



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Priscila Gomes Pereira

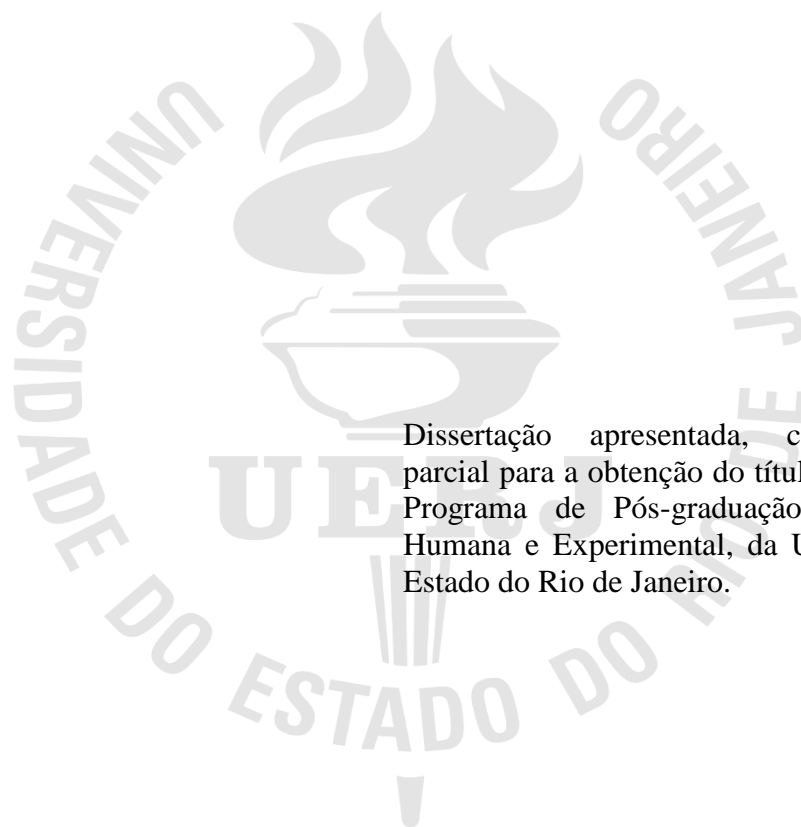
**Efeitos da administração do Alisquireno em rins de ratos com hipertensão  
renovascular (2R1C)**

Rio de Janeiro

2018

Priscila Gomes Pereira

**Efeitos da administração do Alisquireno em rins de ratos com hipertensão renovascular**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P436 Pereira, Priscila Gomes.

Efeitos da administração do Alisquireno rins de ratos com hipertensão renovascular / Priscila Gomes Pereira – 2018.  
69 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Hipertensão renovascular - Teses. 2. Rins - Doenças – Teses. 3. Sistema renina-angiotensina – Efeito das drogas – Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12-008.331.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Priscila Gomes Pereira

**Efeitos da administração do Alisquireno em rins de ratos com hipertensão renovascular**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

---

Prof. Dr. Geraldo Oliveira da Silva Junior

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

---

Dr. Marciano Viana Paes

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

## **DEDICATÓRIA**

Dedico todo o meu esforço à Deus e à  
todas as pessoas que me amam e me querem bem.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, Àquele em que tenho fé e creio ter me guiado nessa caminhada árdua: Deus.

Ao meu orientador e professor Doutor Jorge José de Carvalho pela oportunidade, orientação, compreensão e atenção, tornando possível a realização e concretização dessa dissertação.

A Jemima Fuentes, por ser tão solícita quando mais precisamos! Só tenho a agradecer a você por toda a ajuda e momentos de descontração com suas histórias.

A Kíssila e Bianca, minhas amigas de laboratório e da vida! Agradeço muito a vocês por todos os conselhos, conversas produtivas, gargalhadas e por se fazerem tão presente para me ajudar nos momentos mais indecisos e conturbados. A amizade e companhia de vocês tornou tudo muito mais leve. Construimos um relacionamento de carinho, que será para sempre. Amo vocês!

A Polyana Cury Marinho, por sua amizade. A distância existe, mas a nossa amizade é maior do que isso.

A Ana Lúcia Rosa Nascimento, por sempre estar disponível para ajudar. Obrigada pela explicações, conversas e momentos de descontração.

A Desenir, por ter cuidado tão bem dos meus animais em experimentação no biotério.

A todos os integrantes do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual, por todo o companheirismo e espírito de equipe.

Aos meus pais, Elsa da Silva Gomes e Gilson Pinto Pereira (em memória), que sempre me incentivaram a seguir meus sonhos, me dando apoio e inspiração para traçar os caminhos que me levaram a essa conquista. Todas as vezes que o desânimo bate, basta eu lembrar do meu pai chorando de emoção ao saber da minha aprovação no vestibular da UERJ para que eu tenha forças para continuar.

Aos meus avós Belmira da Silva Galhano e José Toste Gomes (em memória) e Ana Pinto Pereira por toda a compreensão, carinho, preocupação e amor ao longo desses anos.

A minha irmã, Gisele Gomes Pereira, por me inspirar simplesmente por existir. Obrigada por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado, escutando minhas dúvidas e questionamentos inacabáveis, me apoiando com muito carinho.

A toda a minha família, por todo o carinho que sempre tiveram por mim, desde o momento em que eu nasci!

Ao meu namorado, Bruno André Gomes da Silva, por estar comigo nessa trajetória me fazendo acreditar que tudo seria possível. Sem você, o caminho percorrido teria sido mais difícil. Agradeço por seu carinho, amor e paciência.

As meninas de iniciação científica, Raíssa, Letícia, Luciana, Vicky, Gabriela e Alexia por serem tão amáveis e prestativas!

A todos os meus amigos, pelo carinho, tempo disponível para ouvir meus problemas, por dividirem comigo suas vidas, por terem me acolhido de uma forma tão carinhosa, por todas as ótimas conversas, por todos os momentos de descontração e pela amizade que será eterna.

As agências de fomento que de maneira direta ou indireta ajudaram com suporte financeiro para a realização desse trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

E a banca examinadora, que disponibilizou seu tempo para agregar conhecimento e fazer parte desta conquista.

## RESUMO

PEREIRA, Priscila Gomes. *Efeitos da administração do Alisquireno em rins de ratos com hipertensão renovascular*. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados persistentes da pressão arterial, sendo uma das principais causas de óbito no mundo. A hipertensão arterial pode ser primária ou secundária. A hipertensão renovascular representa uma das causas mais comuns de hipertensão secundária e seu progresso está associado à isquemia do rim, que leva à superativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), culminando no aumento da liberação de renina e, conseqüentemente, dos níveis de angiotensina II. Esse aumento provoca alterações sistêmicas, como o aumento do volume sanguíneo, vasoconstrição, ativação do sistema nervoso simpático e retenção de sódio e água, resultando na elevação da pressão arterial. Além das alterações sistêmicas, ocorrem alterações locais, como o estresse oxidativo, infiltração de macrófagos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, disfunção e fibrose tecidual no rim. O bloqueio do SRAA reduz a pressão arterial e retarda a progressão da doença renal. O Alisquireno é um fármaco inibidor da renina que otimiza a supressão do SRAA. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar a morfofisiologia do rim esquerdo de ratos *Wistar* machos com hipertensão renovascular após o tratamento com Alisquireno. A fim de induzir a hipertensão, os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico de acordo com o modelo experimental 2 Rins-1 Clipe de Goldblatt, provocando estenose da artéria renal esquerda. Foram analisados parâmetros inerentes à pressão arterial sistólica, níveis plasmáticos e urinários de creatinina, ureia, fósforo, albumina e proteínas, estrutura e ultraestrutura do córtex renal, além de fibrose, inflamação e atividade de metaloproteinases no tecido renal. Nossos resultados evidenciaram que os animais hipertensos tratados com Alisquireno apresentaram redução da pressão arterial e restabelecimento da função renal com diminuição dos níveis de creatinina plasmática e proteínas urinárias. Além disso, foi observado um remodelamento das alterações morfológicas impostas pela hipertensão renovascular através da diminuição de fibrose e expressão de renina, laminina e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-6, bem como a restauração da integridade da barreira de filtração glomerular. Portanto, nossos achados sugerem que o tratamento com Alisquireno possui efeito renoprotetor, atuando na melhora da morfologia, fisiologia e patologia do córtex renal de animais com hipertensão renovascular.

Palavras-chave: Hipertensão. Sistema renina angiotensina aldosterona. Rim. Alisquireno.



