Bruna Hitomi Inoue

Bases moleculares da microalbuminúria associada à hipertensão arterial essencial: papel da reabsorção tubular de albumina

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

Programa de Ciências Médicas.
Área de concentração: Distúrbios
Genéticos de Desenvolvimento e
Metabolismo
Orientadora: Dra. Adriana Castello
Costa Girardi

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

Inoue, Bruna Hitomi

Bases moleculares da microalbuminúria associada à hipertensão arterial
essencial : papel da reabsorção tubular de albumina / Bruna Hitomi Inoue. -- São
Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1.Endocitose 2.Megalina 3.Cubulina 4.Hipertensão
5.Microalbuminúria

USP/FM/DBD-270/12

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todas as pessoas que, de que algum modo, fizeram parte durante o meu mestrado, algumas com maior importância (meus pais, irmão e amigos), mas todas com seu lugarzinho especial.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por constituírem os alicerces da minha educação, do meu caráter, da minha força e de tudo aquilo que eu tenho como verdade e correto nessa vida. Por serem exemplo de tudo que já foi dito, e por muitas vezes viverem suas vidas por mim. Hoje eu sou ciente da sorte que tenho por ter pais como vocês; talvez eu nunca consiga mostrar o quanto eu sou grata por tudo que vocês já fizeram e fazem por mim e para mim. Esse título de mestre é, com certeza, de longe dedicado mais a vocês do que a qualquer outra pessoa. E podem ter certeza de uma coisa, tudo o que faço nunca é só por mim, pois se existe uma coisa pela qual eu sempre vou me preocupar, acima de tudo, é vocês se orgulharem de mim.

Ao meu irmão por ser sempre um exemplo de que tudo deve ser aproveitado, a cada instante, independente dos problemas.

À minha orientadora Adriana Castello Costa Girardi, pela oportunidade que me foi dada, pelos desafios pelos quais me foram impostos, por acreditar na minha capacidade. Só eu sei tudo o que eu aprendi durante todo esse período, mas só você poderia fazer uma idéia próxima disso, afinal, se eu aprendi tudo o que aprendi foi porque você me permitiu crescer, me direcionou nessa caminhada, me auxiliou em alguns momentos. Confesso, não foi fácil, mas hoje eu posso dizer que valeu. Obrigada por tudo mesmo, hoje eu sei que cresci intelectualmente, socialmente, profissionalmente e como pessoa.

Às minhas amigas de colégio, Ká, Dé, Laura, Jú e Má (agregada) que moraram comigo em São Paulo na “Rep Or Not”. Vocês, e só vocês, que me acalmavam e me aguentavam nos momentos de estresse e loucura quando eu chegava em casa depois do trabalho.

À Bruna Piccolo Muniz Pacheco, minha alma gêmea em muitos aspectos no laboratório, seja quanto à conquista, trabalho, desafios, problemas, dúvidas, etc. Além disso, minha amiga, confidente de todas as horas e que mora em meu coração.

À Taynah Ibraim, “colega” de faculdade que se tornou uma amiga muito especial no Lab. Obrigada por todas as conversas, conselhos e momentos de espairecimento.

Ao Renato de Oliveira Crajoinas, amigo, companheiro de cursinho, faculdade, Oriente, caronas e finalmente de Lab. Obrigada por todos os momentos no Lab, bons e ruins.

A outros amigos como Bibi, Packito, Maíra Kikuchi, Brunno Dias, Camilla Di Nizo, por serem pessoas não menos importantes e que acompanharam essa minha caminhada durante o mestrado, sempre me incentivando, dando conselhos, ouvindo os problemas, e principalmente, por em muitos momentos recarregarem as minhas energias e forças.

A todos os alunos e companheiros de bancada do Grupo Renal, apesar de saídas e entradas, cada um tem um valor muito importante e genuíno pra mim. Sendo mais específica: ao Marcos, meu eterno IC que me ajudou muito nos trabalhos do projeto, mas também teve seu importante papel como amigo, acupunturista, fisioterapeuta, massagista, nunca vou esquecer do truque da cruz no polegar pra acabar com a dor na gargantas, é mágico; à Silmara que se tornou uma amiga querida e única, assim como a Bruna, divido uma cumplicidade muito grande dentro e fora do Lab; à Sáskia e Fernanda, queridas que sempre fizeram muita falta nos períodos de aula; às minhas queridinhas, Vanessa, Ana, Paty e Gabi, por tornarem meus dias mais coloridos, intensos e felizes, num momento “emo” pra mim no Lab vocês chegaram e iluminaram meus dias; ao Daniel que me faz ter certeza que existem pessoas boas, dedicadas, educadas, honestas, amigas, verdadeiras, humildes nessa vida, mesmo que por pouco tempo obrigada pela ajuda nos experimentos, mas principalmente pelas conversas que me fazem acreditar que as pessoas valem à pena.

À Mariliza Velho, pela colaboração ao realizar os experimentos de expressão gênica apresentados no trabalho.

A todos os alunos e amigos dos outros grupos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (LGCM) – HC/FMUSP, pelo companheirismo, ajuda mútua, papos estranhos, engraçados, descontraídos, mas acima de tudo por tornarem o LGCM, que apesar de muito profissional e sério, um lugar tão agradável e gratificante de se trabalhar.

Às secretárias Maúde e Silvana do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – HC/FMUSP por todas as orientações, resoluções de problemas administrativos, etc.

A todos os funcionários, Mônica, Luciana, Sileide, Arruda, Dona Antônia, Andréia, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – HC/FMUSP pela manutenção e organização do laboratório, e por sempre estarem prestando serviços para os alunos e pesquisadores.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, Diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – HC/FMUSP, por propiciar um ambiente profissional de excelência em pesquisa.

Aos pesquisadores da Fisiologia Renal do Instituto de Ciências Biológicas - USP, Prof. Dr. Gerhard Malnic e Thaissa Pessoa, por sempre estarem de portas abertas para os alunos da Adriana, na utilização de alguns equipamentos, colaborações e também pela paciência.

Aos professores participantes da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Gerhard Malnic, Viktoria Woronik e Alexandre da Costa Pereira, por todos os direcionamentos, idéias e questionamentos que possibilitaram um enriquecimento do meu trabalho.

Aos professores das disciplinas de pós-graduação: “Fisiopatologia da Hipertensão Arterial: Bases Clínicas e Experimentais”, Joel Heyman; “Temas Avançados em Fisiologia e Fisiopatologia Renal”, Roberto Zatz; “Fisiopatologia da Proteinúria Glomerular: Bases Moleculares e Imunológicas”, Viktoria Voronik. Obrigada por todo aprendizado que me foi passado durante as disciplinas.

Às secretárias Rose e Angélica do programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por todas as orientações, preocupações com datas, “quebradas de galho” e paciência.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Hipertensão Arterial e Rim	1
1.2 - Microalbuminúria	3
1.3 - Manuseio Renal de Albumina	5
1.3.1 - Barreira de filtração glomerular	6
1.3.2 - Endocitose Mediada por Receptor	12
1.3.2.1 - Megalina	14
1.3.2.2 - Cubilina	15
1.3.2.3 - Isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3)	16
1.3.2.4 - H^+ -ATPase vacuolar	19
1.3.2.5 - CIC-5	20
1.3.2.6 - Ligantes dos receptores endocíticos megalina e cubilina	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 - Objetivo Geral	24
2.2 - Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 - Modelos Experimentais	25
3.2 - Aferição da Pressão Arterial Sistólica	25
3.3 - Avaliação da Função Renal	26
3.4 - Preparação de membranas de córtex renal	27
3.5 - Determinação da concentração de proteínas	28
3.6 - Eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS para proteína	28
3.7 - Coloração do Gel com Nitrato de Prata	29
3.8 - Immunoblotting	29
3.9 - Extração de RNA de córtex renal	32

3.10 - Transcrição Reversa	34
3.11 - Avaliação da expressão gênica	35
3.12 - Análise estatística	38
4. RESULTADOS	39
4.1 - Correlação entre a excreção de proteína urinária e a pressão arterial em SHR	39
4.2 - Avaliação temporal da função renal em SHR e Wistar	41
4.3 - Avaliação temporal da excreção urinária de albumina em ratos SHR e Wistar	44
4.4 - Avaliação temporal da expressão protéica de componentes do complexo macromolecular do aparelho endocítico em córtex renal de ratos Wistar e SHR	45
4.5 - Avaliação temporal da expressão gênica de componentes do complexo macromolecular do aparelho endocítico em córtex renal de ratos Wistar e SHR	51
4.6 - Avaliação temporal da expressão das moléculas nefrina e podocina em córtex renal de ratos SHR e Wistar	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

°C – grau Celsius

µg – microgramas

µl – microlitros

ACR – Relação albumina/creatinina

ADA – *American Diabetes Association*

ATP – Trifosfato de adenosina

cDNA – DNA complementar

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

Cl⁻ – Íon de cloreto

ClC-5 – Canal para cloreto 5

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfato

DTT – ditionitrito

ECL – *Enhanced chemiluminescence*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EP – Erro padrão

g – gramas

h – hora

H⁺ – Íon hidrogênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HRP – Anticorpo secundário conjugado a peroxidase

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

K₂EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico

KCl – Cloreto de sódio

kDa – quilodalton

kg – quilogramas

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

M – molar

MBG – Membrana basal glomerular

mg – miligramas

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – minuto

ml – mililitro

mM – milimolar

mmHg – milímetros de mercúrio

mmol – milimol

MOPS – ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico

mv – milivolts

Na⁺ – Íon de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

ng – nanogramas

NHE3 – trocador Na⁺/H⁺ 3

nm – nanômetros

nM – nanomolar

OKP – Linhagem proveniente do marsupial opossum

PA – Pressão arterial

PAI – *plasminogen activator inhibitor*

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Tampão fosfato-salino

P_{Cr} – Concentração plasmática de creatinina

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

pmoles – picomoles

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PTH – Paratormônio

PVDF – Polímero de Fluoreto de Polivinilideno

r – Coeficiente de determinação de correlação de Pearson

RAP – Proteínas associadas ao receptor

RFG - Ritmo de filtração glomerular

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RNA_{ses} – Ribonuclease

RNA_{sin} – Inibidor de ribonuclease

RPM – Rotações por minuto

RT-PCR – Reação em cadeia pela polimerase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato EDTA

Tris – Hidroximetil aminometano

U – Unidade internacional para quantificação de atividade enzimática

U_{Cr} – Concentração urinária de creatinina

V – Fluxo urinário

v/v – volume/volume

v-H⁺-ATPase – H⁺-ATPase vacuolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	(A) Anatomia do corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman). (B) Microscopia eletrônica da barreira de filtração glomerular.	7
Figura 2	Anatomia dos processos podocitários.	9
Figura 3	Influência do tamanho e da carga elétrica sobre a filtração de dextranas.	11
Figura 4	Esquema representativo da via endocítica em túbulo proximal.	13
Figura 5	Representação esquemática da estrutura do receptor endocítico Megalina.	15
Figura 6	Representação esquemática da estrutura do receptor endocítico Cubilina.	16
Figura 7	Modelo da estrutura secundária proposto para as isoformas do trocador Na^+/H^+ baseado em análises de gráficos de hidropatia.	18
Figura 8	Esquema da topologia da H^+ -ATPase vacuolar.	20
Figura 9	Esquema da topologia do canal para cloreto 5.	21
Figura 10	Gel de agarose mostrando a integridade das amostras de RNA extraídas de córtex renal de SHR com 6, 14 e 21 semanas e de ratos Wistar com idade correspondente.	34

Figura 11	Relação entre a pressão arterial sistólica (PAS) e a excreção de proteínas urinárias em SHR com 6 a 21 semanas e em ratos Wistar com idade correspondente.	40
Figura 12	Razão proteína/creatinina em SHR e Wistar.	43
Figura 13	Avaliação temporal da excreção urinária de albumina em ratos SHR e Wistar.	45
Figura 14	O padrão da excreção urinária de proteínas em ratos SHR com 14 e 21 semanas de idade assemelha-se ao detectado em modelos experimentais de proteinúria tubular.	46
Figura 15	Avaliação temporal da expressão protéica da megalina e da cubilina, em córtex renal de ratos Wistar e SHR.	49
Figura 16	Avaliação temporal da expressão protéica do canal para cloreto CIC-5 e da subunidade B2 da H ⁺ -ATPase vacuolar em córtex renal de ratos Wistar e SHR.	50
Figura 17	Avaliação temporal da expressão gênica da megalina, cubilina, CIC-5 e da subunidade B2 da v-H ⁺ -ATPase em córtex renal de ratos SHR e Wistar.	52
Figura 18	Avaliação temporal da expressão protéica da nefrina e podocina em córtex renal de ratos Wistar e SHR.	54
Figura 19	Avaliação temporal da expressão gênica da nefrina e podocina em córtex renal de ratos Wistar e SHR	55
Figura 20	Modelo esquemático da relação entre a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a redução da expressão de componentes do aparato endocítico em túbulos proximais renais.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da pressão arterial em adultos (<18 anos)*	2
Tabela 2	Definição de microalbuminúria e proteinúria	4
Tabela 3	Ligantes dos receptores endocíticos megalina e cubilina	23
Tabela 4	Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo	31
Tabela 5	Oligonucleotídeos utilizados para Real-Time RT PCR	37
Tabela 6	Peso corpóreo, PAS, parâmetros bioquímicos renais e consumo de água e ração de ratos Wistar e SHR com 6, 14 e 21 semanas de idade	42

