

BRUNA BEZERRA LINS

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

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

São Paulo

2020

BRUNA BEZERRA LINS

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

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Oliveira de Souza

Versão corrigida

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lins, Bruna Bezerra

O papel da angiotensina II na doença renal crônica: Contribuição das enzimas NADPH oxidases e do estresse de retículo endoplasmático / Bruna Bezerra Lins; orientadora Maria Oliveira de Souza. -- São Paulo, 2020.

87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Angiotensina II. 2. Receptor AT1. 3. Estresse Oxidativo. 4. Estresse de Retículo Endoplasmático. 5. Doença Renal Crônica. I. Oliveira de Souza, Maria, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Bezerra Lins.

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

Orientador(a): Prof. Dr. Maria Oliveira de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado (a)

() Reprovado (a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeito crônico da angiotensina II na injúria de podócitos: Participação das espécies reativas de oxigênio na organização da nefrina no diafragma podocitário*", registrado sob o protocolo nº **37/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **30/05/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Oliveira de Souza**
- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*
- Membros da Equipe: *Bruna Bezerra Lins (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Chronic angiotensin II effect on the podocytes injury: Participation of reactive oxygen species in the nephrin organization in podocyte diaphragm*", protocol nº **37/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **5/30/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Oliveira de Souza**
- Team members: *Bruna Bezerra Lins (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Ratus Novergicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Macho/male</i>	<i>200 g</i>	<i>60</i>

São Paulo, 03 de junho de 2016.


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

RELATÓRIO FINAL CEUA

Protocolo nº: 37/2016

Data de aprovação CEUA: 30/05/2016

Título do Projeto: Efeito crônico da angiotensina II na injúria de podócitos: Participação das espécies reativas de oxigênio na organização da nefrina no diafragma podocitário.

Pesquisador Responsável (orientador): Maria Oliveira de Souza

Departamento: Fisiologia e Biofísica

1. O projeto foi finalizado?

(X) SIM () NÃO

Em caso negativo, o manuseio de animais já foi finalizado? Esclareça em que etapa se encontra o projeto e se solicitações adicionais para uso de animais foram enviadas à CEUA durante a vigência da licença.

2. Informe o número de animais solicitados e aqueles efetivamente utilizados:

Espécie	Linhagem	Solicitação Inicial	Solicitação Adicional	Efetivamente Utilizados
Ratus Novergicus	Wistar	60	0	40

Justifique eventuais diferenças entre o número proposto inicialmente e o número de animais utilizados.

O número de animais utilizados foi suficiente para realizar o estudo.

3. Todas as amostras obtidas foram utilizadas?

(X) SIM () NÃO

Em caso negativo, informe quais amostras permanecem armazenadas:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

4. Ocorreram problemas relativos ao uso de animais durante a execução do projeto?
() SIM (X) NÃO

Em caso afirmativo, descreva o acontecimento e informe quais as providências tomadas para evitar que haja reincidência do problema:

5. Algum aluno declarou escusa de consciência à experimentação animal, como previsto no artigo 39 da Lei Estadual nº 11.977/2005, durante a vigência do projeto?
() SIM (X) NÃO

Em caso afirmativo, anexar documentação comprobatória do pedido e a atividade alternativa.

6. Descreva as conclusões obtidas com o projeto, salientando a contribuição do mesmo para a saúde, bem-estar humano/animal, melhoria da qualidade de vida ou melhoria do meio ambiente (máximo de 200 palavras).

Nossos resultados indicam que o tratamento com Ang II por 42 dias, via receptor AT1, foi capaz de induzir estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, inflamação e fibrose renal, além de regular o manejo de sódio tubular por aumentar a expressão dos transportadores de sódio NHE1, NHE3, NCC, NKCC2 e ENaC β . Com este estudo esperamos contribuir para a geração de informações relevantes a cerca dos eventos celulares responsáveis pela expressão dos genes associados aos efeitos da Ang II na progressão da doença renal crônica.

7. O estudo, ou parte dele, já foi publicado na forma de monografia, dissertação, tese e/ou periódico científico ou gerou alguma patente?
() SIM (X) NÃO

Se afirmativo, anexar cópia da primeira página das publicações ou número de patentes derivadas do projeto aprovado pela CEUA.

Data: São Paulo, 25 de novembro de 2019.

Assinatura do pesquisador responsável: *Marina Oliveira de Souza*

*Aos meus pais, Ana e Valdemar
e esposo Bruno, com amor e gratidão pelo
encorajamento ao longo dessa difícil
caminhada, por sempre acreditarem em mim
e nunca me deixado desistir. Obrigada por
serem os meus maiores incentivadores, vocês
dão sentido à minha vida.*

Sem vocês eu não seria nada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre guiar os meus caminhos, por ter escutado as minhas orações, me amparado e me dado muita força ao longo dessa jornada para que eu não desistisse.

Aos meus incríveis pais Ana e Valdemar, a quem eu dedico este trabalho! Obrigada por sempre acreditarem em mim e por nunca terem poupado esforços para que eu pudesse realizar os meus maiores sonhos. Obrigada por vibrarem cada conquista e estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Bruno. Não existe palavras para expressar a minha gratidão por tudo que tem feito por nós, mas quero agradecer por todo estímulo, força, motivação e principalmente pela sua enorme paciência. Obrigada por acreditar em mim, até quando eu mesma não acreditava, me impulsionando sempre a fazer o meu melhor.

Aos meus irmãos Lucas e Valkiria, obrigada por todo amor e por terem participado de tudo isso da maneira de vocês.

Às minhas tias Luciana e Juliana, primas Daiany e Dalila e vó Isabel que sempre estiverem na torcida por mim e me passaram tranquilidade nos momentos mais difíceis.

Aos meus afilhados Felipe, Eloá, Guilherme e Isabela, os maiores presentes da minha vida e que fazem a minha vida muito mais feliz, nada é mais perfeito do que o sorriso de uma criança, nos enchem de entusiasmo e alegria.

À Jessica, uma irmã que a vida me deu. Obrigada por todo incentivo, carinho e paciência. Obrigada por aguentar minhas reclamações diárias, pelos puxões de orelha e por nunca ter me deixar desistir de nada, você é incrível.

À minha orientadora, Prof. Maria Oliveira, por ter me recebido em seu laboratório e pela contribuição e dedicação ao longo desse projeto, sou inteiramente grata por sua orientação.

À técnica do laboratório Juliana, por seu apoio e dedicação, aprendi muito com você, muito obrigada.

Aos amigos de laboratório, Flávia, Guilherme, Mariana, Vanessa, Jessica e Fernando, obrigada pela parceria e amizade, pelas múltiplas risadas e brincadeiras que contribuíram para que o meu dia a dia fosse mais agradável durante essa jornada. Em especial agradeço ao Fernando que cedeu grande parte de suas amostras para que eu pudesse dar andamento nesse projeto, muito obrigada! À Flávia que além de me receber com tanto carinho, me ensinou toda a prática de experimentação com animais, obrigada pela paciência, pelas múltiplas contribuições e por ser essa pessoa tão incrível, sem dúvidas se tornou uma grande amiga que eu vou levar pra vida! E ao Guilherme pela parceria, colaborações e amizade, aprendi muito com você, obrigada.

À todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas e professores do departamento de Fisiologia e Biofísica agradeço por toda a ajuda, atenção e dedicação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado (nº processo 140141/2016-2) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro e à CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

Aos animais, por tornarem possíveis os resultados dessa tese.

E por fim, agradeço a todos aqueles que, embora não nomeados, contribuíram de alguma forma com esse trabalho e com a minha formação. À vocês a minha gratidão.

“ Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar. ”

Josué 1:9

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema renina-angiotensina sistêmico	23
Figura 2 – Isoformas da NADPH oxidase e suas subunidades regulatórias expressas nos rins	27
Figura 3 – Vias da UPR em mamíferos	30
Figura 4 – Reabsorção renal diária de sódio ao longo do néfron	34
Figura 5 – Delineamento experimental.....	39
Figura 6 – Expressão de RNAm para componentes do estresse oxidativo em tecido renal total de ratos.....	47
Figura 7 – Expressão proteica para componentes do estresse oxidativo em tecido renal total de ratos.....	48
Figura 8 – Intensidade de fluorescência para componentes do estresse oxidativo em tecido renal total de ratos	49
Figura 9 – Expressão da proteína PERK no córtex de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan	51
Figura 10 – Expressão de RNAm e proteica de eIF2 α no córtex de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.....	52
Figura 11 – Expressão de RNAm para ATF4 no tecido renal total de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.....	53
Figura 12 – Expressão de RNAm para Nrf2 e Keap1 no tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.	54
Figura 13 – Expressão de RNAm para componentes apoptóticos no tecido renal total de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.....	55
Figura 14 – Expressão de RNAm para NF κ B e IL1 β no tecido renal total de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan	56
Figura 15 – Expressão de RNAm e da proteína α SMA no tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.	57
Figura 16 – Expressão proteica de NHE1 no córtex renal de ratos.....	59
Figura 17 – Expressão proteica de NHE3 no córtex renal de ratos.	61
Figura 18 – Expressão proteica de NKCC2 no córtex renal de ratos	62
Figura 19 – Distribuição de NKCC2 no córtex renal de ratos	63
Figura 20 – Expressão proteica de NCC no córtex renal de ratos.....	64

Figura 21 – Distribuição de NCC no córtex renal de ratos	66
Figura 22 – Expressão proteica de ENaC α e β no córtex renal de ratos.....	67
Figura 23 – Esquema de vias propostas.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estágios da Doença Renal Crônica	20
Tabela 2 – Detalhes das sondas utilizadas em RT-PCR	42
Tabela 3 – Detalhes dos Anticorpos utilizados	45
Tabela 4 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal total ou córtex para componentes de estresse oxidativo	50
Tabela 5 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal total ou córtex para componentes de estresse de retículo endoplasmático	53
Tabela 6 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal total para componentes do sistema antioxidante	54
Tabela 7 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal total para componentes apoptóticos	56
Tabela 8 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal total componentes inflamatórios.....	58
Tabela 9 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal para NHE1..	60
Tabela 10 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal para NHE3.61	
Tabela 11 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal para NKCC2	64
Tabela 12 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal para NCC ..	65
Tabela 13 – Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal para ENaC α e β	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	Angiotensina II
AREs	Do inglês: Antioxidant Response Elements
AT1	Receptor de Angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor de Angiotensina II do tipo 2
ATF4	Do inglês: Activating Transcription Factor 4
ATF6	Do inglês: Activating Transcription Factor 6
ATPase	Enzima que hidrolisa ATP
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Bax	Do inglês: BCL-2 associated protein X
Bcl-2	Do inglês: B-cell lymphoma protein 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHOP	Do inglês: CCAAT- enhancer-binding protein homologous protein
COOH	Terminal carboxila
CTL	Controle
DC	Débito Cardíaco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença Renal Crônica
EFDRG	Estágio Final da Doença Renal Crônica
eIF2 α	Do inglês: Eukaryotic Translation Initiation Factor alpha
ENaC α	Canal de sódio epitelial isoforma alfa
ENaC β	Canal de sódio epitelial isoforma beta
ERE	Estresse de Retículo Endoplasmático
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EPM	Erro Padrão da Média
GAPDH	Do inglês: Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
H ⁺	Hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imunohistoquímica

IκB	Do inglês: Inhibitor of kappa B
IRE1	Do inglês: Inositol-Requiring Kinase 1 Do inglês: Kelch-like
Keap 1	ECH-associated protein 1
Los	Losartan
MEC	Matriz Extracelular
Na ⁺	Sódio
NADPH oxidase	Do inglês: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
Na ⁺ /H ⁺	Trocador de sódio/hidrogênio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba Sódio/Potássio
NCC	Co-transportador sódio e cloreto
NHE1	Trocador de sódio e hidrogênio isoforma 1
NHE3	Trocador de sódio e hidrogênio isoforma 3
NFκB	Do inglês: factor nuclear kappa B
NKCC2	Co-transportador sódio, potássio e cloreto 2
Nrf2	Do inglês: Nuclear Factor Erythroid 2
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PA	Pressão Arterial
PCR	Do inglês: Polimerase Chain Reaction
PERK	Do inglês: protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
Rac 1	Do inglês: Related C3 Botulinum Toxin Substrate
RE	Retículo Endoplasmático
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TGFβ	Do inglês: Transforming growth factor beta
UPR	Do inglês: Unfolded Protein Response
WB	Western blotting

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Doença Renal Crônica (DRC) ou Insuficiência Renal Progressiva.....	20
1.2	Pressão Sanguínea	21
1.2.1	<i>Hipertensão Arterial Sistêmica e Doença Renal Crônica</i>	22
1.3	Sistema renina-angiotensina (SRA).....	23
1.3.1	<i>Sistema renina-angiotensina intrarrenal</i>	25
1.3.2	<i>Angiotensina II e a doença renal crônica</i>	26
1.3.3	<i>Angiotensina II e a geração de espécies reativas de oxigênio no rim</i> 26	
1.3.4	<i>Espécies reativas de oxigênio e estresse de retículo</i> <i>endoplasmático.....</i>	28
1.3.5	<i>Espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante.</i>	30
1.3.6	<i>Espécies reativas de oxigênio, inflamação e fibrose.</i>	31
1.3.7	<i>Efeito da Ang II no transporte de sódio ao longo do néfron.....</i>	32
1.4	Modelo animal de hipertensão arterial induzida por Ang II.	35
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Geral	37
3.2	Específicos.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Animais experimentais	38
4.2	Obtenção dos modelos experimentais	38
4.3	Delineamento experimental.....	39
4.4	Procedimento cirúrgico	40

4.5	Relação entre o estudo anterior e o atual	40
4.6	Perfusão renal e retirada de órgãos	40
4.7	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	41
4.7.1	<i>Extração do RNA total.....</i>	<i>41</i>
4.7.2	<i>Síntese do cDNA a partir do RNAm</i>	<i>41</i>
4.7.3	<i>Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real</i>	<i>41</i>
4.8	Análise da expressão proteica por <i>Western Blotting</i>.....	43
4.8.1	<i>Preparação de membranas.....</i>	<i>43</i>
4.8.2	<i>Transferência de proteínas do gel para a membrana de PVDF.....</i>	<i>43</i>
4.9	Imunohistoquímica.....	44
4.10	Imunofluorescência.....	46
4.11	Análise estatística	46
5	RESULTADOS	47
5.1	Efeito da Ang II e/ou losartan no estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, processos inflamatórios e apoptose no tecido renal.	47
5.2	Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão dos transportadores de sódio.....	58
6	DISCUSSÃO	68
6.1	Efeito da Ang II e/ou losartan no estresse oxidativo, estresse de RE, processos inflamatórios, fibróticos e apoptóticos.	68
6.2	Efeito da Ang II e/ou losartan nos transportadores de sódio e hidrogênio.	71
7	CONCLUSÕES	76
8	REFERÊNCIAS*	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica (DRC) ou Insuficiência Renal Progressiva

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

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

Tabela 1: Estágios da Doença Renal Crônica

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

RFG = Ritmo de Filtração Glomerular.

Em linhas gerais, os mecanismos que mais contribuem para o início e a progressão da DRC incluem: 1) *susceptibilidade* - associada à idade, histórico

familiar, redução da massa renal e baixo peso ao nascer; 2) *iniciação* - decorrente de obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças auto-imunes, infecções sistêmicas e drogas; 3) *progressão* - associada à proteinúria decorrente de alterações na barreira de ultrafiltração e injúria de podócitos (26), hipertensão arterial, obesidade e controle inadequado da glicemia em pacientes diabéticos (128). A presença de anemia também pode sinalizar DRC, uma vez que nessa condição os rins apresentam deficiência na síntese de eritropoietina - hormônio que estimula a produção de hemácias na medula óssea.

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

1.2 Pressão Sanguínea

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

O valor da pressão arterial média (PAM) é obtido pela relação $PAM = [(2PAD) + PAS]/3$, onde "PAD" equivale à diastólica e "PAS" equivale à sistólica. Em

condição fisiológica, a PAS é da ordem de 120 mmHg, a PAD de 80 mmHg (onde se lê 120 x 80 mmHg) e portanto a PAM é aproximadamente 93 mmHg. Nessa condição, a PA é regulada em resposta aos mecanismos neurais de curto prazo (segundos ou minutos) e mecanismos de longo prazo (horas ou dias). Em geral, as respostas de longo prazo dependem da síntese e secreção de hormônios, incluindo a angiotensina e vasopressina, e dos mecanismos de ajustes renais e hemodinâmicos, os quais favorecem a excreção de água e sal (2).

1.2.1 Hipertensão Arterial Sistêmica e Doença Renal Crônica

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

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

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

1.3 Sistema renina-angiotensina (SRA)

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

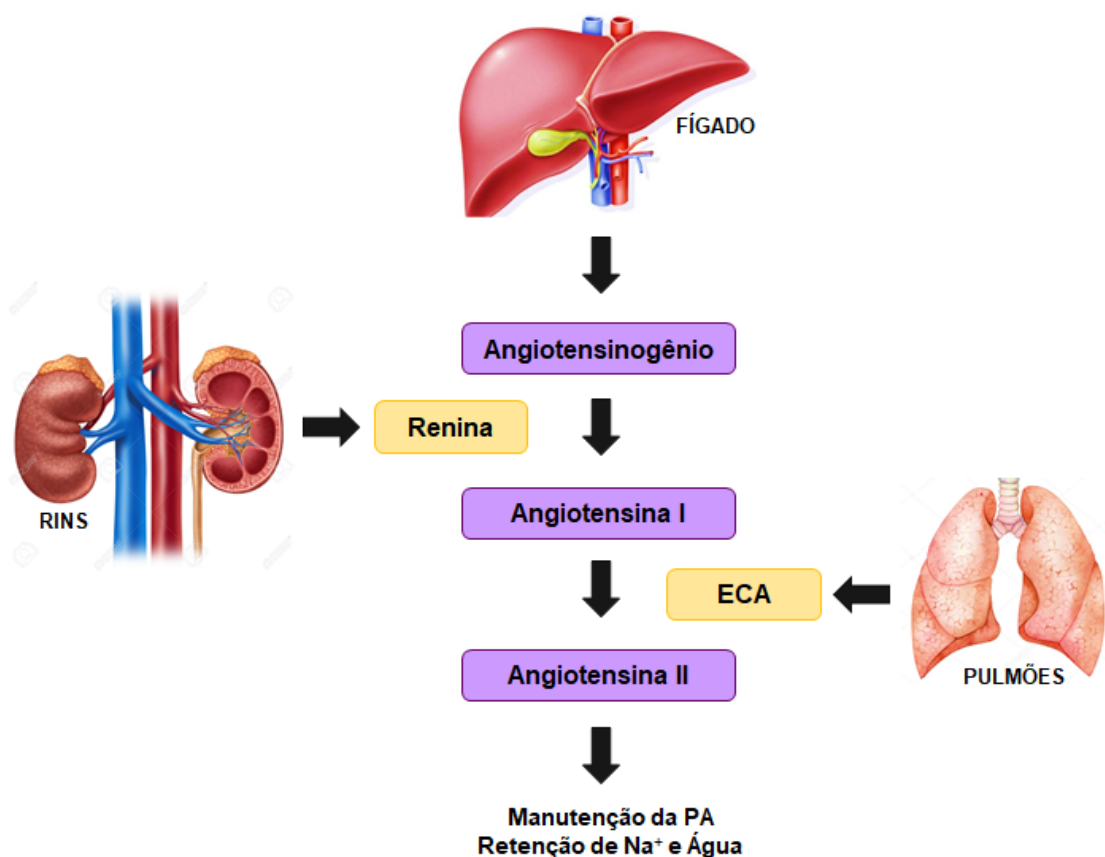


Figura 1: Sistema renina-angiotensina sistêmico. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; PA: Pressão Arterial; Na⁺: Sódio.

