência ou força. Você esteve disponível com conselhos e carinho durante toda a minha trajetória. Obrigada!

Aos alunos Neto, Victor, Raquel e Beatriz pelo companheirismo, força e colaboração durante toda essa fase.

À Claudia Sena que me acolheu durante a iniciação científica e ensinou grande parte dos conhecimentos que tenho hoje. Sua ajuda foi e ainda é indispensável.

À Grasiela Barlette por toda a disponibilidade e cuidado com os cortes e colorações histológicas.

À Janice Pião pela cuidadosa manutenção do biotério e valiosa ajuda todos os dias!

À Vivian Viana e Ricardo pelo apoio técnico no biotério.

À Luciene dos Reis pela paciência e incansáveis explicações. Seu amor pela Ciência já me contagiou! Ainda terei muito a aprender com você!

Ao Wagner Domingues pela disposição em ajudar em absolutamente tudo que fosse necessário e até mesmo por corrigir os meus longos cálculos de diluição.

A todos do LIM-16, pela companhia, colaboração e momentos juntos. Obrigada por poder fazer parte deste ambiente científico, agradável e familiar.

À Denise, Eliana e Pedro por toda ajuda nos assuntos administrativos.

Ao meu marido Thiago, que sempre me apoiou, me incentivou e torceu por mim em cada passo desta trajetória. Você é um exemplo de caráter e bondade. As minhas conquistas são mais completas por você estar ao meu lado!

À minha mãe Ivete e a meu pai Jorge, não tenho palavras para descrever o quanto admiro a força e a perseverança de vocês. Busco todos os dias fazer valer tudo o que vocês fizeram por mim. Obrigada pelo apoio e amor durante toda a minha vida e, especialmente, durante a conclusão deste trabalho!

Ao meu irmão Murilo, sua esposa Marilene e ao meu querido primo Marcio. Vocês são minha fonte de energia! A torcida, o carinho, o cuidado e o querer bem, nada no mundo paga esses momentos. Sou privilegiada por tê-los ao meu lado!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata...

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	08
3. MÉTODOS	09
<i>Protocolo 1</i>	11
<i>Protocolo 2</i>	15
<i>Procedimentos</i>	18
<i>Análise estatística</i>	26
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ABREVIATURA

Abreviaturas	Significado
A	Anlodipina
Ang II	Angiotensina II
ALB	Albuminúria de 24 horas
ALDO	Aldosterona sérica
APAAP	Fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina PCNA
AQP-1	Canal de água localizado nos túbulos proximais
Ang II	Antagonista do receptor AT1 da Angiotensina II
DRC	Doença renal crônica
EG	Esclerose glomerular
H	Hidroclorotiazida
Ht	Hematócrito arterial
H ₂	Hidralazina
ACE	Inibidor da enzima conversora de Angiotensina II
IEG	Índice de esclerose glomerular
INT	Área intersticial fracional
IRCT	Insuficiência renal crônica terminal
L	Losartan
MØ	Infiltração de macrófagos
Nx	Ablação renal de 5/6
OAT1	Transportador de ânions orgânicos
PA	Pressão arterial

PAS	Ácido Periódico-Shiff
PC	Pressão sistólica caudal
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PE	Peso Corpóreo
RFG	Ritmo de filtração glomerular
S	Sham
Scr	Creatinina sérica
SFB	Soro fetal bovino
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBS	Solução salina tris-tamponada
Tg	Triglicérides plasmático
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
NCC	Co-transportador sódio/cloreto

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Peso Corpóreo de 60 a 150 dias de Nx	29
Tabela 02.	Peso Corpóreo de 120 a 210 dias de Nx	29
Tabela 03.	Pressão caudal de 60 a 150 dias de Nx	32
Tabela 04.	Pressão caudal de 120 a 210 dias de Nx	32
Tabela 05.	Albuminúria de 60 a 150 dias de Nx	35
Tabela 06.	Albuminúria de 120 a 210 dias de Nx	35
Tabela 07.	Parâmetros bioquímicos após 60 a 150 dias de Nx	37
Tabela 08.	Parâmetros bioquímicos após 120 a 210 dias de Nx	37
Tabela 09.	Análise do tecido renal aos 60 e 150 dias de Nx	46
Tabela 10.	Análise do tecido renal aos 120 e 210 dias de Nx	46
Tabela 11.	Imuno-histoquímica após 60 e 150 dias de Nx	55
Tabela 12.	Imuno-histoquímica após 120 e 210 dias de Nx	55
Tabela 13.	Imuno-histoquímica após 60 e 150 dias de Nx	62
Tabela 14.	Imuno-histoquímica após 120 e 210 dias de Nx	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Sobrevida dos animais do protocolo 1	28
Figura 02.	Sobrevida dos animais do protocolo 2	28
Figura 03	Peso Corpóreo dos animais do protocolo 1	30
Figura 04	Peso Corpóreo dos animais do protocolo 2	30
Figura 05	Pressão Caudal dos animais do protocolo 1	33
Figura 06	Pressão Caudal dos animais do protocolo 2	33
Figura 07	Albuminúria dos animais do protocolo 1	36
Figura 08	Albuminúria dos animais do protocolo 2	36
Figura 09	Glicemia dos animais do protocolo 1 e 2	38
Figura 10.	Triglicérides dos animais do protocolo 1 e 2	39
Figura 11	Creatinina sérica do protocolo 1 e 2	41
Figura 12.	Potássio sérico dos animais do protocolo 1 e 2	42
Figura 13.	Aldosterona sérica dos animais do protocolo 1 e 2	44
Figura 14	Hematócrito arterial dos animais do protocolo 1 e 2	45
Figura 15	Microfotografias da morfologia glomerular	48
Figura 16	% de glomeruloesclerose do protocolo 1 e 2	48
Figura 17	Índice de glomeruloesclerose do protocolo 1 e 2	50
Figura 18	Distribuição das lesões glomerulares do protocolo 1	52
Figura 19	Distribuição das lesões glomerulares do protocolo 2	52
Figura 20.	Microfotografias da Área intersticial fracional	54
Figura 21.	Área intersticial fracional	54
Figura 22.	Microfotografias dos macrófagos intersticiais	57

Figura 23.	Infiltração de macrófagos do protocolo 1 e 2	57
Figura 24.	Microfotografias da marcação para All intersticial	59
Figura 25	Expressão de células positivas para All	59
Figura 26	Microfotografias da α -actina intersticial	61
Figura 27.	Marcação positiva para α -actina intersticial	61
Figura 28.	Microfotografias da marcação para PCNA	64
Figura 29.	Proliferação glomerular, tubular e intersticial	64
Figura 30.	Microfotografias da marcação para PCNA+AQP1	66
Figura 31.	Proliferação celular nos túbulos proximais	66
Figura 32.	Microfotografias da marcação para PCNA+NCC	68
Figura 33.	Proliferação celular nos túbulos distais	68

RESUMO

Arias, SCA. - *O tratamento da nefropatia avançada com losartan-hidroclorotiazida no modelo de ablação renal de 5/6*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A doença renal crônica (DRC) é hoje um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Apesar de um número crescente de publicações abordando os mecanismos que levam à DRC e à sua progressão, são raros os estudos experimentais cujos resultados podem ser transpostos para a prática clínica. Um dos motivos para essa desproporção é o fato de que, em geral, o tratamento é iniciado em concomitância com a instalação da doença, o que aumenta artificialmente a eficácia da terapêutica, uma vez que os fatores patogênicos envolvidos podem ser mais facilmente neutralizados. Resultados bem menos animadores são obtidos se o tratamento é iniciado em fases mais tardias, quando a interação entre esses fatores, muito mais complexa, exige terapêutica mais vigorosa e a associação de dois ou mais fármacos.

No presente estudo, examinamos a evolução das lesões renais em um modelo estabelecido de DRC – a nefrectomia de 5/6 (Nx) - e o efeito de uma associação entre um bloqueador do receptor AT-1, o losartan (L), e a hidroclorotiazida (H) – até agora, a mais eficaz manobra terapêutica para o modelo em questão. Cento e noventa e seis ratos Munich-Wistar machos e adultos foram submetidos a Nx e divididos em quatro grupos: **Nx**, sem tratamento; **L**, recebendo monoterapia com L; **LH**, recebendo a associação L + H; e **AHHz**, tratados com uma associação entre um bloqueador de canais de cálcio, a anlodipina, um relaxante da musculatura lisa, a hidralazina, e H. Este último grupo serviu para baixar a pressão arterial (PA) independentemente do sistema renina-angiotensina e assim funcionar como controle para esse parâmetro. Um grupo de ratos submetidos a nefrectomia simulada (Sham) foi também estudado. Dois protocolos de estudo foram seguidos. No primeiro (Protocolo 1), os tratamentos foram iniciados 60 dias após Nx, visando simular uma fase relativamente precoce da DRC, com comprometimento funcional e dano

estrutural ainda limitado. No segundo (Protocolo 2), os mesmos tratamentos foram iniciados 120 dias após Nx, procurando mimetizar uma DRC humana em estágio mais avançado.

Conforme esperado, a DRC progrediu para estágios mais avançados em ambos os protocolos. No entanto, a gravidade da DRC e a mortalidade no Protocolo 2 foram muito maiores do que no Protocolo 1. Apesar dessas diferenças, a eficácia dos tratamentos foi comparável nos dois protocolos. O tratamento com L promoveu proteção apenas parcial contra os danos observados no Grupo Nx. A associação com H propiciou proteção muito mais eficiente, logrando, em ambos os protocolos, trazer a PA, a albuminúria, a taxa de proliferação celular tubular/intersticial e os níveis plasmáticos de aldosterona a níveis inferiores aos observados antes dos tratamentos. Apesar de não reverter a progressão da glomeruloesclerose e da expansão/inflamação intersticial, a associação LH deteve completamente, em ambos os protocolos, a progressão dessas lesões. Por outro lado, a associação AHHz, embora também tenha normalizado a PA, não impediu a progressão da nefropatia nem a da albuminúria, indicando que o efeito protetor da associação LH não se deveu a uma ação hemodinâmica sistêmica.

Conclusões: 1) os presentes resultados não apoiam o conceito segundo o qual os tiazídicos deixam de funcionar em fases muito avançadas da DRC, em que a maior parte da função renal já foi perdida; 2) a associação LH é eficiente mesmo em fases avançadas da nefropatia no modelo Nx, detendo sua progressão e mantendo as lesões no nível pré-tratamento, sem, no entanto, fazê-las regredir; 3) essa renoproteção não pode ser explicada somente pelo efeito anti-hipertensivo observado, embora não se possa descartar uma ação sobre a pressão intraglomerular; 4) os mecanismos do efeito renoprotetor da associação LH ainda não estão claros, embora seja provável que envolvam uma combinação de efeitos hemodinâmicos e antiinflamatórios, além de uma notável redução da produção de aldosterona.

SUMMARY

Arias, SCA. - *Treatment of advanced nephropathy with a losartan-hydrochlorothiazide association in the 5/6 renal ablation model*. [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2012.

Chronic kidney disease (CKD) is a serious public health problem in Brazil and worldwide. Despite a growing number of publications on the mechanisms that lead to CKD and its progression, few experimental studies can be translated into clinical practice. One possible reason for this is that, in general, treatment is initiated in concomitance with the onset of the disease, artificially increasing the effectiveness of therapy, since the pathogenic factors involved are more easily neutralized. Far less encouraging results are obtained if treatment is initiated at later stages, when the much more complex interaction between these factors would require more vigorous therapy and the association of two or more drugs.

In the present study, we examined the evolution of renal injury in an established model of CKD - 5/6 nephrectomy (Nx) - and the effect of an association between a blocker of the AT-1 receptor, losartan (L), and hydrochlorothiazide (H) - so far, the most effective therapeutic regimen for the Nx model. One hundred ninety-six adult male Munich-Wistar rats were subjected to Nx and divided into four groups: **Nx**, no treatment; **L**, receiving L monotherapy; **LH**, receiving the L+H association, and **AHHz**, treated with a combination of the calcium channel blocker, amlodipine, the smooth muscle relaxant, hydralazine, and H. This latter group was used to lower blood pressure (BP) independently of the renin-angiotensin system, thus functioning as a control for this parameter. A group of rats subjected to sham nephrectomy (Sham) was also studied. Two study protocols were followed. In the first (Protocol 1), the treatments were initiated 60 days after Nx, aiming to simulate a relatively early stage of CKD, when functional and structural damage is still limited. In the second protocol (Protocol 2), the same treatments were started 120 days after Nx, to mimic advanced human CKD.

As expected, CKD progressed to more advanced stages in both protocols. However, mortality and the severity of CKD were much higher in Protocol 2 than in Protocol 1. Despite these differences, the effectiveness of treatments in the two protocols was comparable. L treatment promoted only partial protection against the renal damage observed in Group Nx. The association with H provided much more efficient protection: in both protocols, BP, albuminuria, the rate of tubular/interstitial cell proliferation and plasma aldosterone regressed to lower levels than those observed before treatment. Although glomerulosclerosis and interstitial expansion/inflammation were not reversed, LH treatment completely detained the progression of renal injury in both protocols. On the other hand, the AHHz association, despite normalizing BP, failed to prevent the progression of albuminuria and renal injury, indicating that the protective effect of the LH association was not due to a systemic hemodynamic action.

Conclusions: 1) the present results do not support the contention that thiazides have no effect in very advanced stages of CKD, in which most of the kidney function has been lost, 2) the LH association is effective even in advanced stages of nephropathy in the Nx model, arresting progression and keeping injury at pretreatment levels, although it promotes no regression of the renal lesions; 3) LH-induced renoprotection cannot be explained simply by its antihypertensive action, although an effect on intraglomerular pressure cannot be excluded, 4) the mechanisms of LH renoprotection remain unclear, although they are likely to involve a combination of anti-inflammatory and hemodynamic effects, besides a remarkable reduction in the production of aldosterone.