RESUMO

INOUE, B. H. *Bases Moleculares da Microalbuminúria Associada à Hipertensão Arterial Essencial: Papel da Reabsorção Tubular de Albumina* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Evidências epidemiológicas indicam que a presença de microalbuminúria prediz maior frequência de eventos cardiovasculares e mortalidade em hipertensos essenciais. A microalbuminúria pode ser decorrente do aumento da permeabilidade glomerular e/ou da diminuição da reabsorção desta macromolécula no túbulo proximal. Todavia não é sabido se os mecanismos que regulam a reabsorção de albumina em túbulo proximal renal encontram-se alterados na hipertensão essencial. Este trabalho teve como objetivo investigar as bases moleculares da microalbuminúria associada à hipertensão arterial essencial, focando na reabsorção tubular de albumina. Para tanto, avaliamos a evolução temporal da excreção urinária de albumina em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 6 semanas de idade (pressão arterial sistólica, PAS, = 105 ± 4 mmHg), 14 semanas de idade (PAS = 180 ± 2 mmHg) e 21 semanas de idade (PAS = 202 ± 2 mmHg). Ratos normotensos Wistar da mesma idade serviram de controle. Observou-se que a excreção urinária diária de albumina aumentou progressivamente com o aumento da pressão arterial em SHR ($10,5 \pm 1,9$; $92 \pm 7,0$ e 154 ± 27 $\mu\text{g}/\text{dia}$, em SHR com PAS média igual a 105, 180 e 202 mmHg respectivamente). Este aumento progressivo não foi observado em ratos normotensos com idade correspondente, indicando que este fenômeno é decorrente do aumento da pressão arterial e não pode ser atribuído ao aumento da idade dos animais durante o período estudado. A análise das proteínas urinárias por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrou que SHR excretam proteínas do tamanho da albumina ou menores ($< 70\text{kDa}$), padrão típico de proteinúria tubular. Adicionalmente, verificou-se que os níveis de expressão dos receptores endocíticos megalina e cubilina, bem como do canal para cloreto CIC-5 diminuem progressivamente no córtex renal de SHR com o aumento da pressão arterial. Observou-se também uma diminuição significativa na expressão de uma outra macromolécula importante no processo de endocitose mediada por receptor em túbulo proximal renal, a $\text{v-H}^+\text{-ATPase}$. Entretanto, a diminuição da expressão protéica da subunidade B2 desta ATPase foi estatisticamente significativa apenas em SHR com 21 semanas comparado aos com 6 semanas de idade. Não foram encontradas alterações no padrão de expressão de componentes estruturais da barreira glomerular como a nefrina e podocina. Em suma, o nosso estudo demonstra que o aumento da excreção urinária de proteínas, especialmente de albumina, está associado com uma menor expressão de componentes essenciais do aparelho endocítico do túbulo proximal renal. É tentador especular que a disfunção da via endocítica no túbulo proximal renal possa ser o principal mecanismo subjacente ao desenvolvimento de microalbuminúria na hipertensão.

Palavras chave: Endocitose, megalina, cubilina, microalbuminúria, hipertensão.

ABSTRACT

INOUE, B. H. *Molecular basis of microalbuminuria in essential hypertension: role of tubular albumin reabsorption* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Epidemiological evidences indicate that the presence of microalbuminuria predicts a higher frequency of cardiovascular events and mortality in essential hypertensive patients. Microalbuminuria may arise from increased glomerular permeability and/or reduced proximal tubular reabsorption of albumin. However, it remains to be determined whether the mechanisms that regulate the renal proximal tubular reabsorption of albumin are altered in essential hypertension. The purpose of this work was to investigate the molecular basis of microalbuminuria in essential hypertension, focusing on the renal tubular reabsorption of albumin. To this end, we evaluated the temporal evolution of urinary albumin excretion in spontaneously hypertensive rats (SHR) at 6 weeks of age (systolic arterial pressure, SAP, = 105 ± 4 mmHg), 14 weeks of age (SAP = 180 ± 2 mmHg) and 21 weeks of age (SAP = 202 ± 2 mmHg). Age-matched normotensive Wistar rats were used as controls. It was observed that the daily urinary excretion of albumin progressively increased with blood pressure in SHR from 6 to 21 weeks of age (10.5 ± 1.9 , 92 ± 7.0 and 154 ± 27 μ g in SHR with 105, 180 and 202 mmHg of average SAP, respectively). This progressive increase in microalbuminuria has not been observed in age-matched normotensive Wistar rats, indicating that this phenomenon cannot be attributed to age progression over the studied period. SDS-PAGE analysis of urinary proteins showed that microalbuminuric SHR virtually excreted proteins of the size of albumin or smaller (< 70 kDa), typical of tubular proteinuria. Additionally, it was verified that the protein expression levels of the endocytic receptors megalin and cubilin as well as of the chloride channel CIC-5 progressively decreased in the renal cortex of SHR from 6 to 21 weeks of age. Moreover, it was observed reduction of expression of another macromolecule that plays an important role in the process of receptor mediated endocytosis in the renal proximal tubule, the v-H⁺-ATPase, was reduced. However, reduced cortical expression of the B2 subunit of the v-H⁺-ATPase, was only statistically significant in 21-wk-old vs. 6-wk-old SHR. Expression levels of structural components of the glomerular barrier such as nephrin and podocin were unchanged. To sum up, our study demonstrates that the increase in urinary protein excretion, especially of albumin, is associated with lower expression of key components of the apical endocytic apparatus in the renal proximal tubule. It is tempting to speculate that dysfunction of the apical endocytic pathway in the renal proximal tubule may be the major mechanism underlying development of microalbuminuria in essential hypertension.

Keywords: Endocytosis, megalin, cubilin, microalbuminuria, hypertension.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Hipertensão Arterial e Rim

As Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI (2010) (1) definem hipertensão arterial sistêmica (HAS) como “condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), associada freqüentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais”. Os limites de PA considerados normais são arbitrários (Tabela 1), mas a linha limítrofe que define a HAS considera valores de pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg e diastólica igual ou superior a 90 mmHg (1).

A HAS pode ser classificada em primária ou secundária. A HAS primária ou essencial é a forma mais comum de hipertensão, contabilizando 90 a 95% de todos os casos da doença. A hipertensão essencial é considerada uma doença complexa e multifatorial, ou seja, diferentes fatores podem contribuir para o seu desenvolvimento (2). Dentre estes fatores estão: hereditariedade, consumo excessivo de sal, alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona e no sistema nervoso simpático, estresse, obesidade, etilismo, resistência à insulina, tabagismo, idade, entre outros (1, 2). A HAS secundária apresenta causa identificável e tem prevalência de 3% a 10%. É decorrente, principalmente, de doenças renais, mas também de transtornos endócrinos ou neurológicos, gravidez e coarctação da aorta (2).

Existe uma estreita relação entre hipertensão e o rim. Este órgão desempenha papel determinante na regulação da pressão arterial e, de acordo com a corrente Guytoniana, é responsável pela gênese da hipertensão essencial em função de um déficit intrínseco na capacidade renal de excretar sódio e água (3).

Tabela 1 – Classificação da pressão arterial em adultos (<18 anos)*

Classificação	Pressão Arterial Sistólica (mm Hg)	Pressão Arterial Diastólica (mm Hg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe **	130 – 139	85 – 89
Hipertensão		
Estágio 1 (leve)	140 – 159	90 – 99
Estágio 2 (moderada)	160 – 179	100 – 109
Estágio 3 (grave)	≥ 180	≥ 110
Sistólica isolada	≥ 140	< 90

*Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial

** Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura.

Adaptado: IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010 (1).

Em consonância com a teoria de Guyton, sabe-se que, na maioria das doenças renais, agudas ou crônicas, a hipertensão é uma ocorrência freqüente. Por outro lado, a hipertensão arterial tem o rim como um de seus principais órgãos-

alvo, provocando, em situações clínicas e em modelos experimentais, lesão e perda progressiva da função renal.

Existe uma variedade muito grande de modelos experimentais que mimetizam aspectos da hipertensão arterial em humanos. No entanto, nenhum destes modelos apresenta todos os aspectos clínicos da doença. Deste modo, a escolha do modelo animal para estudos em hipertensão deve ser tomada levando em conta os objetivos do estudo visando utilizar o modelo mais adequado para validar as hipóteses formuladas pelo pesquisador.

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é o modelo genético mais utilizado no estudo da hipertensão. O SHR foi derivado do cruzamento entre irmãos que apresentavam os maiores níveis de pressão a cada geração a partir de uma população heterogênea de ratos Wistar resultando em uma nova linhagem após 20 gerações (4).

1.2 - Microalbuminúria

Evidências epidemiológicas indicam que a presença de microalbuminúria é associada, em hipertensos essenciais, à maior frequência de eventos cardiovasculares, de doença periférica e de mortalidade (5).

A microalbuminúria pode ser definida através de diferentes medidas, como mostra a Tabela 2. Tradicionalmente, a microalbuminúria é definida como excreção urinária de albumina entre 20 e 200 $\mu\text{g}/\text{min}$, correspondendo a 30-300 mg/dia, ou alternativamente, pela relação albumina/creatinina ($\text{ACR} = \text{albumin/creatinine ratio}$) de 10-25 mg/mmol (6)(Tabela 2).

Tabela 2 – Definição de microalbuminúria e proteinúria

	Normal	Microalbuminúria	proteinúria	Unidade
Albumina urinária (24hrs)	<30	30-300	>300	mg/dia
Taxa de excreção de albumina urinária	<20	20-200	>200	µg/min
Razão albumina/creatinina	<2,5	10-25	>25	mg/mmol

Adaptado: Donnelly et al., 2003 (6).

A determinação da concentração de albumina urinária em amostra isolada é bastante fácil de ser realizada na prática clínica e fornece informação confiável. Obtém-se uma melhor avaliação quando a determinação da albuminúria é feita na primeira urina da manhã, evitando-se, portanto, variações diurnas. Entretanto, de acordo com a *American Diabetes Association* (ADA), o padrão ouro para a mensuração da microalbuminúria é a excreção de albumina da urina de 24 horas (ADA, 2001). Existe, porém, a desvantagem em se medir apenas a concentração urinária de albumina pelo fato desta medida ser influenciada pelo volume urinário (6). Atualmente, a *National Kidney Foundation* recomenda a utilização da relação entre as concentrações de albumina (µg) e creatinina (mmol) em amostras isoladas de urina (ACR) para a detecção da microalbuminúria (7). A ACR é um teste mais conveniente para os pacientes e é menos propenso a erros devido a métodos de coleta imprópria e às variações na excreção de proteína de 24 horas (7).

A identificação e quantificação da proteinúria, particularmente da albumina, é um importante indicador para o prognóstico de doenças (8-10). Qualquer aumento persistente da excreção urinária é em princípio de natureza patológica. Portanto, a avaliação da albuminúria pode constituir-se em um valioso sinal de alteração renal, que freqüentemente antecede as manifestações sistêmicas da doença. O aumento da excreção urinária de albumina pode ocorrer tanto em decorrência do aumento da permeabilidade glomerular como da diminuição da reabsorção destas macromoléculas no túbulo proximal (11).

1.3 - Manuseio Renal de Albumina

A albumina é a mais abundante proteína do plasma, perfazendo um total de 60% das proteínas totais do soro humano. É uma molécula aniônica, exclusivamente sintetizada pelo fígado, constituída por 584 aminoácidos e com massa molecular equivalente a 69 kDa (12). Esta macromolécula possui inúmeras funções importantes como a manutenção da pressão oncótica e do volume sanguíneo, tamponante ácido-base, antioxidante e transportadora de diversas substâncias como ácidos, bilirrubina, cálcio, magnésio, drogas, hormônios e vitaminas lipofílicas e hidrofílicas (12).

Em condições normais, cerca de 170 mg a 9 g de albumina são filtrados pelos glomérulos humanos diariamente, no entanto, menos que 30 mg são excretados por dia. O restante é reabsorvido em túbulo proximal pelo processo de endocitose mediada por receptor, um mecanismo essencial para o transporte de macromoléculas para dentro das células através do epitélio (13-15).

1.3.1 - Barreira de filtração glomerular

O corpúsculo renal consiste em um tufo de capilares sanguíneos (glomérulo) suprido pela arteríola aferente e drenado pela arteríola eferente e envolvido pela cápsula de Bowman. A cápsula de Bowman possui dois folhetos, um interno (visceral) ligado aos capilares, e outro externo (parietal), formando os limites do corpúsculo renal. Entre os dois folhetos da cápsula de Bowman existe o espaço capsular, que recebe o filtrado glomerular (Figura 1) (16).

As células endoteliais dos capilares glomerulares são recobertas por uma membrana basal, revestida por uma camada epitelial de podócitos. As células endoteliais, a membrana basal glomerular (MBG) e os podócitos formam a chamada barreira de filtração glomerular (Figura 1). Esta barreira desempenha o importante papel de selecionar quais os componentes plasmáticos que serão ou não ofertados ao túbulo renal.

A camada de células endoteliais dos capilares glomerulares possui uma pequena porção em contato direto com as células mesangiais, o restante é quase completamente coberto pela MBG e pela camada epitelial de podócitos, e é nesta região que ocorre a filtração. O endotélio é fenestrado (isto é, possui poros de 70 nm) e como consequência é permeável a água e a solutos pequenos, constituindo uma barreira apenas para elementos celulares (16).

Figura 1 – (A) Anatomia do corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman). (B) Microscopia eletrônica da barreira de filtração glomerular. A barreira de filtração é composta por três camadas: o endotélio, a MBG e os processos podocitários dos podócitos. O diafragma das fendas de filtração forma os assoalhos das fendas (setas). CL = luz do capilar. CB = cápsula de Bowman. Adaptado: Boron & Boulpaep, 2011 (16).