## ABSTRACT

PEREIRA, Priscila Gomes. *Effects of Aliskiren administration on kidney of rats with renovascular hypertension*. 2018. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Systemic arterial hypertension is a multifactorial clinical condition characterized by persistent elevated blood pressure levels, which is one of the main causes of death in the world. Hypertension may be primary or secondary. Renovascular hypertension represents one of the most common causes of secondary hypertension and its progress is associated with ischemia of the kidney, leads to the overactivation of the renin angiotensin aldosterone system (RAAS), culminating in an increase of renin release and, consequently, angiotensin II levels, which causes systemic changes such as increased blood volume, vasoconstriction, activation of the sympathetic nervous system and retention of sodium and water, resulting in elevated blood pressure. In addition to systemic alterations, local changes occur, such as oxidative stress, macrophage infiltration, release of proinflammatory cytokines, dysfunction and tissue fibrosis in the kidney. Blockage of RAAS reduces blood pressure and reduces the progression of kidney disease. Aliskiren is a renin-inhibiting drug that optimizes RAAS suppression. In this sense, the present work had as objective to analyze the morphophysiology of the left kidney of male Wistar rats with renovascular hypertension after the treatment with Aliskiren. In order to induce hypertension, the animals were submitted to surgical procedure according to the experimental model 2 Kidney-1 Clip of Goldblatt, causing stenotic left renal artery. The following parameters were analyzed: systolic blood pressure, plasma and urinary levels of creatinine, urea, phosphorus, albumin and proteins, renal cortex structure and ultrastructure, fibrosis and tissue inflammation and metalloproteinase activity. Thus, our results showed that the hypertensive animals treated with Aliskiren presented lower blood pressure and reestablishment of renal function with lower levels of plasma creatinine and urinary proteins. In addition, remodeling of the morphological alterations imposed by renovascular hypertension through the reduction of fibrosis and expression of renin, laminin and pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IL-6, as well as restoration of integrity of the glomerular filtration barrier. Therefore, our findings suggest that the treatment with Aliskiren has renoprotective effect acting on the improvement of the morphology, physiology and pathology of the renal cortex of animals with renovascular hypertension.

Keywords: Hypertension. Renin angiotensin aldosterone system. Kidney. Aliskiren.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição mundial da hipertensão arterial em pacientes com idade superior a 18 anos por país .....	13
Figura 2 –	Representação esquemática do rim .....	16
Figura 3 –	Representação esquemática da ultraestrutura do capilar glomerular e do folheto visceral da cápsula de Bowman .....	17
Figura 4 –	Diagrama simplificado da barreira de filtração glomerular .....	18
Figura 5 –	Prevalência estimada de pacientes em diálise no Brasil .....	24
Figura 6 –	Evolução da pressão arterial sistólica no modelo 2R1C e efeito do tratamento com Alisquireno na pressão arterial sistólica .....	36
Figura 7 –	Fotomicrografias do córtex do rim esquerdo corados com Hematoxilina-Eosina .....	37
Figura 8 –	Fotomicrografias do córtex do rim esquerdo corados com Picro Sirius Red .....	38
Figura 9 –	Quantificação de fibrose no córtex renal esquerdo obtidos pela coloração de Picro Sirius Red .....	39
Figura 10 –	Fotomicrografias do córtex do rim esquerdo corados com Ácido Periódico Schiff .....	40
Figura 11 –	Fotomicrografias do córtex de rim esquerdo marcado com o anticorpo específico para renina .....	41
Figura 12 –	Fotomicrografias do córtex de rim esquerdo marcado com o anticorpo específico para laminina .....	42
Figura 13 –	Quantificação do córtex de rim esquerdo marcado com o anticorpo específico para renina e laminina .....	42
Figura 14 –	Fotomicrografias e quantificação do córtex de rim esquerdo marcado com o anticorpo específico para TNF- $\alpha$ e IL-6 .....	43
Figura 15 –	Fotomicrografias e quantificação do córtex de rim esquerdo marcado com o anticorpo específico para TGF- $\beta$ e IL-10 .....	44
Figura 16 –	Análise ultraestrutural do córtex de rim esquerdo .....	45
Figura 17 –	Quantificação da atividade de MMP-9 .....	46
Figura 18 –	Níveis plasmáticos de creatinina, ureia, fósforo, albumina e proteínas totais dos grupos experimentais .....	48

Figura 19 – Níveis urinários de creatinina, ureia, fósforo, e proteínas dos grupos experimentais .....	50
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Soro albumina bovina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
DAB	Diaminobenzidina
DDSA	Anidrido dodecenil succínico
DMP	2,4 tridimetilaminametilfenol
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
HCl	Ácido clorídrico
HR	Hipertensão renovascular
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
MBG	Membrana basal glomerular
MMP	Metaloproteinase de matriz
NaCl	Cloreto de sódio
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salino
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
2R1C	2 Rins 1 Clipe

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
1.1	<b>Geral</b> .....	28
1.2	<b>Específicos</b> .....	28
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
2.1	<b>Animais e grupos experimentais</b> .....	29
2.2	<b>Indução da hipertensão renovascular</b> .....	30
2.3	<b>Análise da pressão arterial sistólica</b> .....	31
2.4	<b>Excreção urinária, eutanásia e obtenção do sangue e das amostras teciduais</b> .....	31
2.5	<b>Análise bioquímica do plasma e da urina</b> .....	32
2.6	<b>Histoquímica e Imunohistoquímica</b> .....	32
2.7	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	33
2.8	<b>Zimografia</b> .....	34
2.9	<b>Análise Estatística</b> .....	35
3	<b>RESULTADOS</b> .....	36
3.1	<b>Avaliação da pressão arterial sistólica</b> .....	36
3.2	<b>Avaliação histopatológica e quantificação das áreas de fibrose</b> .....	37
3.3	<b>Avaliação e quantificação de alterações na expressão de renina, laminina e citocinas por imunohistoquímica</b> .....	40
3.4	<b>Avaliação da ultraestrutura renal</b> .....	45
3.5	<b>Quantificação da atividade de MMP-9</b> .....	46
3.6	<b>Análises bioquímicas do plasma e da urina</b> .....	46
3.6.1	<u>Análise com tira reagente</u> .....	46
3.6.2	<u>Dosagens bioquímicas do plasma</u> .....	47
3.6.3	<u>Dosagens bioquímicas da urina</u> .....	49
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>ANEXO – Comitê de Ética e Pesquisa</b> .....	69

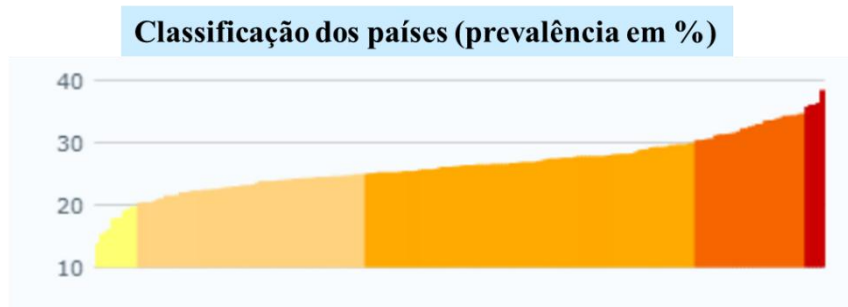
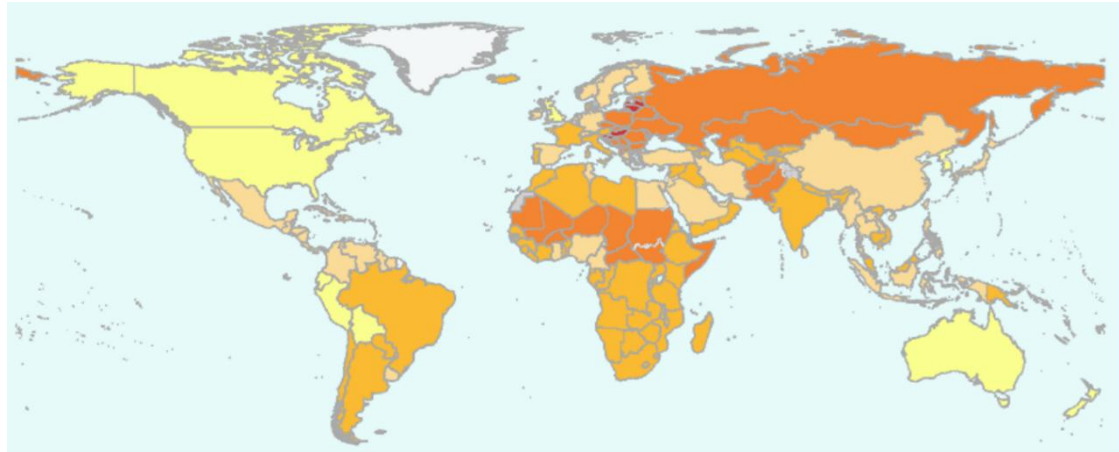
## INTRODUÇÃO

### A hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados persistentes da pressão arterial. A pressão alta ocorre quando a pressão arterial sistólica é igual ou maior a 140 mmHg (milímetros de mercúrio) e diastólica é igual ou maior que 90 mmHg. Associa-se, frequentemente, às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como, por exemplo, no coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e também às alterações metabólicas, que aumentam o risco de disfunções cardiovasculares fatais e não fatais (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). As principais consequências da hipertensão são infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e a doença renal crônica terminal, levando a uma redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (Duncan, Schmidt, Giugliani, 2006; Pullalarevu, Akbar, Teehan, 2014).