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) foi inicialmente descrita, em 1827, por Richard Bright, que associou a presença de albuminúria e edema às alterações renais observadas em autópsias e acabou emprestando seu nome a essa condição clínica, que durante mais de um século foi conhecida como “Doença de Bright”. Uma das principais características morfológicas da Doença de Bright era o aspecto “contraído e granular” do rim, resultante da esclerose dos glomérulos associada à fibrose do parênquima renal, levando à perda quase total da função renal. Desde a primeira descrição da doença de Bright até os dias de hoje, houve grande avanço na compreensão e tratamento da DRC. No entanto, o número de pacientes com insuficiência renal crônica terminal (IRCT) e em necessidade de diálise crônica ou transplante renal vem aumentando em todo o mundo (1) em grande parte como resultado do envelhecimento da população mundial, associado ao aumento da incidência de diabetes tipo 2 (2). No Brasil, a IRCT faz com que anualmente cerca de 30.000 novos pacientes sejam incluídos em programas de diálise e 4.000 a 4.500 pacientes recebam um enxerto renal (3). Nesse contexto, torna-se necessária uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à progressão das nefropatias crônicas progressivas à fibrose do tecido renal, não só em vista do interesse acadêmico e científico que o assunto suscita, como também para possibilitar o desenvolvimento de terapias capazes de retardar ou impedir a evolução desses processos para IRCT.

Mecanismos de lesão renal na DRC

Os mecanismos envolvidos na progressão da DRC ainda estão longe de serem esclarecidos e o desenvolvimento de terapias eficazes parece ainda mais longínquo. No entanto, alguns mecanismos básicos parecem bem estabelecidos. Um deles é a agressão mecânica aos glomérulos, que consiste em um aumento da tensão imposta às paredes de suas alças capilares por uma ação combinada da elevação da pressão hidráulica e da hipertrofia do tufo glomerular. A hipertensão/hipertrofia glomerular acompanha um grande número de nefropatias progressivas, como resultado da perda crônica de néfrons e da sobrecarga aos néfrons remanescentes, ou até mesmo precedendo as lesões renais, como no caso da nefropatia diabética (4-7). Um segundo grupo importante de mecanismos de lesão renal crônica é o das alterações inflamatórias do tecido renal, representadas por eventos tais como a produção de citocinas e quimiocinas, o influxo de células inflamatórias, a proliferação celular e a infiltração do interstício renal por miofibroblastos, eventos esses que terminam por levar ao acúmulo de matriz extracelular e ao desenvolvimento de fibrose renal (8, 9).

Diversos estudos clínicos (10, 11) e experimentais (12, 13) indicam que a Angiotensina II (AII), o principal componente do sistema renina-angiotensina (SRA), bem como seu receptor AT1, estão envolvidos na patogênese da DRC. A inibição farmacológica da AII através do uso de inibidores da enzima conversora de AII (iECA) ou de antagonistas dos receptores AT1 (aRAT1), atenua a hipertensão sistêmica e glomerular

associada à diminuição das lesões renais. Além desse efeito hemodinâmico, a All participa de um grande número de eventos celulares envolvidos na patogênese da DRC (8, 9) e da produção de citocinas (8, 9), fatores de crescimento, incluindo o TGF- β (14, 15) e moléculas de adesão (16, 17), além de influenciar a proliferação de linfócitos (17) e fibroblastos, favorecendo assim o desenvolvimento de fibrose renal (18). Por outro lado, o tratamento com iECA ou aRAT1 diminui a expressão de TGF- β (19-21), atenua a proliferação de macrófagos e miofibroblastos (9, 22) e diminui a expressão de fatores de crescimento (23, 24) e moléculas de adesão (25, 26).

O modelo de ablação renal de 5/6

A ablação renal de 5/6 (Nx), um dos modelos de DRC mais frequentemente utilizados, caracteriza-se pelo rápido desenvolvimento de proteinúria maciça, glomeruloesclerose e fibrose intersticial, em associação com hipertensão sistêmica e glomerular (6, 27), além de intensa inflamação do parênquima renal, especialmente no compartimento intersticial (13, 27-29). Como em outros modelos de DRC, a All tem participação fundamental na patogênese da nefropatia associada à Nx. Coerentemente, o tratamento com iECA e aRAT1, mesmo em monoterapia, previne com eficiência essas lesões renais quando iniciado nas primeiras 2 semanas após a ablação renal (6, 13, 21, 30). No entanto, quando o tratamento é iniciado em fases mais tardias, quatro semanas ou mais após a ablação renal, a inibição da All já não

exerce um efeito renoprotetor tão eficiente ou duradouro (31-35), mesmo quando as doses utilizadas são muito altas (36). Esses achados indicam que os eventos hemodinâmicos e/ou celulares que ocorrem logo após a nefrectomia de 5/6 são cruciais para a evolução da nefropatia, e que, quando o processo atinge um certo estágio de desenvolvimento, seu controle torna-se muito mais difícil (37).

Efeito renoprotetor dos tiazídicos: droga antiga, evidências novas

Uma vez que o uso de supressores do SRA não oferece renoproteção completa ou duradoura contra a progressão da DRC, tem havido inúmeras tentativas de aumentar sua eficiência associando-os a outras drogas (38, 39). Em estudos desenvolvidos neste Laboratório, administramos a ratos Nx (a partir de 30 dias após a remoção de massa renal) uma associação de um aRAT1, o losartan, com o imunossupressor micofenolato mofetil (32) ou com um inibidor inespecífico da ciclo-oxigenase, o nitroflurbiprofen (35). Em ambos os casos, a associação revelou-se mais eficaz do que as monoterapias, mas a proteção conferida foi ainda incompleta. Embora tenham auxiliado a avançar nosso conhecimento sobre a patogênese da DRC, esses estudos são de difícil aplicação clínica, tendo em vista o alto custo e a toxicidade das drogas associadas.

Os tiazídicos têm sido amplamente utilizados na terapêutica de estados edematosos e da hipertensão leve ou moderada (40). No entanto, predomina o conceito de que o uso de tiazídicos não é indicado na DRC

avançada, com RFG inferior a 30 ou 40 ml/min/1,73 m², que dificultaria o acesso dos tiazídicos aos túbulos renais. No entanto, as evidências em apoio a esse conceito são escassas (41, 42). Na verdade, sabe-se que embora o RFG esteja realmente diminuído na DRC avançada, o RFG e o fluxo plasmático renal *por néfron* estão aumentados (6, 30, 31, 43). Além disso, outros estudos indicaram que, tanto quanto os diuréticos de alça, os tiazídicos são secretados pelos túbulos proximais através de um transportador de ânions orgânicos, o OAT1, podendo assim facilmente alcançar o cotransportador sódio-cloreto no túbulo convoluto distal, ali exercendo seu efeito natriurético (44). Em consonância com esses achados, estudos clínicos mais recentes (45-47) trouxeram evidências de que os tiazídicos continuam agindo mesmo após a função renal haver caído a níveis muito baixos. Além disso, o efeito anti-hipertensivo (48), antiproteinúrico e renoprotetor (47, 49) dos supressores do SRA é amplificado quando essas drogas são associadas a um tiazídico, mesmo em pacientes com DRC avançada.

Outra objeção ao uso contínuo de tiazídicos em pacientes hipertensos e/ou portadores de DRC são seus efeitos metabólicos adversos: hiperuricemia, resistência à insulina com intolerância à glicose e dislipidemia (50). Esses efeitos têm sido descritos em diversos estudos clínicos, embora sua intensidade e relevância sejam motivo de controvérsia (40, 48). Um estudo experimental (51) trouxe evidência de que o uso crônico de tiazídico em ratos normais provoca hiperglicemia, resistência à insulina, hipertrigliceridemia, hiperaldosteronismo,

hipocalemia e até mesmo lesões renais, com isquemia glomerular, espessamento da membrana basal tubular, além de inflamação intersticial e proteinúria discreta. No entanto, o efeito adverso do uso dos tiazídicos sobre a mortalidade e a morbidade cardiovasculares pode ser menor do que se esperaria tendo em vista as alterações metabólicas que provocam. Examinando um subgrupo do estudo ALLHAT, Wright e colaboradores (40) mostraram recentemente que o risco relativo de desenvolver insuficiência cardíaca ou IRCT foi menor em pacientes com síndrome metabólica tratados com clortalidona, apesar das alterações metabólicas associadas, do que naqueles que receberam bloqueador de canal de cálcio, iECA ou um alfa-bloqueador (52).

Com o objetivo de avaliar o efeito da combinação dessas drogas no tratamento tardio da nefropatia associada ao Nx, examinamos, em estudo anterior, o efeito do tratamento com losartan (L) e hidroclorotiazida (H) por um período de 7 meses, inusitadamente longo para esse modelo (53). A associação LH promoveu efeitos que chegaram a surpreender, com a prevenção da mortalidade, da albuminúria, da hipertensão e da insuficiência renal de uma maneira completa e prolongada, não observada com as respectivas monoterapias, indicando a ocorrência de um eficaz sinergismo entre L e H. Os mecanismos responsáveis por esse efeito não estão claros. É possível que a normalização da pressão arterial sistêmica e da pressão glomerular tenha tido um papel relevante nesse sentido. No entanto, não sabemos se esse efeito hemodinâmico foi devido simplesmente à ação natriurética da H, ou se houve alguma possível ação

vascular da droga (54). De qualquer forma, o efeito renoprotetor observado com a associação losartan/hidroclorotiazida foi o maior já obtido com o modelo Nx neste laboratório e, acreditamos, em toda a literatura, uma vez que não há outros relatos de sobrevivência de ratos Nx por tanto tempo, livres de hipertensão ou progressão significativa da DRC. Apesar desses resultados surpreendentes, cabem duas críticas importantes em relação a esse estudo experimental: 1) Em pacientes com DRC avançada, a perda acentuada de néfrons decorre de um longo processo de inflamação e fibrose, enquanto no modelo Nx a redução do número de néfrons resulta de uma intervenção cirúrgica e, mesmo depois de 30 dias, o grau de inflamação do tecido renal ainda é relativamente limitado. 2) Não ficou claro o possível papel protetor da queda da pressão arterial sistêmica (PA) promovida pelo tratamento LH. Há pesquisadores que defendem a ideia de que a renoproteção associada a um tratamento anti-hipertensivo é decorrente exclusivamente da redução na PA sistêmica e independente de outros fatores intrarenais (55, 56). O tratamento mais utilizado como “controle pressórico sistêmico” é a associação entre drogas com atividade diurética, vasodilatadora e beta bloqueadora. Embora essa associação de drogas seja eficiente na normalização da PA quando o tratamento é iniciado precocemente (13, 36), o mesmo resultado não foi observado quando o início do tratamento foi tardio (40).

2. OBJETIVOS

- I) Verificar se a associação de Losartan e Hidroclorotiazida é capaz de deter a progressão da glomeruloesclerose em fases muito mais avançadas do modelo Nx, já com a presença de fibrose renal extensa, mimetizando assim o observado na DRC humana avançada.

- II) Avaliar o papel do efeito pressórico da associação LH na nefroproteção obtida com esse tratamento no modelo Nx.

- III) Examinar os efeitos metabólicos do tratamento prolongado com hidroclorotiazida no modelo Nx.

3. MÉTODOS

Utilizamos 234 ratos Munich-Wistar machos e adultos (2-3 meses de idade), pesando entre 230 e 260 gramas. Os animais foram obtidos de uma colônia de linhagem de ratos estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal, com temperatura ambiental de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os ratos do estudo foram mantidos em dieta obtida comercialmente (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil), acrescida de 15% de caseína. Os procedimentos experimentais utilizados seguiram as normas da Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq, protocolo No. 0689/08).

Obtenção do modelo experimental:

Os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (Cristália[®], 50 mg/kg) e rompun (Bayer[®], 10 mg/kg), intramuscular. Após assepsia, foi realizada a laparotomia mediana e ligadura de 2 a 4 ramos da artéria renal e infarto de 2/3 do rim esquerdo. O rim direito foi removido, obtendo assim a redução de 5/6 da massa renal total (Grupo Nx). Após a cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas aquecidas por 24 horas e medicados com antibiótico e analgésico.

Um grupo adicional de animais foi utilizado como grupo controle (Grupo S), onde os ratos foram anestesiados e o pedículo renal foi apenas manipulado, sem a retirada da massa renal. Os animais desse grupo foram acompanhados durante todo o período de estudo e os

resultados estão apresentados nas tabelas e nos gráficos abaixo. Considerando que esses animais, ao contrário dos demais grupos, apresentam os dois rins, os resultados foram utilizados somente como referência e não sendo incluídos nas análises estatísticas.

Um dos objetivos do estudo foi verificar a possibilidade de regressão ou prevenção das lesões renais em animais com nefrectomia em fases tardias. Com esse intuito, iniciamos o tratamento em fases distintas da nefropatia: avançada, iniciando os tratamentos após 60 dias de Nx e outra muito mais avançada, iniciando os tratamentos após 120 dias de Nx. Desta forma, apresentamos os resultados em 2 protocolos distintos.

PROTOCOLO 1: TRATAMENTO INICIADO APÓS 60 DIAS DE NX

Aos 60 dias de Nx, todos os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a determinação da albuminúria de 24 horas (ALB), medida através da técnica de imunodifusão radial (57). Realizamos também as medidas de peso corpóreo (PE) e pressão sistólica caudal (PC), utilizando o método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos). Em seguida, os ratos Nx foram rigorosamente divididos de maneira que todos os grupos apresentassem valores semelhantes para ALB e PC antes do início dos tratamentos. Um grupo de animais Nx foi sacrificado no momento da divisão dos grupos (60 dias de Nx) e utilizado como Grupo Nx pré-tratamento.