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

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

O receptor AT2 é essencialmente expresso nas células de tecidos embrionários e é importante para a diferenciação celular e o desenvolvimento de órgãos (78, 80). Após o nascimento, a expressão de receptores AT2 decai; contudo, persiste em vários órgãos incluindo o coração, glândula adrenal, rins e vasos, onde medeiam importantes efeitos fisiológicos da Ang II (25). A expressão de receptores AT2 pode aumentar em situações de injúria cardíaca ou vascular e durante os processos de cicatrização do tecido renal, o que sugere sua participação nos mecanismos de remodelamento tecidual (43, 132), respostas vasodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-fibróticas (34, 112, 118). Tais respostas são essenciais para contrabalançar as injúrias teciduais que ocorrem em detrimento dos efeitos mediados pelo receptor AT1. As vias de sinalização celular relativas à ativação dos receptores AT2 dependem de mecanismos associados ou não à proteína G ($G_{i\alpha 2}$ e $G_{i\alpha 3}$) (103). De maneira geral, as repostas celulares por ativação de AT2 resultam na

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

1.3.1 Sistema renina-angiotensina intrarrenal

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

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

1.3.2 Angiotensina II e a doença renal crônica

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

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

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

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

dinucleotide phosphate-oxidase); o radical hidroxila (OH^\cdot) e o peroxinitrito (ONOO^\cdot). Dentre as espécies reativas de oxigênio, o ânion superóxido (O_2^\cdot) é a molécula mais importante para a indução do estresse oxidativo, condição que potencializa a progressão de várias patologias.

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

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

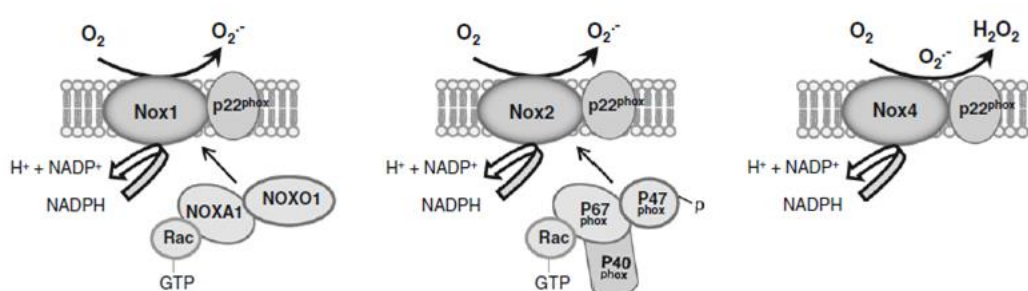


Figura 2: Isoformas da NADPH oxidase e suas subunidades regulatórias expressas nos rins. Nox1 e Nox2 requerem associação com subunidades citosólicas para sua ativação. Nox4 não é regulada por nenhuma subunidade regulatória conhecida. Adaptado de Alexander Sirker (2011).

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

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

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

1.3.4 Espécies reativas de oxigênio e estresse de retículo endoplasmático

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

Em condições normais, essas proteínas são mantidas no estado inativo devido às interações com a Chaperona (Bip ou GRP78) (64). Entretanto, quando há proteínas mal enoveladas (**figura 3**), a GRP78 se dissocia dessas proteínas e estas são ativadas por autofosforilação (11). A proteína PERK fosforilada ativa os fatores

Nrf2 (do inglês: *nuclear factor erythroid 2*) e eIF2 α (do inglês: *eukaryotic translation initiation factor alpha*). O eIF2 α quando fosforilado na serina 51 diminui sua atividade, reduzindo as taxas de início da tradução e de síntese protéica (54) e consequentemente ativando o ATF4 (do inglês: *activating transcription factor 4*) (104). Os fatores ATF4 e Nrf2 induzem aumento na expressão de genes que facilitam a adaptação das células ao estresse (74), incluindo os genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, reações do tipo redox e secreção de proteínas (53, 54). Vale ressaltar que nem todos os genes regulados por ATF4 são anti-apoptóticos. Quando o estresse de RE persiste e a quantidade de proteínas mal enoveladas aumenta, a via PERK/eIF2 α /ATF4 é potencializada e nessa condição, o ATF4 induz a transcrição de CHOP (do inglês: *CCAAT- enhancer-binding protein homologous protein*), o qual induz aumento da produção de EROs no RE e ativa proteínas apoptóticas em resposta ao estresse de RE (95).

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

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

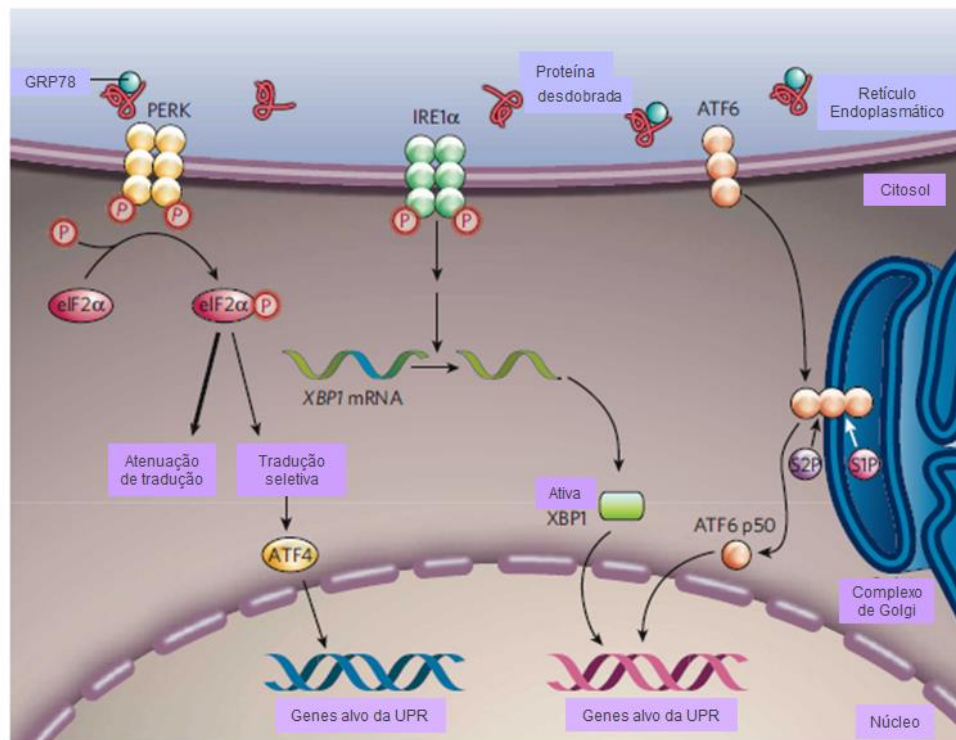


Figura 3: Vias da UPR em mamíferos. Durante o estresse de RE, o GRP78 liga-se preferencialmente a proteínas desdobradas ou mal dobradas, afastando assim o equilíbrio da ligação entre GRP78 e IRE1 α , PERK e ATF6. A liberação de GRP78 resulta na ativação da PERK, IRE1 α e ATF6 através de autofosforilação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

1.3.5 Espécies reativas de oxigênio e o sistema antioxidante.

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

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

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

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

1.3.6 Espécies reativas de oxigênio, inflamação e fibrose.

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

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

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

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

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

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

O sódio (Na⁺) é um íon essencial para o meio interno porque entre inúmeras funções, permite a manutenção do volume do fluido extracelular. A energia para a reabsorção renal de Na⁺ é proveniente da Na⁺/K⁺ ATPase - proteína integral de membrana, localizada na membrana basolateral das células epiteliais, cuja função é criar e manter o gradiente favorável para a entrada de sódio na célula (2). Em

síntese, a Na^+/K^+ ATPase transporta três íons Na^+ para fora da célula e dois íons K^+ para dentro, em consequência da hidrólise de uma molécula de ATP, assim a Na^+/K^+ ATPase promove um gradiente químico e elétrico, pois bombeia mais íons positivos para fora da célula que para dentro, fazendo com que o ambiente intracelular fique mais negativo em relação ao meio extracelular. Por isso, a Na^+/K^+ ATPase é eletrogênica.

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

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

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

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

Co-transportador Na^+/Cl^- (NCC) e Canal de Na^+ epitelial sensível à amiloride (ENaC): O NCC é expresso no túbulo convoluto distal (102), enquanto que o ENaC é

predominantemente expresso no túbulo conector e ducto coletor cortical (81). Tanto o NCC como o ENaC são proteínas alvos para a ação da aldosterona na regulação da excreção de Na^+ .

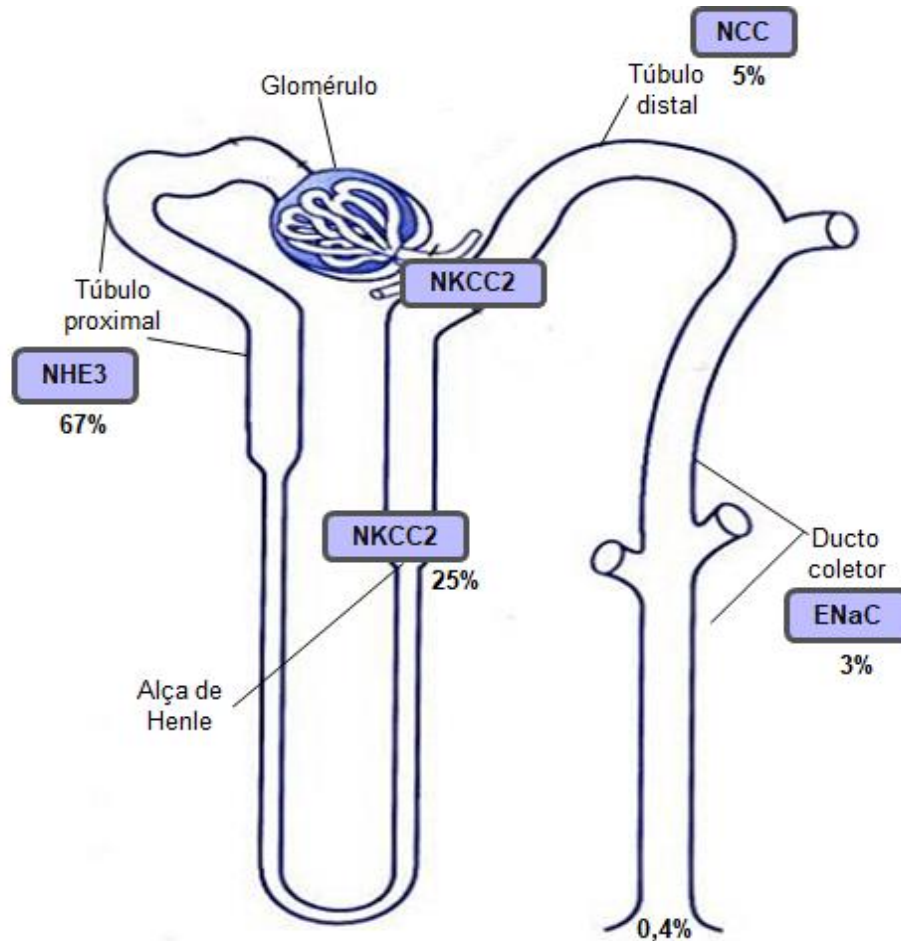


Figura 4: Reabsorção renal diária de sódio ao longo do néfron. Adaptada de Vander (2003).

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

1.4 Modelo animal de hipertensão arterial induzida por Ang II.

Vários estudos demonstram que a infusão crônica de Ang II por uma ou duas semanas induz hipertensão arterial, redução nos parâmetros hemodinâmicos renais, aumento na atividade do SRA intrarrenal e injúria no tecido renal (126, 140). No entanto, recentemente o nosso grupo observou que ratos tratados com Ang II por seis semanas apresentaram hipertensão arterial, remodelamento renovascular associado ao aumento do fluxo sanguíneo renal, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário, além de intenso processo inflamatório, glomeruloesclerose, proteinúria e perda de podócitos na urina (26), o que sugere um quadro de DRC decorrente da ação de Ang II. Os efeitos deletérios da Ang II sobre tais parâmetros foram corrigidos por losartan, antagonista do receptor AT1. Porém, no estudo anterior nós não investigamos o efeito da Ang II via receptor AT1 na manifestação de genes associados à DRC e nem na expressão dos transportadores de Na⁺ renais.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando que a progressão da DRC associada à hipertensão arterial pode estar associada aos efeitos induzidos pela Ang II, torna-se pertinente investigar os mecanismos pelos quais a Ang II participa desse processo. Neste contexto, a nossa **hipótese** é que a Ang II circulante em concentrações elevadas por um período crônico, pode ativar o SRA intrarrenal e conseqüentemente favorecer as lesões no tecido renal, bem como alterações na expressão dos transportadores de sódio no epitélio tubular. Com este estudo esperamos contribuir para a geração de informações relevantes a cerca dos eventos celulares responsáveis pela expressão dos genes associados aos efeitos da Ang II na progressão da DRC.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a ação da Ang II via receptor AT1 na modulação de mecanismos celulares responsáveis pela lesão renal crônica e pela reabsorção de sódio.

3.2 Específicos

- Verificar a contribuição das espécies reativas de oxigênio (EROs), do estresse de retículo endoplasmático (RE), inflamação e fibrose na lesão renal crônica induzida por Ang II.
- Verificar a ação da Ang II na expressão dos transportadores de sódio ao longo do néfron.
- Verificar a contribuição do losartan (antagonista do receptor AT1) em reduzir ou abolir os efeitos deletérios da Ang II na lesão renal crônica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Nesse estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 200 gramas, adquiridos no biotério de criação do Instituto de Ciências Biomédicas/ICB-USP e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP. Os animais foram mantidos sob condição de controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação. Todos os protocolos apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA), protocolo número 37/2016 e estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

4.2 Obtenção dos modelos experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos experimentais, com aproximadamente 10 animais por grupo.

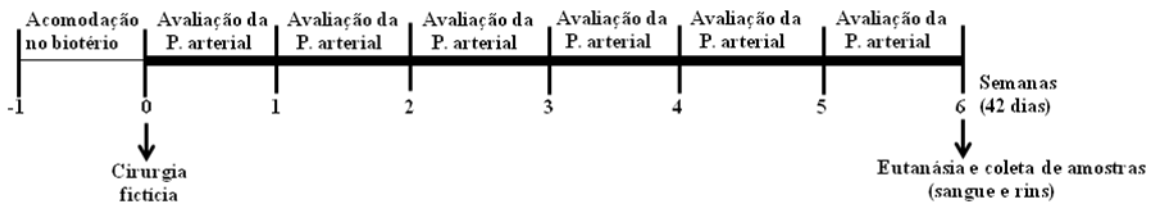
Grupos:

- **Controle** - animais submetidos à cirurgia fictícia, mas sem implante das mini-bombas (cirurgia fictícia);
- **Tratados com Ang II** - animais com implantes de mini-bombas para infusão de Ang II, na dose de 200 ng/kg/min (Tocris Bioscience, Minneapolis, EUA), (65) por 42 dias;
- **Tratados com losartan** - assim como no controle, os animais foram submetidos a cirurgia fictícia e do 28º ao 42º dia, os animais foram tratados com losartan (DuPont - Dup 753) na dose de 10mg/kg/dia (36), por gavagem.
- **Tratados com Ang II e losartan** - animais tratados com Ang II (via mini-bombas, por 42 dias) e com losartan a partir do 28º dia, por gavagem.

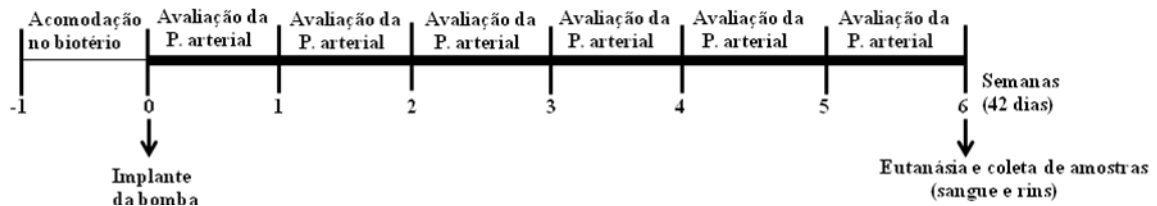
Durante o tratamento os animais foram avaliados semanalmente para confirmar a progressão da hipertensão arterial.

4.3 Delineamento experimental

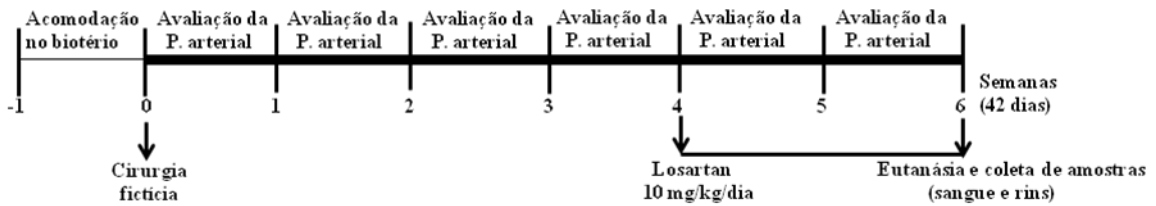
Controle



Ang II 200 ng/kg/min



Losartan



Ang II/Los

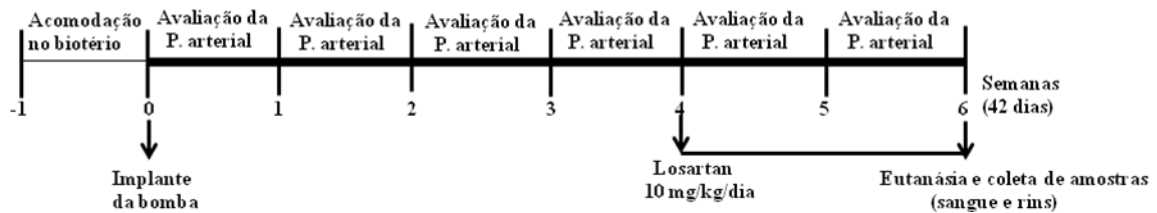


Figura 5: Delineamento experimental.