A taxa de morte por hipertensão aumentou 13,2% em mais de 190 países pesquisados no período entre 2001 a 2011. O Brasil figura no sexto lugar entre os países com a mais alta taxa de morte por doenças cardíacas, infartos e hipertensão arterial, entre homens e mulheres de 35 a 74 anos. O mesmo estudo mostrou, ainda, que a doença arterial é a principal causa de morte em todo o mundo, com 17,3 milhões por ano, e que se espera para 2030 mais de 23,6 milhões. Segundo a pesquisa, em 2025 haverá 1,6 bilhão de pacientes no mundo. A hipertensão arterial é responsável por 10% de todo o custo global de saúde, com o gasto estimado em US\$ 370 bilhões de dólares por ano. Diante disto, constata-se que a hipertensão é um importante problema de saúde pública, pois apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados (Mozaffarian *et al.*, 2015; Pimenta & Oparil, 2010; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição mundial da hipertensão arterial



Legenda: Distribuição mundial da hipertensão arterial em pacientes com idade superior a 18 anos por país.  
 Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2015.

Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial primária, na maioria dos casos (cerca de 95%) não é possível precisar uma condição médica ou doença específica e conhecida. Fatores genéticos, má alimentação, sedentarismo e obesidade são fatores envolvidos na hipertensão. Em contrapartida, a hipertensão arterial secundária se caracteriza pela existência de um fator desencadeador conhecido, passível ou não de correção. A doença renovascular, doença renal intrínseca, hiperaldosteronismo primário e apnéia obstrutiva do sono representam as causas mais comuns de hipertensão secundária (Pullalarevu, Akbar, Teehan, 2014).

## A hipertensão renovascular

A hipertensão renovascular (HR) é caracterizada pela redução parcial da pressão de perfusão renal, causada por uma lesão estenótica ou obstrutiva de uma ou ambas as artérias renais, levando a um aumento da atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e prejudicando, assim, a excreção de sódio e água (Ledingham, 1971). Sua prevalência é estimada em 2% da população de hipertensos. Entretanto, 7% dos pacientes acima de 65 anos de idade apresentam HR e, em pacientes com doença arterial coronariana ou doença aorto-ilíaca, sua prevalência é de 50%. Além de ser uma das principais causas de hipertensão secundária, a HR é uma importante causa de insuficiência renal, chamada de nefropatia isquêmica, sendo inclusive diagnosticada em pacientes em fase dialítica (Al-Suraih & Grande, 2014; Praxedes, 2004). O grau de obstrução da artéria renal prevê a sobrevivência dos pacientes, sendo que a taxa de sobreviventes ao longo de 4 anos para os pacientes que apresentam oclusão luminal <75% é de 89%, no entanto, nos pacientes com oclusão luminal > 75% é de apenas 57% (Al-Suraih & Grande, 2014).

A HR possui fisiopatologia intimamente relacionada ao SRAA, o qual é um mecanismo fisiológico bem conhecido de controle da pressão arterial, uma vez que é um importante regulador da homeostase eletrolítica renal (Navar *et al.*, 1998).

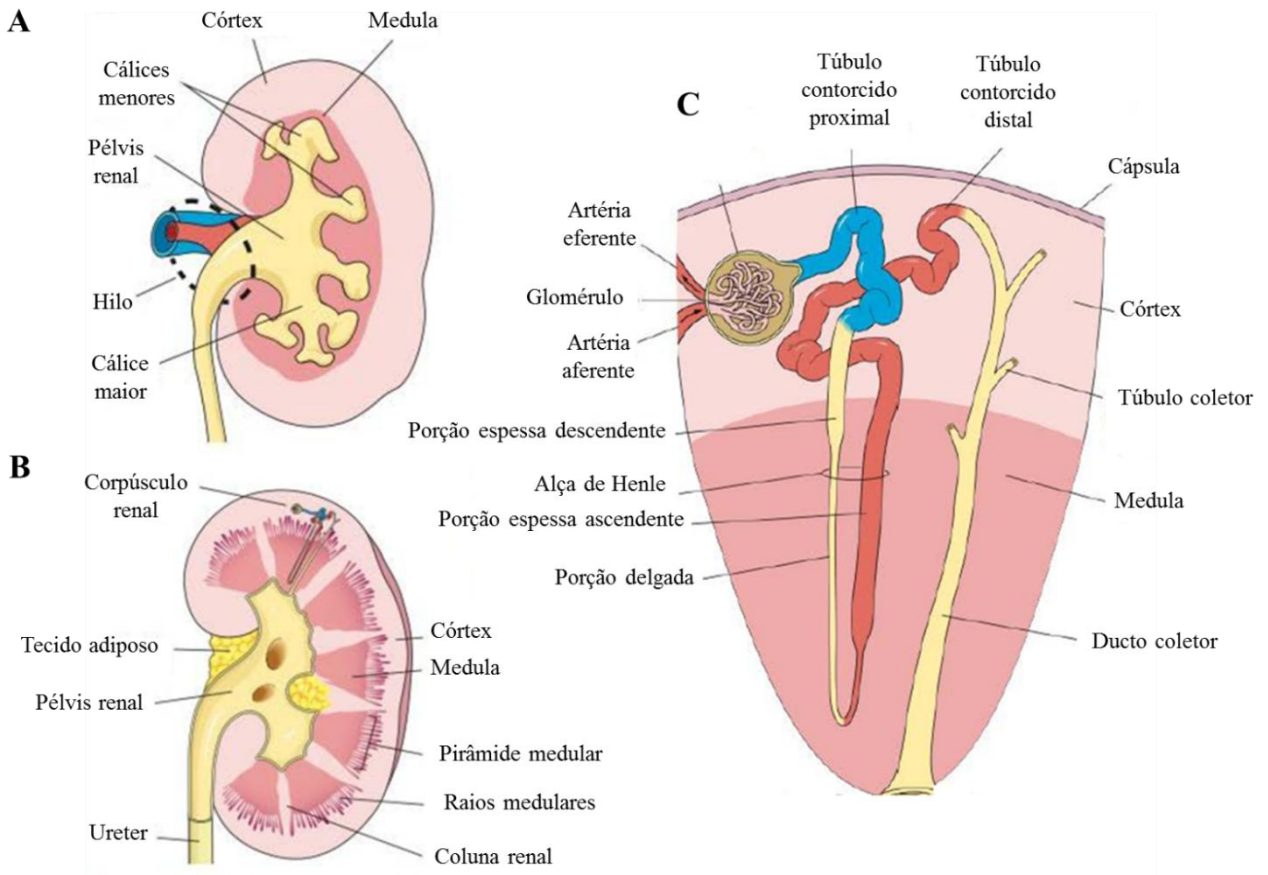
A redução substancial da pressão de perfusão renal, provocada pela estenose da artéria, resulta em aumento da liberação de renina pelas células justaglomerulares na arteríola aferente do rim afetado. Este aumento dos níveis de renina, leva à ativação do SRAA e um aumento gradual da pressão arterial sistêmica, dos níveis de angiotensina II (AngII) circulante e de aldosterona, ocasionando lesões renais e em órgãos alvo (Minuz *et al.*, 2002). Os níveis aumentados de Ang II provocam disfunções cardiovasculares e alterações sistêmicas, como o aumento do volume sanguíneo, vasoconstrição sistêmica, ativação do sistema nervoso simpático e retenção de sódio e água, resultando no aumento da pressão arterial. Além das alterações sistêmicas, ocorrem alterações locais, como o estresse oxidativo, infiltração de macrófagos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, disfunção e fibrose tecidual no rim. (Chade *et al.*, 2003; Matavelli *et al.*, 2011; Nobuhiko *et al.*, 2004; Nyström *et al.*, 2002; Oliveira-Sales *et al.*, 2014; Stouffer *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, níveis sistêmicos elevados de marcadores inflamatórios estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento da doença renal crônica (DRC) em seres humanos (Shankar *et al.*, 2011).