Grupos Experimentais

- **Nx_{pré}** = 15 ratos submetidos a Nx que foram mantidos até 60 dias sem nenhum tratamento.
- **Nx** = 22 ratos submetidos a Nx que foram acompanhados até 150 dias sem nenhum tratamento.
- **L** = 15 ratos Nx mantidos até os 60 dias sem nenhum tratamento. Após esse período, os animais foram tratados com Losartan (50 mg/kg/dia) na água do bebedouro de 60 a 150 dias de Nx.
- **LH** = 17 ratos Nx mantidos até os 60 dias sem nenhum tratamento. Após esse período, os animais foram tratados com a associação de Losartan (L, 50 mg/kg/dia) e Hidroclorotiazida (H, 6

mg/kg/dia) diluídos na água do bebedouro no período de 60 a 150 dias de Nx.

➤ **AHHz** = 20 ratos Nx mantidos até os 60 dias sem nenhum tratamento. Após esse período, os animais foram tratados com o bloqueador do canal de cálcio Anlodipina (A, 5 mg/kg/dia) associado ao diurético Hidroclorotiazida (H, 6 mg/kg/dia) e ao vasodilatador Hidralazina (Hz, 12 mg/kg/dia) diluídos na água do bebedouro durante o período de 60 a 150 dias de Nx.

➤ **S** = 15 ratos submetidos ao estresse anestésico, com manipulação do pedículo sem a retirada de massa renal. Esses animais foram acompanhados até 150 dias sem nenhum tratamento.

Protocolo Experimental

Pré-tratamento (60 dias de Nx)

Após as medidas de PE, PC e ALB, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e o sangue coletado da veia caudal para a determinação da concentração plasmática da glicemia e triglicérides. Após essas avaliações, os animais do grupo Nx_{pré} foram anestesiados com ketamina (Cristália®, 50 mg/kg) e rompun (Bayer®, 10 mg/kg) e amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal para posterior análise bioquímica. Em seguida, os rins foram perfundidos *in situ* e preparados para o exame histológico e imuno-histoquímico.

30, 60 e 90 dias de tratamento (90, 120 e 150 dias de Nx)

- Determinação de PE, PC e ALB.

Após 90 dias de tratamento (150 dias de Nx)

- Determinação de PE, PC e ALB;
- Medidas da concentração sanguínea de triglicérides e da glicemia;
- Avaliação da concentração sérica de creatinina, aldosterona e potássio;
- Medidas do hematócrito sanguíneo;
- Estudo histológico: avaliação das lesões glomerulares e da expansão intersticial renal;
- Estudo imuno-histoquímico: avaliação da infiltração de macrófagos, do número de células positivas para angiotensina II, células em proliferação e presença de miofibroblastos, além da identificação de células dos túbulos proximais e distais em proliferação (duplas marcações).

PROTOCOLO 2: TRATAMENTO INICIADO APÓS 120 DIAS DE NX

Nesse segundo protocolo, os tratamentos foram iniciados após 120 dias de Nx, fase em que a nefropatia está em estágio muito avançado e a mortalidade dos animais é de 20%.

Aos 120 dias de Nx, as medidas de ALB e PC foram determinadas de maneira semelhante ao descrito no protocolo 1. Após essas avaliações, todos os ratos Nx foram rigorosamente divididos de maneira a apresentar valores semelhantes de ALB e PC. Um grupo de animais Nx foi sacrificado no momento da divisão dos grupos e utilizado como grupo Nx pré-tratamento.

Grupos Experimentais

- **Nx_{pré}** = 20 ratos do grupo pré-tratamento. Ratos submetidos a Nx e mantidos até 120 dias sem nenhum tratamento.
- **Nx** = 27 ratos submetidos a Nx que foram acompanhados até 210 dias sem nenhum tratamento.
- **L** = 20 ratos Nx que foram mantidos até os 120 dias sem nenhum tratamento. Após esse período, os animais foram tratados com Losartan (50 mg/kg/dia) na água do bebedouro de 120 a 210 dias de Nx.
- **LH** = 20 ratos Nx que foram mantidos até os 120 dias sem nenhum tratamento. Após esse período, os animais foram tratados com a associação de Losartan (50 mg/kg/dia) e Hidroclorotiazida (6 mg/kg/dia) diluídos na água do bebedouro durante o período de 120 a 210 dias de Nx.

➤ **AHHz** = 20 ratos Nx mantidos até os 120 dias sem nenhum tratamento. Após esse período, os animais foram tratados com Hidroclorotiazida (6 mg/kg/dia) associado à Hidralazina (12 mg/kg/dia) e Anlodipina (5 mg/kg/dia) na água do bebedouro durante o período de 120 a 210 dias de Nx.

➤ **S** = 23 ratos submetidos ao estresse anestésico, com manipulação do pedículo sem a retirada de massa renal. Esses animais foram acompanhados até 210 dias sem nenhum tratamento.

Protocolo Experimental

Pré-tratamento (120 dias de Nx)

Aos 120 dias de Nx, foram determinados os parâmetros de PE, PC, ALB, glicemia e triglicérides, de maneira semelhante ao protocolo 1. Após essas avaliações, os animais do grupo Nx_{pré} foram anestesiados e o sangue coletado para as análises bioquímicas. O tecido renal foi preparado para estudos histológicos e de imuno-histoquímica.

30, 60 e 90 dias de tratamento (150, 180 e 210 dias de Nx)

- Determinação de PE, PC e ALB;

Após 90 dias de tratamento (210 dias de Nx)

- Determinação de PE, PC e ALB;
- Medidas da concentração sanguínea de triglicérides e da glicemia;
- Avaliação da concentração sérica de creatinina, aldosterona e potássio;
- Medidas do hematócrito sanguíneo;
- Estudo histológico: avaliação da hipertrofia renal, das lesões glomerulares e da expansão intersticial renal;
- Estudo imuno-histoquímico: avaliação da infiltração de macrófagos, do número de células positivas para angiotensina II, células em proliferação e presença de miofibroblastos, além da identificação de células dos túbulos proximais e distais em proliferação (duplas marcações).

PROCEDIMENTOS

Glicemia e triglicérides plasmático

Os animais foram mantidos em jejum por um período de 12 horas para a determinação da concentração plasmática de triglicérides e glicemia. Em seguida, sob um breve aquecimento, o sangue foi coletado da veia caudal. A concentração plasmática de triglicérides foi avaliada através do kit enzimático disponível comercialmente (Labtest Diagnóstica S.A) e a concentração de glicose foi analisada através da técnica de reflectometria (Advantage, Roche Diagnostics, USA) (58).

Creatinina sérica

A concentração sérica de creatinina foi determinada na amostra de sangue coletada da aorta abdominal e a dosagem foi realizada através de sistema colorimétrico de kit comercialmente disponível pela Labtest Diagnóstica S.A.

Potássio sérico

A concentração sérica de potássio foi determinada através do analisador de eletrólitos 9140 (AVL Medical Instruments).

Aldosterona sérica

A concentração de aldosterona foi medida através de kit de radioimunoensaio (Aldosterona ACTIVE DSL-8600, GENESE - Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos).

Estudos histológicos

Após a perfusão *in situ*, os tecidos renais foram pesados, fatiados em 2-3 segmentos coronais de 4-5 mm de espessura, e pós-fixados em formaldeído a 10%. Após a fixação os tecidos foram mantidos por 14 horas em processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Alemanha) para desidratação, diafanização e impregnação em parafina. Os rins foram retirados do aparelho, incluídos em blocos de parafina e cortados com a espessura de 4 µm através de micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes histológicos foram corados pela reação de Ácido Periódico-Shiff (PAS) para quantificar os diferentes graus de lesões glomerulares e também foram corados pela reação de Tricrômio de Masson para determinar a fração da área da córtex renal ocupada por interstício.

% de esclerose glomerular

A quantificação da porcentagem de esclerose glomerular (%EG) foi realizada através da contagem do número de glomérulos com esclerose, independente da extensão da lesão. Para essa avaliação foram analisados 200 glomérulos por corte, sob aumento de 200X (59).

Índice de esclerose glomerular

O grau de lesão glomerular de cada animal foi avaliado utilizando um número de glomérulos nunca inferior a 150 em microscópio ótico em aumento final de 200X. Para cada glomérulo foi atribuindo uma “nota” correspondente à extensão da lesão: 0, para glomérulos intactos; 1, para lesões acometendo 10% ou menos da superfície glomerular; 2, para

lesões afetando entre 10-20% do glomérulo; 3, para lesões compreendendo entre 20-30 % do glomérulo e assim por diante até a “nota” 10 correspondente à esclerose global do glomérulo. O índice de esclerose glomerular (IEG) foi calculado como a média ponderada de todas as “notas” atribuídas individualmente aos glomérulos examinados (36).

Fração do córtex renal ocupada pelo interstício

Para avaliar a extensão da expansão intersticial da fração da córtex renal (%INT), foi utilizado a coloração de tricrômio de Masson. Que foi quantificada por método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, em um aumento final de 100x com uma ocular graticulada de 176 pontos.

Estudo imuno-histoquímico

As marcações imuno-histoquímicas foram realizadas para avaliar a infiltração de macrófagos (ED-1), células positivas para All, porcentagem de área intersticial renal ocupada por miofibroblastos (α -actina) e células positivas para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Além disso, realizarmos duplas marcações para localizar as porções tubulares em atividade proliferativa: 1) PCNA e Aquaporina-1 (AQP1, canal de água localizado nos túbulos proximais); 2) PCNA e transportador sensível a Tiazídico (NCC, co-transportador sódio/cloreto localizado no túbulo distal).

Os tecidos parafinizados foram cortados em espessura de 4 μ m e colocados em lâminas previamente silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-

silano, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos). Após 30 minutos em estufa a 60°C, os tecidos foram submetidos à desparafinização em 3 banhos de xilol e re-hidratados em etanol (concentrações decrescentes) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor por 30 minutos a temperatura de 98 °C, em solução de ácido cítrico 10 mM de pH 6,0. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes.

Infiltração de macrófagos

A identificação de células positivas para macrófagos foi realizada pelo método de APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina). Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA) em concentração 1:20 por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com o anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-ED-1 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:50 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após nova lavagem em TBS, os cortes foram incubados com o Complexo APAAP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:70 por 30 minutos. Ao final desses procedimentos, os tecidos estavam prontos para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Fast-Red. As células positivas

para ED-1 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Fast-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de macrófagos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 200X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado.

Células positivas para Angiotensina II e α -Actina no Interstício Renal

A expressão de All e α -actina foram avaliadas pelo método de Estreptavidina-biotina-Fosfatase alcalina. Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Vector, Burlingame, CA, EUA) por 15 minutos cada. Após lavagem com TBS, foi realizado o bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de cavalo (Dako, Carpinteria, CA, EUA), diluído 1:70 em solução 2% de leite desnatado em pó em TBS. Os tecidos renais foram incubados com o anticorpo primário de coelho anti-All na diluição 1:400 (Peninsula Laboratories, Inc., EUA) para a análise de células positivas para All ou anti- α -actina de músculo liso, desenvolvido em camundongos (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) para a marcação da α -Actina de músculo liso, sendo, ambas mantidas à

temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso do anticorpo primário, o tecido foi lavado em TBS e incubado com o anticorpo secundário anti-coelho biotinilado desenvolvido em cabra (Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:1000 à temperatura ambiente por 45 minutos ou biotinilado anti-camundongo (Vector, Burlingame, CA, EUA), diluído 0,5 % em BSA, por 45 minutos também à temperatura ambiente. Após nova lavagem em TBS, os tecidos foram incubados com o Complexo Estreptavidina Biotina-AP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), e então foram revelados com o mesmo substrato cromogênico utilizado para o método APAAP. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Os tecidos renais foram montados e etiquetados de maneira semelhante ao descrito no método de APAAP. A quantificação da AI foi realizada pela contagem de células marcadas em córtex renal com aumento de 200x. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado. E, para a quantificação da área intersticial preenchida por α -actina, foi utilizado o mesmo método de contagem de pontos descrito para a quantificação de área intersticial corada positivamente para o tricrômio de Masson; no entanto áreas ocupadas por vasos sanguíneos, ainda que marcados positivamente, não foram incluídas na quantificação.

Proliferação Celular

A identificação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi avaliada pelo método de Envision-Peroxidase. Após a

desparafinização e recuperação antigênica procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Após serem lavadas com tampão TBS, os cortes foram incubados com soro não imune de cavalo na diluição de 1:50 para bloqueio de marcação inespecífica. Retirou-se o excesso de soro e os tecidos renais foram incubados com o anticorpo primário anti-PCNA desenvolvido em camundongo (Dako, Carpinteria, CA, EUA) diluído 1:200, com incubação à temperatura de 3-8°C, por 18 horas. As lâminas foram lavadas em solução tampão TBS e incubadas com Complexo Envision (Dako, Carpinteria, CA, EUA), lavadas em solução tampão TBS e reveladas com substrato cromógeno. Para a preparação do substrato cromogênico do método Evison-Peroxidase utilizamos solução a base de diaminobenzidina (Vector, Burlingame, CA, EUA). Utilizamos a contracoloração com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto. Os cortes foram montados entre lâminas e lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel). A quantificação foi realizada pela contagem de núcleos celulares marcados no córtex renal com aumento de 200x. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado.

Identificação dos segmentos tubulares em atividade proliferativa

Com o objetivo de identificar se a atividade proliferativa estava presente nos segmentos proximais ou distais, realizamos as seguintes duplas marcações: PCNA + Aquaporina 1 (AQP-1), a fim de identificar

células tubulares em proliferação nos segmentos proximais; 2) PCNA + co-transportador NaCl tiazida-sensível (NCC), para verificarmos a existência de proliferação nos segmentos distais dos túbulos renais.