4.4 Procedimento cirúrgico

Para o implante das mini-bombas osmóticas, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (Virbac, Carros, França) nas doses: 70 e 4 mg/kg de peso corporal, respectivamente, por via intraperitoneal. Após a perda completa dos reflexos de dor, uma pequena incisão subcutânea foi feita no dorso dos animais onde uma mini-bomba osmótica (Alzet, Cupertino, EUA) modelo 2006 foi inserida. No grupo controle ou tratado com losartan, foi feita apenas uma incisão dorsal sem implante da mini-bomba (cirurgia fictícia).

4.5 Relação entre o estudo anterior e o atual

Em estudo anterior utilizando o mesmo modelo experimental (26), avaliamos os níveis de Ang II circulante, todos os parâmetros da hemodinâmica renal, morfologia renovascular e glomerular, a expressão dos componentes do SRA intrarrenal, parâmetros plasmáticos e urinários. Durante este estudo, armazenamos tecidos renais para análise posterior de outros parâmetros morfológicos, expressão gênica e expressão proteica. No estudo atual estamos utilizando os tecidos renais obtidos no estudo anterior e ampliamos o tratamento para mais 20 animais (5 por grupo) para confirmar o rendimento adequado dos grupos tratados anteriormente.

4.6 Perfusão renal e retirada de órgãos

Ao final dos tratamentos os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (Virbac, Carros, França) nas doses: 70 e 4 mg/kg de peso corporal, respectivamente, por via intraperitoneal. A artéria e veia renais do rim direito foram amarradas com fio de algodão e, em seguida, o rim foi removido, fatiado e as amostras foram congeladas a -80 °C para análises posteriores de RT-PCR e *Western blotting*. O rim esquerdo foi submetido à perfusão com solução de PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M, pH 7.4), por 10 minutos (velocidade de perfusão: 10 mL/min) e em seguida, removido, seccionado transversalmente e transferido para uma solução de formalina tamponada a 4% e mantido por 24 horas. Após esse período,

foi incubado em álcool 70 e encaminhado para o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da USP para impregnação com parafina e preparação de cortes histológicos com espessura de 3-4 μm , por microtomia (19).

4.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

4.7.1 Extração do RNA total

As amostras de tecido renal foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e então ressuspensas em 1 mL de TRIzol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em seguida, o homogenato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. O RNA total foi extraído em mini-colunas Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Life Sciences), conforme instruções do fabricante. Neste processo, as amostras foram passadas também por uma coluna que retém DNA genômico, assegurando maior pureza do RNA extraído.

4.7.2 Síntese do cDNA a partir do RNAm

Para a síntese de cDNA à partir do RNAm (RT-PCR) extraído foi utilizado o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e termociclador Veriti™ (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 2000 ng de RNA.

4.7.3 Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real

O cDNA (25 ng) obtido no RT-PCR foi utilizado na análise de expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR). Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Na obtenção das sondas, são

selecionadas aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir ainda mais o impacto de contaminação por DNA genômico. Sendo assim, são sempre escolhidas as sondas "*Best Coverage*" (**Tabela 2**).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados pelo *software* StepOne versão 2.3 (Applied Biosystems), seguidos pela análise estatística no *software* GraphPad Prism (San Diego, EUA).

A semelhança da eficiência de amplificação das sondas (próximo a 100%) permite a utilização do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o cálculo das diferenças de expressão entre os genes alvo e endógeno. Assim, os resultados são apresentados na forma de *fold change*, ou seja, aumento ou diminuição da expressão em relação ao grupo Controle (CTL).

Tabela 2: Detalhes das sondas utilizadas em RT-PCR.

Sonda	Código
Nox2	Rn00576710m1
Nox4	Rn00585380_m1
p22 ^{phox}	Rn00577357_m1
p47 ^{phox}	Rn00586945_m1
eIF2 α	Rn01494813_ml
Atf4	Rn00824644_g1
Chop	Rn00492098_g1
Nrf2	Rn00582415_m1
Keap1	Rn01448220_m1
NF κ B	Rn01399572_m1
α SMA	Rn01759928_g1
Bax	Rn02532082_g1
Bcl-2	Rn99999125_g1
IL1 β	Rn00580432_m1
GAPDH - gene endógeno	Rn01775763_g1

4.8 Análise da expressão proteica por *Western Blotting*

4.8.1 Preparo das amostras e membranas

Após o tratamento, os tecidos renais foram homogeneizados com tampão de lise e centrifugados por 20 minutos, a 12.000 rpm, a 4 °C. O “pellet” de cada amostra de tecido renal foi ressuspendido em 100 µl de [solução Fosfato de Sódio (5 mM, pH 8.0) mais *cocktail* de inibidores de proteases (Sigma Aldrich) e 100 µl de tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 1.96% e azul de bromofenol 0.05%)] e incubado a 95 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas, juntamente com um padrão de massa molecular específico (Cell Signaling), no gel de poliacrilamida-SDS (9% a 12%, com espessura de 1.5 mm), sendo 50 µg de proteínas totais por *lane*, submerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e pH 7.3). A corrida das amostras no gel foi efetuada a 75 V e 500 mA e interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel.

4.8.2 Transferência de proteínas do gel para a membrana de PVDF

Após a eletroforese os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare Amersham Hybond-P). A membrana foi previamente tratada com tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), por cerca de 20 minutos. Para a transferência, foi utilizado um sistema tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 100 mV, durante 90 minutos. Após esse período, a membrana foi transferida para uma solução de bloqueio [NaCl (136 mM), Tris HCl (15,3 mM), pH 7,6, leite em pó desnatado ou albumina (5%), Tween 20 (0,1%) Sigma], durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana permaneceu incubada com anticorpo primário específico, previamente diluído em solução de bloqueio, por 12 horas a 4 °C, com leve agitação. Para remover o excesso do anticorpo foram realizadas 3 lavagens com solução específica (cada uma por 10 minutos). Em

seguida, a membrana foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário conjugado, em solução de bloqueio e novamente lavada como acima descrito. Após essas etapas, a membrana foi exposta ao reagente para imunodeteção através de luminescência ECL™ (Amersham), por 2 minutos. Subsequentemente, foi exposta em filme Hyperfilm™ MP (Amersham), por 30 segundos ou mais, à temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados estão descritos na **Tabela 3**. A intensidade dos “blots” foi avaliada por densitometria óptica, utilizando-se o programa IMAGE J.

4.9 Imunohistoquímica

Cortes renais longitudinais de 3-4 µm embebidos em parafina foram desparafinizados em xilol, reidratados em álcool (100%, 90% e 75%) e então submetidos à marcação por imuno-histoquímica. A recuperação antigênica foi realizada pelo aquecimento a 100 °C, por 20 minutos, em tampão Tris-EDTA+Tween (pH 9,0), seguido pelo resfriamento em água destilada, por 20 minutos. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Na etapas seguintes, os cortes sobre as lâminas foram incubados com 50 µl de solução contendo soro de cabra 10% diluído em albumina 1%, por 1 hora em câmara úmida e escura. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* a 4 °C com anticorpo primário. Os anticorpos utilizados estão descritos na **Tabela 3**. No dia seguinte, os cortes foram lavados 2 vezes de 5 minutos em TBS-T (tampão Tris-Base contendo 0,025% Triton X-100) e então incubados com o anticorpo secundário específico. Após a lavagem, conforme descrito acima, o produto da reação foi detectado com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, EUA). A reação de coloração foi monitorada pelo 3,3-diaminobenzidina (DAB - Sigma Aldrich) e peróxido de hidrogênio 0,3% (Merck, Whitehouse Statio, EUA). Os cortes foram contra-corados com o Methylgreen (Amresco, Ohio, EUA) e desidratado em álcool (75%, 90% e 100%) e imersos em xilol. As lâminas foram montadas com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA) e os cortes renais foram analisados pelo uso de um microscópio de luz em campo claro, acoplado a uma câmera de vídeo e a um analisador de imagens (Eclipse 80i, Nikon). Para cada reação foram analisados 20 campos por lâmina e foram contadas áreas ou células marcadas, de acordo com cada protocolo.

Tabela 3: Detalhes dos Anticorpos utilizados

Anticorpo	Código e fornecedor do Ac.primário	Hospedeiro	Diluição	Técnica utilizada
Estresse Oxidativo				
NOX2	Ab129068	Rabbit	1:7000	WB
NOX4	Ab133303	Rabbit	1:7000	IF
p22 ^{phox}	Ab75941	Rabbit	1:2000	WB, IF
p47 ^{phox}	Sc14015	Rabbit	1:2000	WB, IF
Estresse de RE				
PERK total	#3192	Rabbit	1:3000	WB
PERKp	G.305.4	Rabbit	1:5000	WB
eIF2 α total	5324 S	Rabbit	1:1000	WB
eIF2 α p	3597 S	Rabbit	1:1000	WB
Fibrose				
α SMA	Ab5694	Rabbit	1:1000	WB, IF
Na⁺ Transporters				
NHE1	Ab67313	Mouse	1:2000	WB, IHQ
NHE3	SPC 400D	Rabbit	1:1000	WB
NHE3p	Ab72729	Mouse	1:3000	WB
NCC	GTX 41969	Rabbit	1:5000	WB, IF
NKCC2	#38436	Rabbit	1:1000	WB, IF
ENaC α	SPC 403D	Rabbit	1:1000	WB
ENaC β	SPC 404D	Rabbit	1:1000	WB
Actina	Ab141128	Mouse	1:5000	WB

WB = Western blotting; IF = Imunofluorescência; IHQ = Imunohistoquímica.

4.10 Imunofluorescência

Cortes renais longitudinais de 3-4 μm embebidos em parafina foram desparafinizados em xilol, re-hidratados em álcool, água destilada e PBS-T. A recuperação antigênica foi realizada pelo aquecimento em solução ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1M, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 1M e NaOH 10M, pH 6.2 – 6.5) por 10 minutos, seguida pelo resfriamento na mesma solução por 1 hora. Após a lavagem, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena em solução Dako protein block (Code No: X0909 – Dako Corporation, Carpinteria, CA – USA) por 1 hora. Após a retirada da solução de bloqueio, foi adicionado o anticorpo primário e as lâminas foram incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram expostas em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora. Após lavagem, foi adicionado DAPI (#4083 - Cell Signaling Technology) por 5 minutos em temperatura ambiente e, após mais uma lavagem, foi adicionado sulfato de cobre (10mM CuSO_4 em acetato de amônio 50mM, pH 5,0) por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas, montadas com Fluoromount (F4680-25ML, Sigma-Aldrich) e mantidas em incubadora sem água overnight. O sinal de fluorescência foi analisado através do Sistema de Microscópio Confocal Zeiss Axiovert 100M (MA, Estados Unidos), objetiva 40x, usando laser de excitação 488 ou 543. Os anticorpos utilizados estão descritos na **tabela 3**.

4.11 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizada, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni, realizados a partir do programa GraphPad Prism Software. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como um valor médio \pm erro padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da Ang II e/ou losartan no estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, processos inflamatórios, fibróticos e apoptóticos no tecido renal.

- *Expressão de RNAm e proteica dos componentes de estresse oxidativo.*

Conforme apresentado na **figura 6** e **tabela 4**, o tratamento com Ang II por 42 dias resultou em aumento da expressão de RNAm para as isoformas Nox2 (A) e Nox4 (B) da NADPH oxidase e das enzimas regulatórias p22^{phox} (C) e p47^{phox} (D) em relação ao grupo controle. O co-tratamento com losartan aboliu o efeito da Ang II sobre esses parâmetros.

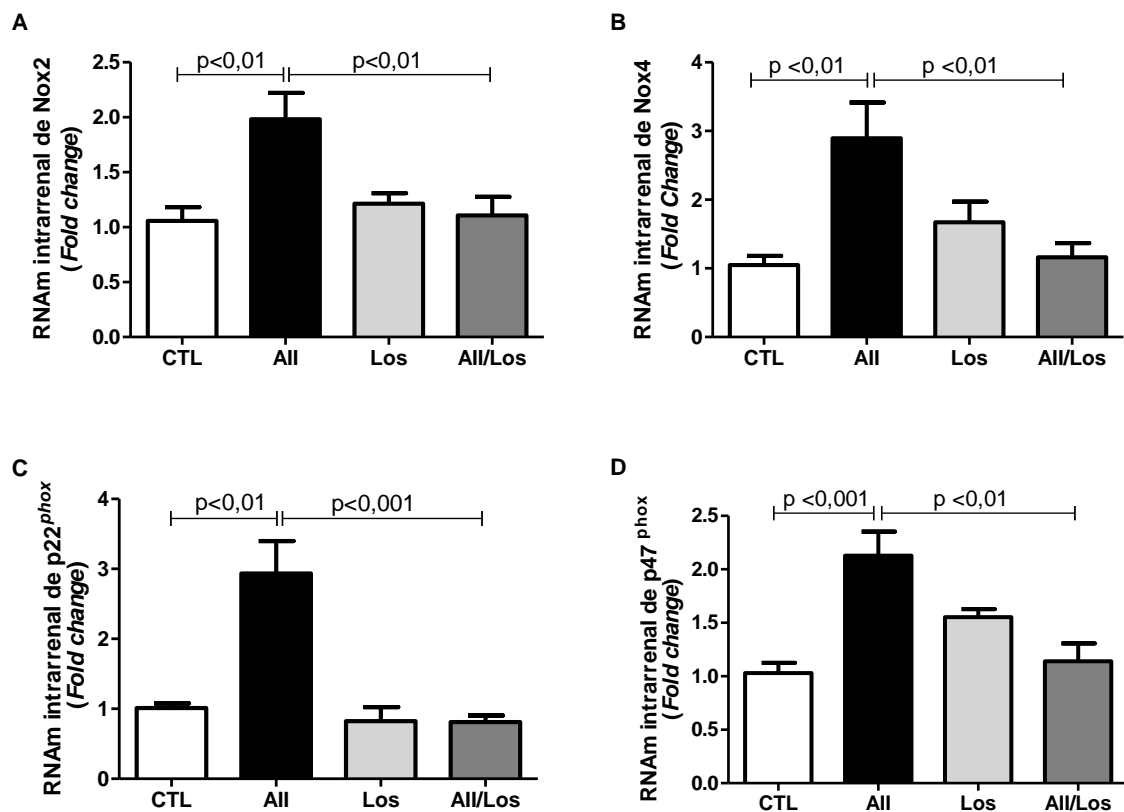


Figura 6: Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) na expressão de RNAm para Nox2 (A), Nox4 (B), p22^{phox} (C) e p47^{phox} (D) em tecido renal total de ratos. Os valores são média \pm EPM, n = 5 – 9. Para controle interno foi utilizado GAPDH.

Em relação à expressão proteica (**figura 7 e tabela 4**), o tratamento com Ang II por 42 dias resultou em aumento da expressão da proteína NOX2 em comparação ao grupo controle e o losartan reverteu este estímulo (A). No entanto, a expressão de p22^{phox} (B) e p47^{phox} (C) não foi alterada entre os grupos.

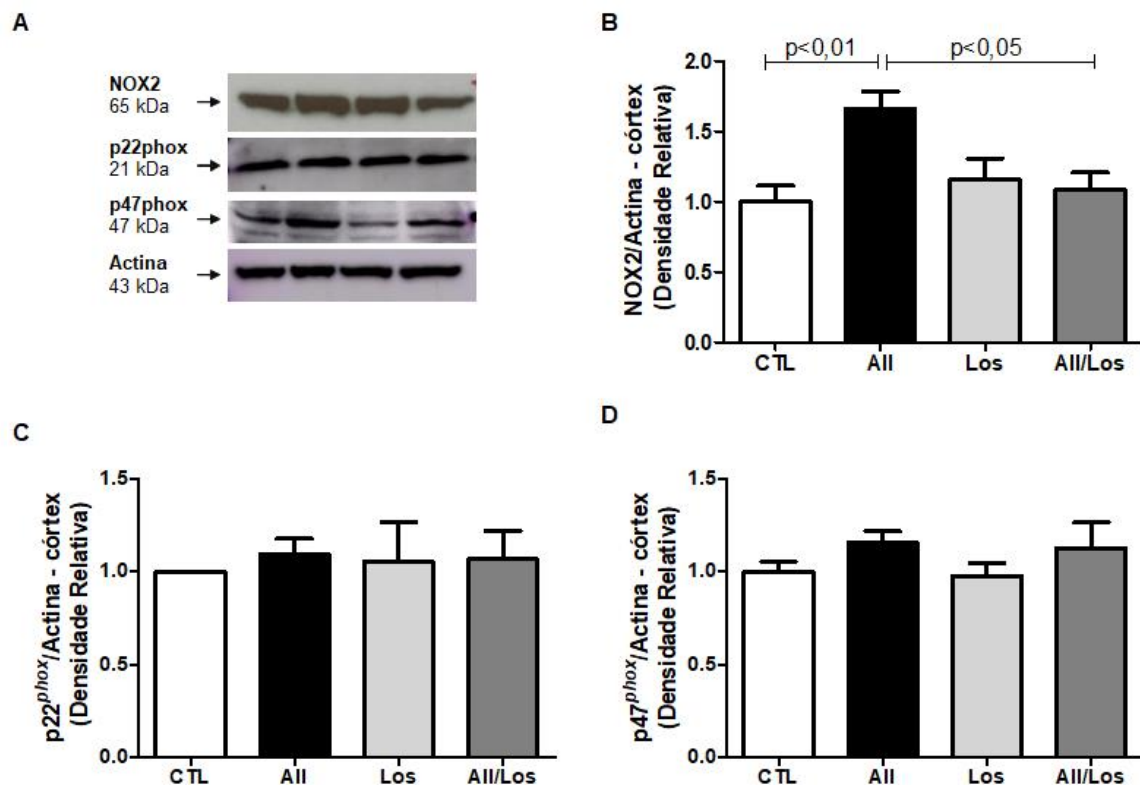


Figura 7: Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) na expressão proteica de Nox2 (B), p22^{phox} (C) e p47^{phox} (D) em córtex renal. Os valores são média \pm EPM, n = 4 – 6. Actina, controle interno.