A MBG encontra-se entre as células endoteliais dos capilares glomerulares e os podócitos e é a única estrutura contínua que separa o sangue contido nos capilares do espaço capsular. Por meio de microscopia eletrônica, demonstrou-se que a MBG é constituída por três camadas distintas: a lâmina rara interna (unida ao endotélio), a lâmina densa (camada intermediária) e a lâmina rara externa (recoberta pelos podócitos). Acredita-se que a MBG represente uma barreira

importante à filtração de proteínas com cargas resultantes negativas em virtude dos resíduos de aminoácidos siálicos e dicarboxílicos presentes nos proteoglicanos que a compõem (16).

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas (76) que possuem processos podocitários que se interdigitam e revestem a MBG. Estes processos podocitários são separados entre si por fendas de filtração que são conectadas por uma membrana bastante delicada, denominada em inglês “*slit membrane*” que contém poros de dimensões de 4 a 14 nm. As fendas de filtração selecionam as moléculas por seu tamanho, impedindo que macromoléculas que tenham cruzado a MBG adentrem a cápsula de Bowman.

A “*slit membrane*” é composta por diversas proteínas, entre elas a nefrina e a podocina (Figura 2). A nefrina, uma proteína transmembrana com massa molecular de 185-200 kDa, é a proteína estrutural principal na manutenção da “*slit membrane*”. A cauda citoplasmática da nefrina liga-se, através do seu domínio C-terminal, à podocina (~42 kDa), outra proteína transmembrana. A podocina está envolvida na ligação da nefrina ao citoesqueleto de actina dos podócitos (17-20), desempenhando papel importante na sinalização de eventos que determinam a integridade estrutural nestas células (Figura 2).

Evidências clínicas demonstram que as causas predominantes de síndrome nefrótica em adultos, caracterizada por proteinúria maciça, são danos nos podócitos (20). A importância da nefrina na manutenção e na integridade dos podócitos é evidenciada por estudos *in vivo* que demonstraram que a injeção de anticorpos anti-nefrina tem como consequência o aparecimento de proteinúria. Além disso, a obliteração do gene que codifica para nefrina, *Neph1*, em

camundongos, é associada ao achatamento dos processos podocitários (17-20). De maneira semelhante, camundongos deficientes em podocina desenvolvem proteinúria intra-uterina severa, achatamento dos processos podocitários e ausência de “*slit diafragma*” (17-20).

Figura 2 - Anatomia dos processos podocitários. Esta figura ilustra as proteínas que formam a “*slit membrane*” da fenda de filtração entre dois processos podocitários adjacentes. A podocina é responsável por confinar a nefrina em microdomínios da membrana plasmática. Muitas das proteínas que compõem a “*slit membrane*” interagem com proteínas adaptadoras (CD2AP) que se ligam à actina filamentosa (F-actina) do citoesqueleto. MGB = membrana basal glomerular. Adaptado: Mundel & Shankland, 2002 (21).

Em 1951, Pappenheimer e colaboradores (22) desenvolveram a teoria dos poros para explicar o mecanismo pelo qual o capilar glomerular, bem como a maioria dos capilares do organismo, é capaz de impedir a passagem de

macromoléculas. Esta teoria prediz que as paredes dos capilares são atravessadas por poros cilíndricos, os quais deixariam passar livremente moléculas de solvente, mas restringiriam moléculas de soluto com base em seu tamanho (22). A teoria dos poros encontrou respaldo em uma série de estudos que utilizaram polissacarídeos sintéticos, fabricados com diferentes massas moleculares, com a finalidade de investigar a influência do tamanho de uma molécula sobre sua filtração glomerular (23, 24). Muitos destes estudos, como o esquematizado na Figura 3, avaliaram a seletividade da barreira de filtração não somente no que se referia à influência do tamanho, mas também da carga elétrica de uma dada molécula (25-27).

O experimento mostrado na Figura 3 ilustra o modo pelo qual o tamanho e a carga elétrica afetam a filtração de macromoléculas pelo glomérulo. Neste gráfico, o eixo das abscissas representa o raio molecular das dextranas e o das ordenadas, seus respectivos clearances fracionais, que é uma medida da permeabilidade glomerular. Nota-se neste gráfico que quanto maior o raio molecular da dextrana, menor sua intensidade de filtração. Adicionalmente, verifica-se que para um dado raio molecular, as moléculas catiônicas são filtradas com maior facilidade que as neutras e aniônicas.

Conforme mencionado acima, a menor intensidade de filtração de moléculas aniônicas é explicada pela presença de glicoproteínas com cargas negativas na composição da MBG. Tendo em vista que a maior parte das proteínas possui carga negativa resultante, as cargas negativas presentes na barreira de filtração glomerular, especialmente na MBG, podem restringir a passagem de proteínas com raios moleculares efetivos entre 2 e 4 nm ou mais. É importante ressaltar que, embora bastante factível do ponto de vista funcional, a teoria dos poros não foi, até

os dias de hoje, comprovada anatomicamente. Muito provavelmente, os poros não existam exatamente como as estruturas cilíndricas idealizadas pelos pesquisadores nos anos 50. Outro ponto que merece atenção é com relação ao fato de que enquanto a existência da seletividade pelo tamanho seja universalmente aceita, alguns grupos de pesquisadores têm questionado o conceito de seletividade da barreira de filtração glomerular por carga elétrica (28, 29).

Figura 3 – Influência do tamanho e da carga elétrica sobre a filtração de dextranas. Valor igual a 1 indica que a substância é livremente filtrada, enquanto valor igual a zero indica que a mesma não é filtrada. (C_x = Clearance da Substância X; C_{In} = Clearance da Inulina; C_x/C_{In} = clearance fracional da substância X). Adaptado: Boron & Boulpaep, 2011 (16).

1.3.2 - Endocitose Mediada por Receptor

Em indivíduos normais, a albumina filtrada pelos glomérulos é quase totalmente reabsorvida no túbulo proximal renal pelo mecanismo de endocitose mediada por receptor (13-15). Na membrana plasmática, os receptores endocíticos estão agrupados nas regiões revestidas de clatrina que são microdomínios da membrana plasmática onde se inicia a internalização. As vesículas revestidas de clatrina internalizadas, contendo os receptores e seus ligantes, perdem seu revestimento e são direcionadas aos endossomas precoces. Os endossomas precoces são as primeiras estruturas a receberem o material endocitado, possuem em pH entre 6,2 e 6,5; e é neste microambiente levemente ácido que ocorre a separação dos receptores e seus ligantes. Os receptores endocíticos retornam para a membrana plasmática por meio de vesículas de reciclagem. Os ligantes internalizados que não foram reciclados são transportados para os endossomas tardios e para os lisossomas, onde são degradados em seus constituintes.

A endocitose mediada por receptor na membrana apical do túbulo proximal envolve a ligação da albumina, bem como de outras proteínas presentes no filtrado glomerular, aos receptores megalina e cubilina (12, 30, 31), internalização do complexo, subsequente dissociação da albumina dos receptores nos endossomas precoces (12), degradação da albumina em seus aminoácidos constituintes nos lisossomas e reciclagem dos receptores megalina/cubilina para a membrana celular (32) (Figura 4). Os aminoácidos resultantes retornam à circulação através membrana basolateral, finalizando o processo de reabsorção.

Estudos recentes evidenciaram que a endocitose da albumina requer um complexo macromolecular que inclui além dos receptores megalina/cubilina, a

isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3), a H^+ -ATPase vacuolar (v-H^+ -ATPase) e o canal para cloreto CIC-5 (12, 33-35) (Figura 4). Estas proteínas de transporte estão envolvidas na manutenção do pH que é essencial ao processo endocítico, pois influencia não somente a dissociação ligante-receptor, mas também o tráfego vesicular, os eventos de fusão endossomal e a reciclagem dos receptores para a membrana plasmática (13, 36-38).

Figura 4 – Esquema representativo da via endocítica em túbulo proximal. Representação do funcionamento e dos componentes do complexo macromolecular da endocitose mediada por receptor. VEI, vesículas endocíticas; EI, endossomas precoces; RE, endossomas de reciclagem; ET, endossomas tardios; Li, lisossomas. Adaptado: Gekle, 2005 (12).

1.3.2.1 Megalina

A megalina pertence à família dos receptores de lipoproteínas de baixa densidade, possui alta massa molecular (<600 kDa) e é constituída por um grande domínio amino-terminal extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda carboxi-terminal citoplasmática curta (Figura 5). Foi descoberta em 1982, por Kerjaschki e Farquhar (39), como um antígeno da nefrite de Heyman, também conhecida como glomerulonefrite membranosa, responsável por cerca de 30% dos casos de síndrome nefrótica em adultos.

A megalina pode ser encontrada em muitos epitélios de absorção, na vesícula vitelina, nos pneumócitos do tipo II, nas células secretoras de paratormônio, intestino delgado, endométrio, útero, trompas e no citotrofoblasto da placenta. No rim, este receptor é altamente expresso no aparato endocítico do túbulo proximal (40, 41). É particularmente encontrada na borda em escova, nas vesículas revestidas de clatrina, endossomas iniciais e de reciclagem, e em menores quantidades nos lisossomas. Sua importância para o aparelho endocítico assim como para a reabsorção de seus ligantes é evidenciada em muitos estudos. Camundongos nocaute para a megalina apresentam proteinúria de baixa massa molecular relativa e albuminúria (42). Por sua vez, inúmeras doenças caracterizadas por proteinúria revelam redução da expressão da megalina em tecido renal (43-46). O decréscimo na expressão deste receptor no túbulo proximal foi observado em animais com estágio inicial de diabetes (47), sugerindo que as funções da megalina possam estar prejudicadas em pacientes diabéticos, uma vez que proteinúria de baixa massa molecular e albuminúria são sintomas freqüentemente observados nesses pacientes nos estágios iniciais da doença (48).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura do receptor endocítico Megalina. Adaptado: Moestrup & Verroust (49)

1.3.2.2 Cubilina

Outro receptor endocítico envolvido na endocitose de proteínas filtradas é a cubilina, proteína com massa molecular equivalente a 460 kDa (50) e cuja estrutura revela ausência de domínio transmembrana (Figura 6). Foi identificada inicialmente como um fator intrínseco do receptor para vitamina B12, não apresentando nenhuma homologia estrutural aos receptores endocíticos conhecidos (49).

A cubilina é ancorada na membrana por meio de sua interação com a proteína amnionless (51) e muito possivelmente com a megalina (52, 53). É

altamente expressa no aparato endocítico do túbulo proximal (54-56), e é encontrada nos mesmos compartimentos que a megalina.

A participação da cubilina na endocitose mediada por receptor pode ser ilustrada por doenças hereditárias (Síndrome Imlerslund-Grasbeck) que acometem famílias nórdicas nas quais mutações na cubilina ou em proteínas que medeiam a inserção deste receptor na membrana da borda em escova resultam em proteinúria de origem tubular.

Figura 6 – Representação esquemática da estrutura do receptor endocítico Cubilina. Adaptado: Moestrup & Verroust, 2001 (49).

1.3.2.3 Isoforma 3 do trocador Na⁺/H⁺ (NHE3)

O trocador Na⁺/H⁺ utiliza energia proveniente do gradiente químico do íon sódio para mediar a troca eletroneutra de sódio extracelular por hidrogênio intracelular. Todos os NHEs clonados possuem dois domínios funcionais distintos:

um domínio N-terminal anfipático que atravessa a membrana plasmática 10-12 vezes, sendo constituído por cerca de 500 aminoácidos, e um segundo domínio hidrofílico que corresponde a face citoplasmática (Figura 7) (57). A sequência de aminoácidos correspondente ao domínio amino-terminal da proteína é altamente conservada, apresentando cerca de 50% a 60% de identidade, quando se comparam as isoformas do trocador Na^+/H^+ já clonadas. Em contraste, na região carboxi-terminal a homologia é bastante baixa. Já está bem estabelecido que a porção N-terminal dos NHEs corresponde ao domínio funcional do transportador e a C-terminal ao domínio regulatório (57-60) (Figura 7).

O NHE3 é a principal isoforma do trocador Na^+/H^+ presente no túbulo proximal onde medeia a reabsorção isotônica de NaCl e água, bicarbonato de sódio e secreção de amônio. O NHE3 parece desempenhar papel importante na endocitose mediada por receptor sendo responsável, ao menos em parte, pela acidificação dos endossomas precoces. Ao utilizar a energia proveniente do gradiente do Na^+ existente no lado externo das vesículas, o trocador medeia o influxo de H^+ , levando à acidificação. A importância do NHE3 na manutenção do pH dos endossomas precoces e, conseqüentemente, na reabsorção de albumina em túbulos proximais renais, foi descrita em uma série de trabalhos realizados por Gekle e colaboradores (35, 61, 62). Nestes estudos demonstrou-se que a captação de albumina em células em cultura de túbulo proximal renal (linhagem proveniente do marsupial opossum, (OKP)) é reduzida quando o NHE3 está inibido, e, totalmente abolida em células que não expressam esta isoforma de trocador (35, 62). Corrobora com estes dados, o fato de camundongos nocaute para o NHE3

apresentarem excreção urinária de proteínas bastante aumentada em relação aos camundongos selvagens (221%) (61).

Figura 7. Modelo da estrutura secundária proposto para as isoformas do trocador Na^+/H^+ baseado em análises de gráficos de hidropatia. O domínio N-terminal é anfipático e contém 10-12 segmentos transmembrana responsáveis por mediar a troca Na^+/H^+ . O domínio C-terminal é altamente hidrofílico e corresponde à porção citoplasmática da molécula pelo qual a troca Na^+/H^+ é regulada. Adaptado: Zachos e colaboradores, 2005 (63).