Após desparafinização e exposição de epítomos, os cortes foram submetidos à incubação com solução de Peróxido de Hidrogênio, seguida por incubações de 15 minutos com soluções bloqueio de Avidina e Biotina (Vector, Burlingame, CA, EUA). As lâminas foram lavadas em TBS e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente com uma mistura de soro não imune de cavalo e de coelho (Vector, Burlingame, CA, EUA), diluídos respectivamente a 2% e 5%, em solução de leite desnatado a 2%. Após a retirada do excesso de soro, os cortes foram incubados com uma mistura contendo os anticorpos primários; anti-PCNA desenvolvido em camundongos (Dako, Carpinteria, CA, EUA) + anti-NCC desenvolvido em coelhos (Chemicon International, Massachusetts, EUA), ambos diluídos a 1% em solução de leite desnatado a 2% em TBS; ou anti-PCNA desenvolvido em camundongos (Dako, Carpinteria, CA, EUA) + anti-AQP1 desenvolvido em camundongos (AbCam, Cambridge, UK), diluídos, respectivamente a 1% e 0,1% em solução de leite desnatado a 2% em TBS, temperatura de 3-8°C, durante 18 horas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em TBS e os cortes incubados com os anticorpos secundários biotinilados anti-coelho (Vector, Burlingame, CA, EUA), diluído 0,1% e/ou anti-camundongo (Vector, Burlingame, CA, EUA), diluído 0,5 % em BSA, por 45 minutos a temperatura ambiente, em câmara-úmida. As lâminas foram novamente lavadas em TBS e

incubadas por 30 minutos com as soluções Streptavidina-AP e/ou LSAB-HRP, sendo posteriormente reveladas com 2 diferentes substratos cromogênicos, sendo um a base de Fast Red e o outro a base de Diaminobenzidina. Por fim, as lâminas foram contraincoradas e montadas conforme descrito acima.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste estudo foram apresentados como média $\pm$ erro padrão e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator com comparações pareadas entre Grupos quanto aos tratamentos. Foi utilizado o post-test pelo método de Newman-Keuls (60) para as comparações. Todos os cálculos foram efetuados através do software GraphPad Prism® versão 4.0 e o nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os dados de sobrevivência dos animais do Protocolo 1 estão representados nas figuras 1. Os animais Nx que foram mantidos sem tratamento por 150 dias apresentaram mortalidade de 41%, enquanto que aqueles tratados com L e LH apresentaram taxa de mortalidade de apenas 7% e 6%, respectivamente. O tratamento com AHHz não resultou em melhora na sobrevivência dos animais, cuja taxa de mortalidade foi de 30%. Os dados de mortalidade do protocolo 2 estão demonstrados na Figura 2. Após 210 dias de Nx, observamos taxa de mortalidade de 70% nos animais sem tratamento, enquanto que nos grupos tratados com L e LH foi de 40% e 25%, respectivamente. O tratamento com AHHz nessa fase avançada não atenuou a taxa de mortalidade, mantendo-a em 69%, valores semelhantes ao grupo Nx.

Figura 1 – Porcentagem de sobrevida de 60 a 150 dias (Protocolo 1): nos Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (* $p<0,05$ vs. Nx).

Figura 2 – Porcentagem de sobrevida de 120 a 210 dias de Nx (Protocolo 2). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (* $p<0,05$ vs. Nx, # $p<0,05$ vs. L; & $p<0,05$ vs. LH).

O peso corpóreo está demonstrado nas tabelas 1 e 2 e nas figuras 3 e 4. Nos dois protocolos experimentais observamos que, independente do tipo de tratamento empregado, o peso corpóreo foi semelhante em todos os grupos Nx ($p>0,05$) e, as drogas administradas não afetaram o crescimento dos animais.

Tabela 1 – Evolução do Peso Corpóreo de 60 a 150 dias pós-Nx (Protocolo 1).

Peso Corpóreo (g)				
	60d	90d	120d	150d
S (N=15)	338±5	368±7	384±8	395±7
Nx (N=22)	273±6	292±10	299±13	297±12
L (N=15)	270±6	297±6	310±9	314±9
LH (N=17)	278±6	286±6	292±6	296±6
AHHz (N=20)	282±6	289±7	315±8	306±10

Peso Corpóreo (PE) dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP.

Tabela 2 – Evolução do Peso Corpóreo de 120 a 210 dias pós-Nx (Protocolo 2).

Peso Corpóreo (g)				
	120d	150d	180d	210d
S (N=23)	373±6	391±7	397±8	406±7
Nx (N=27)	298±6	301±7	289±9	279±6
L (N=20)	294±5	302±7	296±9	293±9
LH (N=20)	289±5	285±6	279±6	283±7
AHHz (N=20)	299±7	298±10	304±13	291±8

Peso Corpóreo (PE) dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP.

Figura 3 – Peso corpóreo de 60 a 150 dias de Nx (Protocolo 1): grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina).

Figura 4 – Peso corpóreo de 120 a 210 dias de Nx (Protocolo 2): Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina).

Os animais Nx foram cuidadosamente divididos de forma que, no início do tratamento, a PC e a ALB fossem semelhantes em todos os grupos ($p>0,05$).

As medidas de PC do Protocolo 1 estão representadas na tabela 3 e figura 5. No grupo Nx sem tratamento, a hipertensão arterial foi mantida ao longo dos 150 dias. O tratamento com L iniciado após 60 dias de Nx não promoveu redução da PC, apresentando valores próximos aos observados nos animais Nx sem tratamento ($p>0,05$). Mesmo iniciado após 60 dias de Nx, o tratamento com a associação LH normalizou a PC, mantendo esse padrão ao longo dos 150 dias de estudo. De maneira semelhante, os animais tratados com AHHz, entre os 60 e os 150 dias pós-Nx, mantiveram-se normotensos, sendo portanto, eficiente como controle pressórico do grupo LH ($p>0,05$). Na tabela 4 e na figura 6 estão representados os resultados de PC do Protocolo 2. Como demonstrado em estudos anteriores, os animais sem tratamento mantiveram a hipertensão arterial acentuada até os 210 dias de Nx. O tratamento a monoterapia de L não promoveu efeito anti-hipertensivo ($p>0,05$ vs. Nx). A combinação LH, iniciada em fase muito avançada da DRC, ainda foi capaz de manter os valores de PC abaixo daqueles observados nos grupos Nx e L ($p<0,05$). Os animais tratados com AHHz mantiveram os valores de PC semelhantes àqueles observados no grupo LH ($p>0,05$), mesmo iniciado após 120 dias de Nx.

Tabela 3 – Evolução da pressão sistólica caudal de 60 a 150 dias pós-Nx (Protocolo 1).

Pressão Caudal (mmHg)				
	60d	90d	120d	150d
S (N=15)	138±2	142±2	141±2	139±2
Nx (N=22)	201±4	205±4	209±3	210±4
L (N=15)	201±4	194±3	199±4	202±5
LH (N=17)	200±3	148±3	150±3	148±4 ^{*#}
AHHz (N=20)	202±4	151±4	148±4	152±5 ^{*#}

Pressão Sistólica Caudal (PC) dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (*p<0,05 vs Nx; ,[#] p<0,05 vs L).

Tabela 4 – Evolução da pressão sistólica caudal de 120 a 210 dias pós-Nx (Protocolo 2).

Pressão Caudal (mmHg)				
	120d	150d	180d	210d
S (N=23)	140±2	140±2	139±1	141±1
Nx (N=27)	207±3	215±4	218±4	212±4
L (N=20)	209±3	203±2	208±2	205±5
LH (N=20)	210±3	155±2	153±3	164±3 ^{*#}
AHHz (N=20)	207±3	170±4	171±4	172±9 ^{*#}

Pressão Sistólica Caudal (PC) dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (*p<0,05 vs Nx; ,[#] p<0,05 vs L).

Figura 5 – Pressão caudal de 60 a 150 dias de Nx. Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (* $p < 0,05$ vs Nx; # $p < 0,05$ vs L).

Figura 6 – Pressão caudal de 120 a 210 dias de Nx: Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (* $p < 0,05$ vs. Nx, # $p < 0,05$ vs. L; & $p < 0,05$ vs. LH).

A ALB dos animais do protocolo 1 está representada na tabela 5 e na figura 7. Os animais Nx apresentaram aumento progressivo da ALB, atingindo valores elevados aos 150 dias. O grupo tratado com L manteve a ALB em valores semelhantes ao obtido no período de pré-tratamento, apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo Nx sem tratamento ($p < 0,05$). Por outro lado, a dupla terapia com LH, iniciada aos 60 dias, foi capaz de limitar a ALB, mantendo-a em valores comparáveis àqueles observados em animais controles. Apesar da normalização da PC, o tratamento com AHHz não foi capaz de diminuir a ALB, cujos valores foram semelhantes aos do grupo Nx sem tratamento ($p > 0,05$). Na tabela 6 e na figura 8 está representada a quantificação da ALB ao longo dos 210 dias de Nx (Protocolo 2). Como esperado, a ALB dos animais sem tratamento permaneceu extremamente alta ao longo do estudo. O tratamento com L, iniciado numa fase mais avançada da DRC, manteve os valores da ALB próximos dos observado no início do tratamento. De maneira semelhante ao protocolo 1, a associação de LH reduziu significativamente a ALB ($p < 0,05$ vs. Nx e L). Esses resultados indicam a eficiência do tratamento LH em reduzir a ALB e prevenir o seu aumento em condições avançada da DRC. O tratamento com AHHz não foi capaz de limitar a progressão da ALB apresentando valores comparáveis aos obtidos com o grupo sem tratamento ($p > 0,05$ vs. Nx). É importante ressaltar que os valores de ALB observados nos animais tratados com AHHz podem ainda estar subestimado devido a alta % de mortalidade nesse grupo.

Tabela 5 – Evolução da Albuminúria de 60 a 150 dias pós-Nx (Protocolo 1).

Excreção Urinária de Albumina (mg/24h)				
	60d	90d	120d	150d
S (N=15)	6±1	12±3	13±4	16±4
Nx (N=22)	98±8	145±10	169±19	161±11
L (N=15)	97±12	101±15	84±14	115±14*
LH (N=17)	97±9	29±5	25±4	50±10* [#]
AHHz (N=20)	98±9	157±15	166±17	185±20 ^{#&}

Albuminúria (ALB) dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (*<0,05 vs. Nx, [#]<0,05 vs. L; [&]<0,05 vs. LH).

Tabela 6 – Evolução da Albuminúria de 120 a 210 dias pós-Nx (Protocolo 2).

Excreção Urinária de Albumina (mg/24h)				
	120d	150d	180d	210d
S (N=23)	6±1	10±2	14±3	16±3
Nx (N=27)	151±11	210±21	198±27	249±42
L (N=20)	147±13	132±15	127±16	153±22*
LH (N=20)	148±13	53±7	38±4	49±7* [#]
AHHz (N=20)	147±14	250±24	230±43	185±31 ^{&}

Albuminúria (ALB) dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (*<0,05 vs. Nx, [#]<0,05 vs. L; [&]<0,05 vs. LH).

Figura 7 – Excreção urinária de Albumina até os 150 dias nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (*p<0,05 vs. Nx, #p<0,05 vs. L; &p<0,05 vs. LH).

Figura 8 – Excreção urinária de Albumina até os 210 dias nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (*p<0,05 vs. Nx, #p<0,05 vs. L; &p<0,05 vs. LH).

Os dados da concentração sanguínea de glicose, triglicérides, creatinina, potássio, aldosterona e hematócrito arterial estão apresentados nas tabelas 7 (protocolo 1) e 8 (protocolo 2) e nas figuras de 9 a 15 (Protocolo 1 e 2).

Tabela 7 – Análises Bioquímicas após 60 e 150 dias de Nx (Protocolo 1).

Parâmetros Bioquímicos						
	Gli	Tg	Scr	K⁺	Aldo	Ht
S (N=15)	97±2	64±4	0,6±0,02	4,9±0,1	844±110	48±1
Nx_{pré} (N=15)	98±3	70±3	1,04±0,04	5,8±0,1	1172±219	45±1
Nx (N=16)	104±3	92±7 ^a	1,73±0,11 ^a	5,8±0,3	1527±267	42±1
L (N=14)	108±2	75±6	1,35±0,09 ^b	6,0±0,1	707±103 ^b	42±1
LH (N=16)	105±2	64±4 ^b	1,14±0,09 ^b	5,6±0,1	357±75 ^{abc}	40±1
AHHz (N=16)	108±3	79±8	1,47±0,16 ^a	4,7±0,1 ^{abcd}	1393±266 ^d	37±2 ^{abc}

Glicemia (Gli, mg/dL), Triglicérides (Tg, mg/dL), Creatinina sérica (Scr, mg/dL), Potássio sérico (K⁺, mEq/L), Aldosterona sérica (Aldo, pg/mL) e Hematócrito (Ht, %). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados: Média±EP. (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Tabela 8 – Análises Bioquímicas após 120 e 210 dias de Nx (Protocolo 2).