Não foi possível avaliar a expressão proteica de NOX4 por *Western blotting* devido à baixa especificidade do anticorpo. Por isso, optamos por avaliar a expressão/distribuição dessa proteína por imunofluorescência. Conforme apresentado na **figura 8 A-C/tabela 4**, o tratamento com Ang II induziu aumento da intensidade de fluorescência para NOX4, p22^{phox} e p47^{phox} em túbulos, em comparação ao grupo controle. O losartan foi capaz de reverter este efeito.

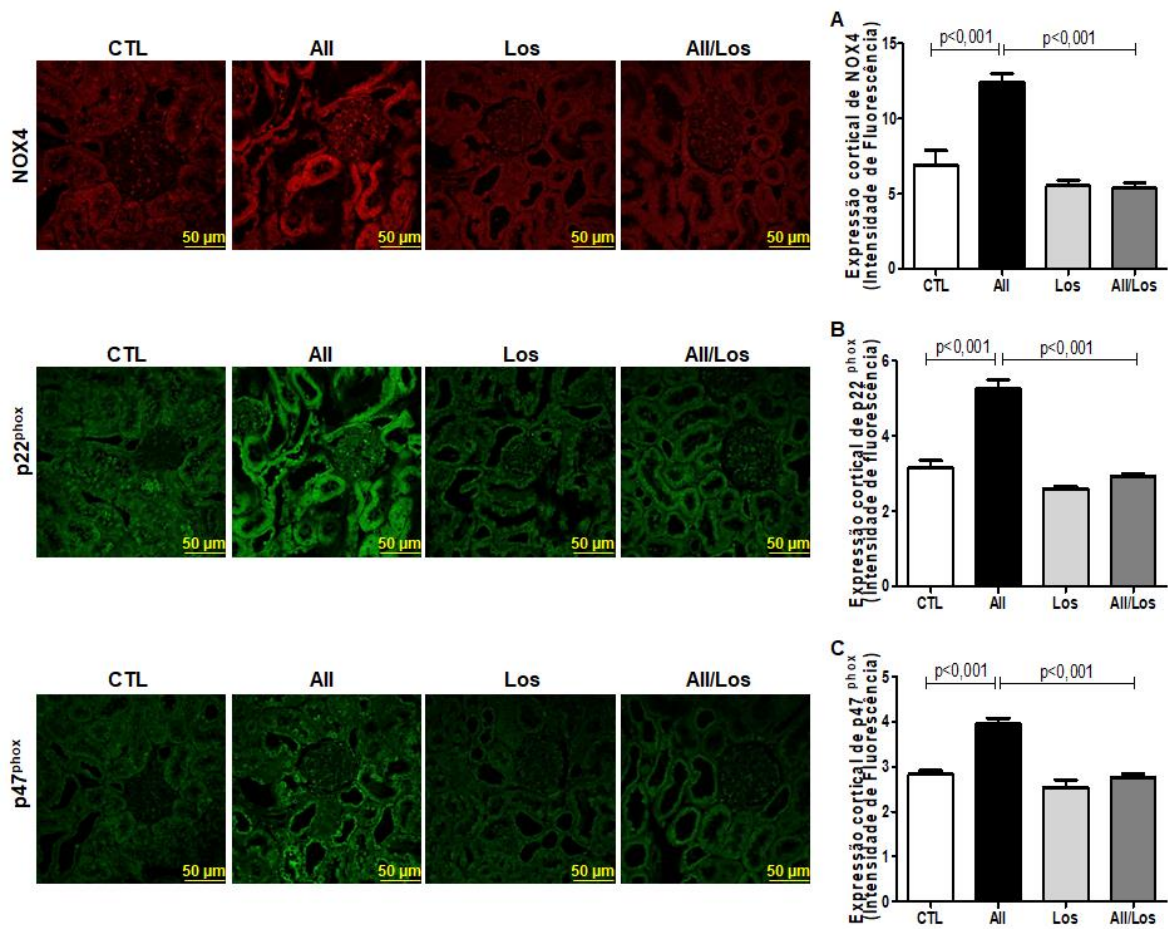


Figura 8: Efeito da Ang II (200 ng/kg/min) e/ou losartan (10 mg/kg/dia) na intensidade de fluorescência para as proteínas NOX4 (A), p22^{phox} (B), p47^{phox} (C). As imagens foram capturadas com objetiva de 40x. Os valores são média ± EPM. N = 4 – 5.

Tabela 4: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal total (RNAm) ou córtex (expressão proteica) de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>RNAm Nox2/GAPDH</i> (Fold change)	1,05 \pm 0,12 n= 7	1,98 \pm 0,24** n= 9	1,21 \pm 0,09 n= 9	1,10 \pm 0,17## n= 7
<i>RNAm Nox4/GAPDH</i> (Fold change)	1,04 \pm 0,14 n= 6	2,90 \pm 0,51** n= 6	1,67 \pm 0,30 n= 5	1,16 \pm 0,21## n= 7
<i>RNAm p22^{phox}/GAPDH</i> (Fold change)	1,01 \pm 0,06 n= 6	2,94 \pm 0,46** n= 8	0,83 \pm 0,19 n= 6	0,81 \pm 0,09### n= 5
<i>RNAm p47^{phox}/GAPDH</i> (Fold change)	1,03 \pm 0,09 n= 7	2,12 \pm 0,22*** n= 8	1,55 \pm 0,07 n= 7	1,14 \pm 0,16## n= 6
<i>Proteína NOX2/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,11 n=6	1,66 \pm 0,12** n=6	1,15 \pm 0,15 n=5	1,08 \pm 0,13# n=4
<i>Proteína p22^{phox}/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,00 n=5	1,09 \pm 0,09 n=5	1,05 \pm 0,21 n=5	1,07 \pm 0,15 n=4
<i>Proteína p47^{phox}/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,07 n=6	1,15 \pm 0,06 n=6	0,98 \pm 0,07 n=5	1,13 \pm 0,14 n=6
<i>Túbulos marcados com p22^{phox}</i> (Unidades Arbitrárias)	3,15 \pm 0,20 n=4	5,25 \pm 0,24*** n=5	2,59 \pm 0,07 n=4	2,94 \pm 0,07### n=4
<i>Túbulos marcados com p47^{phox}</i> (Unidades Arbitrárias)	2,83 \pm 0,08 n=4	3,96 \pm 0,12*** n=5	2,54 \pm 0,17 n=4	2,75 \pm 0,08### n=5
<i>Túbulos marcados com NOX4</i> (Unidades Arbitrárias)	6,94 \pm 0,94 n=4	12,45 \pm 0,55*** n=5	5,53 \pm 0,33 n=4	5,37 \pm 0,36### n=5

** $p < 0,01$ versus CTL (controle); *** $p < 0,001$ versus CTL;

$p < 0,05$ versus All (Angiotensina II); ## $p < 0,01$ versus All; ### $p < 0,001$ versus All.

- *Expressão de RNAm e proteica dos componentes de estresse de retículo endoplasmático.*

O aumento das EROs pode dificultar o enovelamento proteico no retículo endoplasmático (32) e nessa condição, o acúmulo de proteínas mal enoveladas interferem na homeostase da organela, o que caracteriza o estresse de retículo endoplasmático (85). No estudo atual, o tratamento com Ang II não alterou a expressão da PERK total quando comparado ao grupo controle. Porém, induziu aumento significativo na expressão da PERK fosforilada (pPERK), o que resultou em

aumento da razão PERK / pPERK. O co-tratamento com losartan reduziu o efeito da Ang II apenas sobre a expressão da pPERK fosforilada (**figura 9 A-D / tabela 5**).

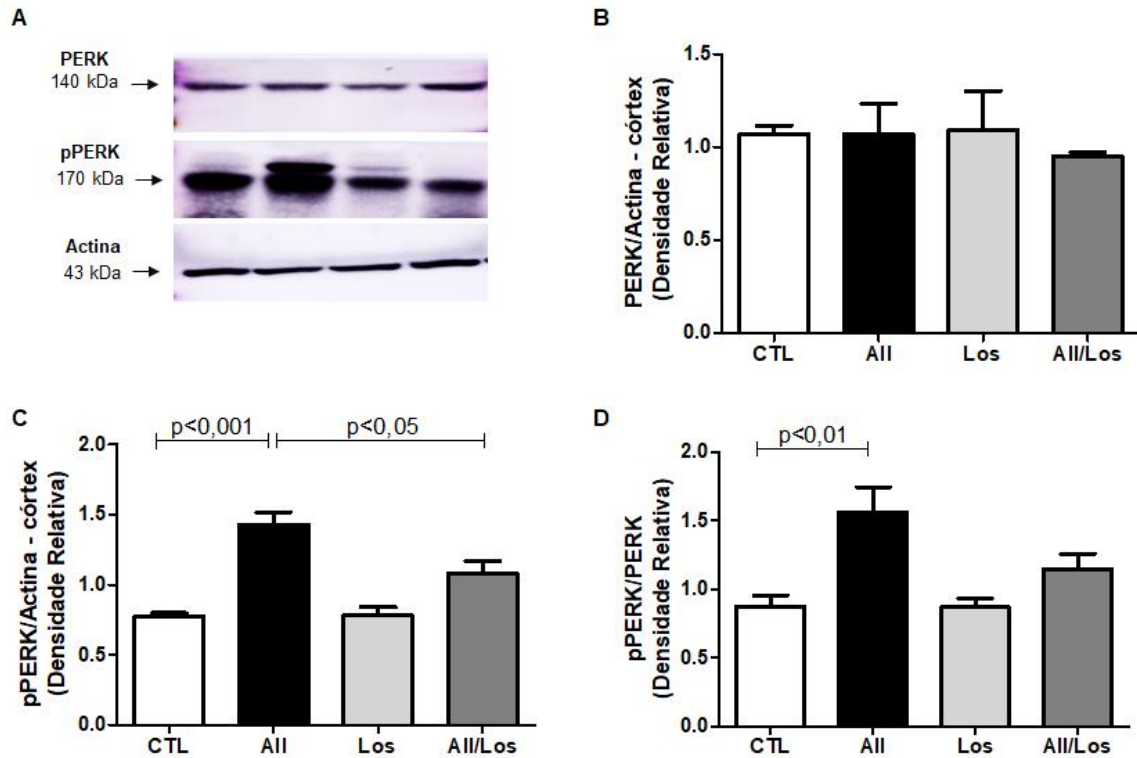


Figura 9: Imagem representativa da expressão da proteína PERK total e fosforilada (A). Expressão da proteína PERK total (B), fosforilada (C) e razão fosforilada/total no córtex de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Actina, controle interno. Os valores são média \pm EPM, $n = 3 - 4$.

Em seguida, foi avaliada a expressão de eIF2 α . O tratamento com Ang II induziu aumento da expressão de RNAm e da proteína eIF2 α (total e fosforilada) quando comparado aos respectivos controles. O co-tratamento com losartan aboliu o efeito da Ang II sobre esses parâmetros (**figura 10 A-C e tabela 5**).

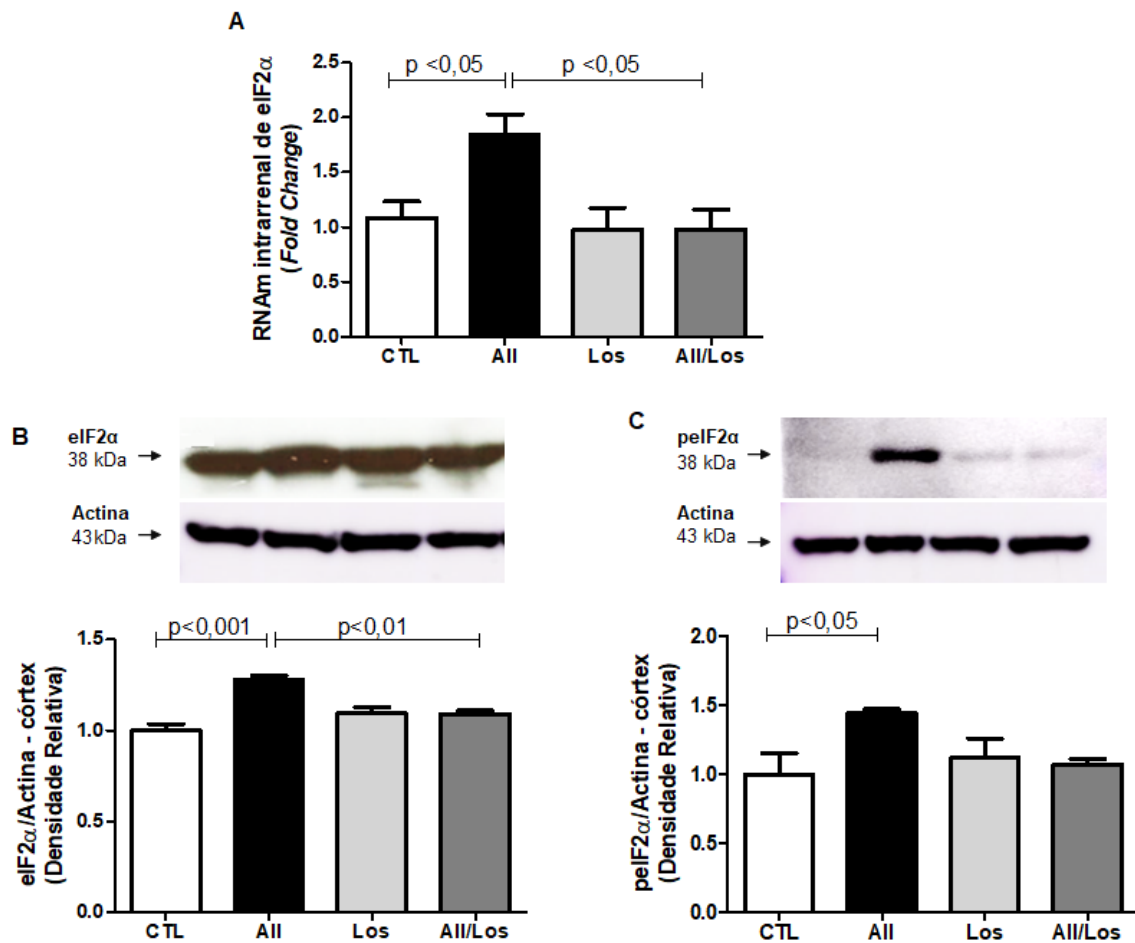


Figura 10: Expressão de RNAm (A) e proteica de eIF2 α total (B) e fosforilada (C) no córtex de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Os valores são média \pm EPM, $n = 4 - 8$. GAPDH, controle interno para o RNAm. Actina, controle interno para *Western blotting*.

Considerando a baixa especificidade do anticorpo para a proteína ATF4, no estudo atual foi avaliada apenas a expressão de RNAm. O tratamento com Ang II induziu aumento significativo na expressão de RNAm para ATF4 quando comparado ao grupo controle e o losartan reverteu o efeito da Ang II sobre este parâmetro (figura 11 / tabela 5).

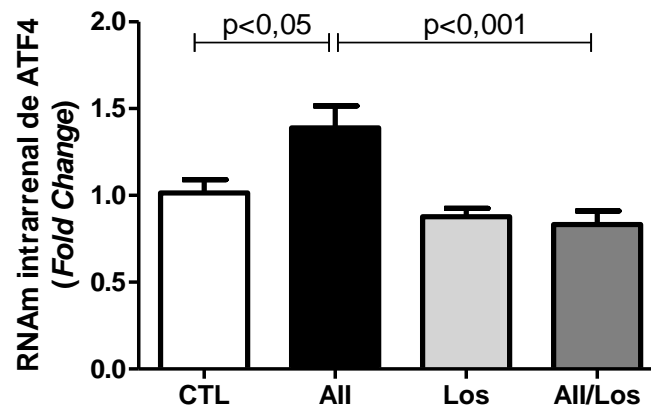


Figura 11: Expressão de RNAm para ATF4 no tecido renal total de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Os valores são média \pm EPM, n = 7 – 8.

Tabela 5: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal (RNAm) ou córtex (proteína) de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>Proteína PERK/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,07 \pm 0,05 n= 4	1,07 \pm 0,16 n= 5	1,09 \pm 0,21 n= 4	0,95 \pm 0,02 n=4
<i>Proteína pPERK/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	0,79 \pm 0,02 n= 4	1,43 \pm 0,09*** n= 4	0,78 \pm 0,06 n= 4	1,08 \pm 0,09# n= 4
<i>Razão pPERK/Total</i> (Unidades Arbitrárias)	0,87 \pm 0,08 n= 4	1,56 \pm 0,18** n= 4	0,87 \pm 0,06 n= 4	1,14 \pm 0,11 n=4
<i>RNAm eIF2α/GAPDH</i> (Fold change)	1,08 \pm 0,15 n= 8	1,84 \pm 0,18* n= 5	0,98 \pm 0,19 n= 7	0,98 \pm 0,18# n= 6
<i>Proteína eIF2α/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,03 n= 6	1,28 \pm 0,02*** n= 5	1,09 \pm 0,04 n= 5	1,09 \pm 0,02## n= 4
<i>Proteína peIF2α/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,15 n= 5	1,44 \pm 0,03* n= 6	1,12 \pm 0,14 n= 4	1,07 \pm 0,04 n= 4
<i>RNAm ATF4/GAPDH</i> (Fold change)	1,02 \pm 0,07 n= 7	1,39 \pm 0,12* n= 7	0,88 \pm 0,04 n= 7	0,84 \pm 0,07 n= 8##

* $p < 0,05$ versus CTL (controle); ** $p < 0,01$ versus CTL; *** $p < 0,001$ versus CTL;

$p < 0,05$ versus Ang II (Angiotensina II); ## $p < 0,01$ versus Ang II.

▪ *Expressão de RNAm para fatores reguladores de respostas adaptativas*

Em condição fisiológica, a proteína Nrf2 interage com a Keap1 formando o complexo Nrf2/Keap1. No entanto, frente a uma condição de estresse oxidativo e/ou estresse de retículo endoplasmático, o complexo proteico se dissocia e a Nrf2 se desloca para o núcleo para atuar como regulador das respostas adaptativas. O tratamento com Ang II resultou em redução da expressão de RNAm para Nrf2 e aumento deste parâmetro para Keap1 em comparação aos respectivos controles. No co-tratamento com losartan, esses parâmetros foram revertidos para valores próximos aos controles (**figura 12 e tabela 6**).