## **Histologia e fisiologia renal**

Os rins são os órgãos responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular de cada indivíduo dentro dos limites fisiológicos compatíveis com a vida. Eles desempenham suas funções através da filtração glomerular, reabsorção e secreção tubular, levando à excreção das substâncias indesejadas na urina. Além disso, os rins secretam hormônios, como a renina - que participa da regulação da pressão arterial - e exercem importante papel na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, da osmolaridade e do equilíbrio ácido-base. Os rins estão localizados na parede da cavidade retroperitoneal e são constituídos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, pela zona cortical e medular. Cada rim possui uma borda convexa e outra côncava, na qual se situa uma região denominada hilo, onde passam a artéria e a veia renal, o suprimento nervoso e o ureter. O parênquima renal é formado de duas regiões principais: o córtex, contendo túbulos e glomérulos, que constitui a parte externa, e a medula, composta principalmente por túbulos, que constitui a parte interna. Na região medular, observam-se projeções cônicas denominadas pirâmides renais que se projetam para a pelve renal, uma continuação da parte superior do ureter. A borda externa da pelve é formada pelos cálices maiores, que se dividem em cálices menores e coletam a urina proveniente dos túbulos (Figura 1) (Aires, 2008; Guyton e Hall, 2006; Junqueira e Carneiro, 2013; Riella, 2003; Ross, 2016).

Figura 2 - Representação esquemática do rim



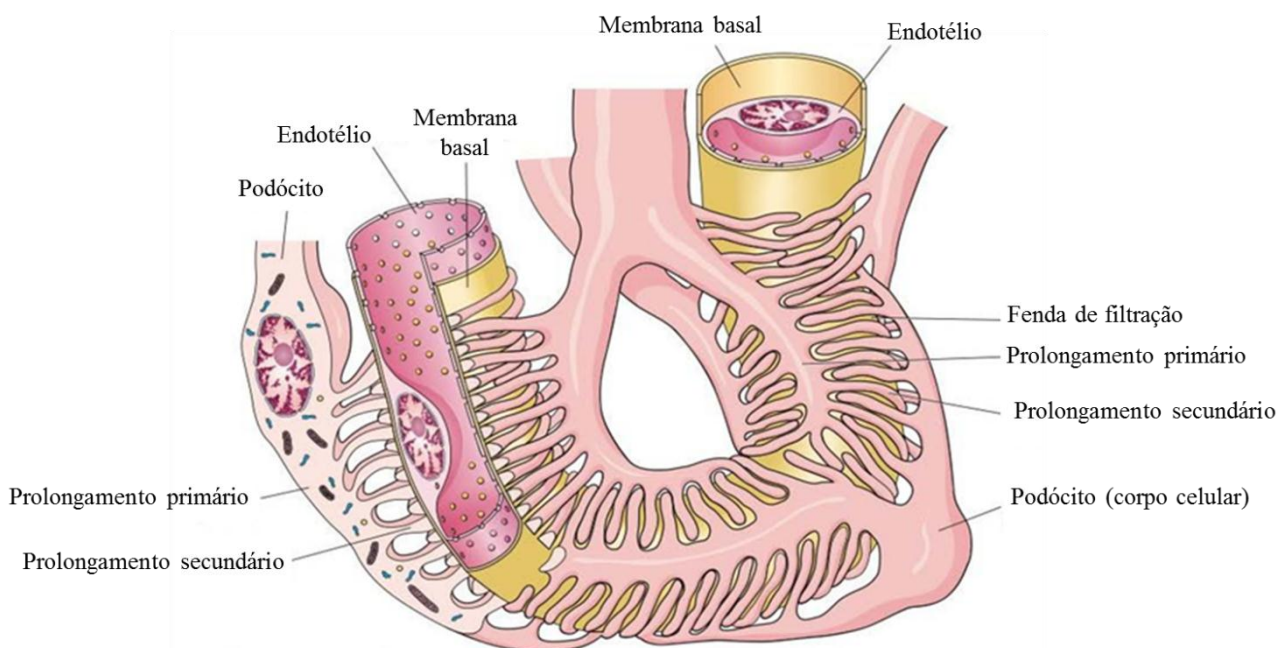
Legenda: Representação esquemática do rim evidenciando em A: Estrutura macroscópica do rim; B: Destaque da região cortical e medular; C: Organização com detalhes do córtex, medula e dos componentes do néfron, tais como: corpúsculo renal (composto pelo glomérulo e cápsula de Bowman), túbulos contorcidos proximal e distal e alça de Henle.

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2013.

A unidade funcional do rim é o néfron, formado pelo corpúsculo renal, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e uma porção do ducto coletor. O primeiro segmento do néfron, o corpúsculo renal ou de Malpighi, é constituído por um tufo de capilares, o glomérulo, que é envolvido pela cápsula de Bowman (Figura 2). O glomérulo é um enovelado capilar formado a partir de subdivisões da arteríola aferente que, posteriormente, se unem formando a arteríola eferente. Esses capilares são envolvidos pela cápsula de Bowman, uma estrutura que tem forma de cálice, possuindo parede dupla entre as quais fica o espaço de Bowman, ocupado pelo filtrado glomerular. A parede externa da cápsula constitui o folheto parietal, e é formada por epitélio simples pavimentoso, sendo responsável pela manutenção da integridade da cápsula. A parede interna, o folheto visceral, é constituída pelos podócitos,

capazes de fazer endocitose e participar da síntese e manutenção da membrana basal do glomérulo. Os podócitos estão sobre a membrana basal e são formados pelo corpo celular, de onde partem os prolongamentos primários e à medida que se diferenciam, estendem os mesmos ao redor dos capilares e desenvolvem inúmeros prolongamentos secundários denominados pedicelos. Os pedicelos interdigitam-se com pedicelos de podócitos vizinhos, formando espaços alongados, as fendas de filtração, que permitem que o ultrafiltrado do sangue entre na cápsula de Bowman. Os capilares glomerulares são do tipo fenestrado e, entre as células endoteliais e os podócitos, há uma membrana basal (Figura 3). A associação dos podócitos, das células endoteliais glomerulares e da membrana basal glomerular forma a barreira de filtração glomerular, uma barreira física semipermeável que filtra seletivamente componentes do sangue com base no tamanho molecular e carga elétrica (Aires, 2008; Junqueira e Carneiro, 2013; Riella, 2003; Ross, 2016). Sendo assim, danos aos podócitos podem resultar em proteinúria e perda da função renal.

Figura 3 - Representação esquemática da ultraestrutura do capilar glomerular e do folheto visceral da cápsula de Bowman

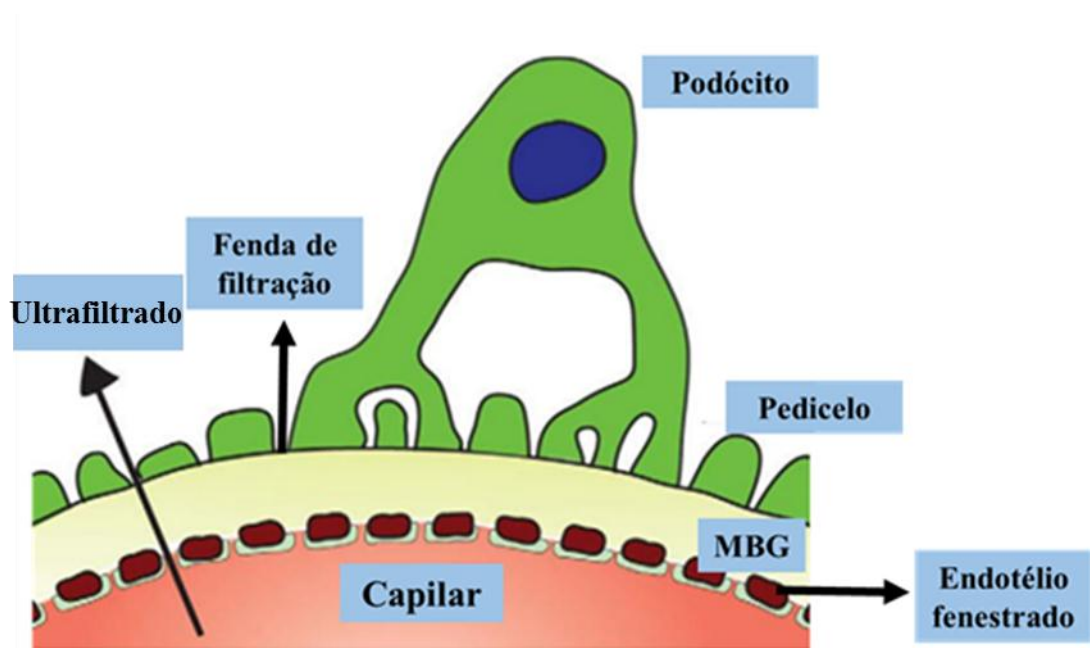


Legenda: Evidência para os podócitos com seus prolongamentos primários e secundários, formando a fenda de filtração. Tanto os prolongamentos dos podócitos quanto o capilar fenestrado estão apoiados na membrana basal.

Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

A membrana basal glomerular (MBG) é constituída pela lâmina densa e lâminas raras interna e externa, contendo colágeno do tipo IV, sialoglicoproteínas e outras glicoproteínas não colagenosas, como a laminina, bem como proteoglicanas e glicosaminoglicanas, sobretudo o sulfato de heparana. As lâminas raras contêm fibronectina, que estabelece ligações com as células. A lâmina densa é um feltro de colágeno do tipo IV e laminina, que juntos, constituem um filtro de macromoléculas, atuando como uma barreira física. A MBG restringe o movimento de partículas, geralmente proteínas maiores do que cerca de 70 KDa, como a albumina. Logo, a presença de quantidades significativas dessa proteína na urina indica dano físico e/ ou funcional da MBG (Junqueira e Carneiro, 2013; Ross, 2016).

Figura 4 - Diagrama simplificado da barreira de filtração glomerular



Legenda: Barreira de filtração glomerular evidenciando o podócito sobre a MBG e seus prolongamentos secundários, os pedicelos, se interdigitando e formando as fendas de filtração. Abaixo da MBG está esquematizado o capilar glomerular formado por células endoteliais fenestradas.

Fonte: Adaptado de Jaakko e Tryggvason, 2010.

Outro tipo celular presente nos glomérulos e intimamente associados à MBG são as células mesangiais, que produzem matriz mesangial extracelular fornecendo sustentação estrutural aos podócitos. Além disso, elas participam de mecanismos de fagocitose e da modulação da filtração glomerular, regulando o fluxo sanguíneo nos capilares glomerulares através de suas propriedades musculares de contração e relaxamento. A célula mesangial

também produz citocinas, agentes vasoativos, sintetiza e degrada várias substâncias do tufo glomerular. Na matriz mesangial são encontrados glicosaminoglicanos sulfatados, laminina e fibronectina (Junqueira e Carneiro, 2013; Riella, 2003; Ross, 2016).

O líquido filtrado presente na cápsula de Bowman flui, em seguida, pelos diversos segmentos tubulares, onde sofre processo de reabsorção e secreção seletiva de substâncias, de acordo com as necessidades de manutenção da homeostase. O túbulo contorcido proximal, o segundo segmento do néfron, é revestido por um epitélio cúbico simples com microvilosidades, invaginações e diversas mitocôndrias. O grande número de mitocôndrias permite que essas células participem de processos de reabsorção dependentes de energia, ou seja, o transporte ativo de íons. O ultrafiltrado sai do corpúsculo renal e entra no túbulo contorcido proximal, onde há absorção principalmente de água e íons sódio e cloreto e excreção de creatinina, ureia e outras substâncias. Sendo assim, níveis elevados de creatinina e ureia podem indicar risco de desenvolvimento e progressão de doenças renais (Aires, 2008; Gorris e Martinez-Castelao, 2012; Guyton & Hall, 2006).

O terceiro segmento do néfron, a alça de Henle, possui um segmento delgado (epitélio pavimentoso simples) e dois segmentos espessos (epitélio cúbico simples), atuando na reabsorção de água, no mecanismo de concentração da urina, na composição de proteína na urina, entre outros (Junqueira e Carneiro, 2013; Mount, 2014).

Após passar pela alça de Henle, o ultrafiltrado segue para a porção final do néfron, o túbulo contorcido distal, formado por epitélio cúbico simples e localizado entre a mácula densa e o ducto coletor. Diferentemente do túbulo contorcido proximal, o túbulo contorcido distal não possui borda em escova e contém menor quantidade de mitocôndrias. Próximo às arteríolas aferentes e eferentes, há células colunares com polaridade invertida, denominadas mácula densa. A mácula densa é sensível ao conteúdo iônico e ao volume de água no fluido tubular, promovendo, indiretamente, a liberação da enzima renina na circulação, ou seja, atua nas células justaglomerulares. A mácula densa, as células mesangiais extraglomerulares e as células justaglomerulares constituem o aparelho justaglomerular (Junqueira e Carneiro, 2013; Ross, 2016).

O aparelho justaglomerular regula a pressão arterial por meio da ativação do SRAA. Em distúrbios patológicos, como a redução na perfusão renal, as células justaglomerulares são responsáveis por ativar o SRAA, importante na manutenção da homeostase de sódio e na hemodinâmica renal. Os grânulos das células justaglomerulares contêm renina, uma enzima sintetizada, armazenada e liberada na corrente sanguínea pelas células musculares lisas modificadas. No sangue, a renina inicia a cascata de eventos do SRAA, culminando no

aumento dos níveis de Ang II e aldosterona, que age nos túbulos coletores aumentando a absorção de cloreto de sódio e água, elevando a pressão arterial. Logo, um desequilíbrio na atividade do SRAA pode culminar no desenvolvimento de hipertensão e lesões renais (Ross, 2016).

### **Modelo experimental de hipertensão renovascular**

Um dos modelos mais utilizados para o estudo da patogênese da HR foi proposto por Goldblatt e colaboradores em 1934, quando demonstraram, experimentalmente, que a redução do suprimento sanguíneo renal ocasionava a elevação da pressão arterial em cães. No modelo denominado 2 Rins – 1 Clipe (2R1C), a HR é induzida por oclusão parcial unilateral através da implantação de um clipe de prata na artéria renal. Devido à anatomia das artérias renais, o rim de escolha, geralmente, é o esquerdo.

São reconhecidas três fases no desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R1C em animais experimentais, apesar de ser impossível delinear essas fases na hipertensão renovascular humana. A elucidação das diferentes fases permitiu uma melhor compreensão dos papéis desempenhados pelos sistemas envolvidos na gênese e manutenção dessa hipertensão (Martinez-Maldonado, 1991).

A primeira fase da hipertensão de Goldblatt dura cerca de quatro semanas após a implantação do clipe e é marcada por aumento imediato na pressão sanguínea associada com aumento da atividade da renina plasmática e de angiotensina (Pradhan & Rossi, 2013). Já no primeiro dia após a implantação do clipe na artéria renal, observa-se uma pequena elevação da pressão arterial. Esta fase é mediada, principalmente, pela ativação do SRAA bem como pela retenção de sal e água e expansão de volume (Lerman *et al.*, 2005).

A segunda fase da hipertensão 2R1C ocorre entre a quinta e a oitava semana após a implantação do clipe e é marcada pela estabilização ou aumento da pressão arterial, com retenção de sal e expansão do volume. Evidências apoiam o papel de Ang II como um mediador importante para promover a retenção de sal e expansão do volume nesta fase. Dentre os vários mecanismos pelos quais a Ang II exerce sua função, destaca-se o aumento da liberação de noradrenalina a partir das glândulas suprarrenais. A estimulação do receptor adrenérgico provoca aumento da reabsorção de sódio no túbulo proximal. A Ang II também pode exercer um efeito local através da estimulação do nervo eferente renal, o qual também

aumenta a reabsorção de sódio (Faber & Brody, 1983; Martinez-Maldonado, 1991; Pradhan & Rossi, 2013).

A terceira fase da hipertensão 2R1C ocorre nove semanas ou mais após a clipagem da artéria renal. Esta fase caracteriza-se por uma elevação persistente da pressão arterial (Pradhan & Rossi, 2013; Naftilan *et al.*, 1989).

A HR 2R1C é um modelo clássico de hipertensão secundária, pois é um modelo experimental, que em muitos aspectos se assemelha à HR em humanos. Em coelhos e ratos, o modelo 2R1C induz um aumento crônico e gradual da pressão arterial, atingindo um pico após duas semanas da oclusão da artéria renal. Em geral, os ratos desenvolvem hipertensão mais facilmente do que os coelhos e se tornam a principal escolha para estabelecer um modelo hipertensivo renovascular 2R1C (Cervenka *et al.*, 2003; Fujii, *et al.*, 1967; Leenen *et al.*, 1971).

Desta forma, o modelo 2R1C de Goldblatt aplicado em ratos foi utilizado neste trabalho por mimetizar a hipertensão renovascular clínica e, conseqüentemente, possibilitar uma melhor compreensão da doença e contribuir na busca de novos tratamentos terapêuticos.

### **Sistema Renina Angiotensina Aldosterona**

O SRAA foi descrito, em 1898, pelo fisiologista finlandês Robert Tigerstedt, através da descoberta de um extrato (renina) do córtex renal de ratos, que aumentava a pressão sanguínea. Entre os anos 1939 e 1940, Braun Menendez e Page descobriram a angiotensina. Somente em 1954, Skeggs purificou a angiotensina e mostrou a existência de duas formas, a Angiotensinas I (Ang I) e II. Dois diferentes tipos de sistemas renina-angiotensina foram identificados: o circulante, descrito desde a descoberta da renina, e o local, descrito mais recentemente e que parece desempenhar papel importante na homeostase circulatória. Ainda hoje os conhecimentos de fisiologia e biologia molecular sobre este sistema continuam crescendo, todavia, muitos estudos são necessários para compreender as funções do SRAA, principalmente nos acometimentos cardiovasculares e renais (Hall, 2003).