1.3.2.4 - H^+ -ATPase vacuolar

A acidificação dos endossomas tardios e dos lisossomas é promovida pela H^+ -ATPase vacuolar, v- H^+ -ATPase (62). A v- H^+ -ATPase é composta por dois domínios funcionais principais: um catalítico e citoplasmático (V1, de 640 kDa) e outro que atravessa a bicamada lipídica na qual o transportador está inserido (V0, de 240 kDa), (64, 65), formando um complexo protéico de aproximadamente 900 kDa (64-66) (Figura 8).

O domínio V1 forma um grande complexo, composto de 8 subunidades, designados pelas letras A-H e o domínio V0 compreende cópias simples de a, c, c', c'' e d. Algumas destas subunidades, por sua vez, são codificadas por diferentes genes e apresentam mais de uma isoforma (67, 68) (Figura 8). Devido a esta bomba ser movida pela hidrólise do ATP, que provê substancial quantidade de energia para o transporte, a H^+ -ATPase é capaz de gerar um grande gradiente de H^+ através da membrana. Considerando que o mecanismo de transporte desta ATPase é eletrogênico, a entrada de H^+ para o interior das vesículas torna o lúmen das mesmas mais positivo na ausência de uma corrente neutralizadora, criando um gradiente eletroquímico desfavorável ao ulterior transporte de H^+ (64, 65). Em muitas organelas intracelulares, uma condutância paralela de cloreto provê um desvio elétrico compensatório para as cargas positivas transferidas pela bomba, dissipando assim a diferença de potencial estabelecida pela ATPase (65, 66).

Figura 8 – Esquema da topologia da H^+ -ATPase vacuolar. Fonte: Carraro-Lacroix e colaboradores, 2009 (69).

1.3.2.5 - CIC-5

O CIC-5 pertence à superfamília de canais para cloreto voltagem-dependentes (70), no entanto, estudos recentes sugerem que ele atue como um trocador Cl^-/H^+ (71). A topologia proposta para estes canais é de 12 segmentos transmembrana α -hélice, vários deles contribuindo para a formação dos poros, e uma região amino e carboxi-terminal intracelular (Figura 9).

Estudos de imunocitoquímica indicaram que este canal colocaliza com a v- H^+ -ATPase em endossomas e lisossomas no túbulo proximal renal (34, 72). Sua mais conhecida função é a de atuar como um trocador de ânions, gerando a contra-condutância, atuando em parceria com a H^+ -ATPase vacuolar. Tal função foi evidenciada por estudos realizados em camundongos com nocaute para o CIC-5, os quais apresentam deficiência na acidificação e acúmulo de ânions cloreto nos

endossomas (34, 73). Há relatos recentes que o CLC-5 possui ainda outro papel crucial para o funcionamento da endocitose mediada por receptor, mediando, de forma ainda não esclarecida, a arquitetura do complexo endocítico ligante-receptor, entre a albumina e os receptores megalina/cubilina na membrana apical do túbulo proximal (34). Mutações neste canal provocam a doença de *Dent* clinicamente caracterizada por proteinúria tubular, hipercalcúria, nefrolitíase e acidose tubular renal. Muitos estudos mostram que a disfunção do CLC-5 prejudica a endocitose mediada por receptor em túbulo proximal renal e causa redução na expressão da megalina (43, 74).

Figura 9 – Esquema da topologia do canal para cloreto 5. Adaptado: Lehmann-Horn & Jurkat-Rott, 1999 (75).

1.3.2.6 - Ligantes dos receptores endocíticos megalina e cubilina

Uma quantidade muito grande de ligantes foi identificada tanto para megalina como para cubilina (Tabela 4). Esta tabela mostra que a endocitose mediada por receptor é um mecanismo importante não apenas para realizar a reabsorção de proteínas presentes no ultrafiltrado glomerular, mas é também responsável pela reabsorção de inúmeras macromoléculas, sendo que algumas delas são essenciais para a manutenção da homeostase do organismo.

Tabela 3 – Ligantes dos receptores endocíticos megalina e cubilina

Megalina	Cubilina
<i>Proteínas de ligação de vitaminas</i>	
Proteína de ligação da vitamina B ₁₂ ⁽⁷⁶⁾	Proteína de ligação da vitamina B ₁₂ ⁽⁵⁵⁾
Proteína de ligação da vitamina D ⁽⁷⁷⁾	Proteína de ligação da vitamina D ⁽⁷⁸⁾
Proteína de ligação do retinol ⁽⁷⁹⁾	
<i>Apolipoproteínas</i>	
Apolipoproteína B ⁽⁸⁰⁾	Apolipoproteína A-I ⁽⁸¹⁾
Apolipoproteína E ⁽⁸²⁾	LDL ⁽⁸³⁾
Apolipoproteína J/clusterina ⁽⁸⁴⁾	
Apolipoproteína H ⁽⁴⁹⁾	
<i>Hormônios e peptídeos de baixa massa molecular</i>	
PTH ⁽⁴⁹⁾	
Insulina ⁽⁸⁵⁾	
β ₂ -microglobulina ⁽⁴⁹⁾	
Fatores de crescimentos epidermais ⁽⁸⁵⁾	
Prolactina ⁽⁸⁵⁾	
Lisozima ⁽⁴⁹⁾	
Citocromo c ⁽⁴⁹⁾	
PAP-1 ⁽⁴²⁾	
Proteína de ligação de odorantes ⁽⁴⁹⁾	
Transtiretina ⁽⁴⁹⁾	
<i>Outros</i>	
Albumina ^(86, 87)	Ig de cadeia leve ⁽⁸⁸⁾
RAP ⁽⁸⁹⁾	Transferrina ⁽⁹⁰⁾
Tiroglobulina ⁽⁹¹⁾	Albumina ^(86, 87)
Lactoferrina ⁽⁴⁹⁾	RAP ⁽⁸⁹⁾
Ca ²⁺ ⁽⁴⁰⁾	
<i>Drogas Polibásicas</i>	
Amilloglicosídeos ⁽⁹²⁾	
Polimixina ⁽⁹²⁾	
Aprotinina ⁽⁹²⁾	
<i>Enzimas e inibidores de enzima</i>	
PAI-1 ⁽⁹³⁾	
PAI-1-uroquinase ⁽⁸⁰⁾	
PAI-1-tPA ⁽⁸⁰⁾	
Lipase lipoproteica ⁽⁹⁴⁾	
β -amilase ⁽⁹⁴⁾	

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

- ✓ Investigar as bases moleculares da microalbuminúria associada à hipertensão arterial essencial, focando na reabsorção tubular de albumina.

2.2 - Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a evolução temporal da excreção urinária de proteínas totais e de albumina em ratos espontaneamente hipertensos.
- ✓ Avaliar a expressão das proteínas implicadas na endocitose mediada por receptor (receptores megalina/cubilina, canal para cloreto CIC-5 e a H⁺-ATPase vacuolar) em córtex de ratos espontaneamente hipertensos com o evoluir da hipertensão arterial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Modelos Experimentais

Todos os procedimentos realizados foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos Wistar e SHR com idades de 6, 14 e 21 semanas, comprados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências de Animais de Laboratório (CEMIB), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em gaiolas, sob condições controle de temperatura (22°C), de umidade (60%) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação.

3.2 - Aferição da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial em ratos Wistar e SHR foi medida por meio do método indireto de pletismografia de cauda. Primeiramente, realizou-se a calibração do sistema (BP-2000 Blood Pressure Analysis System™; Visitech Systems, Inc.) e, em seguida, os ratos foram acondicionados em um meio de contenção e colocados sob uma plataforma aquecida. A região proximal da cauda dos animais foi encaixada num manguito de borracha acoplado a um transdutor de pulso (sensor) que capta os sinais a serem enviados e registrados em computador para a realização das

medidas de pressão arterial sistólica. O experimento só teve início após a estabilização dos sinais de pulso e frequência cardíaca. A PAS foi considerada como a média de no mínimo dez medidas.

3.3 - Avaliação da Função Renal

Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas. O consumo de água e ração foi monitorado e o procedimento repetido por 4 dias consecutivos: o primeiro dia para adaptação dos animais às gaiolas e os dias seguintes para coleta de urina de 24 horas e avaliação da função renal. Após este período, os animais foram anestesiados, o sangue arterial retirado, e, por fim, os animais foram sacrificados e os rins removidos.

Para avaliação da função renal os seguintes parâmetros foram avaliados: fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular (RFG), excreção urinária de proteínas, relação proteína/creatinina urinária e excreção urinária de albumina.

O fluxo urinário foi obtido dividindo-se o volume urinário obtido pelo tempo de coleta, e este valor foi corrigido pelo peso do rato. Os resultados foram expressos em ml/dia/kg.

O RFG foi estimado por meio da depuração da creatinina endógena, calculado pela fórmula $(U_{Cr} \times V / P_{Cr})$, sendo U_{Cr} correspondente à concentração urinária de creatinina, V o fluxo urinário e P_{Cr} a concentração plasmática de creatinina. Os resultados foram expressos em ml/min/kg. As concentrações urinária e plasmática de creatinina foram determinadas por um método cinético, utilizando-se um kit colorimétrico da Labtest (Lagoa Santa, MG). A reação foi feita em

duplicata e de acordo com as instruções do fornecedor. A absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm.

A concentração de proteínas urinárias excretadas por dia foi determinada utilizando-se o kit Sensiprot da Labtest. A reação foi feita em duplicata e de acordo com as instruções do fornecedor. Os valores obtidos foram padronizados pelo fluxo urinário e pelo peso corporal dos animais. Os resultados foram expressos em mg/dia/kg. Adicionalmente, os valores de proteína urinária excretada foram normalizados pelos valores de creatinina, visando minimizar as diferenças no RFG e as perdas urinárias que podem resultar em valores subestimados.

A concentração de albumina urinária foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se um kit específico para albumina de rato (Nephtrat kit; Exocell). Os experimentos foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

3.4 - Preparação de membranas de córtex renal

A cápsula renal foi removida com o auxílio de uma pinça, cortou-se o rim ao meio e retiraram-se as porções referentes ao córtex, que foram imediatamente transferidas para um frasco contendo tampão fosfato-salino (PBS), gelado, constituído por 150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico e 7,2 mM fosfato de sódio dibásico; pH 7,4). Os seguintes inibidores de protease foram adicionados a este tampão: pepstatina A (0,7 µg/ml), leupeptina (0,5 µg/ml), K₂EDTA (1mM) e PMSF (40 µg/ml). Adicionaram-se também os inibidores de fosfatase fluoreto de sódio (50 mM) e pirofosfato sódico (15 mM).

Em seguida, os córtices foram pesados, adicionou-se tampão PBS na quantidade aproximada de 15-20 vezes a massa cortical obtida e homogeneizou-se com homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.). O homogenato foi então aliquotado em tubos para centrífuga. A fração correspondente à preparação de proteínas totais de membrana de córtex renal foi isolada do homogenato por meio de centrifugações diferenciadas (P), assim efetuadas: P₁: 4000 rpm por 10 minutos e P₂: 28000 rpm por 90 minutos. Após a centrifugação P₁, salvou-se o sobrenadante e descartou-se o “pellet”. Após a centrifugação P₂, descartou-se o sobrenadante. O “pellet” final obtido foi ressuspensão em tampão PBS, aliquotado e acondicionado em -80°C.

3.5 - Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas da preparação de proteínas de membrana de córtex renal foi obtida pelo método de Lowry (95).

3.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida–SDS para proteína

Amostras de proteínas de membranas corticais renais ou um volume de urina contendo 40 µg de creatinina foram ressuspensas em tampão de amostra para eletroforese (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; SDS 2,0%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 1,96%; azul de bromofenol 0,01%). Adicionou-se aos géis um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope, Bio-Rad) para estimar a massa das proteínas extraídas de córtex renal ou presentes na urina.

Para separação das proteínas, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi feita segundo Laemmli (96), onde o gel de corrida era constituído de acrilamida 7,5% (para amostras de proteína) ou 10% (para amostras de urina); o de empilhamento 3% e a espessura do gel 1,5 mm. As amostras de eletroforese foram aplicadas no gel imerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,4; glicina 192 mM). A corrida foi interrompida de acordo com o tamanho das proteínas de interesse, tomando como base o padrão de massa molecular.

3.7 - Coloração do Gel com Nitrato de Prata

A coloração do gel contendo amostras de urina foi realizada utilizando-se o kit ProteoSilver® Plus Silver Stain (Sigma-Aldrich), seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. O kit ProteoSilver Plus utiliza nitrato de prata que se liga seletivamente aos aminoácidos das proteínas em soluções neutras ou levemente ácidas. Os íons prata ligados às proteínas são reduzidos pelo formaldeído, em meio alcalino, gerando prata metálica. Durante o processo de descoloração do gel, a prata metálica é oxidada a ferrocianeto de prata, que forma um complexo solúvel em água na presença de sódio tiosulfato.

3.8 - Immunoblotting

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas isoladas de córtex renal de ratos Wistar e SHR contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). A membrana havia sido previamente tratada com metanol 100% por 2 minutos, água MilliQ por 2 minutos e equilibrada em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192

mM, metanol 20%) por pelo menos 5 minutos. Para a transferência utilizou-se um sistema tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 500 mV por tempo 4 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi corada por 10 minutos com Ponceau (Ponceau S – Sigma - 0,1%; ácido acético 10%) e descorada com água MilliQ, até que as bandas desejadas pudessem ser visualizadas.