Parâmetros Bioquímicos						
	Gli	Tg	Scr	K⁺	Aldo	%Ht
S (N=23)	97±1	54±4	0,59±0,02	4,9±0,1	780±90	49±1
Nx_{pré} (N=20)	94±2	77±2	1,36±0,11	5,5±0,1	1649±301	44±1
Nx (N=21)	123±10 ^a	95±5	2,46±0,12 ^a	5,9±0,2	1903±394	31±2 ^a
L (N=18)	114±5 ^a	84±10	2,06±0,21 ^a	6,2±0,2 ^a	892±180 ^b	35±2 ^a
LH (N=16)	116±2 ^a	64±5 ^b	1,56±0,09 ^b	5,7±0,1	432±50 ^{abc}	36±1 ^a
AHHz (N=14)	132±6 ^a	100±15 ^d	2,06±0,19 ^a	5,1±0,2 ^{abcd}	1980±234 ^{cd}	29±2 ^a

Glicemia (Gli, mg/dL), Triglicérides (Tg, mg/dL), Creatinina sérica (Scr, mg/dL), Potássio sérico (K⁺, mEq/L), Aldosterona sérica (Aldo, pg/mL) e Hematócrito (Ht, %). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados: Média±EP. (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Na figura 9 está representada a glicemia dos animais dos protocolos 1 e 2. No protocolo 1, após 150 dias de Nx, a glicemia foi semelhante em todos os grupos avaliados ($p>0.05$). No protocolo 2, aos 210 dias, a glicemia estava aumentada nos ratos Nx, sugerindo resistência a insulina, independente dos tratamentos empregados.

Figura 9 - Glicemia (mg/dL) dos animais no protocolo 1 e protocolo 2 dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^a $p<0.05$ vs. Nx_{pré}).

Na figura 10 está representada a concentração de triglicérides plasmático (Tg) dos animais dos dois protocolos. No Protocolo 1, a concentração de Tg progrediu com a evolução da nefropatia ($p < 0,05$ Nx vs. Nx_{pré}) e, dentre os tratamentos empregados, a associação de LH foi a única a manter esse parâmetro em valores próximos ao grupo pré-tratamento ($p < 0,05$ vs. Nx). No protocolo 2, após 210 dias de Nx, os níveis de Tg plasmático apresentaram a mesma tendência observada no protocolo 1. Novamente, o tratamento com LH foi o mais eficiente em limitar a hipertrigliceridemia ($p < 0,05$ vs. Nx). Além disso, a concentração de Tg no grupo AHHz foi comparável ao grupo sem tratamento ($p > 0,05$ vs. Nx e $p < 0,05$ vs LH). Esses resultados indicam que, ao contrário de alguns estudos, nem sempre o tratamento com hidroclorotiazida promove alterações metabólicas.

Figura 10 - Triglicérides plasmático (mg/dL) dos animais no protocolo 1 e 2. Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^a $p < 0,05$ vs Nx_{pré}, ^b $p < 0,05$ vs Nx; ^d $p < 0,05$ vs LH).

Nos 2 protocolos, a concentração sérica de creatinina (figura 11) elevou-se de acordo com a perda da função renal. No protocolo 1, o tratamento com L atenuou a perda da função renal, mantendo a Scr em níveis comparáveis àqueles observados no grupo pré-tratamento ($p > N_{x_{pré}}$ e $p < 0,05$ vs. Nx). Resultados semelhantes foram obtidos com a associação LH ($p > 0.05$ vs L). E, apesar da normalização na PC, o tratamento com AHHz não foi capaz de prevenir a perda de função renal, apresentando Scr maior que o grupo $N_{x_{pré}}$ ($p < 0,05$). No protocolo 2, os animais sobreviventes apresentaram perda acentuada da função renal com valores bastante elevados aos 210 dias de Nx. O tratamento com L apresentou Scr semelhante ao grupo Nx ($p > 0,05$), indicando que, em fases muito avançadas da DRC, a monoterapia com L perde a sua eficiência na preservação da função renal. Por outro lado, os animais tratados com a associação de LH mantiveram a mesma eficácia observada no protocolo 1 ($p < 0.05$ vs Nx), comprovando a sua capacidade em preservar a função renal mesmo quando iniciada após 120 dias de Nx. A tripla terapia com AHHz não promoveu renoproteção quanto a este parâmetro, apresentando níveis de Scr semelhantes aos observados no grupo Nx sem tratamento ($p > 0.05$).

Figura 11 - Creatinina sérica (mg/dL) dos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap < 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp < 0,05 vs Nx).

A concentração sérica de potássio dos protocolos 1 e 2 estão representadas na figura 12. No protocolo 1, os animais do grupo Nx, tanto aos 60 como aos 150 dias, apresentaram aumento do potássio sérico. Os tratamentos com L e LH não alteraram os níveis séricos de potássio desses animais ($p > 0.05$ vs Nx), ao contrário, a tripla terapia AHHz regrediu a hipercalemia, mantendo a concentração sérica de potássio em valores semelhantes aos observados no grupo Sham. No protocolo 2, o tratamento com L acentuou a hipercalemia, alcançando valores significativamente superiores aos observados no grupo Nx_{pré} ($p < 0.05$). O mesmo efeito não é observado com LH, uma vez que o H promove a perda de potássio ($p > 0.05$ vs Nx_{pré}). Como foi observado no protocolo 1, o tratamento com AHHz reduziu significativamente a concentração de potássio sérico, mantendo os valores semelhantes aos observados no grupo Sham, mesmo iniciado após 120 dias de Nx.

Figura 12 - Potássio sérico dos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Os valores de aldosterona (ALDO) estão representados na Figura 13. No Protocolo 1, a ALDO foi numericamente maior nos animais Nx com 150 dias quando comparada com 60 dias. O tratamento com L reduziu significativamente a concentração de ALDO ($p < 0,05$ vs. Nx). A associação LH foi mais eficiente em reduzir a concentração desse mineralocorticoide, apresentando valores menores que todos os outros grupos ($p < 0,05$ vs. Nx_{pré}, Nx e L). O tratamento triplo com AHHz manteve a concentração de ALDO comparável ao grupo sem tratamento ($p > 0.05$). Após 210 dias (Protocolo 2), a concentração de ALDO dos animais sem tratamento foi ainda maior que a observada no protocolo 1. A monoterapia com L apresentou redução significativa da ALDO com relação ao grupo Nx ($p < 0,05$). Mesmo iniciado numa fase avançada da DRC, o tratamento com LH ainda foi capaz de reduzir drasticamente o valor da ALDO ($p < 0,05$ vs. Nx_{pré}, Nx e L). Como foi observado no Protocolo 1, a concentração de ALDO no grupo AHHz progrediu de maneira semelhante ao grupo sem tratamento ($p > 0.05$ vs Nx).

Figura 13 – Aldosterona Plasmática (pg/mL) do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

A figura 14 representa a porcentagem do hematócrito arterial (%Ht) em ambos os protocolos experimentais. No protocolo 1, observamos redução do hematócrito em todos os animais submetidos à ablação renal e os tratamentos L e LH não alteraram esse parâmetro. Ao contrário, o tratamento AHHz acentuou a anemia (Nx_{pré}, Nx e L), provavelmente decorrente da retenção de volume promovida pela anlodipina. No protocolo 2, após 210 dias de Nx, a anemia foi agravada em todos os grupos (p<0.05 vs. Nx_{pré}), no entanto não foi observada alteração significativa com os tratamentos empregados.

Figura 14 - Hematócrito arterial (%) dos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^a $p < 0,05$ vs Nx_{pré}, ^b $p < 0,05$ vs Nx; ^c $p < 0,05$ vs L).

Os dados da porcentagem de esclerose glomerular (%EG), índice de esclerose glomerular (IEG) e porcentagem de expansão intersticial (%INT) estão apresentados nas tabelas 9 (protocolo 1) e 10 (protocolo 2) e nas figuras de 15 a 21 (protocolo 1 e 2).

Tabela 9 – Análise morfológica do tecido renal após 60 e 150 dias de Nx (Protocolo 1).

Morfologia do tecido Renal			
	%EG	IEG	%INT
S (N=15)	0,24±0,11	0,31±0,15	0,12±0,04
Nx_{pré} (N=15)	9,91±1,70	29,33±8,22	2,95±0,35
Nx (N=17)	30,56±4,40 ^a	142,13±30,00 ^a	4,28±0,43
L (N=14)	19,80±4,05	80,25±26,52	3,77±0,61
LH (N=17)	10,19±1,62 ^b	25,70±5,55 ^b	3,02±0,31
AHHz (N=16)	31,48±4,84 ^{ad}	117,68±29,23 ^{ad}	4,13±0,42

Porcentagem de esclerose glomerular (%EG), Índice de esclerose glomerular (IEG), porcentagem de área intersticial (%INT) nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos por Média±EP. (^ap<0,05 vs Nx_{pré}, ^bp<0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Tabela 10 - Análise morfológica do tecido renal após 120 e 210 dias de Nx (Protocolo 2).

Morfologia do tecido Renal			
	%EG	IEG	%INT
S (N=23)	0,38±0,23	0,38±0,23	0,11±0,03
Nx_{pré} (N=20)	26,54±3,04	112,77±21,24	4,22±0,47
Nx (N=22)	59,52±3,32 ^a	401,54±25,53 ^a	7,16±0,47 ^a
L (N=17)	42,69±3,71 ^{ab}	245,00±32,72 ^{ab}	6,91±0,67 ^a
LH (N=16)	24,81±3,19 ^{bc}	105,19±18,50 ^{bc}	4,01±0,46 ^{bc}
AHHz (N=13)	46,92±5,93 ^{abd}	196,95±47,39 ^b	6,45±0,62 ^{ad}

Porcentagem de esclerose glomerular (%EG), Índice de esclerose glomerular (IEG), porcentagem de área intersticial (%INT) nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos por Média±EP. (^ap<0,05 vs Nx_{pré}, ^bp<0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

As lesões glomerulares foram quantificadas quanto ao número de glomérulos com lesões do tipo esclerose (%EG), independente do grau de lesão; e para avaliar o índice de esclerose glomerular (IEG), quantificado através do grau de lesão presentes em cada um dos glomérulos acometidos por glomeruloesclerose.

Como esperado, a %EG progrediu dos 60 dias de Nx (fase pré-tratamento) até 150 dias de Nx sem tratamento ($p < 0.05$). O tratamento com a monoterapia L preveniu parcialmente a progressão das lesões glomerulares ($P > 0.05$ vs. $Nx_{\text{pré}}$ e Nx). Por outro lado, foi evidente a proteção renal observada nos animais tratados com a associação LH, apresentando %EG comparáveis àquelas obtidas no grupo pré-tratamento ($p > 0.05$). O tratamento com AHHz não foi eficiente em limitar as lesões glomerulares ($p > 0.05$ vs. Nx), progredindo de maneira semelhante ao grupo sem tratamento. Após 210 dias de Nx (protocolo 2), aproximadamente 60% dos glomérulos apresentavam algum grau de lesão ($p < 0.05$ vs. $Nx_{\text{pré}}$). O tratamento com L iniciado aos 120 dias de Nx atenuou a %EG quando comparada ao grupo sem tratamento ($p < 0.05$), no entanto não foi capaz de manter em níveis comparáveis ao $Nx_{\text{pré}}$ ($p < 0.05$). Por outro lado, a associação LH, ainda que iniciada em uma fase muito tardia da DRC impediu a progressão da %EG, mantendo os valores desse parâmetro semelhantes àqueles observados no grupo pré-tratamento ($p > 0.05$). Os animais tratados com AHHz apresentaram %EG semelhante àquela observada no grupo tratado com a monoterapia de L ($p > 0.05$).

Figura 15 – Microfotografias representativas da esclerose glomerular observada nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Coloração de PAS. Aumento 200X.

Figura 16 - Porcentagem de esclerose glomerular dos animais do protocolo 1 e do protocolo 2 dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap<0,05 vs Nx_{pré}, ^bp<0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Os resultados obtidos com a análise do IEG (tabelas 9 e 10 e figura 17) seguiram a tendência observada na quantificação da %EG. No protocolo 1, observamos progressão da lesão renal nos animais Nx que não receberam tratamento. O tratamento com L não impediu de maneira eficaz a progressão da IEG, embora tenha ocasionado uma redução numérica desse parâmetro em relação aos animais Nx mantidos sem tratamento ($p > 0.05$). A dupla terapia de LH preveniu a progressão da IEG ($p > 0,05$ vs. $Nx_{pré}$), demonstrando a eficiência desse tratamento quando iniciado após 60 dias de Nx. A associação AHHz apresentou IEG semelhante àquele encontrado no grupo Nx sem tratamento ($p > 0,05$). Como era esperado, o IEG alcançou valores extremamente altos nos animais Nx do protocolo 2. Quanto aos tratamentos, notamos a mesma tendência observada no protocolo 1. A monoterapia com L não impediu a progressão da IEG ($p < 0,05$ vs. $Nx_{pré}$), a associação LH protegeu significativamente os animais, impedindo a progressão da IEG ($p > 0,05$ vs. $Nx_{pré}$) e o tratamento com AHHz promoveu renoproteção apenas parcial ($p < 0,05$ vs. Nx).