A hiperatividade do SRAA tem sido relacionada à gênese de várias doenças, como a hipertensão arterial, o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, as arritmias cardíacas, o diabetes mellitus, a insuficiência renal crônica e o acidente vascular encefálico (Fyhrquist e Saijonma, 2008). A cascata do SRAA se inicia com a produção de

angiotensinogênio, principalmente por via hepática e renal, apesar de a maioria dos órgãos, incluindo o cérebro, a vasculatura, rins, coração e pulmões, também poderem produzir angiotensinogênio (Passos-Silva, Verano-Braga, Santos, 2013). Esse peptídeo não possui atividade intrínseca, portanto, necessita sofrer duas modificações em sua estrutura: a primeira é a perda de dois aminoácidos, transformando-se num decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I), através da ação da enzima proteolítica renina (Santos *et al.*, 2005), produzida pelas células justaglomerulares. A secreção de renina é regulada principalmente por quatro fatores interdependentes: (1) um mecanismo barorreceptor renal na arteríola aferente que detecta alterações na pressão de perfusão renal; (2) mudanças no transporte de cloreto de sódio (NaCl) para as células da mácula densa do túbulo distal; (3) estimulação do nervo simpático via receptores adrenérgicos, e (4) *feedback* negativo por uma ação direta da Ang II nas células justaglomerulares (Atlas, 2007). A renina e pró-renina se ligam a uma proteína presente no mesângio glomerular e no subendotélio arterial conhecida como receptor de renina/ pró-renina igualmente independente das suas atividades biológicas. A pró-renina, que representa 70% a 90% do total de renina circulante, e a renina, quando ligadas ao receptor, induzem um aumento na eficiência catalítica do angiotensinogênio gerando Ang I, exercendo efeitos fisiológicos que são independentes da Ang II, incluindo a estimulação da produção de colágeno e fibronectina (Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014).

A Ang I é um decapeptídeo de pouca ação biológica e, através da ação de diversas peptidases, pode originar a angiotensina 1-7 (Ang1-7) que exerce sua ação através da ligação com o seu alvo específico, o receptor *Mas*, produzindo diversos efeitos, como vasodilatação, melhora da função contrátil pós-infarto e inibição da proliferação celular (Passos-Silva, Verano-Braga, Santos, 2013; Santos *et al.*, 2005). Além disso, a Ang I pode sofrer a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) tipo 2 para formar angiotensina 1-9 (Ang1-9), a qual é subsequentemente clivado para formar Ang1-7. A Ang I também pode originar Ang II pela ação da ECA (Millatt *et al.*, 1999),

A Ang II é o efetor primário de uma variedade de ações fisiológicas e fisiopatológicas induzidas pelo SRAA (Figura 4), sendo um potente agente vasoconstritor que estimula a atividade simpática, além de apresentar efeitos pró-fibróticos, pró-inflamatórios e estimular a eritropoiese e a agregação plaquetária (Atlas, 2007; Cole *et al.*, 2000; Dzau, Gibbons, Pratt, 1991; Freudenthaler *et al.*, 1999; Mrug *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2003).

A síntese de Ang II é principalmente regulada pela renina (Mindel e Morrison, 2005; Yoo *et al.*, 2007). Em resposta a uma redução na PA ou à diminuição da perfusão renal, as células justaglomerulares, presentes nas arteríolas aferentes e eferentes dos glomérulos renais,



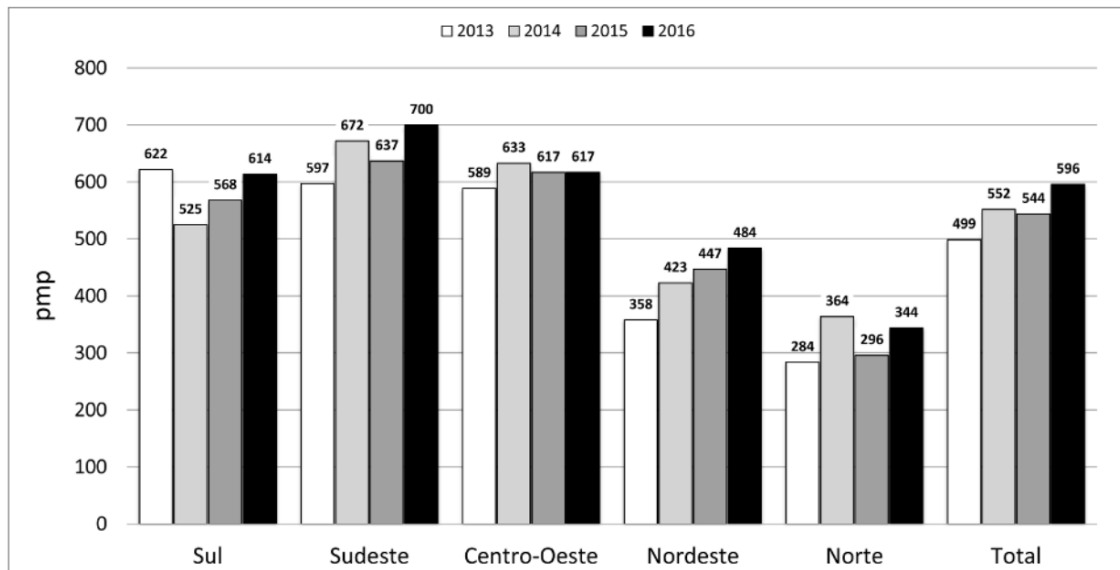
aumentam a secreção e liberação de renina, gerando um aumento da atividade do SRAA (Gupta, 2015). A ativação excessiva do SRAA tem sido implicada na progressão de toda a evolução de doenças cardiovasculares e renais desde as fases iniciais, como a hipertensão, até as fases mais tardias, como microalbuminúria e insuficiência renal. Portanto, a superativação do SRAA culminando no excesso de produção de Ang II é responsável, em grande parte, pelo estabelecimento e desenvolvimento de hipertensão e lesão renal (Escobar *et al.*, 2012).

Por este motivo, o SRAA torna-se um bom alvo para terapias anti-hipertensivas e, conseqüentemente, para o tratamento de doença renal. Sendo assim, a utilização de inibidores da ECA (iECA), bloqueadores dos receptores da Angiotensina e, nos últimos anos, o Alisquireno, um inibidor da renina, são medicamentos de escolha no tratamento clínico da hipertensão renovascular (Riccioni *et al.*, 2009; Riccioni *et al.*, 2011).

### **Doença renal crônica**

A DRC tornou-se um problema de saúde pública e o número de portadores aumenta de forma global (Jha *et al.*, 2013). No Brasil, as taxas de incidência e prevalência dessa doença crescem de forma acelerada, sendo que, o número estimado de pacientes na fila de espera para terapia de substituição renal, em julho de 2016, alcançou a marca de 29.268 casos. Além disso, o número total estimado de pacientes em tratamento dialítico no país em 1 de julho de 2016 foi de 122.825. Este número representa um aumento de 31,5 mil pacientes nos últimos 5 anos (91.314 em 2011). Houve um aumento anual médio no número de pacientes de 6,3% nos últimos cinco anos. Metade desses pacientes encontrava-se na região Sudeste do Brasil. A taxa de prevalência de tratamento dialítico em 2016 foi de 596 pacientes por milhão da população (pmp), variando por região entre 344 pacientes pmp na região Norte a 700 pacientes pmp na região Sudeste (Sesso *et al.*, 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Prevalência estimada de pacientes em diálise no Brasil



Legenda: Pacientes em diálise no Brasil por região, no período entre os anos de 2013 a 2016.  
 Fonte: Sesso *et al.*, 2016.

A DRC geralmente é associada à idade avançada, diabetes, hipertensão, obesidade e doenças cardiovasculares (Levey *et al.*, 2003), sendo caracterizada por danos estruturais, que podem evoluir progressivamente para uremia, insuficiência renal crônica e falência renal (Polzin *et al.*, 2000). O dano renal refere-se a anormalidades histopatológicas observadas por biópsia ou imagem, alterações na sedimentação da urina, proteinúria ou concentrações plasmáticas e/ ou urinárias de creatinina (Lamb *et al.*, 2013). Após a instalação da lesão renal, ocorrem mudanças estruturais e funcionais adaptativas dos néfrons remanescentes, na tentativa de manter a homeostase, principalmente quanto à regulação do volume e da composição do fluido corporal extracelular. Eventualmente, essas mudanças adaptativas tornam-se excessivas ou ineficientes, favorecendo ainda mais, o desenvolvimento de alterações dos néfrons (Polzin *et al.*, 2005; Shimizu, 2005).