Após a transferência, a membrana foi colocada numa solução de bloqueio (NaCl 150mM; fosfato de sódio monobásico 2,8 mM; fosfato de sódio dibásico 7,2 mM; leite em pó desnatado 5%, Tween-20 0,1%) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpo primário (Tabela 4) mantendo-o por 12 horas a 4°C com leve agitação. Foram feitas a seguir cinco lavagens, de 5 minutos cada, com solução bloqueio. A membrana foi então incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), em solução de bloqueio (Tabela 4). A membrana foi novamente lavada conforme acima descrito. Em seguida, adicionou-se PBS 1% para retirar o excesso de solução bloqueio e incubou-se a membrana durante 1 minuto, sob leve agitação, com ECL (Amersham); reagente para imuno-deteção através de luminescência. Em seguida, a membrana foi colocada em um fotodocumentador (GE Healthcare) para visualização das bandas e captura pelo software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) para posteriormente serem analisadas por densitometria por meio do software Image J (Scion).

Tabela 4 – Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo

ANTICORPO	DILUIÇÃO (v/v)	FONTE
Megalina	1:50000	Doação (Dr. Daniel Biemesderfer, Yale University)
Cubilina	1:5000	Santa Cruz Biotechnogy
CIC-5	1:200	Alomone Laboratories
V-H⁺-ATPase (B2)	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Nefrina	1:2000	Abcam
Podocina	1:2000	Abcam
Actina	1:50000	Merck
HRP-cabra-anti-camundongo IgG	1:2000	Life Technologies
HRP-cabra-anti-camundongo IgM	1:2000	Life Technologies
HRP-cabra-anti-coelho	1:2000	Life Technologies

3.9 - Extração de RNA de córtex renal

Uma vez isolado o córtex renal, este foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente amostras de tecido pesando entre 0,2 e 0,5 g foram homogeneizadas em Trizol® (Life Technologies), seguindo o protocolo de extração de RNA recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi tratado com 10 U de desoxiribonuclease ribonuclease isentas de RNase por 1 hora a 37°C. Após o tratamento, realizou-se uma extração com igual volume de solução contendo fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 v/v, respectivamente. Esta mistura foi centrifugada a 3800 rpm por 45 minutos. No final da centrifugação, três fases distintas foram visualizadas. Na fase superior (aquosa), estava o RNA que foi cuidadosamente transferido para outro tubo. Em seguida, precipitou-se o RNA com 0,2 M acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. Incubou-se em freezer (-70°C) por 30 minutos. Após uma centrifugação a 3800 rpm por 20 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC.

A concentração do RNA foi estimada por densidade óptica por meio de espectrofotometria no comprimento de onda 260 nm. Para a análise da pureza do RNA dividiu-se o valor da absorbância a 260 nm pelo valor obtido a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas). A faixa ideal que sugere boa qualidade da preparação deve variar entre 1,6 a 2,0. Em seguida, fez-se eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão 1X MOPS (40 mM MOPS, pH 7,0; 3 M acetato de sódio, pH 5,2) sob condições desnaturantes (1,7% formaldeído) para que as moléculas de RNA fossem fracionadas (Figura 10).

Amostras contendo 20 µg de RNA total foram aliquotadas e, a estas, adicionou-se 25 µL de tampão de corrida (0,75 mL formamida; 0,15 mL 10X MOPS; 0,24 mL formaldeído 37%; 0,1 mL água DEPC, glicerol 0,1% e 0,08 de azul de bromofenol 10%). As amostras foram então desnaturadas a 96°C por 15 minutos e colocadas diretamente no gelo. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de agarose, imersas em tampão de corrida 1X MOPS e sujeitas a 50 mV. Ao término da corrida, os RNA ribossômicos foram visualizados através de fluorescência proporcionada pela adição do corante fluorescente SYBRTM Green II (Molecular Probes, Inc.) ao gel. Este corante liga-se por interação eletrostática à cadeia principal das molecular de RNA. O gel foi incubado por 20 minutos, sob agitação, em solução contendo corante “SYBR Green II para RNA, diluído 200 vezes em tampão TBE 1X (89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8,0)). Em seguida, a imagem foi digitalizada permitindo a visualização dos RNAs ribossômicos e, por tanto, a verificação da integridade das moléculas de RNA (Figura 10).

Figura 10 – Gel de agarose mostrando a integridade das amostras de RNA extraídas de córtex renal de SHR com 6, 14 e 21 semanas e de ratos Wistar com idade correspondente.

3.10 - Transcrição Reversa

Para síntese do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 5 µg de RNA total. Amostras de RNA foram incubadas com 1,5 µl água isenta de RNases; 4,0 µl 5X First Strand Buffer (concentração final de 1X); 1,0 µl DTT (concentração final de 0,01M); 1,0 µl dNTP (concentração final de 0,5 nM); 1,0 µl de Oligo-dT (concentração final de 0,025 nM); 0,5 µl de RNAsin (concentração final de 1U/µl) e 1,0 µl da enzima SuperTranscriptase reversa (concentração final de 10U/µL) para cada amostra. Incubou-se estas amostras a 50°C por 2 horas, e, em seguida, as mesmas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. Ao final da reação obteve-se um estoque de cDNA na concentração de 250 ng/µl. As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

3.11 - Avaliação da expressão gênica

O conteúdo de RNAm das proteínas de interesse foi determinado por meio de PCR em tempo real. Antes da realização dos experimentos de PCR em tempo real, os oligonucleotídeos sintetizados foram avaliados pelo método de PCR convencional para verificarmos a presença da amplificação dos produtos desejados e também a especificidade das bandas. Para a realização do PCR convencional foi utilizado 1 µl de cDNA numa concentração de 50 ng/µl, 1 µl de cada oligonucleotídeo na concentração de 12,5 pmoles/µl, 9,0 µl de tampão contendo 1,25 mM dNTP, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% de Triton X-100), 0,125 µl Taq polimerase na concentração de 2,5U/µl.

As amostras foram amplificadas nas máquinas de PCR comuns nas seguintes condições: 92°C por 10 minutos (etapa 1), 92°C por 1 minuto (etapa 2), 60°C por 1 minuto (etapa 3), 72°C por 1 minuto (etapa 4), 72°C por 10 minutos (etapa 5), tendo se repetido 32 vezes as etapas de 2 a 4.

Após a amplificação, as amostras foram preparadas para serem aplicadas no gel de agarose, adicionando-se 3 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol + glicerol) e, então, verificadas em gel de agarose 3% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi colocado em uma cuba de eletroforese, imerso em tampão TAE 1X, e a corrida foi realizada a 100 v, por aproximadamente 40 minutos. Um marcador foi colocado no gel antes das aplicações das amostras para servir de controle do tamanho do produto de amplificação dos oligonucleotídeos. A qualidade das amostras foi avaliada por um sistema de exposição de luz ultravioleta. Apenas as reações nos quais os oligonucleotídeos utilizados

resultaram na geração de uma banda única e íntegra foram escolhidas para os estudos de expressão gênica; as que não atingiram este critério tiveram seus oligonucleotídeos redesenhados e novamente testados.

15 ng de cDNA foram usados para a reação de real time RT-PCR (SYBR[®] Green PCR Master Mix-PE Applied Biosystems) em um termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O gene controle que codifica para a ciclofilina foi usado para normalizar os resultados. O método CT comparativo foi usado para análise dos dados. Os oligonucleotídeos utilizados para detecção da megalina, cubilina, CIC-5, subunidade B2 da v-H⁺-ATPase, nefrina, podocina e o controle interno ciclofilina foram:

Tabela 6 – Oligonucleotídeos utilizados para PCR em tempo real

GENE	REFERÊNCIA NCBI	SEQUÊNCIA	TAMANHO
Lrp2	NC_005102	S- TCCATCCTTCTTCGTTGGA AS- CCGGTTTGCTGTGATAACC	131 pb
Cubn	NM_053332	S- CACCAGGGGCTACAACAGGCT AS- GGGTACCCAGGGCTGCTGAA	154 pb
Atp6v1b2	NM_057213	S- GAAAGCTGTGGTGGGAGAA AS- CCAGCCAATGTCCAAAGTC	140 pb
Clcn5	NM_017106	S- TTACGCCAATGGAGATCGT AS- CAAAACAACCCCATGCTTC	183 pb
Nphs1	NC_000019.9	S- TGAGACGCTTCACAACACCCGT AS- CCCAGATGTCAGCCTGAGTCCTCT	92 pb
Nphs2	NC_000001.10	S- AAGAGCATTGCCCAAGATG AS- TCTTTGTGCCTCAGCTTCC	146 pb
Ppia	NM_017101.1	S- AATGCTGGACCAACACAAA AS- CCTTCTTTCACCTTCCCAA	101 pb

Lrp2, receptor Megalina; Cubn, receptor Cubilina; Atp6v1b2, sub-unidade B2 da v-H⁺-ATPase; Clcn5, Canal para cloreto 5 (ClC-5); Nphs1, nefrina; Nphs2, Podocina; Ppia, Peptidilprolil isomerase A (ciclofilina A); S, sense; AS, antisense.

3.12 - Análise estatística

Os resultados apresentados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EP) com n indicando o número amostral. As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA). Ajuste para comparações múltiplas foi feita utilizando o método de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 - Correlação entre a excreção de proteína urinária e a pressão arterial em SHR

A cepa de SHR é o modelo de hipertensão experimental mais utilizado para mimetizar a patogênese da hipertensão essencial humana. Estes animais desenvolvem hipertensão sem necessidade de manobras adicionais tais como sobrecarga de sal e apresentam alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo. Com a finalidade de verificar a aplicabilidade do modelo SHR aos nossos estudos, realizamos uma análise de regressão linear para investigar se há relação entre proteinúria e pressão arterial sistólica nesta linhagem de ratos hipertensos.

Tal como descrito para humanos, a Figura 11 ilustra uma correlação positiva e praticamente linear entre a quantidade de proteína excretada na urina e a pressão arterial sistólica (PAS) de SHR com idade entre 6 e 21 semanas (Coeficiente de correlação de Pearson, $r = 0,8853$; $P < 0,0001$) (Figura 11A). Por sua vez, não se observou correlação entre estas variáveis quando plotamos os dados provenientes de ratos Wistar normotensos, com idade correspondente ($r = 0,3864$; $P = 0,13$) (Figura 11 B). Estes resultados indicam que o aumento da excreção de proteína urinária em ratos, durante o período analisado, é decorrente do aumento da pressão arterial e não está associado à progressão da idade dos animais.

Figura 11 – Relação entre a pressão arterial sistólica (PAS) e a excreção de proteínas urinárias em SHR com 6 a 21 semanas e em ratos Wistar com idade correspondente. O coeficiente de correlação r e os valores de P foram obtidos pelo teste de correlação de Pearson. As linhas representam a regressão linear dos pontos. A excreção de proteínas urinárias está expressa pela razão proteína/creatinina urinária. **(A)** Uma correlação positiva é observada entre a excreção de proteínas urinárias e PAS em SHR com idade entre 6 e 21 semanas ($n = 25$; $P < 0,0001$). **(B)** A excreção de proteínas urinárias não guarda relação com a PAS em ratos Wistar normotensos com idade correspondente ($n = 15$; $P = 0,13$).

4.2 - Avaliação temporal da função renal em ratos Wistar e SHR

A Tabela 6 mostra o peso dos animais, a PAS, o consumo de água e ração e parâmetros bioquímicos da função renal. Conforme esperado, a PAS de SHR aumentou progressivamente entre 6 e 21 semanas de idade. Ratos Wistar jovens, com 6 semanas de idade, apresentaram PAS modestamente menor que aqueles com 14 e 21 semanas de idade. Entretanto, diferentemente dos SHR, a PAS manteve-se relativamente constante entre 14 e 21 semanas de vida em ratos Wistar.

Em ambas as linhagens, o consumo de água e ração, bem como o fluxo urinário é maior em ratos com 6 semanas comparados aos de 14 e 21 semanas de idade, muito provavelmente em decorrência de um metabolismo mais acelerado nos animais jovens (Tabela 6). Não há diferença estatisticamente significativa em nenhum destes parâmetros quando se compara ratos da mesma linhagem de 14 vs. 21 semanas de idade. O RFG, estimado pelo clearance da creatinina, seguiu o mesmo padrão do fluxo urinário. Ou seja, em ambas as linhagens foi maior em ratos com 6 semanas e manteve-se relativamente constante em ratos com 14 e 21 semanas de idade.

Em consonância com os dados apresentados na Figura 11, a excreção de proteínas em urina de 24 horas aumentou progressivamente em SHR durante o período analisado (Tabela 6). Em ratos Wistar, houve um aumento significativo na excreção urinária diária de proteínas entre 6 e 14 semanas de idade e entre 6 e 21 semanas de idade. No entanto, nenhuma variação foi observada entre ratos normotensos com 14 e 21 semanas de vida (Tabela 6).

Tabela 6 – Peso corpóreo, PAS, parâmetros bioquímicos renais e consumo de água e ração de ratos Wistar e SHR com 6, 14 e 21 semanas de idade.

	Wistar			SHR		
	6 sem	14 sem	21 sem	6 sem	14 sem	21 sem
Peso corpóreo (g)	151±14 (n=10)	358±11 (n=8)	417±21 (n=14)	136±4 (n=8)	292±4 (n=19)	311±5 (n=24)
PAS (mmHg)	102±2 (n=7)	121±1 ^{***} (n=7)	127±3 ^{***} (n=5)	105±4 (n=6)	180±2 ^{###} (n=9)	202±1 ^{###} (n=6)
Consumo de água (ml/kg/dia)	214,5±11 (n=10)	101,3±5,5 ^{***} (n=8)	90,7±2,8 ^{***} (n=14)	207,6±13,7 (n=8)	122,3±2,8 ^{###} (n=19)	104,1±2,9 ^{###} (n=24)
Consumo de ração (mg/kg/dia)	144,4±7,1 (n=10)	60,8±2,8 ^{***} (n=8)	54,9±2,8 ^{***} (n=14)	136±4,5 (n=8)	79,3±1,6 ^{###} (n=19)	70,8±1,4 ^{###} (n=24)
Fluxo urinário (μl/kg/dia)	43,6±2,9 (n=10)	34,2±2,5 ^{**} (n=8)	30,6±2,1 ^{**} (n=14)	39,8±3,8 (n=8)	30,4±1,1 ^{##} (n=9)	32,3±1,2 ^{##} (n=24)
RFG	8,7±0,3 (n=5)	6,3±0,2 ^{***} (n=6)	6,2±0,2 ^{***} (n=6)	7,7±0,3 (n=8)	5,9±0,2 ^{###} (n=9)	6,24±0,2 ^{###} (n=7)
Excreção urinária de proteína (mg/dia)	10±1 (n=10)	29±2 ^{***} (n=8)	37±3 ^{***} (n=14)	15±1 (n=8)	71±2 ^{###} (n=19)	117±6 ^{###} (n=24)

^{**}P < 0,01 e ^{***}P < 0,001 vs. Wistar-6 sem. ^{##}P < 0,01 e ^{###}P < 0,001 vs. SHR-6 sem.