Figura 17 - Índice de esclerose glomerular (IEG) dos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Adicionalmente foi realizada a quantificação da distribuição da porcentagem de glomérulos acometidos por cada grau de lesão nos diferentes grupos experimentais (figuras 18 e 19). Nessa análise, construímos gráficos de distribuição de acordo com a “nota” atribuída ao grau de lesão existente em cada glomérulo, isto é, a porcentagem de glomérulos que receberam nota 1 para lesões acometendo 10% ou menos da superfície glomerular, nota 2 para lesões acometendo entre 10-20% do glomérulo e assim por diante até a “nota” 10, correspondente à esclerose global do glomérulo. Na figura 18 mostramos a distribuição das lesões glomerulares do protocolo 1, nos diferentes grupos experimentais. Aos 60 dias pós-Nx a maioria dos glomérulos acometidos apresentava lesões na faixa entre os graus 1 e 3 (figura 18-a). Após 150 dias, ratos Nx apresentaram dois picos de porcentagem de glomérulos lesados, sendo

um concentrado entre os graus 1 e 3 e o outro entre 8 e 10 (figura 18-b). Nos animais tratados com L, o perfil da distribuição das lesões foi semelhante ao apresentado no grupo sem tratamento, observamos dois picos de distribuição de grau 1 a 3 e de grau 8 a 10 (figura 18-c). Ao contrário, a associação LH manteve o mesmo perfil de distribuição de lesões glomerulares dos animais do grupo pré-tratamento, predominando as lesões do tipo 1 a 3 (figura 18-d). Apesar da normalização da pressão sistêmica, o tratamento com AHHz não alterou o padrão de distribuição observado nos animais Nx sem tratamento (figura 18-e). Os dados de distribuição das lesões glomerulares do protocolo 2 estão representados na figura 19. Na fase pré-tratamento (120 dias de Nx), foi possível observar dois picos de distribuição de glomérulos nas faixas de lesão de grau 1 a 3 e de 7 a 9 (figura 19-a). Após 210 dias, a progressão do número de glomérulos acometidos por lesões mais severas foi ainda mais evidente, predominando as lesões de grau 9 e 10 (figura 19-b). O tratamento com L promoveu uma distribuição com picos de cerca de 50% de glomérulos apresentando lesões do tipo 1 a 3 e cerca de 40% apresentando um segundo pico de lesão nos graus 9 e 10 (figura 19-c). Como no protocolo 1, os animais tratados com LH apresentaram um perfil de distribuição de glomérulos semelhante ao observado nos animais do grupo pré-tratamento (figura 19-d), por outro lado, a terapia com AHHz gerou uma distribuição de glomérulos comparável à observada no grupo L (figura 19-e).

Figura 18 – Distribuição das lesões glomerulares de acordo com a extensão da esclerose glomerular dos animais do protocolo 1. Notas atribuídas a cada glomérulo sendo, 1 para lesões menores que 10%, 2 para lesões de 11 a 20%, 3 para lesões de 21 a 30%, até a nota 10 que corresponde ao glomérulo com esclerose global. Os glomérulos íntegros, cuja nota seria 0, não foram representados graficamente. **a)** Nx pré-tratamento; **b)** Nx sem tratamento; **c)** Nx tratado com Losartan; **d)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida; **e)** Nx tratados com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina.

Figura 19 – Distribuição das lesões glomerulares de acordo com a extensão da esclerose glomerular dos animais do protocolo 2. Notas atribuídas a cada glomérulo sendo, 1 para lesões menores que 10%, 2 para lesões de 11 a 20%, 3 para lesões de 21 a 30%, até a nota 10 que corresponde ao glomérulo com esclerose global. Os glomérulos íntegros, cuja nota seria 0, não foram representados graficamente. **a)** Nx pré-tratamento; **b)** Nx sem tratamento; **c)** Nx tratado com Losartan; **d)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida; **e)** Nx tratados com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina.

Nas tabelas 9/10 e nas figuras 20 e 21 estão representadas a porcentagem de expansão intersticial renal (%INT) nos grupos de estudo dos dois protocolos. Após 60 dias de Nx, os animais já apresentavam expansão intersticial, que progrediu lentamente ao longo dos 150 dias de Nx. Apesar da ausência de significância estatística entre os grupos observados no protocolo 1, os animais que receberam LH apresentaram valores mais próximos do grupo pré-tratamento. No Protocolo 2, a %INT foi agravada dos 120 dias aos 210 dias de Nx ($p < 0,05$). A monoterapia com L iniciada após 120 dias de Nx não foi capaz de atenuar a %INT, mantendo valores próximos do grupo sem tratamento ($p > 0,05$). Por outro lado, a associação LH impediu de maneira eficiente a progressão desse parâmetro, mantendo-o em valores semelhante àqueles observados no grupo pré-tratamento ($p > 0,05$). O animais tratados com AHHz não apresentaram proteção eficiente quanto a %INT, resultando em valores semelhantes àqueles obtidos no grupo sem tratamento ($p > 0,05$).

Figura 20 – Microfotografias representativas da expansão da área intersticial observada nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Coloração de Masson. Aumento 100X.

Figura 21 - Expansão intersticial renal dos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap<0,05 vs Nx_{pré}, ^bp<0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Os estudos de imuno-histoquímica estão representados nas tabelas de 11 a 14 e nas figuras de 22 a 33.

Tabela 11 – Estudo imuno-histoquímico renal após 60 e 150 dias de Nx (Protocolo 1).

<i>Imuno-histoquímica do tecido Renal</i>			
	<i>MØ</i>	<i>All+</i>	<i>α-Actina</i>
S	19,70±2,28	0,51±0,14	0,49±0,12
Nx_{pré}	128,06±16,59	6,66±1,17	8,54±0,88
Nx	191,39±14,99 ^a	16,03±1,81 ^a	12,24±0,99 ^a
L	131,05±13,22 ^b	13,86±1,34 ^a	10,46±1,13
LH	113,47±10,94 ^b	9,50±1,53 ^{bc}	7,73±0,95 ^b
AHHz	180,40±20,49 ^d	14,08±1,49 ^{ad}	12,98±0,57 ^{ad}

Infiltração de macrófago túbulo-intersticial (MØ, céls/mm²), células positivas para All da região túbulo-intersticial (All+, céls/mm²) e porcentagem de interstício ocupado por α-actina (α-actina, %). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Tabela 12 – Estudo imuno-histoquímico renal após 120 e 210 dias de Nx (Protocolo 2).

<i>Imuno-histoquímica do tecido Renal</i>			
	<i>MØ</i>	<i>All+</i>	<i>α-Actina</i>
S	22,20±1,89	0,66±0,11	0,37±0,07
Nx_{pré}	188,18±17,59	12,75±1,78	10,95±1,02
Nx	249,70±17,81 ^a	19,75±2,02 ^a	13,01±1,19
L	188,73±11,50 ^b	17,34±1,45 ^a	12,52±1,46
LH	148,94±13,05 ^b	11,90±1,72 ^{bc}	7,69±1,19 ^{abc}
AHHz	187,56±14,20 ^b	20,59±1,42 ^{ad}	12,23±1,45 ^d

Infiltração de macrófago túbulo-intersticial (MØ, céls/mm²), células positivas para All na região túbulo-intersticial (All+, céls/mm²) e porcentagem de interstício ocupado por α-actina (α-actina, %). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Após 60 dias de Nx (protocolo 1), observamos uma intensa infiltração de macrófagos (MØ), que progrediu após 150 dias de Nx, alcançando valores significativamente maiores do que os observados no grupo Nx_{pré}. Tanto a monoterapia com L como a associação LH foi eficaz em impedir a progressão deste parâmetro, mantendo a infiltração de macrófagos em níveis semelhantes aos observados no grupo pré-tratamento ($p>0,05$ vs. Nx_{pré}). A MØ observada no grupo tratado com a tripla terapia de AHHz não diferiu daquela observada nos animais Nx sem tratamento ($p>0,05$). No protocolo 2, observamos que aos 120 dias pós-Nx, os animais do grupo Nx_{pré} apresentavam infiltração acentuada de macrófagos, progredindo significativamente com o passar do tempo, atingindo níveis muito elevados aos 210 dias ($p<0,05$ vs. Nx_{pré}). Todos os tratamentos foram eficazes em impedir a progressão para esse parâmetro, apresentando diferença significativa em relação ao grupo Nx ($p<0,05$). O tratamento com LH apresentou redução numérica do infiltrado macrofágico quando comparado ao grupo pré-tratamento, porém, não diferindo significativamente dos outros grupos tratados.

Figura 22 – Microfotografias representativas da marcação para macrófagos por imunohistoquímica no interstício renal nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Aumento 200X.

Figura 23 - Expressão de macrófago túbulo-intersticial dos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap < 0,05 vs S, ^bp < 0,05 vs Nx_{pré}, ^cp < 0,05 vs Nx; ^dp < 0,05 vs LH).

A expressão de células positivas para a Angiotensina II (All+) está demonstrada nas figuras 24 e 25. No protocolo 1, observamos que mesmo aos 60 dias pós-Nx ocorre aumento da All+. Os animais Nx mantidos sem tratamento até 150 dias apresentam All+ significativamente maior no compartimento túbulo-intersticial do que os animais do grupo pré-tratamento ($p < 0,05$). A monoterapia com L não foi capaz de prevenir o aumento de All+, sendo semelhante ao grupo Nx ($p > 0,05$). A associação de LH limitou o aumento da expressão de All+, mantendo-a em valores próximos aos encontrados no grupo Nx_{pré} ($p > 0,05$). Os animais tratados com AHHz apresentaram expressão túbulo-intersticial de All+ semelhante à observada no grupo Nx sem tratamento ($p > 0,05$) e significativamente maior que o grupo LH. No protocolo 2, após 210 dias da nefrectomia, a presença de células All+ foi ainda mais acentuada ($p < 0,05$ vs. Nx_{pré}). Como no protocolo 1, a monoterapia com L não preveniu a progressão nesse parâmetro ($p < 0,05$ vs. Nx_{pré}). A associação de LH manteve os valores de All+ comparáveis ao grupo Nx_{pré}. ($p > 0,05$). O tratamento com AHHz não impediu a progressão de All+, alcançando valores semelhantes àqueles observados no grupo Nx sem tratamento ($p > 0,05$).

Figura 24 – Microfotografias representativas da marcação positiva para AII por imunohistoquímica na região túbulo-intersticial nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Aumento 200X.

Figura 25 - Expressão de células túbulo-intersticiais positivas para AII nos animais do protocolo 1 e 2 dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap< 0,05 vs S, ^bp< 0,05 vs Nx_{pré}, ^cp< 0,05 vs Nx; ^dp<0,05 vs L; ^ep<0,05 vs LH).

Nas figuras 26 e 27 estão demonstradas a fração de área intersticial ocupada por α -actina. No protocolo 1, a presença de α -actina já era evidente aos 60 dias e continuou a progredir até os 150 dias pós-Nx ($p < 0.05$). O tratamento com L atenuou a presença de miofibroblastos no interstício renal ($p > 0,05$ vs. Nx). O tratamento com LH limitou de maneira eficaz a presença da α -actina intersticial ($p > 0,05$ vs. Nx_{pré}). Por outro lado, a tripla terapia AHHz apresentou valores de miofibroblastos semelhantes aos obtidos no grupo sem tratamento ($p > 0,05$). No protocolo 2, observamos que os animais sobreviventes do grupo sem tratamento apresentaram intensa positividade para α -actina intersticial. O tratamento com L, iniciado após 120 dias de Nx, manteve os valores de α -actina semelhantes aos do grupo sem tratamento ($p > 0.05$). Ao contrário, nos animais que receberam LH após 120 dias de Nx, a presença de miofibroblastos era menor que a da fase pré-tratamento ($p < 0,05$ vs. Nx_{pré}), corroborando os dados de expansão intersticial. O tratamento triplo AHHz não foi capaz de atenuar a porcentagem de área positiva para os miofibroblastos intersticiais, sendo semelhantes ao grupo sem tratamento ($p > 0,05$ vs. Nx_{pré} e Nx).

Figura 26 – Microfotografias representativas da marcação positiva para α -actina da região intersticial realizada por imuno-histoquímica nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Aumento 100X.

Figura 27 – Porcentagem de interstício ocupado α -Actina dos protocolos 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^a $p < 0,05$ vs S, ^b $p < 0,05$ vs Nx_{pré}, ^c $p < 0,05$ vs Nx; ^d $p < 0,05$ vs L; ^e $p < 0,05$ vs LH).

Nas tabelas 13 e 14 e nas figuras 28 e 29 estão representados os dados obtidos com a análise da proliferação celular (PCNA) de todos os compartimentos (glomerular, tubular e intersticial) de todos os grupos. Além disso, estão representados os dados de quantificação da proliferação celular dos túbulos proximais e distais.

Tabela 13 – Estudo imuno-histoquímico renal após 60 e 150 dias de Nx (Protocolo 1).

<i>Imuno-histoquímica do tecido Renal</i>					
	<i>PCNA_{glom}</i>	<i>PCNA_{tub}</i>	<i>PCNA_{Int}</i>	<i>PCNA+AQP1</i>	<i>PCNA+NCC</i>
S	9±2	11±2	29±4	7,16±1,32	0,54±0,21
Nx_{pré}	7±2	47±3	93±9	38,00±2,70	4,79±1,03
Nx	8±3	67±8	143±12 ^a	51,61±9,37	4,32±1,09
L	5±1	54±8	125±11	39,32±7,11	2,27±0,47
LH	2±1	24±2 ^{abc}	39±5 ^{abc}	26,67±3,53 ^b	1,34±0,25 ^{ab}
AHHz	5±1	65±10 ^d	127±15 ^d	47,96±5,61	2,48±0,67

Proliferação de células glomerulares (PCNA_{glom}, céls/mm²), tubulares (PCNA_{tub}, céls/mm²) e intersticiais (PCNA_{Int}, céls/mm²). Dupla marcação para proliferação nos túbulos proximais (PCNA+AQP1, céls/mm²) e distais (PCNA+NCC, céls/mm²). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Tabela 14 – Estudo imuno-histoquímico renal após 120 e 210 dias de Nx (Protocolo 2).