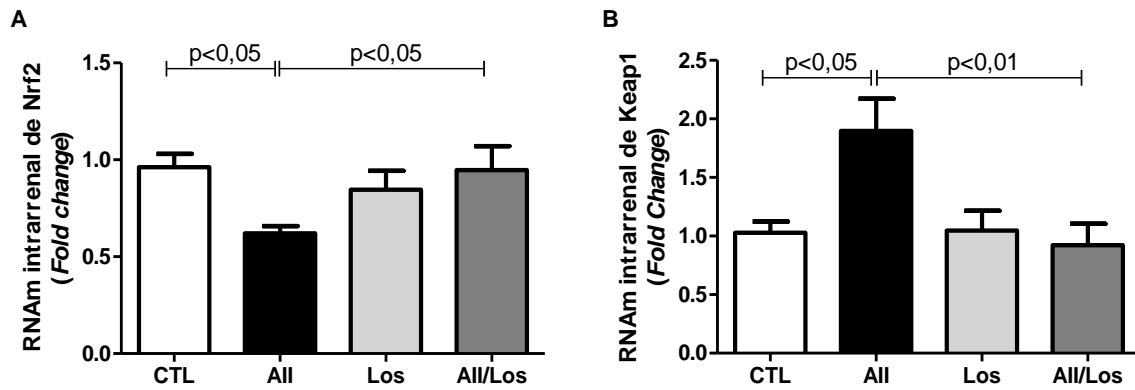


Figura 12: Expressão de RNAm para Nrf2 (A) e Keap1 (B) no tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Os valores são média \pm EPM, n = 5 – 8.

Tabela 6: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	AII	Los	AII/Los
<i>RNAm Nrf2/GAPDH</i> (Fold change)	0,96 \pm 0,07 n= 6	0,62 \pm 0,04* n= 7	0,86 \pm 0,10 n= 5	0,95 \pm 0,12# n= 6
<i>RNAm Keap1/GAPDH</i> (Fold change)	1,02 \pm 0,09 n= 8	1,90 \pm 0,26* n= 7	1,05 \pm 0,17 n= 8	0,92 \pm 0,18## n= 6

* $p < 0,05$ versus CTL (controle);

$p < 0,05$ versus Ang II (Angiotensina II); ## $p < 0,01$ versus Ang II.

▪ *Expressão de RNAm intrarrenal para os fatores apoptóticos*

O ATF4 que está associado às respostas de estresse de retículo endoplasmático, pode induzir transcrição da CHOP e conseqüentemente, apoptose. No estudo atual não se observou diferença na expressão de CHOP ou Bax entre os grupos estudados (**figura 13 A e B / tabela 7**). O tratamento com Ang II induziu aumento na expressão de RNAm para Bcl-2, indicando sobrevivência. No entanto, a razão Bax/Bcl2 não foi diferente entre os grupos. O co-tratamento com losartan não alterou qualquer parâmetro associado a apoptose ou sobrevivência.

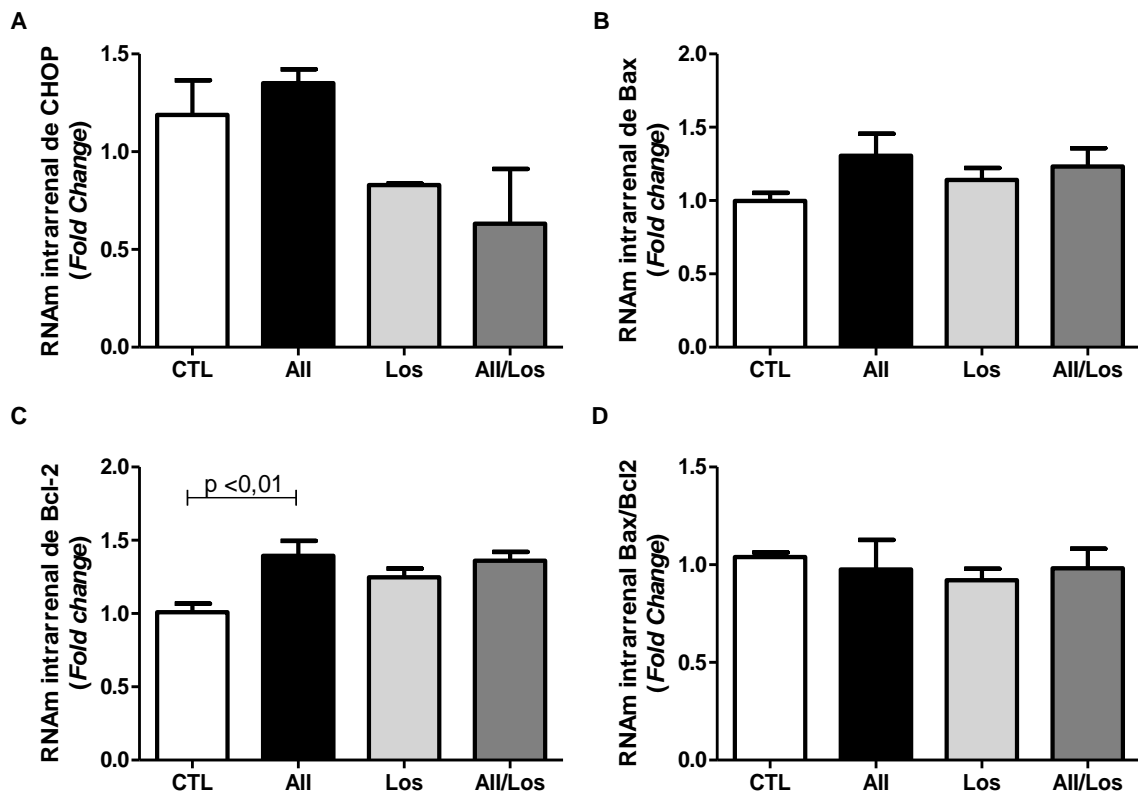


Figura 13: Expressão de RNAm para CHOP (A), Bax (B) e Bcl2 (C) no tecido renal total de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Os valores são média \pm EPM, n = 4 – 8. Razão Bax/Bcl2 (D).

Tabela 7: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>RNAm CHOP/GAPDH</i> (Fold change)	1,08 \pm 0,16 n= 6	1,35 \pm 0,07 n= 4	0,83 \pm 0,00 n= 4	0,63 \pm 0,28 n= 6
<i>RNAm Bcl-2/GAPDH</i> (Fold change)	1,01 \pm 0,05 n= 7	1,39 \pm 0,10** n= 8	1,24 \pm 0,06 n= 7	1,36 \pm 0,06 n= 5
<i>RNAm Bax/GAPDH</i> (Fold change)	1,00 \pm 0,05 n= 5	1,31 \pm 0,14 n= 7	1,14 \pm 0,08 n= 6	1,23 \pm 0,13 n= 6
<i>Razão Bax/Bcl-2</i> (Fold change)	1,04 \pm 0,02 n= 5	0,99 \pm 0,15 n= 7	0,92 \pm 0,06 n= 6	0,98 \pm 0,10 n= 5

** $p < 0,01$ versus CTL (controle).

- *Expressão de RNAm intrarrenal e/ou proteica para os fatores inflamatórios e fibróticos*

Durante o estresse de retículo endoplasmático a fosforilação de IRE1 e eIF2 α resulta em aumento de NF κ B e conseqüentemente, inflamação e fibrose. O tratamento com Ang II resultou em aumento da expressão de RNAm para NF κ B e Interleucina 1 β (IL1) em comparação ao grupo controle. No co-tratamento, o losartan aboliu o efeito da Ang II sobre estes parâmetros (**figura 14 / tabela 8**).

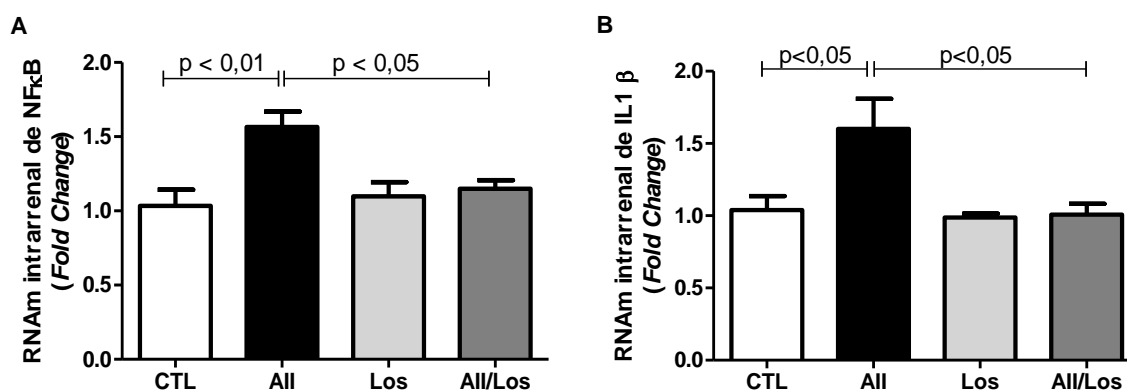


Figura 14: Expressão de RNAm para NF κ B (A) e IL1 β (B) no tecido renal total de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. Os valores são média \pm EPM, n = 5 – 8.

O tratamento com Ang II também induziu aumento na expressão de RNAm e da proteína α SMA em comparação ao grupo controle. A análise por imunofluorescência indica uma maior distribuição de α SMA no espaço intersticial. No co-tratamento, o losartan aboliu o efeito da Ang II sobre este parâmetro (**figura 15 / tabela 8**).

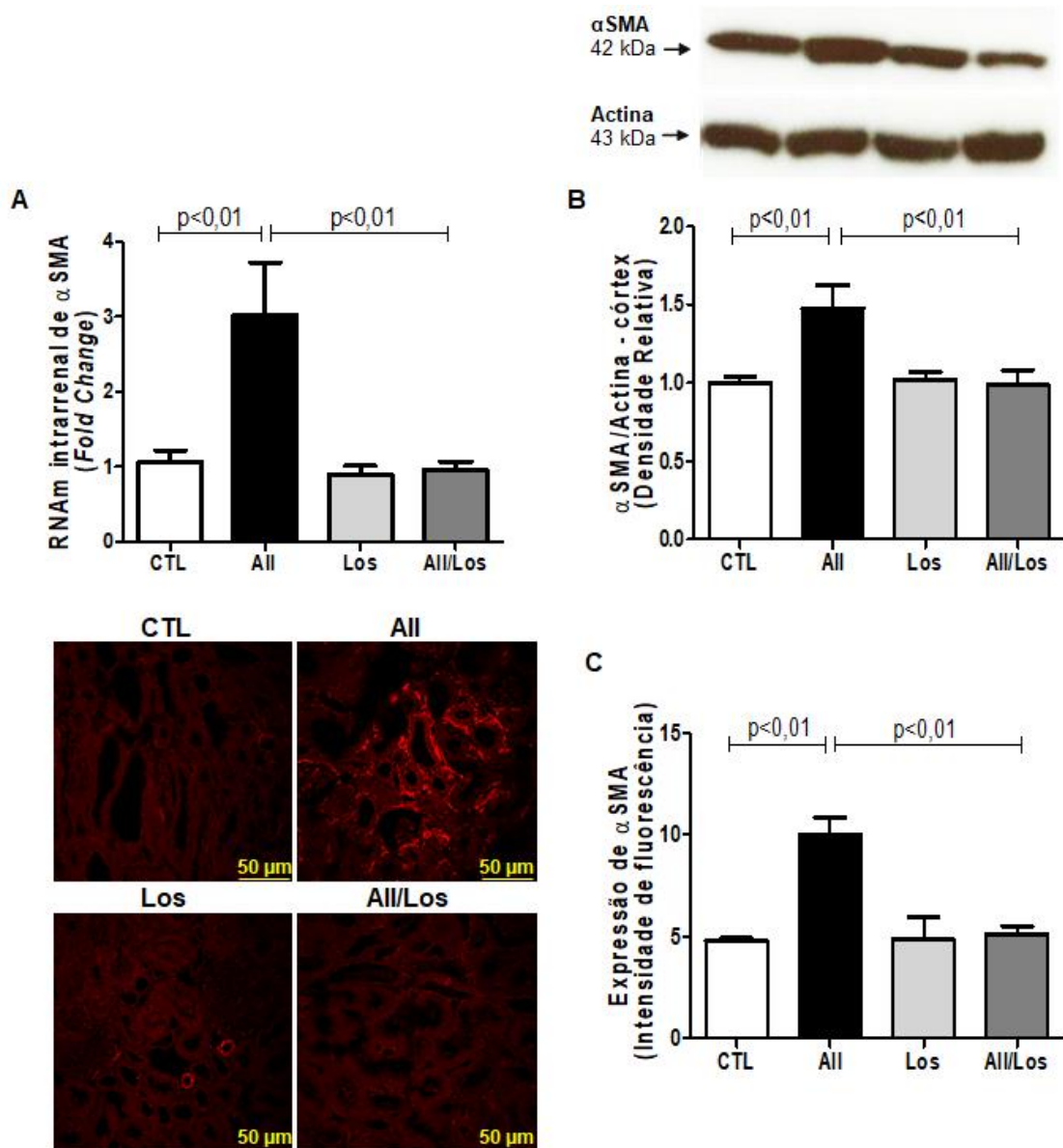


Figura 15: Expressão de RNAm (A) e da proteína α SMA (B -C) no tecido renal total e córtex renal, respectivamente, de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan. As imagens de imunofluorescência (C) foram capturadas com objetiva de 40X. Os valores são média \pm EPM, n = 4 – 7.

Tabela 8: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em tecido renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>RNA_m NFκB/GAPDH</i> (Fold change)	1,03 \pm 0,10 n= 6	1,56 \pm 0,10** n= 7	1,09 \pm 0,09 n= 8	1,15 \pm 0,05# n= 8
<i>RNA_m IL 1β/GAPDH</i> (Fold change)	1,04 \pm 0,09 n= 6	1,60 \pm 0,20* n=5	0,90 \pm 0,02 n= 4	1,08 \pm 0,07# n= 5
<i>RNA_m αSMA/GAPDH</i> (Fold change)	1,06 \pm 0,15 n= 7	3,03 \pm 0,69** n= 5	0,89 \pm 0,11 n= 6	0,96 \pm 0,11## n= 6
<i>Proteína αSMA /Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,06 n= 6	1,48 \pm 0,15** n= 5	1,02 \pm 0,04 n= 5	0,99 \pm 0,09## n= 4
<i>Túbulos marcados com αSMA</i> (Unidades Arbitrárias)	4,79 \pm 0,14 n= 3	10,0 \pm 0,80** n= 3	4,86 \pm 1,13 n= 3	5,09 \pm 0,44## n= 4

* $p < 0,05$ versus CTL (controle) e ** $p < 0,01$ versus CTL;

$p < 0,05$ versus All (Angiotensina II) e ## $p < 0,01$ versus All.

5.2 Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão dos transportadores de sódio.

- *Trocador Na⁺/H⁺ isoforma 1 (NHE1).*

Conforme apresentado na **figura 16 A–B** e **tabela 9** o tratamento com Ang II induziu aumento significativo na expressão proteica de NHE1 em comparação ao grupo controle. Esse resultado foi confirmado por análise de imunohistoquímica (**figura 16 C–D** e **tabela 9**), onde se verificou que as marcações tubulares corticais de NHE1 são predominantes na membrana basolateral (indicados por setas). No co-tratamento, o losartan reverteu o efeito da Ang II sobre este parâmetro.

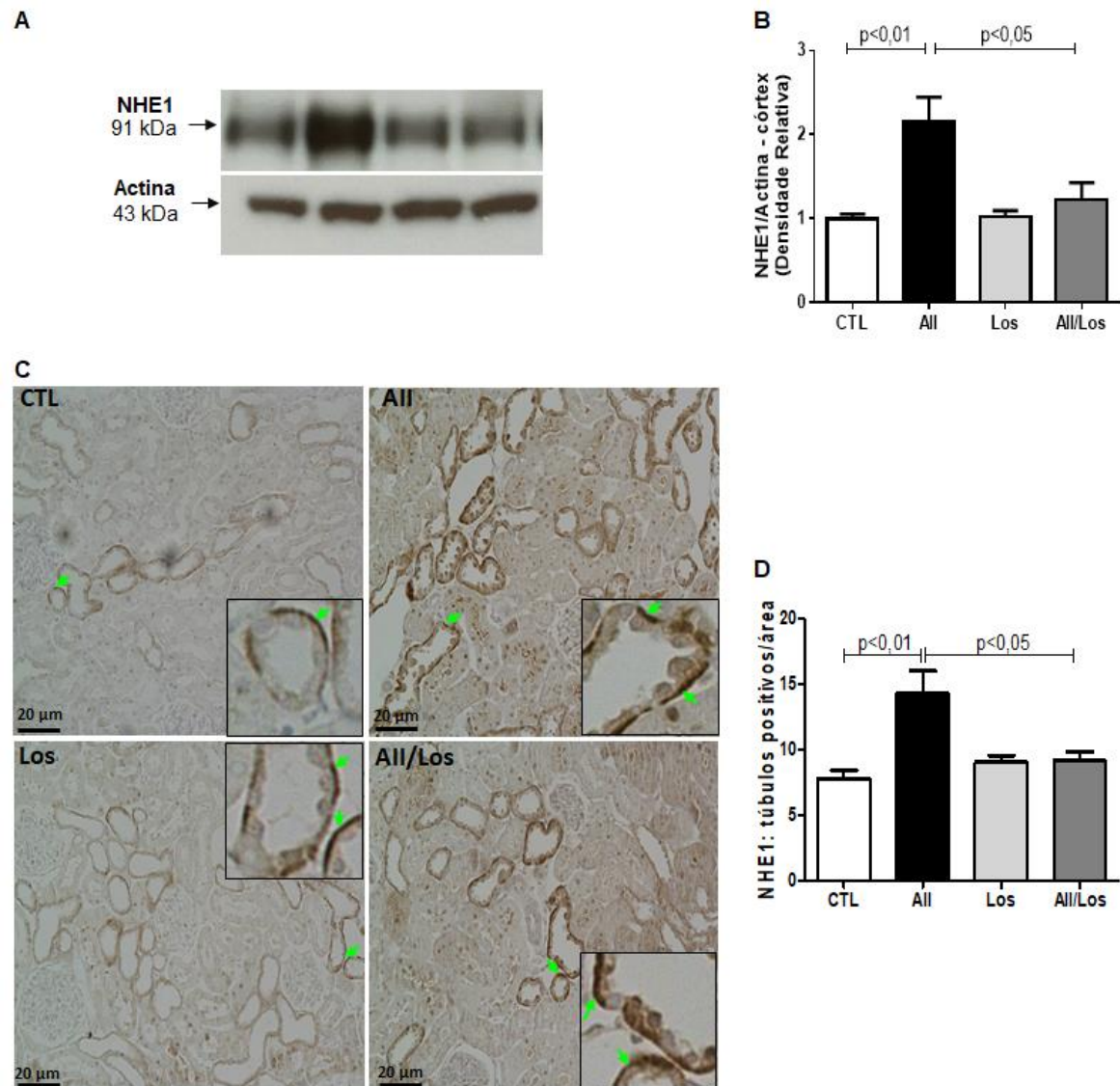


Figura 16: Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão proteica de NHE1 no córtex renal de ratos. Western blotting: (A) experimento representativo; (B) valores médios obtidos por análise densitométrica. Imuno-histoquímica: (C) foram utilizados 3 animais/grupo. As imagens foram capturadas com objetiva de 20 x e aumento de 200x e as imagens em destaque foram capturadas com aumento de 400x. As setas indicam túbulos marcados com NHE-1; (D) representação das médias dos grupos. Os valores são média ± EPM. N = 3 – 8.