Visando minimizar as diferenças no RFG e as perdas urinárias que podem acarretar em valores subestimados da excreção urinária de proteínas, estes dados foram normalizados pela creatinina e estão apresentados na Figura 12. De maneira similar ao que foi mostrado anteriormente, a razão proteína/creatinina aumentou progressivamente em SHR durante o período observado. Em ratos Wistar, a razão proteína/creatinina foi menor às 6 semanas de idade quando comparada às 14 ou 21 semanas, mas permaneceu inalterada entre as idades 14 e 21 semanas.

Figura 12 – Razão proteína/creatinina em ratos Wistar e SHR. Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24h durante três dias consecutivos. Os valores de clearance de creatinina e excreção de proteína urinária foram obtidos e utilizados para calcular a relação proteína/creatinina. Valores

expressos como média $\pm$ EP. $n = 14$ ratos/grupo, $*P < 0,05$ e $***P < 0,001$ vs. Wistar com 6 semanas de idade. $##P < 0,01$ e $###P < 0,001$ vs. SHR 6 com semanas idade.

4.3 - Avaliação temporal da excreção urinária de albumina ratos Wistar e SHR

Após determinarmos que a excreção urinária de proteínas totais aumenta progressivamente com o aumento da pressão arterial em SHR, nosso próximo passo foi medir, especificamente, a quantidade de albumina excretada por estes animais e por ratos Wistar normotensos. Os resultados dos ensaios imuno-enzimáticos utilizando anticorpo específico para albumina de rato estão mostrados na Figura 13. Conforme atesta esta Figura, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos de ratos Wistar, no entanto, SHRs apresentaram um aumento progressivo e notável na excreção de albumina urinária entre 6 e 21 semanas de idade (Figura 13). Na Figura 13, observa-se também que os níveis urinários de albumina excretada por ratos normotensos e por SHR com 6 semanas de idade estavam dentro do valor definido como normal (< 30 mg/dia), para humanos. Por outro lado, de acordo com a definição mostrada na Tabela 2, SHRs com 14 e 21 semanas de idade apresentavam microalbuminúria (92 ± 7 e 154 ± 27 mg/dia, respectivamente).

Em seguida, analisou-se o padrão de excreção urinária de proteínas em SHR e ratos Wistar por SDS-PAGE. Para tal, amostras de urina contendo $40 \mu\text{g}$ creatinina foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas contidas no gel foram visualizadas no gel por meio da coloração com nitrato de prata (Figura 14). É possível notar que as proteínas excretadas na urina dos animais que apresentavam microalbuminúria (SHR com 14 e 21 semanas de idade)

eram do tamanho da albumina ou menores. Este resultado sugere que a microalbuminúria observada nos animais SHR com 14 e 21 semanas de idade assemelha-se ao dos camundongos com nocaute para a proteína megalina (42, 46), aos dos camundongos com nocaute para o canal para cloreto CIC-5 (97) e aos camundongos deficientes para o NHE3 (61), todos considerados modelos típicos de proteinúria tubular.

Figura 13 – Avaliação temporal da excreção urinária de albumina em ratos Wistar e SHR. Determinação quantitativa da excreção de albumina urinária em ratos Wistar e SHR com 6, 14 e 21 semanas de idade. Os níveis urinários de albumina foram obtidos por ELISA e normalizados pelo fluxo urinário dos ratos. Valores expressos como média $\pm$ EP. $n = 8$ ratos/grupo, exceto SHR com 14

semanas (n = 11) e SHR com 21 semanas de idade (n = 10). ^{##}P < 0,01 e ^{###}P < 0,001 vs. SHR com 6 semanas de vida.

Figura 14 – O padrão da excreção urinária de proteínas em SHR com 14 e 21 semanas de idade assemelha-se ao detectado em modelos experimentais de proteinúria tubular. Gel representativo contendo amostras de urina (volume equivalente a 40 µg de creatinina) de ratos Wistar e SHR que foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. O ultimo poço do gel foi preenchido com 5 µg de albumina sérica bovina (BSA); sem = semanas. Os géis (n = 4) foram corados com nitrato de prata, utilizando o kit ProteoSilver (Sigma).

4.4 - Avaliação temporal da expressão protéica de componentes do complexo macromolecular do aparelho endocítico em córtex renal de ratos Wistar e SHR

Uma vez que os resultados obtidos até o momento sugerem que SHR com 14 e 21 semanas de idade apresentam proteinúria de origem tubular, testamos a hipótese que a progressão da microalbuminúria observada nestes ratos associa-se à redução da expressão de uma ou mais proteínas envolvidas no maquinário endocítico do túbulo proximal renal. Para tanto, as expressões protéicas dos receptores endocíticos megalina e cubilina, do canal para cloreto CIC-5 e da subunidade B2 da v-H⁺-ATPase foram avaliadas em córtex renal de SHR e Wistar por *immunoblotting* (Figuras 15 e 16), utilizando anticorpos específicos (Tabela 4).

Como atestam as Figuras 15 e 16, as proteínas megalina, cubilina, canal CIC-5 e da subunidade B2 da v-H⁺-ATPase apresentaram um padrão semelhante de expressão em córtex renal de ratos normotensos. A expressão relativa destas proteínas, normalizada pela actina, apresentou-se significativamente maior em ratos normotensos com 14 e 21 semanas de idade quando comparado aos jovens, com 6 semanas de idade. Por outro lado, as abundâncias protéicas destes receptores endocíticos (Figura 15) e transportadores de membrana (Figura 16) diminuem progressivamente em córtex renal de SHR. A redução da expressão protéica da megalina foi aproximadamente 50% às 14 semanas de idade e 70% às 21 semanas, em comparação aos SHRs com 6 semanas (Figura 15A). Os níveis de expressão relativa da cubilina decaíram aproximadamente 40% às 14 semanas e 50% às 21 semanas de idade em comparação aos SHR com 6 semanas de vida (Figura 15B). Do mesmo modo, os níveis de expressão relativa do CIC-5 foram

aproximadamente 60% menor às 14 semanas de idade e 80% menor às 21 semanas em comparação aos SHR com 6 semanas (Figure 16A). Apesar de haver uma diminuição progressiva na expressão protéica da subunidade B2 da v-H⁺-ATPase em córtex renal, diferentemente das proteínas citadas anteriormente, não se observou diferença estatística ao comparar-se SHR com 14 semanas vs. SHR com 6 semanas de idade ($29 \pm 3\%$, $P < 0.05$). No entanto, uma diminuição significativa foi atingida em SHR com 21 semanas de idade vs. SHR com 6 semanas de vida ($47 \pm 7\%$, $P > 0.001$) (Figura 16B).

Figura 15 – Avaliação temporal da expressão protéica da megalina e da cubilina, em córtex renal de ratos Wistar e SHR. (A) Megalina. (B) Cubilina. *Painel superior:* Amostras equivalentes (5 µg) de proteínas de membranas isoladas de córtex renal de ratos Wistar e SHR com 6, 14 e 21 semanas de idade foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por “immunoblotting”. *Painel inferior:* Representação gráfica do nível de expressão relativa da proteína de interesse normalizado pela actina. Valores expressos como média ± EP. n = 8 ratos/grupo. *P < 0,05 e ***P < 0,001 vs. Wistar com 6 semanas de idade. ##P < 0,01 e ###P < 0,00 vs. SHR com 6 semanas de idade.

Figura 16 – Avaliação temporal da expressão protéica do canal para cloreto CIC-5 e da subunidade B2 da H^+ -ATPase vacuolar em córtex renal de ratos Wistar e SHR. (A) Canal para cloreto CIC-5. (B) Subunidade B2 da v- H^+ -ATPase. Painel superior: Amostras equivalentes (50 μ g para CIC-5; 30 μ g para subunidade B2 da v-ATPase B2 e 5 μ g para actina) de proteínas de membranas isoladas de córtex renal de ratos Wistar e SHR com 6, 14 e 21 semanas de idade foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por “immunoblotting”. *Painel inferior:* Representação gráfica do nível de expressão relativa da proteína de interesse normalizado pela actina. Valores expressos como média $\pm$ EP. $n = 8$ ratos/grupo. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs. com 6 semanas de idade. ### $P < 0,01$ e #### $P < 0,001$ SHR com 6 semanas de idade.

4.5 - Avaliação temporal da expressão gênica de componentes do complexo macromolecular do aparelho endocítico em córtex renal de ratos Wistar e SHR

A expressão gênica relativa dos receptores endocíticos megalina e cubilina e dos transportadores de membrana, canal CIC-5 e subunidade B2 da v-H⁺-ATPase, foi avaliada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time RT PCR) em córtex renal de ratos SHR e Wistar (Figura 17), utilizando oligonucleotídeos específicos para cada um destes genes (Tabela 5). A expressão destes transcritos foi normalizada pelo gene que codifica para a ciclofilina. Como pode ser observado na Figura 17, em ratos Wistar, o padrão da expressão de RNAm dos quatro genes analisados foi correspondente aos níveis protéicos observados em córtex renal. Ou seja, a expressão gênica da megalina, cubilina, CIC-5 e subunidade B2 da v-H⁺-ATPase foram significativamente maior em ratos normotensos com 14 e 21 semanas de idade quando comparado aos jovens, com 6 semanas de idade. Curiosamente, em oposição ao declínio progressivo dos níveis protéicos de megalina e cubilina (Figura 15) e CIC-5 (Figura 16A) em córtex renal de SHR, a expressão dos respectivos RNA mensageiros apresentou-se significativamente maior às 14 e 21 semanas de idade quando comparados aos SHR de 6 semanas (Figura 17A-C). Por outro lado, a expressão do RNAm-B2-v-H⁺-ATPase (Figura 17D) seguiu um padrão similar à variação na expressão protéica desta ATPase em córtex renal de SHR (Figure 16B), isto é, não foram observadas diferenças significativas ao comparar-se a expressão de RNAm-B2-v-ATPase em córtex renal de SHR com 14 semanas vs. SHR com 6 semanas de idade. No entanto, uma diminuição significativa na expressão de RNAm-B2-v-ATPase cortical

renal foi atingida em SHR com 21 semanas vs. SHR com 6 semanas de vida (Figura 17 D).

Figura 17 - Avaliação temporal da expressão gênica da megalina, cubilina, CIC-5 e da subunidade B2 da v-H⁺-ATPase em córtex renal de ratos SHR e Wistar. Os níveis de RNA mensageiro de componentes do aparelho endocítico foram determinados por real-time PCR. A ciclofilina foi utilizada como controle interno. Representação gráfica da expressão gênica relativa de **(A)** Megalina, **(B)** Cubilina, **(C)** Canal para cloreto CIC-5 e **(D)** sub-unidade B2 da v-H⁺-ATPase em córtex renal de ratos Wistar e SHR. Valores expressos como média $\pm$ SE. n = 6 ratos/grupo. *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. Wistar com 6 semanas de idade. #P < 0,05; ###P < 0,01 e ####P < 0,001 vs. SHR com 6 semanas de idade.

4.6 - Avaliação temporal da expressão das moléculas nefrina e podocina em córtex renal de ratos SHR e Wistar

O excesso de proteína na urina tem sido atribuído, em grande parte dos estudos, a alterações na barreira de ultrafiltração glomerular (11). Tendo em vista a importância da nefrina e podocina para a manutenção da seletividade e integridade da barreira de filtração glomerular (17-20), avaliou-se também a expressão protéica e gênica destas duas macromoléculas em córtex renal de ratos Wistar e SHR.

Os mesmos padrões de expressão protéica (Figura 18) e gênica (Figura 19) da nefrina e da podocina foram observados em ambas as linhagens de ratos. Conforme atesta a Figura 18A, a expressão protéica relativa da nefrina, normalizada pela actina, foi significativamente maior em ratos Wistar e SHR com 14 e 21 semanas de idade comparados aos ratos de mesma linhagem com 6 semanas de idade. Como mostra a Figura 18B, não houve variação significativa da expressão protéica da podocina com a idade nem em ratos normotensos nem em hipertensos.

Os níveis de expressão gênica tanto da nefrina como da podocina, normalizados pela ciclofilina (Figura 19), foram significativamente maiores em ratos Wistar e SHR com 14 e 21 semanas de idade quando comparados aos jovens, com 6 semanas de idade. Estes dados corroboram com os valores de RFG descritos acima (Tabela 6), e, em conjunto sugerem que a barreira de ultrafiltração glomerular dos ratos hipertensos encontra-se intacta e que, possivelmente, a proteinúria observada nos SHR, durante o período avaliado, não é de origem glomerular.