A mudança adaptativa consiste no aumento do volume de filtração glomerular e do aporte sanguíneo dos néfrons remanescentes, com conseqüente hipertrofia e hipertensão glomerular, na tentativa de manter a taxa de filtração glomerular. Deste modo exacerba-se a agressão hemodinâmica ao glomérulo, estabelecendo um ciclo vicioso que leva, ao final do processo, à completa destruição do parênquima renal (Shimizu, 2005).

A hipertensão sistêmica é uma das complicações cardiovasculares mais frequentemente reconhecidas da DRC, sendo principalmente de origem secundária (Acierno e

Labato, 2005; Gregory, 2005). O mecanismo etiológico exato da hipertensão associada à DRC ainda não foi totalmente elucidado (Darke *et al.*, 2000).

A hipertensão sistêmica é identificada como um fator de risco expressivo para o desenvolvimento de insuficiência renal terminal (Klag *et al.*, 1996; Schiffrin *et al.*, 2007). Jacob *et al.* (2003) concluíram que uma alta pressão sanguínea sistólica no momento do diagnóstico inicial da DRC em cães, é associada com um maior risco de morte e taxa de declínio da função renal. A hipertensão sistêmica perpetua o dano vascular e aumenta a resistência vascular periférica e renal, a qual induz a progressão da DRC, e acentua a hipertensão arterial (Stiles *et al.*, 1994).

Estudos realizados em humanos demonstraram a existência de uma relação entre proteinúria e hipertensão (Grauer *et al.*, 2000; Grauer, 2009). A ativação do SRAA está diretamente relacionada com a hipertensão arterial e também provoca a proteinúria. A hipertensão capilar glomerular leva ao aumento da permeabilidade glomerular e excessiva filtração de proteínas (Grauer, 2009). A presença de proteínas na urina ocorre como consequência de lesões glomerulares e/ ou tubulares (Grauer, 2009; Gregory, 2005) e pode provocar inflamação tubulointersticial, fibrose e morte celular (Gregory, 2005; Scott, 2008; Shimizu, 2005).

A proteinúria de origem renal é decorrente de alterações estruturais na barreira glomerular, que causam a passagem de uma quantidade maior de proteína em direção ao filtrado glomerular, e a não reabsorção destas proteínas pelos túbulos proximais (Grauer, 2009).

A descoberta da DRC nos estágios iniciais da doença permite intervenções terapêuticas que retardam sua progressão e reduzem as complicações relacionadas à diminuição da taxa de filtração glomerular, melhorando a qualidade de vida e a sobrevivência (Levey e Coresh, 2012; Obrador *et al.*, 2002; Pereira, 2000).

Nos pacientes com DRC, o objetivo do tratamento da hipertensão compreende não só a proteção cardiovascular, com a redução da pressão arterial, mas também o retardamento da progressão da doença renal (Ravera *et al.*, 2006; Sarafidis e Bakris, 2003). O controle da pressão arterial e o bloqueio do SRAA tem limitado o declínio da taxa de filtração glomerular (Foss, 2000) através da diminuição dos níveis de Ang II e da vasodilatação da arteríola eferente glomerular, promovendo assim, a redução da pressão intraglomerular e o aumento do fluxo sanguíneo renal. Portanto, estes efeitos reduzem a proteinúria e retardam a progressão da doença renal (Acierno; Labato, 2005; Brown, 2005; Morais e Pereira, 2002).

## Alisquireno

O Alisquireno (Rasilez®) (2S, 4S, 5S, 7S) -N- (2-carbamoil-2-metilpropil) -5-amino-4-hidroxi-2,7-diisopropil- 8- [4-metoxi-3- (3-metoxipropoxi -fenil) –octanamida é um novo representante da classe de agentes anti-hipertensivos e foi aprovado para uso clínico pela Food Drug Administration em março de 2007 no tratamento da hipertensão, sendo o primeiro inibidor de renina liberado para comercialização (Van Esch *et al.*, 2010).

O Alisquireno é um inibidor direto da renina, ativo por via oral, que atua através da ligação ao sítio ativo da renina. Este medicamento inibe diretamente a atividade da renina plasmática, o passo inicial e limitante no SRAA, ou seja, resulta numa inibição completa do SRAA acarretando no declínio dos níveis de Ang II (Friedrich & Schmieder, 2013; Lizakowski, Tylicki, Rutkowski, 2013). Diversos estudos clínicos têm demonstrado que o Alisquireno é eficaz na diminuição da pressão arterial em pacientes com hipertensão arterial leve a moderada (Chen *et al.*, 2013; Musini *et al.*, 2008; Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014; Verdecchia *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012) e previne e/ou melhora a resistência à insulina, a disfunção endotelial aórtica e o remodelamento vascular em ratos hipertensos alimentados com frutose (Chou *et al.*, 2013).

A renina possui alta especificidade por apenas um substrato: o angiotensinogênio, logo, com a introdução do Alisquireno era esperado um grande avanço no controle da pressão arterial. Diferentemente da renina, a ECA tem muitos substratos peptídicos, como a bradicinina que, quando acumulada, é responsável por promover diversos efeitos colaterais observados com estes medicamentos (Angeli *et al.*, 2014; Friedrich & Schmieder, 2013). Assim, o Alisquireno é associado a uma eficiência maior no controle da pressão arterial e a taxas mais baixa de efeitos colaterais quando comparado aos demais anti-hipertensivos (Friedrich & Schmieder, 2013). Além disso, a otimização da supressão do SRAA é difícil de ser obtida com os inibidores da ECA e bloqueadores dos receptores de Ang II. Isso porque essas duas classes de anti-hipertensores ativam mecanismos de compensação que resultam na liberação de renina e aumento da atividade da renina plasmática. Em contraste, o Alisquireno neutraliza qualquer aumento compensatório na renina plasmática e previne a formação tanto de Ang I quanto de Ang II (Imanish *et al.*, 2008).

A biodisponibilidade do Alisquireno após administração por via oral é de 2,6%, com uma concentração plasmática máxima atingida dentro de 1-3 horas após dose oral única (Vaidyanathan *et al.*, 2008). Sua concentração plasmática no estado de equilíbrio é atingida

após 7-8 dias de administração diária e sua meia vida no plasma é de 23-40 horas, permitindo assim, dosagem diária única (Azizi *et al.*, 2006). A maior parte do Alisquireno (90,9%) é excretado pela via fecal ou biliar em indivíduos saudáveis após uma única dose de 300mg, enquanto que 0,6% da droga é eliminada pela urina (Waldmeir *et al.*, 2007). Além disso, o Alisquireno apresenta boa solubilidade em água, baixa lipofilicidade e resistência à biodegradação por peptidases no intestino, na circulação sanguínea e no fígado (Rahuel *et al.*, 2000).

A administração do Alisquireno possui efeitos benéficos sobre os danos causados em órgãos-alvo da hipertensão, prevenindo ou tratando, não só doenças do sistema cardiovascular, como também do sistema renal (Fogari & Zoppi, 2010; Pimenta & Oparil, 2009; Van Esch, 2010). Estudos anteriores avaliaram o Alisquireno como um agente renoprotetor na doença renal crônica apontando a eficácia na redução de albuminúria, proteinúria, atividade da renina plasmática e da Ang II (Fisher *et al.*, 2008; Lizakowski, Tylicki, Rutkowski, 2013; Persson *et al.*, 2008). Além disso, o Alisquireno demonstrou ser capaz de suprimir a produção de colágenos do tipo III e IV e do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Feldman *et al.*, 2008).

Com base nas informações apresentadas, o Aliquireno pode ser uma alternativa terapêutica no tratamento de pacientes com DRC que, atualmente, gera custos elevados aos cofres públicos e lista de espera para transplante de rim. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos morfofisiológicos do tratamento com Alisquireno no rim esquerdo de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar os parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos do córtex do rim esquerdo de ratos *Wistar* com hipertensão renovascular após o tratamento com Alisquireno.

### 1.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito do tratamento com Alisquireno sobre a (o):
  - a) Pressão arterial sistólica sanguínea, por pletismografia caudal;
  - b) Morfologia do córtex renal esquerdo, por colorações de Hematoxilina-Eosina, Picro Sirius Red e Ácido Periódico Schiff, e posterior observação em microscópio óptico;
  - c) Fibrose, pela quantificação de fibras colágenas observados em microscopia óptica;
  - d) Indução de hipertensão e inflamação, pela detecção e quantificação de renina e laminina, TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10, por imunohistoquímica;
  - e) Morfologia ultraestrutural dos corpúsculos renais observados em microscópio eletrônico de transmissão;
  - f) Alteração de matriz extracelular, por quantificação da atividade de metaloproteinase MMP-9, por zimografia;
  - g) Função renal, por quantificação dos níveis de creatinina, albumina, fósforo, proteínas totais e ureia no plasma e urina, por espectrofotometria;

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais e grupos experimentais

Os procedimentos foram realizados de acordo com as guias convencionais para experimentação em animais. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (n.º CEUA/019/2017) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Neste trabalho, foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, com 45 dias de idade, pesando em média 160 g. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) na UERJ sob condições controladas (temperatura  $21\pm 2$  °C, umidade  $60 \pm 10\%$ , ciclo de luz invertido de 12 h – claro/ escuro e ciclo de reposição de ar 15 min/h) e receberam ração balanceada padrão (ração Nuvilab, Brasil) e água filtrada durante todo o experimento.