Tabela 9: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>Proteína NHE1/Actina (Unidades Arbitrárias)</i>	1,00 \pm 0,06 n= 8	2,15 \pm 0,30** n= 8	1,02 \pm 0,07 n= 6	1,23 \pm 0,20# n= 5
<i>Túbulos marcados com NHE1</i>	7,8 \pm 0,60 n= 3	14,3 \pm 1,67** n= 3	9,05 \pm 0,51 n= 4	9,2 \pm 0,69# n= 3

** $p < 0,01$ versus CTL (controle); # $p < 0,05$ versus All (Angiotensina II).

- *Trocador Na⁺/H⁺ isoforma 3 (NHE3).*

O tratamento com Ang II induziu aumento significativo na expressão proteica total e fosforilada de NHE3 em relação ao grupo controle (**figura 17 A e B/ tabela 10**). No co-tratamento, o losartan reduziu significativamente o efeito da Ang II sobre a expressão de NHE3 total (**B**), mas não alterou o efeito da Ang II sobre o NHE3 fosforilado. Apesar dos efeitos da Ang II, não se observou alterações na razão de NHE3 fosforilado/NHE3 total (**D**).

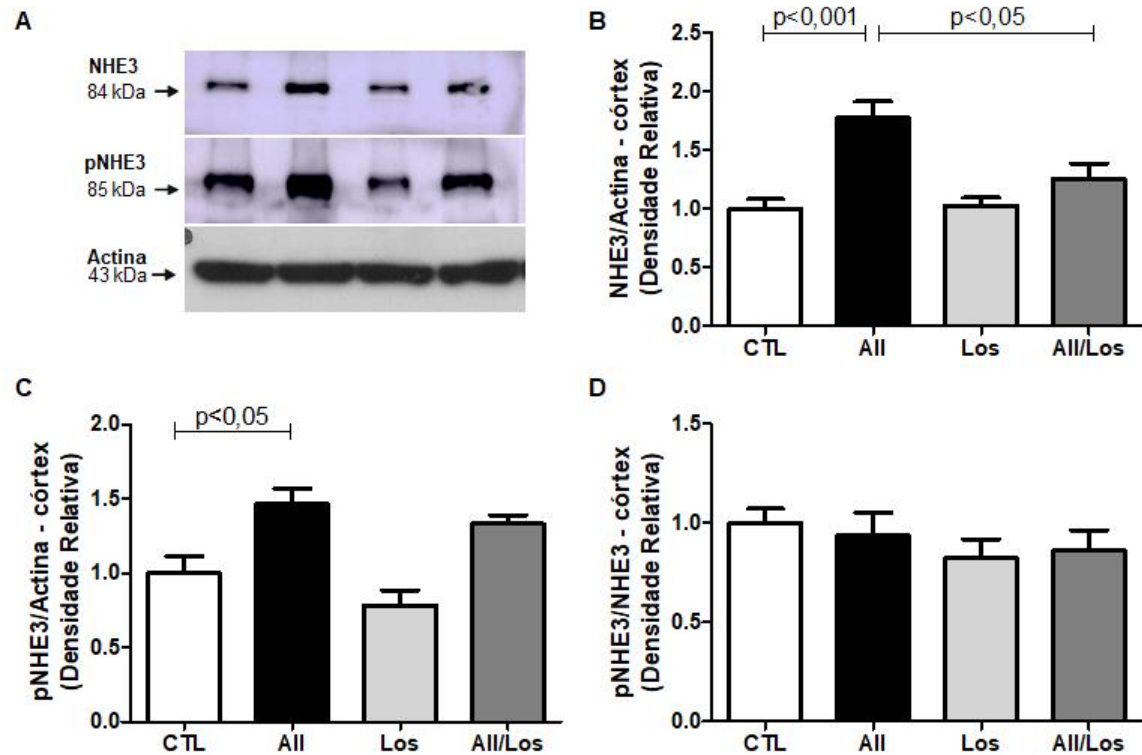


Figura 17: Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão proteica de NHE3 no córtex renal de ratos. Experimentos representativos (A); Valores médios obtidos por análise densitométrica de NHE3 total (B), pNHE3 (C), e razão total/fosforilado (D). Os valores são média \pm EPM, n = 5 – 7.

Tabela 10: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
Proteína NHE3/Actina (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,08 n= 7	1,78 \pm 0,14 ^{***} n= 6	1,03 \pm 0,07 n= 7	1,26 \pm 0,13 [#] n= 5
Proteína pNHE3/Actina (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,11 n= 6	1,47 \pm 0,10 [*] n= 5	0,79 \pm 0,10 n= 5	1,33 \pm 0,06 n= 5
Razão pNHE3/NHE3 (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,07 n=6	0,94 \pm 0,11 n= 4	0,82 \pm 0,09 n= 6	0,86 \pm 0,10 n= 4

^{*}p < 0,05 e ^{***}p < 0,001 versus CTL (controle); [#]p < 0,05 versus All (Angiotensina II).

- *Co-transportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC2)*

O tratamento com Ang II induziu aumento significativo na expressão proteica do co-transportador NKCC2 em relação ao grupo controle (**figura 18 A – B / tabela 11**). No co-tratamento, o losartan reverteu o efeito da Ang II sobre este parâmetro.

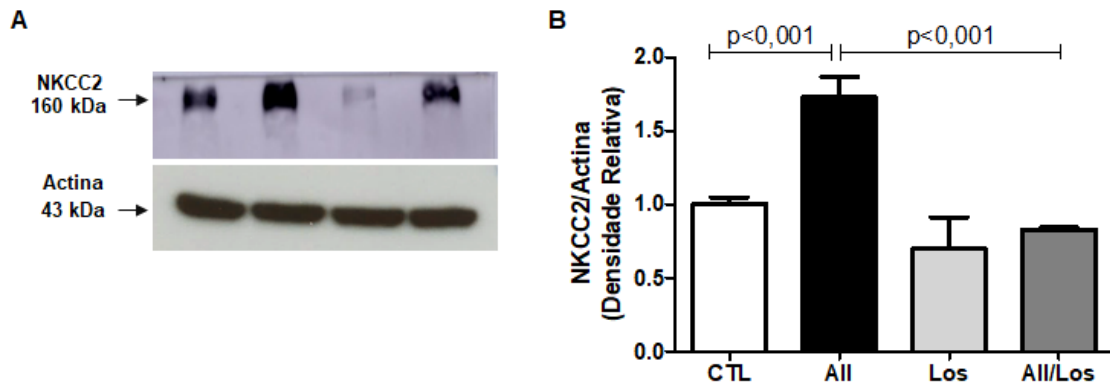


Figura 18: Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão proteica de NKCC2 no córtex renal de ratos. (A) experimento representativo; (B) valores médios obtidos por análise densitométrica. Os valores são média \pm EPM. N = 4 – 6.

Conforme apresentado na **figura 19 A – B / tabela 11**, a análise por imunofluorescência resultou em marcações de NKCC2 na membrana luminal de alças de Henle (segmento espesso) e marcações da Na⁺/K⁺-ATPase na membrana basolateral (controle interno). O tratamento com Ang II induziu aumento da intensidade fluorescente de NKCC2 na membrana luminal em comparação ao grupo controle. No entanto, o co-tratamento com losartan reduziu o efeito da Ang II sobre este parâmetro.

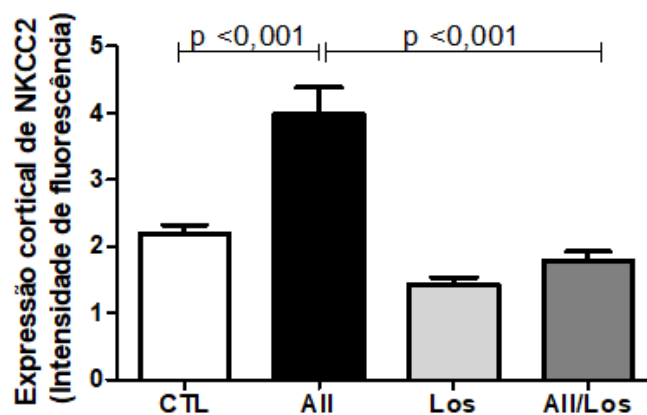
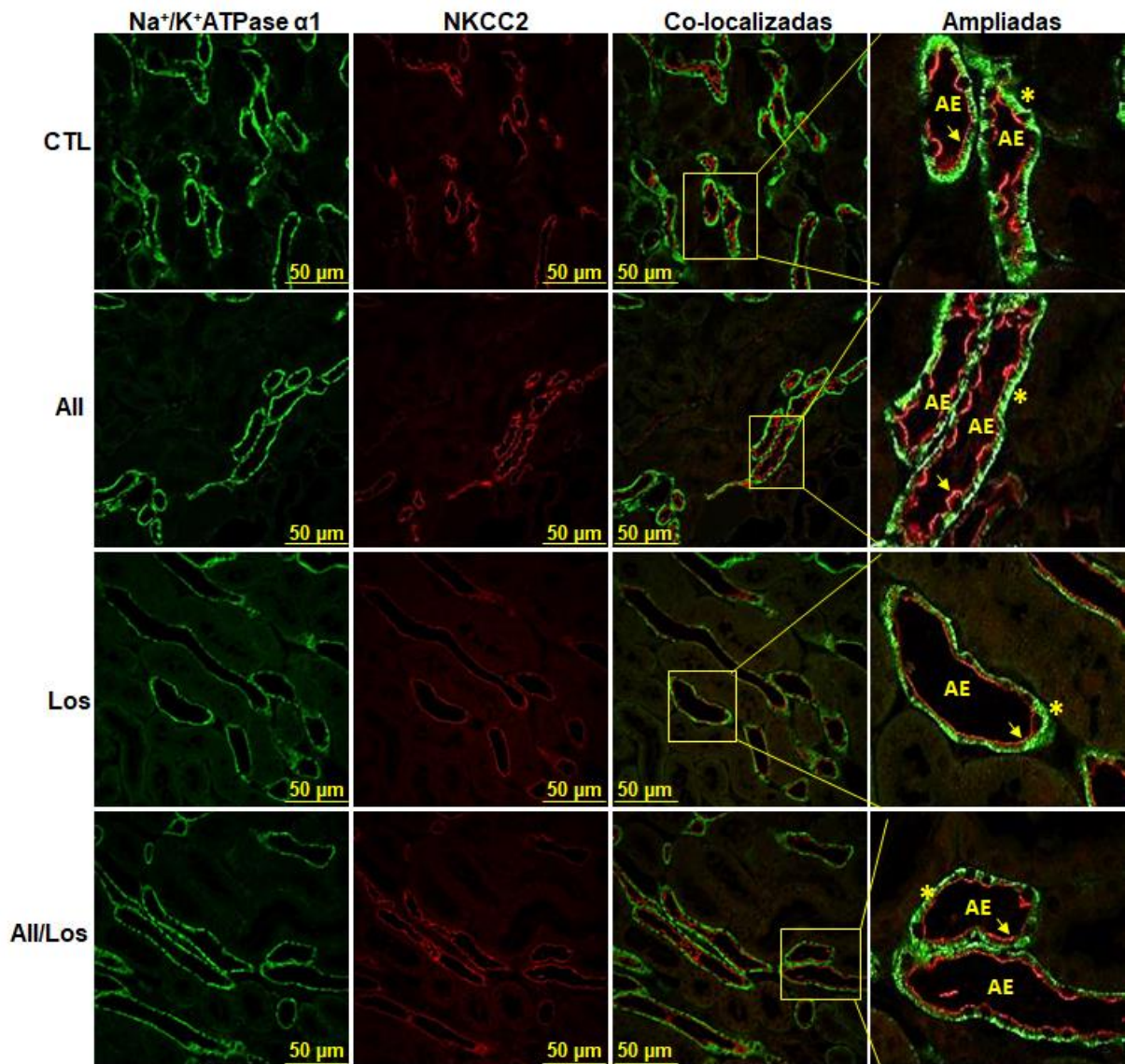


Figura 19: Efeito da Ang II e/ou losartan na distribuição de NKCC2 no córtex renal de ratos. (A) experimento representativo; (B) valores médios obtidos por análise densitométrica. Foram utilizados 5 animais/grupo. As imagens foram capturadas com objetiva 40x. Os valores são média \pm EPM. N = 4 – 6. AE, alça espessa; seta, NKCC2 na membrana luminal; * Na⁺/K⁺ATAPase na membrana basolateral.

Tabela 11: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>Proteína NKCC2/Actina</i> (Unidades Arbitrárias)	1,00 \pm 0,04 n= 6	1,73 \pm 0,14 ^{***} n= 5	0,70 \pm 0,21 n= 4	0,83 \pm 0,01 ^{###} n= 4
<i>Túbulos marcados com NKCC2</i> (Unidades Arbitrárias)	2,19 \pm 0,13 n= 5	3,98 \pm 0,40 ^{***} n= 6	1,42 \pm 0,10 n= 4	1,77 \pm 0,14 ^{###} n= 6

^{***} $p < 0,001$ versus CTL (controle); ^{###} $p < 0,001$ versus All (Angiotensina II).

- *Co-transportador Na⁺/Cl⁻ (NCC)*

O NCC é expresso no túbulo convoluto distal (102) e o tratamento com Ang II induziu aumento significativo na expressão proteica de NCC (**figura 20 A e B / tabela 12**) em comparação ao grupo controle. No co-tratamento, o losartan reverteu o efeito da Ang II sobre este parâmetro.

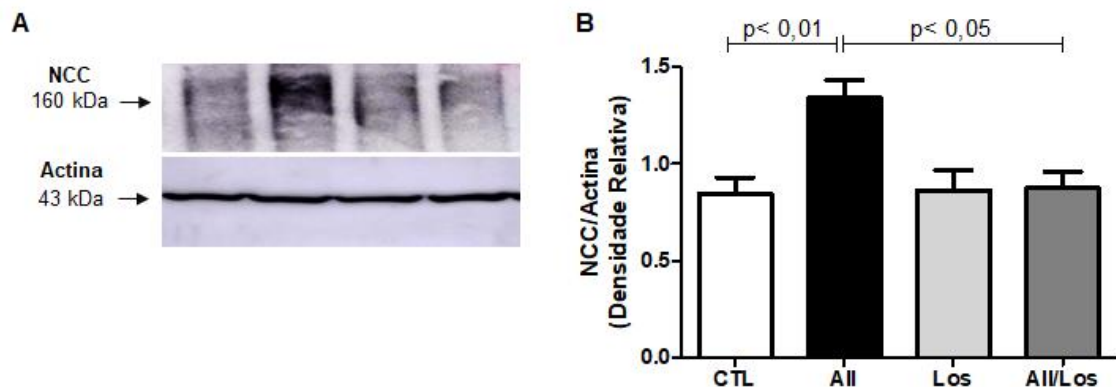


Figura 20: Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão proteica por Western blotting de NCC no córtex renal de ratos. (A) experimento representativo; (B) valores médios obtidos por análise densitométrica. Os valores são média \pm EPM. N = 4 – 6.

Conforme apresentado na **figura 21 / tabela 12**, a análise por imunofluorescência resultou em marcações de NCC na membrana luminal de túbulos distais e marcações da Na⁺/K⁺-ATPase na membrana basolateral (controle

interno). O tratamento com Ang II induziu aumento da intensidade fluorescente de NCC na membrana luminal e o co-tratamento com losartan reduziu este efeito da Ang II.

Tabela 12: Média \pm EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
<i>Proteína NCC/Actina (Unidades Arbitrárias)</i>	0,85 \pm 0,08 n= 4	1,34 \pm 0,09*** n= 4	0,87 \pm 0,10 n= 4	0,88 \pm 0,08### n= 4
<i>Túbulos marcados com NCC (Unidades Arbitrárias)</i>	2,95 \pm 0,38 n= 5	3,87 \pm 0,35* n= 6	1,85 \pm 0,18 n= 4	2,13 \pm 0,10### n= 6

* $p < 0,05$ versus CTL (controle); *** $p < 0,001$ versus CTL; ### $p < 0,001$ versus All (Angiotensina II).