Figura 18 - Avaliação temporal da expressão protéica da nefrina e podocina em córtex renal de ratos Wistar e SHR. Amostras equivalentes (30 μ g para nefrina e podocina e 5 μ g para actina) de membranas isoladas de córtex renal de ratos Wistar e SHR com 6, 14 e 21 semanas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas para membrana PVDF e analisadas por “immunoblotting”. *Painel inferior.* Representação gráfica do nível de expressão relativa da proteína de interesse normalizada pela actina. Valores expressos como média $\pm$ EP. n = 8 ratos/grupo. *P < 0,05 e ***P < 0,01 vs. Wistar com 6 semanas de idade. ###P < 0,001 vs. SHR com 6 semanas de idade.

5. DISCUSSÃO

Tendo em vista os riscos atrelados ao aparecimento de proteinúria em pacientes hipertensos, o importante papel da reabsorção tubular proximal de proteínas e o fato de haver poucos estudos que tenham investigado o possível papel da proteinúria de origem tubular em hipertensão, o presente estudo buscou investigar as bases moleculares da microalbuminúria associada à hipertensão arterial essencial, focando na reabsorção tubular de albumina. Para tal, avaliamos se há uma relação entre a evolução da hipertensão com o padrão de excreção urinária de proteínas em ratos espontaneamente hipertensos e, em seguida, testamos a hipótese que a expressão de proteínas implicadas na endocitose mediada por receptor (receptores endocíticos megalina e cubilina, canal para cloreto CIC-5 e a H^+ -ATPase vacuolar) em túbulo proximal de ratos espontaneamente hipertensos poderia sofrer redução com o evoluir da hipertensão arterial.

Muitos trabalhos atribuem o desenvolvimento de microalbuminúria na hipertensão essencial à disfunção endotelial glomerular, hipertensão intraglomerular e ao desajuste hemodinâmico, bem como à lesão dos podócitos (9, 14, 33, 40). Entretanto, evidências obtidas no presente estudo indicam que alterações na função tubular pode também ser um mecanismo importante no desenvolvimento da microalbuminúria associada à hipertensão essencial. Os seguintes resultados suportam esta hipótese: [1] As análises de amostras de urina por SDS-PAGE mostraram que os SHR microalbuminúricos excretam proteínas com massa molecular igual ou inferior à da albumina (70 kDa), assemelhando-se

ao perfil de proteínas excretadas por modelos experimentais de proteinúria tubular tais como camundongos nocaute para megalina (42), para o CIC-5 (73) e para o NHE3 (61); [2] A progressão da microalbuminúria em SHR durante o período analisado encontra-se associada com uma menor expressão dos principais componentes da maquinaria endocítica do túbulo proximal renal; [3] Apesar do aumento progressivo da excreção urinária de proteínas, o RFG permanece inalterado entre 14 e 21 semanas de idade em SHR, reduzindo assim a possibilidade de hiperfiltração glomerular de albumina como causa do aparecimento da microalbuminúria. [4] Finalmente, durante o período estudado, não foram observadas reduções na abundância das proteínas nefrina e podocina, componentes importantes para o funcionamento da barreira de filtração glomerular.

A absorção de albumina presente no ultrafiltrado glomerular ocorre no túbulo proximal renal por meio de um mecanismo denominado endocitose mediada pelo receptor que requer a formação do complexo de receptores megalina/cubilina e a participação de várias proteínas de transporte (12, 33-35). Nossos resultados mostram que a expressão protéica dos receptores endocíticos megalina e cubilina, bem como do canal para cloreto CIC-5, diminui progressivamente em SHR durante o período de 6 a 21 semanas de idade, sugerindo fortemente que o mecanismo de reabsorção de proteínas em túbulo proximal possa estar comprometido nesta fase da hipertensão. Este é o primeiro trabalho, segundo nosso conhecimento, que mostra que a microalbuminúria em SHR encontra-se associada com uma menor expressão renal de megalina, cubilina e também da subunidade B2 da $v\text{-H}^+$ -ATPase. Por sua vez, a redução da expressão renal do canal para cloreto CIC-5 em SHR foi previamente demonstrada por Tanaka e Nakaki (98). Estes autores

verificaram que a expressão relativa do CIC-5 em córtex renal de SHR é 60% menor do que em ratos Wistar Kyoto (WKY) com 11 semanas de idade e 70% mais baixos quando a comparação é feita entre ratos hipertensos e normotensos com 14 semanas de idade.

Uma grande quantidade de estudos *in vitro* (35, 99, 100), bem como observações *in vivo* (61), demonstraram que o NHE3 é uma das proteínas de transporte necessárias para o mecanismo de reabsorção de albumina em túbulo proximal renal. A regulação do NHE3 em modelos genéticos de hipertensão essencial tem sido extensivamente estudada (101), no entanto, ainda não foi determinado se há alterações na acidificação mediada pelo NHE3 no compartimento endossomal precoce de SHR e se esta possível alteração estaria relacionada à maior excreção de albumina nesta linhagem de ratos hipertensos. Estudos de nosso grupo demonstraram previamente que atividade de transporte do NHE3 encontra-se reduzida na superfície da membrana apical do túbulo renal de SHR após o desenvolvimento de hipertensão (102). A inibição da secreção de H^+ mediada pelo NHE3 em SHR é decorrente da redistribuição do transportador do corpo para a base das microvilosidades, sem que ocorram alterações significativas na abundância total do NHE3 (101, 102). Além disso, as alterações na atividade do NHE3 foram acompanhadas por alterações nos níveis de fosforilação do transportador na serina 552, sítio consenso para a proteína cinase A (PKA) (102). Vale mencionar que a inibição do NHE3 pela via do AMPc/PKA reduz a reabsorção de albumina por endocitose mediada por receptor em células de túbulo proximal (99). Estudos futuros são necessários a fim de esclarecer se o aumento da fosforilação do NHE3, especialmente nos sítios consenso para PKA, pode levar a

uma alcalinização do compartimento endossomal e, conseqüentemente, diminuir a captação de albumina por células do túbulo proximal.

Um resultado intrigante deste estudo é a dissociação entre os níveis de expressão protéica e gênica de alguns dos constituintes da maquinaria endocítica do túbulo proximal renal de ratos hipertensos. Como pode ser observado nas Figuras 15-17, enquanto as expressões protéicas da megalina, cubilina e do CIC-5 diminuem progressivamente com o aumento da pressão arterial, os níveis de expressão dos RNA mensageiros correspondentes aumentam após o desenvolvimento da hipertensão. Conclui-se, portanto, que a diminuição progressiva da expressão destas proteínas em córtex renal de SHR não é decorrente de regulação transcricional. Esta dissociação pode ser atribuída a eventos pós-transcricionais, como por exemplo, pela modulação da tradução por proteínas que se ligam ao RNA (50), ou ainda por aumento da degradação destas proteínas.

A nefropatia diabética constitui a principal causa de insuficiência renal crônica. A microalbuminúria é o sinal clínico mais precocemente detectável de nefropatia diabética. Tem crescido o número de evidências que sugerem que a disfunção tubular possa desempenhar um papel importante no desenvolvimento da microalbuminúria nas fases iniciais da nefropatia diabética (44, 103). Tojo e colaboradores (44) observaram que a reabsorção tubular de albumina encontra-se diminuída em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ). Esta redução na captação de albumina é independente de alterações na permeabilidade glomerular e está associada a uma redução na expressão da megalina em túbulos proximais renais (44). Tal como descrito para a nefropatia diabética, os resultados

do presente estudo sugerem que os eventos que levam à microalbuminúria na hipertensão são, pelo menos em parte, de origem tubular. Tipicamente, na nefropatia diabética bem como na hipertensão arterial, a microalbuminúria pode evoluir para proteinúria. Neste contexto, verificamos em nosso laboratório que SHR com 42 semanas de idade excretam uma concentração urinária de proteínas superior a 500 mg/dia. Além disso, ao analisarmos o padrão de proteínas urinárias excretadas por estes animais em gel corado com nitrato de prata, visualizamos não somente proteínas com massa molecular inferior à da albumina, mas também, com massa molecular superior a 70 kDa (dados não apresentados), sugerindo que ocorra, disfunção da barreira de filtração glomerular numa fase mais tardia da hipertensão em SHR.

Uma questão importante, cuja resposta não pode ser deduzida com base nos resultados apresentados neste trabalho é: Como o aumento da pressão arterial em SHR pode levar à redução da expressão protéica de componentes do aparelho endocítico em túbulo proximal renal? O modelo ilustrado na Figura 20 tem como intuito responder, hipoteticamente, a esta questão, fundamentando-se em evidências disponíveis na literatura e em resultados de experimentos em andamento que estão sendo realizados em nosso laboratório.

Estudos realizados por Russo e colaboradores demonstraram que SHRs apresentam microalbuminúria associada com uma menor atividade lisossomal e que este fenômeno pode ser decorrente de uma maior expressão renal do fator transformador de crescimento β (TGF- β) (104). Uma atuação direta do TGF- β no aparelho endocítico do túbulo proximal renal foi posteriormente demonstrada por Gekle e colaboradores (105). Por meio de estudos realizados em células em cultura

de túbulo proximal renal, linhagem OKP, estes pesquisadores mostraram que o TGF- β diminui a endocitose de albumina de modo dose-dependente e tempo-dependente (105). Esta diminuição na captação de albumina é acompanhada por uma redução na expressão dos receptores endocíticos megalina e cubilina, e também por uma menor degradação dos ligantes, em decorrência da diminuição da atividade lisossomal (105). Tais estudos explicam a relação do aumento da pressão arterial com a redução da expressão protéica de componentes do aparelho endocítico em túbulo proximal renal por meio da atuação do TGF- β .

Na prática clínica, nota-se que os inibidores da enzima conversora de angiotensina bem como antagonistas do receptor AT-1 de angiotensina II exibem maior capacidade de reduzir a microalbuminúria do que outras drogas anti-hipertensivas (106-108). O mecanismo proposto para este efeito protetor renal é o bloqueio da produção e/ou ação da angiotensina II que age preferencialmente na arteríola eferente diminuindo a pressão glomerular. Entretanto, no momento, nosso grupo de pesquisa está investigando se o efeito anti-proteinúrico dos antagonistas do sistema renina-angiotensina-aldosterona pode também ser mediado, ao menos em parte, pela modulação da expressão dos componentes da via endocítica que promove a reabsorção de proteínas em túbulo proximal renal. Esta hipótese é respaldada por um estudo recente realizado em células de túbulo proximal em cultura (linhagem OKP) que demonstrou que a ativação do receptor AT1 por angiotensina II inibe a expressão (gênica e protéica) da megalina (109). Adicionalmente, Russo e colaboradores (110) mostraram que o inibidor da enzima conversora de angiotensina ramipril reduz a excreção de albumina urinária de ratos

hipertensos e diabéticos, restaura a função lisossomal em túbulo proximal renal bem como diminui a ativação do TGF- β .

Figura 20 – Modelo esquemático da relação entre a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a redução da expressão de componentes do aparato endocítico em túbulos proximais renais. A HAS pode estar associada a um aumento da expressão do TGF- β em túbulo proximal e/ou à ativação do sistema renina angiotensina (SRA) intra-renal. Além disso, a angiotensina II estimula a ação do TGF- β (111), e, o próprio TGF- β pode ativar o SRA em células de túbulo proximal (112). Demonstrou-se que tanto a angiotensina II como o TGF- β reduzem a expressão da megalina (105, 109), sendo que o TGF- β diminui também a expressão da cubilina (105). Postula-se, portanto, que o TGF- β e/ou a angiotensina II medeiam a interação entre a HAS e a redução da expressão protéica dos componentes do aparelho endocítico. A menor expressão destes receptores endocíticos e, possivelmente dos transportadores de membrana avaliados neste estudo, contribui para o desenvolvimento de microalbuminúria de origem tubular.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstra que a excreção urinária de albumina, entre outras proteínas de baixa massa molecular, aumenta progressivamente em SHR entre 6 e 21 semanas de idade, e ainda, que este aumento na excreção de proteínas urinárias está associado com uma menor expressão de componentes essenciais do aparelho endocítico em TP renal. Com base nos resultados apresentados, é tentador especular que a disfunção da via endocítica apical em túbulo proximal renal possa ser o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento da microalbuminúria na hipertensão essencial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. Arq Bras Cardiol. Jul;95(1 Suppl):1-51.
2. Beevers G, Lip GYH, O'Brien E. ABC of Hypertension. 5 ed.: Willey; 2010.
3. Guyton AC. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. Science. 1991 Jun 28;252(5014):1813-6.
4. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jpn Circ J. 1963 Mar;27:282-93.
5. Mogensen CE, Viberti GC, Peheim E, Kutter D, Hasslacher C, Hofmann W, et al. Multicenter evaluation of the Micral-Test II test strip, an immunologic rapid test for the detection of microalbuminuria. Diabetes Care. 1997 Nov;20(11):1642-6.
6. Donnelly R, Rea R. Microalbuminuria: how informative and reliable are individual measurements? J Hypertens. 2003 Jul;21(7):1229-33.
7. Keane WF, Eknoyan G. Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. Am J Kidney Dis. 1999 May;33(5):1004-10.
8. Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. Kidney Int. 1997 Jan;51(1):2-15.
9. Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. Kidney Int. 1987 Feb;31(2):673-89.
10. Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet. 1982 Jun 26;1(8287):1430-2.
11. D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. Kidney Int. 2003 Mar;63(3):809-25.
12. Gekle M. Renal tubule albumin transport. Annu Rev Physiol. 2005;67:573-94.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver)

13. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev.* 1997 Jul;77(3):759-803.
14. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986 Apr 4;232(4746):34-47.
15. Tojo A, Endou H. Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. *Am J Physiol.* 1992 Oct;263(4 Pt 2):F601-6.
16. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology.* 2nd edition ed.: Saunders; 2011.
17. Aaltonen P, Holthofer H. The nephrin-based slit diaphragm: new insight into the signalling platform identifies targets for therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Dec;22(12):3408-10.
18. Nielsen R, Christensen EI. Proteinuria and events beyond the slit. *Pediatr Nephrol.* 2010 May;25(5):813-22.
19. Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med.* 2007 Sep;13(9):396-403.
20. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006 Jun;69(12):2131-47.
21. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Dec;13(12):3005-15.
22. Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol.* 1951 Oct;167(1):13-46.
23. Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Bennett CM, Glassock RJ, Brenner BM, et al. Permselectivity of the glomerular capillary wall. Studies of experimental glomerulonephritis in the rat using neutral dextran. *J Clin Invest.* 1976 May;57(5):1272-86.
24. Chang RL, Ueki IF, Troy JL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall to macromolecules. II. Experimental studies in rats using neutral dextran. *Biophys J.* 1975 Sep;15(9):887-906.
25. Bennett CM, Glassock RJ, Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM, et al. Permselectivity of the glomerular capillary wall. Studies of experimental glomerulonephritis in the rat using dextran sulfate. *J Clin Invest.* 1976 May;57(5):1287-94.