Imuno-histoquímica do tecido Renal

	<i>PCNA_{glom}</i>	<i>PCNA_{tub}</i>	<i>PCNA_{Int}</i>	<i>PCNA+AQP1</i>	<i>PCNA+NCC</i>
S	10±2	9±1	35±3	5,09±0,42	0,22±0,10
Nx_{pré}	9±3	68±7	128±13	45,78±5,80	3,88±0,91
Nx	12±2	72±9	145±14	43,12±4,54	2,63±0,33
L	7±2	55±7	111±7	39,58±7,92	2,46±0,87
LH	1±1 ^b	26±2 ^{abc}	60±6 ^{abc}	28,33±2,32	0,51±0,32 ^{abc}
AHHz	7±2	55±5 ^d	97±6 ^{bd}	36,52±8,13	2,11±0,43 ^d

Proliferação de células glomerulares (PCNA_{glom}, céls/mm²), tubulares (PCNA_{tub}, céls/mm²) e intersticiais (PCNA_{Int}, céls/mm²). Dupla marcação para proliferação nos túbulos proximais (PCNA+AQP1, céls/mm²) e distais (PCNA+NCC, céls/mm²). Grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). Resultados expressos como Média±EP. (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

No protocolo 1, a proliferação celular nos animais Nx era evidente tanto aos 60 quanto aos 150 dias (p<0,05). Dentre os tratamentos, a associação LH foi a única capaz de prevenir e até regredir a proliferação de células intersticiais e tubulares (p<0,05 vs. Nx_{pré}, Nx, L e AHHz), apresentando valores comparáveis aos observados no grupo controle. No protocolo 2, na fase muito mais avançada da DRC, a proliferação é mais lenta e não observamos diferença entre 120 e 210 dias de Nx. Mesmo nessas condições, a associação LH foi ainda capaz de regredir e manter os valores de PCNA comparáveis aos observados no grupo controle. Esses resultados indicam que há um sinergismo entre L e H que tem um efeito surpreendente na proliferação celular.

Figura 28 – Microfotografias representativas da marcação positiva para PCNA realizada por imuno-histoquímica nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Aumento 200X.

Figura 29 - Proliferação celular nos compartimentos glomerular, tubular e intersticial dos animais do protocolo 1 e 2 dos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap< 0,05 vs Nx_{pré}, ^bp< 0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Nas tabelas 13 e 14 e nos gráficos de 30 a 33 estão representados os resultados da proliferação nos túbulos proximais (PCNA+AQP1) e distais (PCNA+NCC).

No protocolo 1, as células do túbulo proximal proliferam intensamente tanto aos 60 quanto aos 150 dias de Nx, provavelmente em consequência da grande quantidade de albumina que está chegando nessa porção do néfron. O tratamento com L ou AHHz não diferiram significativamente quando comparados aos grupos não tratados ($p > 0,05$ vs. Nx). Apesar da redução na albuminúria, o tratamento com LH apresentou apenas redução numérica na proliferação das células do túbulo proximal quando comparados com todos os outros grupos ($p > 0,05$). No protocolo 2, na fase mais avançada da DRC, o segmento proximal apresenta aumento na proliferação celular, sendo discretamente menor nos animais com 210 dias de Nx. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que nessa fase da DRC ocorra a perda de AQP-1, como consequência do alto grau de lesão renal.

Figura 30 – Microfotografias representativas dos túbulos proximais em proliferação realizada por imuno-histoquímica nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Aumento 200X.

Figura 31 – Dupla marcação para PCNA e AQP-1 nos animais do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap<0,05 vs Nx_{pré}, ^bp<0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

Investigamos a proliferação celular do segmento tubular convoluto distal através da dupla-marcação para PCNA+NCC. Esses dados estão representados nas tabelas 13 e 14 e nos gráficos 34 e 35. No protocolo 1 observamos que aos 60 dias os animais Nx apresentam intensa proliferação celular do túbulo distal que é mantida aos 150 dias pós-Nx. O tratamento com L reduziu numericamente este parâmetro ($p > 0.05$ vs Nx). O tratamento com LH foi o mais eficiente em limitar e regredir o número de células distais em proliferação quando comparado aos grupos pré-tratamento ($p < 0.05$). De maneira semelhante ao L, o tratamento com AHHz atenuou a proliferação das células desse segmento do nefron ($p > 0.05$ vs Nx). No protocolo 2, a expressão do PCNA+NCC estava aumentada, mas houve uma redução numérica após 210 dias, como já foi observado em PCNA+AQP1. Nesse protocolo, assim como a AQP-1, o NCC é um marcador epitelial que diminui sua expressão de acordo com a intensidade da lesão tubular. Tanto a monoterapia de L quanto o tratamento triplo de AHHz apresentaram PCNA+NCC semelhantes àqueles observados nos animais sem tratamento ($p > 0.05$). Mesmo iniciado após 120 dias, o tratamento com LH ainda foi capaz de reduzir a proliferação das células do túbulo distal, apresentando valores semelhantes aos observados no grupo controle.

Figura 32 – Microfotografias representativas dos túbulos distais em proliferação realizada pela técnica de imuno-histoquímica nos animais do protocolo 2. **a)** Sham (210d); **b)** Nx pré-tratamento (120d); **c)** Nx sem tratamento (210d); **d)** Nx tratado com Losartan (210d); **e)** Nx tratado com a associação de Losartan e Hidroclorotiazida (210d); **f)** Nx tratado com Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina (210d). Aumento 200X.

Figura 33 – Dupla marcação para PCNA e NCC nos animais Nx do protocolo 1 e 2 nos grupos S (Sham), Nx (sem tratamento), L (receberam Losartan), LH (receberam Losartan+Hidroclorotiazida) e AHHz (receberam Anlodipina, Hidroclorotiazida e Hidralazina). (^ap<0,05 vs Nx_{pré}, ^bp<0,05 vs Nx; ^cp<0,05 vs L; ^dp<0,05 vs LH).

5. DISCUSSÃO

Conforme descrevemos anteriormente (36, 53), a redução da massa renal em 5/6 resultou em hipertensão sistêmica, albuminúria, altas taxas de glomeruloesclerose (EG), em associação com atrofia tubular, inflamação e fibrose do interstício renal, com proliferação túbulo-intersticial acentuada e a presença marcante de macrófagos, miofibroblastos e células positivas para AII. A porcentagem de EG, que era de 10% aos 60 dias e 26% aos 120 dias após a ablação renal, chegou a 60% 210 dias após esse procedimento, observando-se a mesma tendência com relação à expansão intersticial, o que evidencia a natureza progressiva da nefropatia. A mortalidade foi muito alta no grupo que não recebeu qualquer tratamento, superando 40% aos 150 dias e 70% 210 dias após a redução de massa renal, como provável consequência da perda de função renal, aliada a lesão vascular sistêmica, mimetizando o quadro observado na prática clínica.

Um importante mediador da fibrose renal que se associa à DRC é a aldosterona que, além de promover retenção de sódio e espoliação de potássio, estimula a proliferação celular, o estresse oxidativo, a produção de miofibroblastos e a expressão do TGF- β (61-63).

No presente estudo, corroborando observações anteriores (53), a concentração sérica de aldosterona nos ratos Nx não tratados elevou-se continuamente com o tempo, o que certamente contribuiu para exacerbar a fibrose renal, agravando a DRC. Embora o principal fator de estímulo à síntese de aldosterona sejam os níveis circulantes de AII, sua produção

pelas adrenais provavelmente foi também influenciada pelas elevadas concentrações plasmáticas de potássio observadas nos animais Nx, ajudando assim para manter o balanço desse íon, mas ao custo do agravamento da DRC.

O principal foco do presente estudo foi a resposta dos ratos Nx a esquemas terapêuticos iniciados em tempos diferentes da evolução da DRC. Na maioria dos estudos desenvolvidos anteriormente com o modelo Nx, os tratamentos foram iniciados nos estágios iniciais da DRC, imediatamente após a nefrectomia ou poucas semanas após o procedimento. Nessa fase, o comprometimento estrutural do tecido renal remanescente ainda é leve, sendo relativamente fácil preveni-lo, detê-lo ou até mesmo revertê-lo. Demonstramos anteriormente (37) que a administração de losartan e micofenolato mofetil a ratos Nx durante os primeiros 30 dias após a nefrectomia atenuava fortemente a progressão da DRC, e que esse efeito protetor persistia longamente após a interrupção do tratamento. A aplicação do mesmo esquema entre o 30º e o 60º dias após a nefrectomia teve um impacto muito menor, indicando que os eventos iniciais desse processo são cruciais para sua evolução em longo prazo. Esses achados podem ajudar a explicar o relativo insucesso, no contexto clínico, de tratamentos que se mostraram promissores em modelos experimentais. No presente estudo, comparamos a resposta de ratos Nx a dois esquemas terapêuticos, a monoterapia com L e a associação LH, iniciados em dois tempos distintos da DRC associada. No primeiro tempo – 60 dias após a nefrectomia – procuramos reproduzir as

condições de uma DRC moderada. No segundo tempo, o tratamento foi instituído em uma fase muito tardia, nunca examinada anteriormente – 120 dias após a nefrectomia - quando as lesões renais se encontram em estado muito avançado e a função renal já caiu a uma fração do controle e a mortalidade já é de 20%. Dessa forma, procuramos mimetizar mais fielmente as condições de uma DRC avançada.

A monoterapia com L propiciou uma proteção apenas parcial contra as consequências da ablação renal, principalmente na fase mais avançada da DRC (Protocolo 2): a mortalidade observada nesse grupo foi de 7% quando os ratos foram tratados entre o 60º e o 150º dia após a ablação renal, e de 40% quando o tratamento foi iniciado aos 120 dias pós-ablação, portanto já em uma fase muito avançada da DRC. A monoterapia com L, embora tenha limitado a EG quando iniciada aos 60 dias, não impediu sua progressão quando instituída aos 120 dias. O efeito desse tratamento foi também discreto com relação à taxa de proliferação celular e ao acúmulo intersticial de α -actina e células positivas para All. Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores (31, 34), embora nestes a monoterapia com L tenha sido iniciada, no máximo, aos 60 dias, e contrastam com os estudos em que ela foi iniciada em concomitância com a ablação renal ou logo após a mesma. Em seu conjunto, esses achados vêm em reforço ao conceito de que, uma vez postos em ação, os mecanismos que atuam na DRC não mais podem ser controlados apenas pela inibição do SRA, exigindo a associação de outras drogas ou procedimentos para manter sua eficácia.

O efeito benéfico do tratamento com L foi notavelmente aumentado quando associado ao da H. Mesmo iniciada em fases mais avançadas do que no estudo anterior (53), a associação LH foi extremamente eficaz, chegando a fazer regredir a ALB e a hipertensão arterial, que retornaram a níveis inferiores aos observados antes de instituído o tratamento. Além disso, a associação LH deteve a queda da função renal e a progressão das lesões glomerulares e intersticiais, que permaneceram em níveis semelhantes aos do Grupo Nx_{pré}. No entanto, diferentemente do observado no estudo anterior, não foi possível reduzir a zero a mortalidade (que, no entanto, foi drasticamente reduzida), nem normalizar a albuminúria ou a pressão arterial, salientando a importância do início precoce do tratamento e mimetizando mais uma vez o observado na prática clínica.

Os fatores que possibilitaram a renoproteção observada com o tratamento LH mesmo em uma fase avançada da DRC não estão claros. Uma possibilidade óbvia é a drástica redução da PA obtida com o tratamento (64, 65). No entanto, a queda da PA observada no grupo AHHz foi comparável à obtida com o tratamento LH, sem que se obtivesse o mesmo efeito protetor, permanecendo elevadas a mortalidade e a gravidade das lesões renais. Esses achados indicam que a renoproteção e a redução da mortalidade observadas com o tratamento LH não são uma simples consequência de seu efeito anti-hipertensivo. Outro importante fator patogênico associado ao modelo Nx é a hipertensão intracapilar (6, 13, 36). Demonstramos anteriormente que o

tratamento LH iniciado após 30 dias de Nx normalizou a pressão capilar glomerular (53), neutralizando assim, presumivelmente, os eventos relacionados ao estresse mecânico e os eventos inflamatórios associados (66-70). No presente estudo, não foi possível medir a pressão glomerular nos ratos Nx, devido à alteração da superfície renal, tornada extremamente irregular pela doença. No entanto, tendo em vista as observações anteriores, é plausível a hipótese de que, mesmo iniciado numa fase muito avançada da DRC, a associação LH tenha revertido, parcial ou totalmente, hipertensão glomerular.

Outra possível explicação para a ação renoprotetora da associação LH é o seu drástico efeito sobre a aldosterona, cuja concentração plasmática foi reduzida, em ambos os Protocolos, a níveis inferiores aos observados antes do tratamento e mesmo no grupo Sham. É provável que esse efeito reflita com fidelidade o sinergismo entre as duas drogas: de um lado, o bloqueio do receptor AT-1 na adrenal neutraliza diretamente um dos principais estímulos à síntese de aldosterona. De outro, a H, por facilitar a excreção de potássio, elimina também esse estímulo. Como resultado, todo o cortejo de efeitos da aldosterona que conduzem à fibrose renal pode ter sido desativado.

Finalmente, de ve-se considerar o efeito da associação LH sobre a proliferação de células nos túbulos e no interstício renal. A administração de LH, mesmo iniciada aos 120 dias de Nx, diminuiu significativamente a taxa de proliferação celular nos três compartimentos estudados (glomérulo, túbulo e interstício), trazendo-os a valores inferiores aos

observados no início do tratamento. Os mecanismos desse efeito antiproliferativo não são claros. É possível que uma parte desse efeito reflita a regressão da albuminúria, retirando o estímulo inflamatório das proteínas filtradas às células tubulares proximais (71, 72). No túbulo distal, a inibição do NCC, por diminuir a entrada de sódio em excesso, pode também ter reduzido o estímulo à proliferação celular (73). Efeito adicional pode ter derivado da queda da concentração de aldosterona, que estimula a reabsorção distal de sódio e poderia facilitar a proliferação de suas células (74). A queda da proliferação tubular pode também ter limitado uma importante fonte de miofibroblastos, que podem derivar de células epiteliais tubulares através do mecanismo de transdiferenciação epitélio-mesenquimal (75).