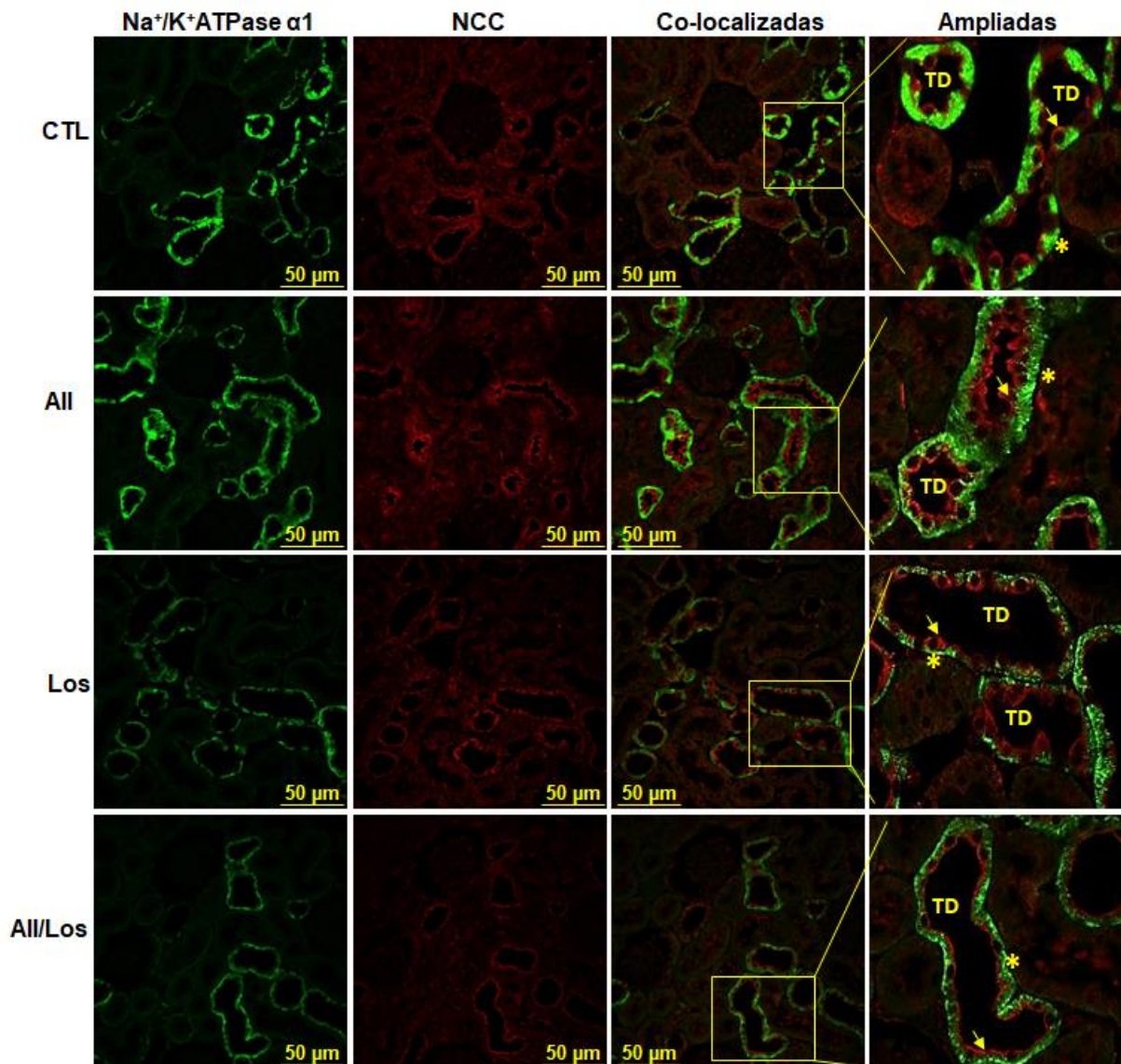


Figura 21: Efeito da Ang II e/ou losartan na distribuição de NCC no córtex renal de ratos. (A) experimento representativo; (B) valores médios obtidos por análise densitométrica. As imagens foram capturadas com objetiva de 40x. (D) representação das médias dos grupos. Os valores são média ± EPM. N = 4 – 6.

- Canal de Na⁺ epitelial sensível à amiloride (ENaC)

Conforme apresentado na **figura 22 / tabela 13**, o tratamento com Ang II não alterou a expressão proteica de ENaC – subunidade alfa (α) no córtex (**A – B**), porém aumentou a expressão de ENaC – subunidade beta (β) em relação ao grupo controle, mas o losartan aboliu este efeito.

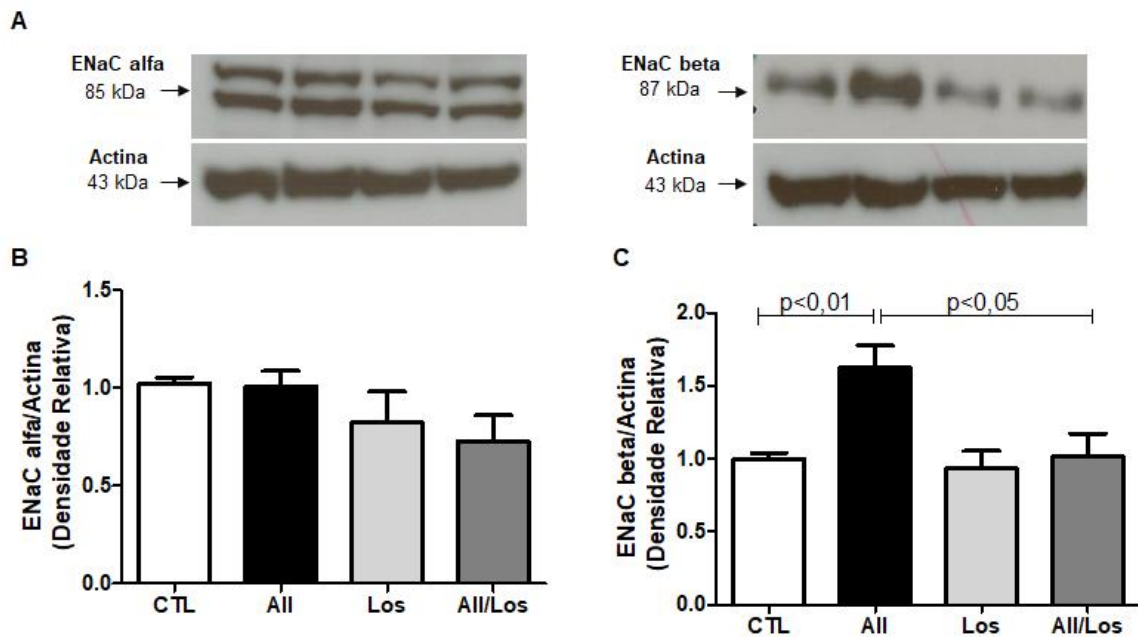


Figura 22: Efeito da Ang II e/ou losartan na expressão proteica de ENaC α (**B**) e β (**C**) no córtex renal de ratos. Imagens representativas (**A**). Os valores médios foram obtidos por análise densitométrica. Os valores são média ± EPM. N = 3 – 6.

Tabela 13: Média ± EPM dos parâmetros avaliados em córtex renal de ratos controles ou tratados com Ang II e/ou losartan.

Parâmetros	CTL	All	Los	All/Los
Proteína ENaC α /Actina (Unidades Arbitrárias)	1,02±0,03 n= 6	1,00±0,08 n= 6	0,83±0,15 n= 6	0,73±0,13 n= 6
Proteína ENaC β /Actina (Unidades Arbitrárias)	1,00±0,04 n= 7	1,62±0,15** n= 6	0,93±0,12 n= 6	1,02±0,16# n= 6

**p < 0,01 versus CTL; #p < 0,05 versus All (Angiotensina II).

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeito da Ang II e/ou losartan no estresse oxidativo, estresse de RE, processos inflamatórios, fibróticos e apoptóticos.

A Ang II é um dos principais estímulos para ativação da NADPH oxidase – complexo enzimático constituído pelas famílias NOX (121) e PHOX (42, 121). Uma vez ativada, a NADPH oxidase passa a gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas importantes para o desenvolvimento de várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares associadas à hipertensão arterial (22) e doenças renais (106). Os rins expressam NOX1, NOX2 e principalmente NOX4 (121). Embora a função da NOX1 e da NOX2 não seja bem definida nesses órgãos, sabe-se que a NOX2 é regulada pelas enzimas p22^{phox} e p47^{phox} (42, 121). A NOX4, que também é regulada pela p22^{phox}, é a mais importante fonte de EROs intrarrenal (121) e está associada aos eventos patológicos que culminam na injúria de mesângio, podócitos e células tubulares renais (42).

Estudos de função vascular demonstram que animais hipertensos por infusão de Ang II apresentam aumento da produção de ânion superóxido e da atividade da NADPH oxidase nas células vasculares (90, 141). Nesse modelo, além de ativar a NADPH oxidase, a Ang II também aumenta a expressão de p22^{phox}, NOX1 e NOX4 em aorta. Em estudos com cultura de células isoladas de músculo liso de artérias, se observou que a Ang II estimula a expressão de p22^{phox} e p47^{phox} (22). Nossos resultados vão de encontro com esses achados, visto que o tratamento crônico com Ang II induziu, via receptor AT1, significativo aumento na expressão de NOX2, NOX4, p22^{phox} e p47^{phox}, sugerindo uma relevante participação da NADPH oxidase na lesão renal crônica induzida por Ang II.

O acúmulo de EROs intracelular pode contribuir para alterações funcionais no retículo endoplasmático e potencializar o estresse de RE (30). Nessa condição, o RE deixa de realizar uma das funções mais importantes que é o enovelamento de proteínas. O enovelamento de proteínas nas conformações corretas é um processo que consome energia, e condições oxidantes são necessárias para a formação de ligações dissulfeto intramoleculares e intermoleculares. Quando o estresse de RE

persiste a via PERK/eIF2 α /ATF4 é potencializada e nessa condição, o ATF4 induz a transcrição de CHOP, o qual induz aumento da produção de EROs no RE e ativa proteínas apoptóticas em resposta ao estresse de RE (95). A via PERK da UPR pode ativar respostas antioxidantes traduzindo preferencialmente RNAm que codifica o fator de transcrição ATF4, que induz a transcrição de genes cujos produtos mantêm o nível de glutathiona, o principal tampão redox na célula (39, 54). Em nosso estudo, observamos que a Ang II via AT1, induziu aumento da fosforilação de PERK e do eIF2 α , além de aumentar a expressão de RNAm para ATF4, sugerindo contribuição do estresse de retículo endoplasmático no processo de lesão renal crônica induzida por Ang II.

O ATF4, produto do estresse de retículo endoplasmático fosforila o fator Nrf2 que transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição de um conjunto de enzimas antioxidantes e desintoxicantes, incluindo heme oxigenase -1 (HO-1), superóxido dismutase 1 (SOD1), NAD(P)H desidrogenase [quinone] 1 (NQO1), sulfiredoxina (SRXN), tioredoxina (TRX), ferritina (Ft), além de genes relacionados com o metabolismo da glutathiona, como a glutamato-cisteina ligase (GCL) e a glutathiona peroxidase (GPX) (3, 9, 29, 136). Essa função mediada por Nrf2 desempenha papel crítico na defesa contra citotoxicidade induzida por estresse oxidativo e lesão tecidual (79). Conseqüentemente, a atividade do Nrf2 é fundamental para manter o balanço redox em condições normais, e sua indução em resposta ao estresse oxidativo é essencial para a proteção contra lesão tecidual. A incapacidade de ação de Nrf2 pode resultar em inflamação e progressão de doenças renais crônicas em modelos de nefrectomia 5/6 (67), nefropatia tubulointersticial (5), nefropatia diabética (145) e em modelo de glomeruloesclerose focal espontânea (6, 66). Portanto, nossos dados vão de encontro com esses achados, uma vez que observamos uma diminuição da expressão gênica de Nrf2 no grupo tratado com Ang II. A inativação de Nrf2 depende da ação de Keap1, cuja expressão está aumentada no grupo tratado cronicamente com Ang II. Em conjunto, esses resultados apontam que a Ang II/AT1 induz um desbalanço no estado redox.

Em outros tecidos, as EROs induzem ativação de genes responsáveis pelos processos inflamatórios e no rim as EROs, incluindo o peróxido de hidrogênio, regula a transcrição do NF κ B (91), fator que estimula a expressão de vários genes incluindo os das citocinas como IL1 e IL6 e o TNF α (16). Além disso, foi demonstrado que a ativação de NF κ B pode estar também associada ao estresse de

retículo endoplasmático decorrente do estresse oxidativo (45). Assim, em resposta ao estresse de retículo, o eIF2 α pode estimular a via de ativação do NF κ B (44). Nossos resultados indicam que no tratamento crônico, a Ang II via receptor AT1 regula a expressão de RNAm para NF κ B e possivelmente o processo inflamatório, condição essencial para a progressão da DRC (1, 116).

Além do processo inflamatório, a fibrose também está presente na DRC associada a outras nefropatias, como aquelas associadas ao diabetes, por exemplo (1, 116). Na progressão da doença renal as citocinas atuam nas células renais (células tubulares, mesangiais e fibroblastos) para induzir proliferação e alterações fenotípicas. Essas células, principalmente os fibroblastos, passam a expressar o α SMA e aumentar a produção de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (147). Além disso, um estudo anterior do nosso grupo observou que ratos tratados com Ang II pelo mesmo período apresentaram aumento de TGF β via receptor AT1 (26), portanto, nossos resultados confirmam o processo fibrótico induzido por Ang II via AT1, uma vez que observamos um relevante aumento da expressão gênica e proteica de α SMA no modelo estudado.

Considerando que tanto o estresse oxidativo quanto o estresse de retículo estimula eventos celulares associados à apoptose, avaliamos a expressão de RNAm para os componentes apoptóticos como a Bcl-2 e Bax que atuam como reguladores anti e pró-apoptóticos, respectivamente, porém não encontramos diferença na razão Bax/Bcl-2, observamos somente alterações na expressão de RNAm para Bcl-2 com infusão crônica de Ang II. Evidências mostram que a superexpressão de Bcl-2 bloqueia as mudanças associadas com a Bax em células apoptóticas, o que pode justificar os nossos resultados. Uma possibilidade é que proteínas de pró-sobrevivência da família Bcl-2 possam tornar inacessíveis proteínas ou ambientes lipídicos na membrana mitocondrial que são necessários para a ativação de Bax. Alternativamente, as moléculas de pró-sobrevivência podem sequestrar Bax, restringindo-a através de uma interação direta. É possível, também, que Bcl-2 possa ligar-se a Bax nas mitocôndrias seguindo um estímulo apoptótico para impedir a sua ativação e oligomerização adicionais nos poros condutores do citocromo C (135). Porém, ainda assim, avaliamos a expressão proteica das Caspases 3, 8 e 12, mas também, não vimos diferenças significativas entre os diferentes grupos (dados não mostrados). Além disso, foram realizadas análises de expressão gênica e proteica para CHOP, um importante fator que reduz a atividade da proteína anti-apoptótica

Bcl-2, induz aumento da produção de EROs no RE e ativa vias pró-apoptóticas mediadas pela calmodulina cinase II (CaMKII) (95), porém, também, não vimos alterações nos diferentes grupos em relação a expressão gênica, e tivemos problemas vinculados ao uso de anticorpos, em relação a expressão proteica. Sugerimos então, que a apoptose neste modelo experimental pode não estar ocorrendo pela via da CHOP.

6.2 Efeito da Ang II e/ou losartan nos transportadores de sódio e hidrogênio.

Considerando a importância da Ang II na injúria tubular renal e a importância do transporte de íons no rim para a manutenção do balanço hidroeletrólítico e do pH do meio interno, pode-se considerar pertinente investigar a expressão proteica dos principais transportadores de sódio e hidrogênio renais na DRC associada à exposição crônica de Ang II. Em estudo anterior (26), nosso grupo observou que no grupo tratado com Ang II por 42 dias a hiperfiltração glomerular induzida por Ang II via receptor AT1 foi acompanhada pelo aumento do fluxo urinário, da filtração e da excreção de Na^+ . Entretanto, não alterou a fração de filtração do íon, sugerindo um balanço de Na^+ para a manutenção do volume do fluido extracelular. A excreção de Na^+ é bastante complexa, uma vez que depende da dose e duração do tratamento com Ang II, bem como da magnitude da resposta hipertensiva (149). Estudos que utilizaram a infusão crônica de Ang II por duas semanas demonstram que inicialmente a Ang II induz retenção de Na^+ , mesmo depois de alguns dias, quando começa o balanço do íon, apesar de persistir a hipertensão arterial (82). No estudo atual, nossos dados apontam que em longo prazo, a Ang II via receptor AT1 atua sobre múltiplos mecanismos para manter o balanço de Na^+ , principalmente no túbulo proximal (maior sítio de reabsorção) e nos segmentos mais distais do néfron (responsáveis pelo ajuste fino do transporte de Na^+). Sendo assim, avaliamos a expressão de NHE1, que é importante para regulação do pH e volume intracelular (137, 138) e no rim encontra-se na membrana basolateral de todas as células dos múltiplos segmentos do néfron (12), e observamos um aumento em sua expressão no grupo tratado com Ang II o que contribui para a homeostase ácido-base e volume celular, além do que, é considerado um fator de sobrevivência crítico, que pode

regular aspectos-chave da progressão da DRC (113). Outro ponto importante, é que a produção de EROs pode estar a montante da ativação do NHE1, induzida por Ang II, como demonstrado em cardiomiócitos (35) e vai de acordo com os nossos resultados. Além disso, a inibição do NHE1 pode atenuar o estresse de RE prolongado e prevenir apoptose (68).

Observamos também, um efeito positivo da Ang II via AT1 na expressão de NHE3 total e concomitante aumento na expressão de NHE3 fosforilado (inativo), o que sugere uma resposta do túbulo proximal em contribuir para restabelecer o ajuste fino da reabsorção de Na^+ e manter a homeostase do volume do fluido extracelular apesar dos estímulos da Ang II. É bem conhecido que a atividade do NHE3 é reduzida pela fosforilação da S552, devido a modulação da atividade do NHE3 em resposta a estímulos que pode envolver alterações no número de transportadores presentes na membrana, ou seja, a atividade deste transportador pode ser modificada sem que ocorra alterações na expressão total em córtex renal, o que pode explicar a razão pNHE3/NHE3 estar inalterada. Contudo, este resultado pode justificar o aumento na excreção de Na^+ observado anteriormente nesse grupo de animais. Além disso, dados da literatura referente à modulação desse trocador mostraram que em modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 12 semanas, estágio no qual a hipertensão já está bem estabelecida, ocorre uma redistribuição do NHE3, sugerindo que este trocador passa por uma compensação homeostática ao aumento da pressão arterial (84).

Em conjunto, nossos resultados corroboram com outros estudos, nos quais foram avaliados os efeitos da Ang II por períodos mais curtos na expressão de transportadores de Na^+ . Sandbeg e colaboradores (110) observaram que a infusão de Ang II por 20 minutos não alterou a pressão arterial, mas aumentou a reabsorção de Na^+ devido ao efeito estimulatório da Ang II sobre o NHE3 e sobre o co-transporte isoforma 2 (NaPi2). No entanto, a infusão do peptídeo por duas semanas resultou em hipertensão arterial e natriurese (86, 93). Nessa condição, a Ang II reduziu a expressão de transportadores de Na^+ no túbulo proximal e aumentou a expressão dos transportadores do néfron distal, incluindo a alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (93). Nosso estudo confirmou a natriurese com Ang II por 42 dias.

Outro ponto importante que vale ressaltar, é que as EROs têm efeitos específicos no transporte tubular de Na^+ e na reabsorção de fluidos, diminuindo a

reabsorção de Na^+ no túbulo proximal (100), e aumentando a reabsorção na alça de Henle e nos segmentos distais do néfron (123, 127).