26. Bohrer MP, Baylis C, Humes HD, Glassock RJ, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations. *J Clin Invest*. 1978 Jan;61(1):72-8.
27. Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int*. 1975 Oct;8(4):212-8.
28. Miner JH. Glomerular filtration: the charge debate charges ahead. *Kidney Int*. 2008 Aug;74(3):259-61.
29. Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, et al. Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney Int*. 2008 Aug;74(3):289-99.
30. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*. 2006 Feb;69(3):440-9.
31. Pollock CA, Poronnik P. Albumin transport and processing by the proximal tubule: physiology and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2007 Jul;16(4):359-64.
32. Czekay RP, Orlando RA, Woodward L, Lundstrom M, Farquhar MG. Endocytic trafficking of megalin/RAP complexes: dissociation of the complexes in late endosomes. *Mol Biol Cell*. 1997 Mar;8(3):517-32.
33. Marshansky V, Vinay P. Proton gradient formation in early endosomes from proximal tubules. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Oct 23;1284(2):171-80.
34. Hryciw DH, Ekberg J, Pollock CA, Poronnik P. ClC-5: a chloride channel with multiple roles in renal tubular albumin uptake. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(7):1036-42.
35. Gekle M, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Gassner B, Silbernagl S. Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J Physiol*. 1999 Nov 1;520 Pt 3:709-21.
36. Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Silbernagl S. Endosomal alkalization reduces J_{max} and K_m of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 2):F899-906.
37. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:663-700.

38. Storrie B, Desjardins M. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays*. 1996 Nov;18(11):895-903.
39. Kerjaschki D, Farquhar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Sep;79(18):5557-61.
40. Christensen EI, Gliemann J, Moestrup SK. Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J Histochem Cytochem*. 1992 Oct;40(10):1481-90.
41. Christensen EI, Nielsen S, Moestrup SK, Borre C, Maunsbach AB, de Heer E, et al. Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Eur J Cell Biol*. 1995 Apr;66(4):349-64.
42. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, et al. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1361-70.
43. Piwon N, Gunther W, Schwake M, Bosl MR, Jentsch TJ. CIC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):369-73.
44. Tojo A, Onozato ML, Ha H, Kurihara H, Sakai T, Goto A, et al. Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem Cell Biol*. 2001 Sep;116(3):269-76.
45. Obermuller N, Kranzlin B, Blum WF, Gretz N, Witzgall R. An endocytosis defect as a possible cause of proteinuria in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Feb;280(2):F244-53.
46. Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, et al. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8460-4.
47. Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Silbernagl S. Functional characterization of albumin binding to the apical membrane of OK cells. *Am J Physiol*. 1996 Aug;271(2 Pt 2):F286-91.
48. Vestbo E, Damsgaard EG, Mogensen CE. The relationship between microalbuminuria in first generation diabetic and non-diabetic subjects and microalbuminuria and hypertension in the second generation (a population based study). *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12 Suppl 2:32-6.

49. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:407-28.
50. Kozyraki R, Kristiansen M, Silahatoglu A, Hansen C, Jacobsen C, Tommerup N, et al. The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3593-600.
51. Kalantry S, Manning S, Haub O, Tomihara-Newberger C, Lee HG, Fangman J, et al. The amnionless gene, essential for mouse gastrulation, encodes a visceral-endoderm-specific protein with an extracellular cysteine-rich domain. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):412-6.
52. Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Orskov H, et al. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest.* 2000 May;105(10):1353-61.
53. Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D, et al. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5235-42.
54. Sahali D, Mulliez N, Chatelet F, Dupuis R, Ronco P, Verroust P. Characterization of a 280-kD protein restricted to the coated pits of the renal brush border and the epithelial cells of the yolk sac. Teratogenic effect of the specific monoclonal antibodies. *J Exp Med.* 1988 Jan 1;167(1):213-8.
55. Seetharam B, Christensen EI, Moestrup SK, Hammond TG, Verroust PJ. Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J Clin Invest.* 1997 May 15;99(10):2317-22.
56. Sahali D, Mulliez N, Chatelet F, Laurent-Winter C, Citadelle D, Roux C, et al. Coexpression in humans by kidney and fetal envelopes of a 280 kDa-coated pit-restricted protein. Similarity with the murine target of teratogenic antibodies. *Am J Pathol.* 1992 Jan;140(1):33-44.
57. Donowitz M, Li X. Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):825-72.
58. Levine SA, Nath SK, Yun CH, Yip JW, Montrose M, Donowitz M, et al. Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. *J Biol Chem.* 1995 Jun 9;270(23):13716-25.

59. Tse M, Levine S, Yun C, Brant S, Counillon LT, Pouyssegur J, et al. Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family. *J Membr Biol*. 1993 Aug;135(2):93-108.
60. Winkel GK, Sardet C, Pouyssegur J, Ives HE. Role of cytoplasmic domain of the Na⁺/H⁺ exchanger in hormonal activation. *J Biol Chem*. 1993 Feb 15;268(5):3396-400.
61. Gekle M, Volker K, Mildenerger S, Freudinger R, Shull GE, Wiemann M. NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger supports proximal tubular protein reabsorption in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Sep;287(3):F469-73.
62. Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S. Inhibition of Na⁺-H⁺ exchanger-3 interferes with apical receptor-mediated endocytosis via vesicle fusion. *J Physiol*. 2001 Mar 15;531(Pt 3):619-29.
63. Zachos NC, Tse M, Donowitz M. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:411-43.
64. Gluck SL, Underhill DM, Iyori M, Holliday LS, Kostrominova TY, Lee BS. Physiology and biochemistry of the kidney vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Physiol*. 1996;58:427-45.
65. Malnic G, Geibel JP. Cell pH and H(+) secretion by S3 segment of mammalian kidney: role of H(+)-ATPase and Cl(-). *J Membr Biol*. 2000 Nov 15;178(2):115-25.
66. Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1263-314.
67. Breton S, Brown D. New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jan;292(1):F1-10.
68. Karet FE. Physiological and metabolic implications of V-ATPase isoforms in the kidney. *J Bioenerg Biomembr*. 2005 Dec;37(6):425-9.
69. Carraro-Lacroix LR, Lessa LM, Fernandez R, Malnic G. Physiological implications of the regulation of vacuolar H⁺-ATPase by chloride ions. *Braz J Med Biol Res*. 2009 Feb;42(2):155-63.
70. Plans V, Rickheit G, Jentsch TJ. Physiological roles of CLC Cl(-)/H (+) exchangers in renal proximal tubules. *Pflugers Arch*. 2009 May;458(1):23-37.
71. Picollo A, Pusch M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature*. 2005 Jul 21;436(7049):420-3.

72. Gunther W, Luchow A, Cluzeaud F, Vandewalle A, Jentsch TJ. CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8075-80.
73. Gunther W, Piwon N, Jentsch TJ. The CIC-5 chloride channel knock-out mouse - an animal model for Dent's disease. *Pflugers Arch*. 2003 Jan;445(4):456-62.
74. Norden AG, Lapsley M, Igarashi T, Kelleher CL, Lee PJ, Matsuyama T, et al. Urinary megalin deficiency implicates abnormal tubular endocytic function in Fanconi syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jan;13(1):125-33.
75. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1317-72.
76. Moestrup SK, Birn H, Fischer PB, Petersen CM, Verroust PJ, Sim RB, et al. Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8612-7.
77. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell*. 1999 Feb 19;96(4):507-15.
78. Nykjaer A, Fyfe JC, Kozyraki R, Leheste JR, Jacobsen C, Nielsen MS, et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13895-900.
79. Christensen EI, Moskaug JO, Vorum H, Jacobsen C, Gundersen TE, Nykjaer A, et al. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Apr;10(4):685-95.
80. Stefansson S, Chappell DA, Argraves KM, Strickland DK, Argraves WS. Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19417-21.
81. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, et al. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):656-61.
82. Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen

activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem*. 1992 Dec 25;267(36):26172-80.

83. Hammad SM, Stefansson S, Twal WO, Drake CJ, Fleming P, Remaley A, et al. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31;96(18):10158-63.

84. Morales CR, Igdoura SA, Wosu UA, Boman J, Argraves WS. Low density lipoprotein receptor-related protein-2 expression in efferent duct and epididymal epithelia: evidence in rats for its in vivo role in endocytosis of apolipoprotein J/clusterin. *Biol Reprod*. 1996 Sep;55(3):676-83.

85. Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJ, et al. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Oct;9(10):1759-66.

86. Zhai XY, Nielsen R, Birn H, Drumm K, Mildenerberger S, Freudinger R, et al. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int*. 2000 Oct;58(4):1523-33.

87. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol*. 1996 Oct;271(4 Pt 2):F900-7.

88. Birn H, Verroust PJ, Nexø E, Hager H, Jacobsen C, Christensen EI, et al. Characterization of an epithelial approximately 460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B12 and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem*. 1997 Oct 17;272(42):26497-504.

89. Kanalas JJ, Makker SP. Analysis of a 45-kDa protein that binds to the Heymann nephritis autoantigen GP330. *J Biol Chem*. 1993 Apr 15;268(11):8188-92.

90. Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ, Jacobsen C, Dautry-Varsat A, Gburek J, et al. Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12491-6.

91. Zheng G, Marino M, Zhao J, McCluskey RT. Megalin (gp330): a putative endocytic receptor for thyroglobulin (Tg). *Endocrinology*. 1998 Mar;139(3):1462-5.

92. Moestrup SK, Cui S, Vorum H, Bregengard C, Bjorn SE, Norris K, et al. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest*. 1995 Sep;96(3):1404-13.

93. Moestrup SK, Nielsen S, Andreasen P, Jorgensen KE, Nykjaer A, Roigaard H, et al. Epithelial glycoprotein-330 mediates endocytosis of plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor type-1 complexes. *J Biol Chem*. 1993 Aug 5;268(22):16564-70.
94. Birn H, Vorum H, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Feb;11(2):191-202.
95. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75.
96. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
97. Christensen EI, Devuyst O, Dom G, Nielsen R, Van der Smissen P, Verroust P, et al. Loss of chloride channel CIC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8472-7.
98. Tanaka K, Nakaki T. Reduced renal CIC-5 Cl⁻ channel expression in spontaneously hypertensive rats with microalbuminuria. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 6;501(1-3):185-9.
99. Gekle M, Serrano OK, Drumm K, Mildenerberger S, Freudinger R, Gassner B, et al. NHE3 serves as a molecular tool for cAMP-mediated regulation of receptor-mediated endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Sep;283(3):F549-58.
100. Gekle M, Mildenerberger S, Freudinger R, Schwerdt G, Silbernagl S. Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol*. 1997 May;272(5 Pt 2):F668-77.
101. Girardi AC, Di Sole F. Deciphering the mechanisms of the Na⁺/H⁺ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012.
102. Crajoinas RO, Lessa LM, Carraro-Lacroix LR, Davel AP, Pacheco BP, Rossoni LV, et al. Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Oct;299(4):F872-81.
103. Russo LM, Osicka TM, Brammar GC, Candido R, Jerums G, Comper WD. Renal processing of albumin in diabetes and hypertension in rats: possible role of TGF-beta1. *Am J Nephrol*. 2003 Mar-Apr;23(2):61-70.

104. Russo LM, Osicka TM, Bonnet F, Jerums G, Comper WD. Albuminuria in hypertension is linked to altered lysosomal activity and TGF-beta1 expression. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2):281-6.
105. Gekle M, Knaus P, Nielsen R, Mildenerger S, Freudinger R, Wohlfarth V, et al. Transforming growth factor-beta1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *J Physiol*. 2003 Oct 15;552(Pt 2):471-81.
106. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Microalbuminuria in essential hypertension: significance, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis*. 1999 Dec;34(6):973-95.
107. Ruilope LM, Alcazar JM, Hernandez E, Praga M, Lahera V, Rodicio JL. Long-term influences of antihypertensive therapy on microalbuminuria in essential hypertension. *Kidney Int Suppl*. 1994 Feb;45:S171-3.
108. Nielsen S, Dollerup J, Nielsen B, Jensen HA, Mogensen CE. Losartan reduces albuminuria in patients with essential hypertension. An enalapril controlled 3 months study. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12 Suppl 2:19-23.
109. Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, et al. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):871-8.
110. Russo LM, Brammar GC, Jerums G, Comper WD, Osicka TM. The effect of ramipril on albumin excretion in diabetes and hypertension: the role of increased lysosomal activity and decreased transforming growth factor-beta expression. *J Hypertens*. 2003 Feb;21(2):419-28.
111. Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. *J Mol Med (Berl)*. 1999 Jul;77(7):556-64.
112. Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL, Hsieh TJ, Guo DF, Hebert MJ, et al. Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2006 Jun;69(11):1977-85.