O metabolismo da glicose e triglicérides está alterado na DRC mesmo nos estágios iniciais, havendo resistência à insulina e dislipidemia (40), o que pode agravar ainda mais as lesões glomerulares e intersticiais (76, 77). Corroborando esses dados clínicos, observamos no presente estudo um aumento na glicemia e trigliceridemia na fase avançada da DRC, sugerindo resistência à insulina e acúmulo de fatores que conduzem ao desenvolvimento de dislipidemia. Os tiazídicos podem agravar essas alterações metabólicas (78).

No entanto, não observamos, em nenhuma das fases deste estudo, um agravamento da hiperglicemia e dislipidemia associadas à DRC pelo tratamento LH. É interessante observar que, em contraste, o tratamento triplo não preveniu o desenvolvimento de alterações metabólicas,

permanecendo a glicemia e a trigliceridemia em níveis elevados, comparáveis àqueles observados no grupo não tratado. Esse achado sugere que a H não promove os efeitos colaterais observados, que talvez exijam a ação dos outros componentes do esquema tríptico empregado. Como efeito colateral adicional, o esquema AHHz agravou a queda do hematócrito arterial observada em ratos Nx, possivelmente em consequência da hemodiluição associada à retenção de sódio provocada pela anlodipina (79, 80).

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que o uso da associação entre um bloqueador do receptor da All e um tiazídico detém a progressão da nefropatia no modelo Nx, mesmo quando iniciado em fases avançadas do processo. Nossos resultados não apoiam o conceito de que os tiazídicos deixam de funcionar quando o RFG é muito baixo. A ação renoprotetora da associação LH não pode ser explicada apenas por seu efeito anti-hipertensivo. Outros mecanismos possivelmente envolvidos nesse efeito protetor são uma queda da pressão intraglomerular, que não pôde ser demonstrada, e alguns efeitos da própria associação: a queda acentuada da filtração de proteínas e da produção de aldosterona, bem como o efeito antiproliferativo da associação. Há necessidade de estudos adicionais para verificar se esse efeito também pode ser obtido com o uso de outras classes de diuréticos e de estudos clínicos adequados para determinar se a associação de tiazídicos a supressores do sistema renina-angiotensina-aldosterona pode

oferecer na prática clínica efeito renoprotetor semelhante ao observado neste estudo.

6. CONCLUSÕES

No modelo Nx:

I) Contrariando conceitos estabelecidos, a associação de um tiazídico ao tratamento com Losartan pode deter a progressão da DRC, mesmo quando o tratamento é iniciado em uma fase tardia, em que a fibrose intersticial já se encontra muito avançada.

II) O efeito benéfico da associação LH não pode ser explicado por seu efeito sobre a pressão arterial, embora não se possa excluir um efeito sobre a pressão hidráulica glomerular.

III) O efeito benéfico da associação LH pode ter decorrido da notável redução promovida sobre a concentração plasmática de aldosterona e/ou de uma diminuição da taxa de proliferação túbulo-intersticial.

IV) O tratamento combinado LH não teve efeito metabólico adverso. Ao contrário, atenuou ou até reverteu, mesmo em estágios avançados de DRC, a hiperglicemia e a hipertrigliceridemia associadas a essa condição.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, *et al.* US Renal Data System 2010 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 2011; **57**: A8, e1-526.
2. Li PK, Weening JJ, Dirks J, *et al.* A report with consensus statements of the International Society of Nephrology 2004 Consensus Workshop on Prevention of Progression of Renal Disease, Hong Kong, June 29, 2004. *Kidney Int Suppl* 2005: S2-7.
3. Zatz R, Romao JE, Jr., Noronha IL. Nephrology in Latin America, with special emphasis on Brazil. *Kidney Int Suppl* 2003: S131-134.
4. Machado FG, Poppi EP, Fanelli C, *et al.* AT1 blockade during lactation as a model of chronic nephropathy: mechanisms of renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **294**: F1345-1353.
5. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, *et al.* Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 1986; **77**: 1925-1930.
6. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, *et al.* Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1985; **76**: 612-619.
7. Fujihara CK, Padilha RM, Zatz R. Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes. Role of hemodynamic and nonhemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy. *Diabetes* 1992; **41**: 286-293.
8. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, *et al.* Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 1999; **103**: 627-635.

9. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, *et al.* Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol* 1998; **161**: 430-439.
10. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, *et al.* The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1456-1462.
11. Maschio G, Alberti D, Janin G, *et al.* Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 1996; **334**: 939-945.
12. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Exp Nephrol* 1996; **4 Suppl 1**: 34-40.
13. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, *et al.* Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1992; **90**: 766-771.
14. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, *et al.* Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992; **19**: 464-474.
15. Kagami S, Border WA, Miller DE, *et al.* Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; **93**: 2431-2437.

16. Grafe M, Auch-Schweik W, Zakrzewicz A, *et al.* Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 1997; **81**: 804-811.
17. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, *et al.* Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1693-1701.
18. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, *et al.* Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; **277**: C1-9.
19. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001; **38**: 635-638.
20. Sun Y, Zhang J, Zhang JQ, *et al.* Local angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in renal fibrosis of rats. *Hypertension* 2000; **35**: 1078-1084.
21. Wu LL, Cox A, Roe CJ, *et al.* Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1997; **51**: 1553-1567.
22. Wu LL, Yang N, Roe CJ, *et al.* Macrophage and myofibroblast proliferation in remnant kidney: role of angiotensin II. *Kidney Int Suppl* 1997; **63**: S221-225.
23. Shankland SJ, Ly H, Thai K, *et al.* Increased glomerular capillary pressure alters glomerular cytokine expression. *Circ Res* 1994; **75**: 844-853.
24. Tanaka R, Sugihara K, Tatematsu A, *et al.* Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis--modulation of platelet-derived growth factor by angiotensin II. *Kidney Int* 1995; **47**: 131-139.

25. Mervaala EM, Muller DN, Park JK, *et al.* Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 1999; **33**: 389-395.
26. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, *et al.* Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999; **100**: 1223-1229.
27. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, *et al.* Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 1998; **54**: 1510-1519.
28. Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, *et al.* Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 1996; **49**: 666-678.
29. Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, *et al.* Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13**: 1967-1974.
30. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986; **77**: 1993-2000.
31. Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, *et al.* Reversing glomerular hypertension stabilizes established glomerular injury. *Kidney Int* 1987; **31**: 752-759.
32. Fujihara CK, Noronha IL, Malheiros, *et al.* Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 283-290.

33. Noda M, Matsuo T, Fukuda R, *et al.* Effect of candesartan cilexetil (TCV-116) in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; **56**: 898-909.
34. Yamamoto M, Fukui M, Shou I, *et al.* Effects of treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) or angiotensin II receptor antagonist (AIIIRA) on renal function and glomerular injury in subtotal nephrectomized rats. *J Clin Lab Anal* 1997; **11**: 53-62.
35. Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, *et al.* Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**: F945-954.
36. Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, *et al.* An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int* 2005; **67**: 1913-1924.
37. Fujihara CK, Vieira JM, Jr., Sena CR, *et al.* Early brief treatment with losartan plus mycophenolate mofetil provides lasting renoprotection in a renal ablation model. *Am J Nephrol* 2010; **32**: 95-102.
38. Remuzzi G, Zoja C, Gagliardini E, *et al.* Combining an antiproteinuric approach with mycophenolate mofetil fully suppresses progressive nephropathy of experimental animals. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 1542-1549.
39. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, *et al.* Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1941-1951.
40. Wright JT, Jr., Harris-Haywood S, Pressel S, *et al.* Clinical outcomes by race in hypertensive patients with and without the

metabolic syndrome: Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Arch Intern Med* 2008; **168**: 207-217.

41. Reubi FC, Cottier PT. Effects of reduced glomerular filtration rate on responsiveness to chlorothiazide and mercurial diuretics. *Circulation* 1961; **23**: 200-210.
42. Brater DC. Diuretic therapy. *N Engl J Med* 1998; **339**: 387-395.
43. Bricker NS. On the meaning of the intact nephron hypothesis. *Am J Med* 1969; **46**: 1-11.
44. Kim GH, Na KY, Kim SY, *et al*. Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 1505-1511.
45. Dussol B, Moussi-Frances J, Morange S, *et al*. A randomized trial of furosemide vs hydrochlorothiazide in patients with chronic renal failure and hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 349-353.
46. Dussol B, Moussi-Frances J, Morange S, *et al*. A pilot study comparing furosemide and hydrochlorothiazide in patients with hypertension and stage 4 or 5 chronic kidney disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2012; **14**: 32-37.
47. Ruilope LM, Malacco E, Khder Y, *et al*. Efficacy and tolerability of combination therapy with valsartan plus hydrochlorothiazide compared with amlodipine monotherapy in hypertensive patients with other cardiovascular risk factors: the VAST study. *Clin Ther* 2005; **27**: 578-587.

48. Malacco E, Omboni S. Antihypertensive efficacy of zofenopril plus hydrochlorothiazide fixed combination for treatment in metabolic syndrome. *Adv Ther* 2007; **24**: 1006-1015.
49. Zhou X, Matavelli LC, Ono H, *et al.* Superiority of combination of thiazide with angiotensin-converting enzyme inhibitor or AT1-receptor blocker over thiazide alone on renoprotection in L-NAME/SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F871-879.
50. Fogari R, Derosa G, Zoppi A, *et al.* Effects of manidipine/delapril versus olmesartan/hydrochlorothiazide combination therapy in elderly hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Hypertens Res* 2008; **31**: 43-50.
51. Reungjui S, Hu H, Mu W, *et al.* Thiazide-induced subtle renal injury not observed in states of equivalent hypokalemia. *Kidney Int* 2007; **72**: 1483-1492.
52. Fujiwara W, Izawa H, Ukai G, *et al.* Low dose of hydrochlorothiazide, in combination with angiotensin receptor blocker, reduces blood pressure effectively without adverse effect on glucose and lipid profiles. *Heart Vessels* 2012.
53. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R. Losartan-hydrochlorothiazide association promotes lasting blood pressure normalization and completely arrests long-term renal injury in the 5/6 ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F1810-1818.
54. Zhu Z, Zhu S, Liu D, *et al.* Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase. *Hypertension* 2005; **45**: 233-239.
55. Bakris GL, Sarafidis PA, Weir MR, *et al.* Renal outcomes with different fixed-dose combination therapies in patients with hypertension at high risk for cardiovascular events

(ACCOMPLISH): a prespecified secondary analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; **375**: 1173-1181.

56. Cuspidi C, Sampieri L, Angioni L, *et al.* Effects of long-term blood pressure control on left and right ventricular structure and function in hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; **17 Suppl 2**: S157-158.
57. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; **2**: 235-254.
58. Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, *et al.* High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; **16**: 148-155.
59. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha II, *et al.* Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension* 2001; **37**: 170-175.
60. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 1980; **47**: 1-9.
61. Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, *et al.* Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000; **212**: 155-169.
62. Queisser N, Oteiza PI, Stopper H, *et al.* Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells. *Mol Carcinog* 2011; **50**: 123-135.

63. Fan YY, Kohno M, Hitomi H, *et al.* Aldosterone/Mineralocorticoid receptor stimulation induces cellular senescence in the kidney. *Endocrinology* 2011; **152**: 680-688.
64. Bidani AK, Griffin KA, Bakris G, *et al.* Lack of evidence of blood pressure-independent protection by renin-angiotensin system blockade after renal ablation. *Kidney Int* 2000; **57**: 1651-1661.
65. Soto K, Gomez-Garre D, Largo R, *et al.* Tight blood pressure control decreases apoptosis during renal damage. *Kidney Int* 2004; **65**: 811-822.
66. Riser BL, Cortes P, Heilig C, *et al.* Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor-beta isoforms in cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 1996; **148**: 1915-1923.
67. Riser BL, Varani J, Cortes P, *et al.* Cyclic stretching of mesangial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adherence: a possible new mechanism for glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 2001; **158**: 11-17.
68. Harris RC, Haralson MA, Badr KF. Continuous stretch-relaxation in culture alters rat mesangial cell morphology, growth characteristics, and metabolic activity. *Lab Invest* 1992; **66**: 548-554.
69. Zatz R, Fujihara CK. Glomerular hypertrophy and progressive glomerulopathy. Is there a definite pathogenetic correlation? *Kidney Int Suppl* 1994; **45**: S27-29; discussion S30-21.
70. Zatz R, Fujihara CK. Mechanisms of progressive renal disease: role of angiotensin II, cyclooxygenase products and nitric oxide. *J Hypertens Suppl* 2002; **20**: S37-44.

71. Tang S, Leung JC, Abe K, *et al.* Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2003; **111**: 515-527.
72. Takase O, Marumo T, Imai N, *et al.* NF-kappaB-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. *Kidney Int* 2005; **68**: 464-473.
73. van der Lubbe N, Lim CH, Fenton RA, *et al.* Angiotensin II induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter independent of aldosterone. *Kidney Int* 2011; **79**: 66-76.
74. Rozansky DJ, Cornwall T, Subramanya AR, *et al.* Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2601-2612.
75. Zhou L, Xue H, Yuan P, *et al.* Angiotensin AT1 receptor activation mediates high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in renal proximal tubular cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; **37**: e152-157.
76. Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **290**: F262-272.
77. Moradi H, Yuan J, Ni Z, *et al.* Reverse cholesterol transport pathway in experimental chronic renal failure. *Am J Nephrol* 2009; **30**: 147-154.
78. Reungjui S, Roncal CA, Mu W, *et al.* Thiazide diuretics exacerbate fructose-induced metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 2724-2731.

79. Linde T, Sandhagen B, Hagg A, *et al.* Decreased blood viscosity and serum levels of erythropoietin after anti-hypertensive treatment with amlodipine or metoprolol: results of a cross-over study. *J Hum Hypertens* 1996; **10**: 199-205.
80. Messerli FH. Vasodilatory edema: a common side effect of antihypertensive therapy. *Curr Cardiol Rep* 2002; **4**: 479-482.