O NKCC2 é expresso na membrana apical de células epiteliais da porção espessa ascendente da alça de Henle e em nosso estudo, sua expressão foi aumentada com a infusão crônica de Ang II e ativação do AT1. E já foi relatado anteriormente que a hipertensão induzida por Ang II por 2 semanas estimulou significativamente a abundância cortical de NKCC2 (87). Contudo, evidências indicaram que os produtos relacionados com ânions superóxido desempenham um papel na estimulação da reabsorção renal de Na^+ e água e que o H_2O_2 estimula a troca de Na^+/H^+ luminal e o co-transportador NKCC2 no ramo ascendente espesso da alça de Henle (61, 62).

O NCC, por sua vez, é expresso no túbulo convoluto distal (102), e também é uma proteína alvo para a ação da aldosterona na regulação da excreção de Na^+ . E em nosso estudo o tratamento com Ang II por 42 dias induziu aumento significativo na expressão proteica de NCC e o losartan reverteu o efeito da Ang II sobre este parâmetro. Esses resultados vão de acordo com dados na literatura, onde foi demonstrado um aumento na estimulação de transportadores de Na^+ durante a hipertensão induzida por Ang II (93), e que essa estimulação do transportador pode ser secundária à estimulação da secreção de aldosterona durante a infusão de Ang II (98). Além disso, existem evidências que demonstram que a albuminúria estimula o estresse oxidativo mitocondrial e ativa o SRAA intrarenal, o que leva à alta regulação de NCC (59).

Por outro lado, observamos um aumento na expressão proteica apenas da subunidade β (córtex) do ENaC, o que era esperado não só pelo efeito da Ang II via AT1 na expressão da proteína, mas também pela ação da Ang II/AT1 na produção de aldosterona, mineralocorticoide importante na expressão de ENaC nas células principais do néfron distal (115). Porém, não observamos alteração significativa da subunidade α no córtex no tratamento com Ang II. É comum que as subunidades de ENaC sejam reguladas diferencialmente (58) e sabe-se que a síntese da subunidade α de ENaC foi sugerida como um fator limitante de taxa do complexo multimérico de ENaC, com isso o transporte de Na^+ poderia ser proporcional à abundância dos níveis de proteína α ENaC. No entanto, já foi demonstrado que o aumento da atividade de ENaC e do transporte de Na^+ foi associado ao aumento da expressão das subunidades β e γ de ENaC em células do ducto coletor de rato, na ausência de

alterações na subunidade α . Além disso, Kim SW e colaboradores mostraram um aumento significativo das subunidades β e γ em associação com a expressão da subunidade α mantida, em modelos SHR (70). Além disso, no néfron distal, a aldosterona aumenta a transcrição de α ENaC, mas não a de β e γ ENaC (125) e a exposição prolongada a níveis elevados de vasopressina circulante estimula um aumento acentuado nas abundâncias das proteínas da subunidade β e γ , com pouco ou nenhum efeito na abundância da subunidade α (46), ou seja, esses achados confirmam que as subunidades são reguladas independentes uma da outra e corroboram com os nossos resultados, sugerindo assim que a subunidade β de ENaC pode contribuir significativamente para o aumento da reabsorção de Na^+ tubular renal e para patogênese do desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão. Contudo, vale ressaltar que, quando a Ang II estimula a NADPH oxidase, aumenta a geração de ânion superóxido o qual tem um papel importante na estimulação de ENaC (56, 109). Além disso, a confirmação de que a inibição da Nox aboliu o efeito de Ang II em ENaC sugere fortemente que as EROs estão envolvidas na mediação do efeito estimulador de Ang II no ENaC e que a estimulação induzida por Ang II na geração de ânion superóxido é através da ativação de AT1 (28, 109, 142) e anteriormente foi demonstrado que a inibição de AT1 diminuiu significativamente a geração de superóxido em túbulos renais (60), o que vai de acordo com os nossos resultados. No entanto, o mecanismo pelo qual os ânions superóxido estimulam ENaC no tecido renal ainda não é claro.

O esquema de vias propostas no estudo atual está demonstrado na **figura 23**.

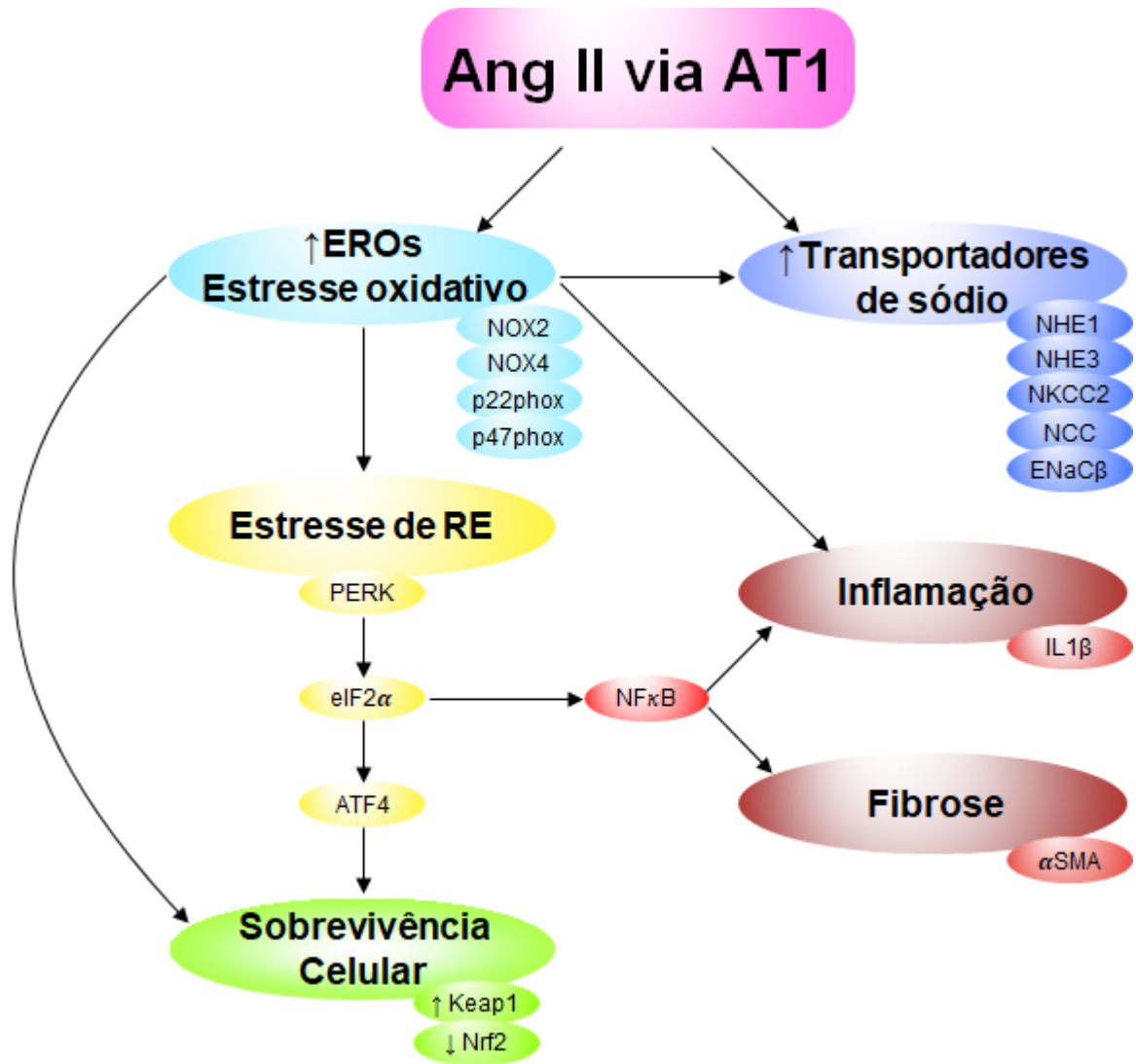


Figura 23: Esquema das vias propostas.

7 CONCLUSÕES

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

- A expressão gênica e/ou proteica para moléculas associadas:
 - Ao estresse oxidativo;
 - Ao estresse de RE;
 - À inflamação;
 - À fibrose renal.

- Regular o manejo de Na⁺ tubular por induzir aumento na expressão de:
 - NHE1;
 - NHE3 total e fosforilado;
 - NKCC2;
 - NCC; e
 - Subunidade β do ENaC (córtex).

8 REFERÊNCIAS*

1. **Abbate M, Zoja C, and Remuzzi G.** How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17: 2974-2984, 2006.
2. **Aires.** *Fisiologia*. 2012.
3. **Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, and Cook JL.** Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274: 26071-26078, 1999.
4. **Allen AM, Zhuo J, and Mendelsohn FA.** Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S23-29, 1999.
5. **Aminzadeh MA, Nicholas SB, Norris KC, and Vaziri ND.** Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28: 2038-2045, 2013.
6. **Aminzadeh MA, Sato T, and Vaziri ND.** Participation of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of spontaneous glomerulosclerosis--role of intrarenal angiotensin system. *Transl Res* 160: 309-318, 2012.
7. **Ares GR, Caceres PS, and Ortiz PA.** Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F1143-1159, 2011.
8. **Bader M.** Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 439-465, 2010.
9. **Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, and Brigelius-Flohe R.** The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 25: 4914-4923, 2005.
10. **Bedard K, Lardy B, and Krause KH.** NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie* 89: 1107-1112, 2007.
11. **Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, and Ron D.** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326-332, 2000.
12. **Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, and Aronson PS.** Immunocytochemical characterization of Na(+)-H+ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am J Physiol* 263: F833-840, 1992.
13. **Biemesderfer D, Rutherford PA, Nagy T, Pizzonia JH, Abu-Alfa AK, and Aronson PS.** Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol* 273: F289-299, 1997.
14. **Birn H, and Christensen EI.** Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int* 69: 440-449, 2006.
15. **Bolívar JJ.** Essential Hypertension: An Approach to Its Etiology and Neurogenic Pathophysiology. *Int J Hypertens* 2013: 547809, 2013.

*De acordo com:

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

16. **Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, and Runge MS.** Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 212: 155-169, 2000.
17. **Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, and Lavandero S.** Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* 301: 215-290, 2013.
18. **Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL, Hsieh TJ, Guo DF, Hébert MJ, Ingelfinger JR, Filep JG, and Chan JS.** Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int* 69: 1977-1985, 2006.
19. **Brinkkoetter PT, Holtgreffe S, van der Woude FJ, and Yard BA.** Angiotensin II type 1-receptor mediated changes in heparan sulfate proteoglycans in human SV40 transformed podocytes. *J Am Soc Nephrol* 15: 33-40, 2004.
20. **Buckalew VM, Berg RL, Wang SR, Porush JG, Rauch S, and Schulman G.** Prevalence of hypertension in 1,795 subjects with chronic renal disease: the modification of diet in renal disease study baseline cohort. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Am J Kidney Dis* 28: 811-821, 1996.
21. **Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, and Luno J.** Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* S4-9, 2008.
22. **Cai H, Griendling KK, and Harrison DG.** The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24: 471-478, 2003.
23. **Cano A, Miller RT, Alpern RJ, and Preisig PA.** Angiotensin II stimulation of Na-H antiporter activity is cAMP independent in OKP cells. *Am J Physiol* 266: C1603-1608, 1994.
24. **Cardiologia SBd.** 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial.
25. **Carey RM, and Padia SH.** Role of angiotensin AT(2) receptors in natriuresis: Intrarenal mechanisms and therapeutic potential. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40: 527-534, 2013.
26. **Casare FA, Thieme K, Costa-Pessoa JM, Rossoni LV, Couto GK, Fernandes FB, Casarini DE, and Oliveira-Souza M.** Renovascular remodeling and renal injury after extended angiotensin II infusion. *Am J Physiol Renal Physiol* ajprenal.00471.02015, 2016.
27. **Castrop H, and Schießl IM.** Physiology and pathophysiology of the renal Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2). *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F991-F1002, 2014.
28. **Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, and Wilcox CS.** Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R117-124, 2003.

29. **Chan JY, and Kwong M.** Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 1517: 19-26, 2000.
30. **Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, and Ravanan P.** A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8: 213, 2014.
31. **Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, and Kunsch C.** Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1862-1870, 2006.
32. **Cheng YC, Chen CA, Chang JM, and Chen HC.** Albumin overload down-regulates integrin- β 1 through reactive oxygen species-endoplasmic reticulum stress pathway in podocytes. *J Biochem* 158: 101-108, 2015.
33. **Cho JH, Musch MW, Bookstein CM, McSwine RL, Rabenau K, and Chang EB.** Aldosterone stimulates intestinal Na⁺ absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am J Physiol* 274: C586-594, 1998.
34. **Chow BS, Kocan M, Bosnyak S, Sarwar M, Wigg B, Jones ES, Widdop RE, Summers RJ, Bathgate RA, Hewitson TD, and Samuel CS.** Relaxin requires the angiotensin II type 2 receptor to abrogate renal interstitial fibrosis. *Kidney Int* 86: 75-85, 2014.
35. **Cingolani OH, Perez NG, Ennis IL, Alvarez MC, Mosca SM, Schinella GR, Escudero EM, Console G, and Cingolani HE.** In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy. *Pflugers Arch* 462: 733-743, 2011.
36. **Colognato H, Winkelmann DA, and Yurchenco PD.** Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol* 145: 619-631, 1999.
37. **Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, and Levey AS.** Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298: 2038-2047, 2007.
38. **Costa-Pessoa JM, Figueiredo CF, Thieme K, and Oliveira-Souza M.** The regulation of NHE1 and NHE3 activity by angiotensin II is mediated by the activation of the angiotensin II type I receptor/phospholipase C/calcium/calmodulin pathway in distal nephron cells. *Eur J Pharmacol* 2013.
39. **Cullinan SB, and Diehl JA.** PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279: 20108-20117, 2004.
40. **Cybulsky AV.** Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 13: 681-696, 2017.
41. **D'Agati VD, Kaskel FJ, and Falk RJ.** Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 365: 2398-2411, 2011.

42. **Datla SR, and Griendling KK.** Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. *Hypertension* 56: 325-330, 2010.
43. **de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, and Unger T.** International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-472, 2000.
44. **Deng J, Lu PD, Zhang Y, Scheuner D, Kaufman RJ, Sonenberg N, Harding HP, and Ron D.** Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 24: 10161-10168, 2004.
45. **Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, and Brenner C.** Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27: 285-299, 2008.
46. **Ecelbarger CA, Kim GH, Wade JB, and Knepper MA.** Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin. *Exp Neurol* 171: 227-234, 2001.
47. **El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, Burtin M, Broueilh M, Heidet L, Mollet G, Druilhe A, Antignac C, Knebelmann B, Friedlander G, Bienaimé F, Gallazzini M, and Terzi F.** Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun* 7: 10330, 2016.
48. **Gilmore TD.** The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844, 1999.
49. **Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, and Hsu CY.** Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351: 1296-1305, 2004.
50. **Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, and Abboud HE.** Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F219-229, 2003.
51. **Granger JP, and Schnackenberg CG.** Renal mechanisms of angiotensin II-induced hypertension. *Semin Nephrol* 20: 417-425, 2000.
52. **Hallan SI, Øvrehus MA, Romundstad S, Rifkin D, Langhammer A, Stevens PE, and Ix JH.** Long-term trends in the prevalence of chronic kidney disease and the influence of cardiovascular risk factors in Norway. *Kidney Int* 90: 665-673, 2016.
53. **Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, and Ron D.** Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5: 897-904, 2000.
54. **Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, and Ron D.** An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11: 619-633, 2003.

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

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

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

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

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

124. **Siragy HM, and Carey RM.** The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100: 264-269, 1997.
125. **Snyder PM.** Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology* 146: 5079-5085, 2005.
126. **Stevenson KM, Edgley AJ, Bergström G, Worthy K, Kett MM, and Anderson WP.** Angiotensin II infused intrarenally causes preglomerular vascular changes and hypertension. *Hypertension* 36: 839-844, 2000.
127. **Sun P, Yue P, and Wang WH.** Angiotensin II stimulates epithelial sodium channels in the cortical collecting duct of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F679-687, 2012.
128. **Tesauro M, Mascali A, Franzese O, Cipriani S, Cardillo C, and Di Daniele N.** Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. *Int J Hypertens* 2012: 943605, 2012.
129. **Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, and Thomas PE.** Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278: 12384-12389, 2003.
130. **Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, and Martins CT.** Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol* 41: 208-214, 2019.
131. **Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, and Franzoso G.** The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol* 22: 557-566, 2012.
132. **Touyz RM, and Berry C.** Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35: 1001-1015, 2002.
133. **Touyz RM, and Schiffrin EL.** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122: 339-352, 2004.
134. **Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, and Donowitz M.** Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem* 267: 9340-9346, 1992.
135. **van Delft MF, and Huang DC.** How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 16: 203-213, 2006.
136. **Venugopal R, and Jaiswal AK.** Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14960-14965, 1996.
137. **Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, and Shigekawa M.** Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective. *J Biol Chem* 269: 13710-13715, 1994.

138. **Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, and Pouysségur J.** The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2424-2428, 1992.
139. **Wallner EI, Wada J, Tramonti G, Lin S, and Kanwar YS.** Status of glucose transporters in the mammalian kidney and renal development. *Ren Fail* 23: 301-310, 2001.
140. **Wang CT, Chin SY, and Navar LG.** Impairment of pressure-natriuresis and renal autoregulation in ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F319-325, 2000.
141. **Wassmann S, Wassmann K, and Nickenig G.** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44: 381-386, 2004.
142. **Welch WJ.** Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 52: 51-56, 2008.
143. **Wolf G.** Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie* 19: 451-456, 1998.
144. **Wolf G, Butzmann U, and Wenzel UO.** The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 93: P3-13, 2003.
145. **Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, Yamada A, Takeuchi M, Yamagishi S, Morito N, Nakano T, Ojima M, Shimohata H, Itoh K, Takahashi S, and Yamamoto M.** Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells* 13: 1159-1170, 2008.
146. **Yoshioka K, Tohda M, Takemura T, Akano N, Matsubara K, Ooshima A, and Maki S.** Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen. *J Pathol* 162: 141-148, 1990.
147. **Zhang G, Moorhead PJ, and el Nahas AM.** Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol* 3: 308-318, 1995.
148. **Zhang K, and Kaufman RJ.** From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454: 455-462, 2008.
149. **Zhao D, Seth DM, and Navar LG.** Enhanced distal nephron sodium reabsorption in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension* 54: 120-126, 2009.
150. **Zoja C, Benigni A, and Remuzzi G.** The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 29 Suppl 1: i19-i24, 2014.