O desenho experimental teve a duração total de oito semanas. Ao marco inicial, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, de modo que 20 desses animais tiveram estenose induzida por implante de um clipe de prata na artéria renal esquerda e, constituíram o grupo denominado Hipertenso. Os outros 20 não receberam a o clipe e foram alocados no grupo denominado Sham.

Após quatro semanas, foram formados quatro grupos conforme descritos mais adiante. As primeiras quatro semanas do experimento foram estipuladas para que a cirurgia induzisse a hipertensão renovascular nos ratos do grupo Hipertenso. A partir da 5ª semana, os animais receberam a administração de Alisquireno ou placebo.

Da quarta até a oitava semana, os quatro grupos foram tratados com Alisquireno (na dose de 10 mg/kg/dia) ou placebo (água) para que tivessem a mesma manipulação. A administração do Alisquireno ou placebo se deu por via oral (gavagem orogástrica), diariamente no mesmo horário.

Os quatro grupos são:

- a) Grupo Sham: os animais foram submetidos à cirurgia sem o implante do clipe. Esses animais receberam administração de água via gavagem orogástrica durante as últimas quatro semanas de experimentação.
- b) Grupo Sham+Alisquireno: os animais foram submetidos à cirurgia sem o implante do clipe. Esses animais receberam administração de Alisquireno na dose de 10 mg/kg/dia via gavagem orogástrica durante as últimas quatro semanas de experimentação.
- c) Grupo Hipertenso: os animais foram submetidos à cirurgia com implante do clipe. Esses animais receberam administração de água via gavagem orogástrica durante as últimas quatro semanas de experimentação.
- d) Grupo Hipertenso+Alisquireno: os animais foram submetidos à cirurgia com implante do clipe. Esses animais receberam Alisquireno na dose de 10 mg/kg/dia via gavagem orogástrica durante as últimas quatro semanas de experimentação.

## 2.2 Indução da hipertensão renovascular

A hipertensão renovascular foi induzida pelo método de 2 Rins-1 Clipe (2R-1C) desenvolvido por Goldblatt (Goldblatt, 1934). Sob anestesia intraperitoneal com Tiopental sódico (40 mg/ kg), foi realizada tricotomia, com posterior assepsia com álcool à 70% na região mediana (linha alba) do animal. Foi realizada uma incisão na linha alba para isolamento da artéria renal e, posteriormente, foi colocado um clipe de prata pré-calibrado (com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm) na artéria renal esquerda do animal para obstrução parcial da mesma (estenose parcial), induzindo a hipertensão renovascular. O rim contralateral permaneceu intacto.

Após o procedimento, a incisão foi suturada e os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e mantidos no biotério sob observação durante sete dias. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, com manipulação da artéria renal esquerda, porém não foi implantado o clipe de prata.



### 2.3 Análise da pressão arterial sistólica

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada semanalmente através do método não invasivo da pletismografia da artéria caudal (Letica LE 5100; Panlab, Espanha) em todos os grupos experimentais, com os animais conscientes, a partir da semana zero (antes do procedimento cirúrgico para indução da hipertensão renovascular) até a semana oito. Todos os animais foram aclimatados durante duas semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante as aferições da PAS. As aferições foram feitas por meio de um garrote e de um sensor de pulso colocados em torno da cauda de cada animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e exsufla automaticamente o garrote, e detecta o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal determinando, assim, a PAS. A média de três aferições de cada animal foi utilizada.

### 2.4 Excreção urinária, eutanásia e obtenção do sangue e das amostras teciduais

Na oitava semana de experimentação, 24 h antes da eutanásia, os animais de todos os grupos experimentais foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina de 24 h de cada um foi coletada.

Os animais foram profundamente anestesiados com Tiopental sódico (80 mg/ kg), intraperitonealmente. Através de incisão mediana (na linha alba), o abdômen e tórax foram expostos. As amostras de sangue foram extraídas por punção cardíaca e colocadas em tubos previamente heparinizados (0,1 ml), sendo imediatamente centrifugado a 819 x g por 10 min, à temperatura ambiente; o plasma foi armazenado em refrigeração a -20°C para posteriores análises bioquímicas.

Em seguida, os rins esquerdos foram cuidadosamente dissecados e retirados. Posteriormente, foram fixados em paraformaldeído 4%, ou glutaraldeído 2,5% ou congelados em refrigeração a -80°C com ou sem crioprotetor.

## 2.5 Análise bioquímica do plasma e da urina

A partir da coleta da urina e do plasma sanguíneo de cada animal, foram realizadas as análises bioquímicas. A fim de avaliar a função renal, foram feitas as dosagens plasmáticas de creatinina, ureia, fósforo, albumina e proteínas totais e dosagens urinárias de proteínas, creatinina, ureia e fósforo, realizadas de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin System II, Brasil).

Além disso, a urinálise foi realizada com auxílio das tiras reagentes (Iris Urine Chemistry Strips iChem 10 SG Diagnostic). A urina coletada de cada animal foi colocada sobre a tira reagente por 60 segundos. No momento em que a urina entra em contato com a tira, ocorre uma reação química que permite a avaliação de parâmetros bioquímicos através de cores. As cores obtidas nesta reação foram comparadas com uma tabela de cores fornecidas pelo fabricante. Através deste teste qualitativo, foi possível analisar os seguintes parâmetros: urobilinogênio, bilirrubina, proteínas, nitrito, corpos cetônicos, glicose, pH, densidade e presença de leucócitos.

## 2.6 Histoquímica e Imunohistoquímica

As amostras de rins esquerdos fixados em paraformaldeído 4% foram clivadas com bisturi longitudinalmente e lavadas por 1 h em água corrente. Após a lavagem, as amostras teciduais foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% (2x), por 1 h em cada etapa. Posteriormente, o material foi clarificado através de dois banhos de xilol, sendo 20 min em cada. Em seguida, os fragmentos de rins foram inseridos duas vezes em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 60 °C por 30 min em cada etapa e incluídos na mesma. Todos os fragmentos incluídos em Paraplast Plus foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo (American Optical, modelo Spencer, Estados Unidos). As secções foram desparafinadas em estufa a 60 °C por 5 min e os cortes foram hidratados, como a seguir: 2 banhos de xilol, álcool 100%, 90%, 70% e água destilada, por 2 min em cada etapa.

Para histoquímica, as lâminas foram coradas pelos métodos de Hematoxilina-Eosina, Picro Sirius Red e Ácido Periódico Schiff. Em seguida, os cortes foram lavados em água

destilada e diafanizados em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e xilol. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Alemanha) e lamínulas e visualizadas ao microscópio óptico.

Para quantificação do colágeno por Picro Sirius Red, foram analisados 20 campos randômicos de cada lâmina sob luz polarizada. As áreas coradas em vermelho, consideradas como fibrose, foram quantificadas pelo software Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

Para realização da técnica de imunohistoquímica, foram utilizados os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos): renina, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10 e laminina. Inicialmente, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando peróxido de hidrogênio a 3%, por 15 min e os cortes foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) 3 vezes, por 5 min cada vez. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por tampão citrato, pH 6,0, por 20 min a 60 °C. Em seguida, os cortes foram lavados novamente com PBS e marcações inespecíficas dos anticorpos foram bloqueadas através da incubação em PBS/BSA (soroalbumina bovina) 3%, por 20 min, em temperatura ambiente. Os cortes foram, então, incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS (proporção 1:100) em câmara úmida *overnight* a 10 °C. No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado, por 1 h, e, posteriormente, com a estreptavidina (Dako, Estados Unidos), por 30 min, em temperatura ambiente. Após lavagens com PBS, os produtos da imunorreação foram visualizados usando o reagente diaminobenzidina (DAB) (Dako, Estados Unidos) e contracolorados com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então hidratadas em concentrações crescentes de álcool, 70%, 90%, 100% e xilol e montadas com Entellan e lamínulas para posterior observação ao microscópio óptico. Os cortes do controle negativo da reação foram obtidos omitindo a etapa de incubação do anticorpo primário.

Para quantificação da expressão das substâncias citadas acima, foi utilizado o software Image-Pro Plus versão 7.0. Para tal, foram analisados 20 campos aleatórios de cada lâmina, ao microscópio óptico (Olympus BX53 com câmera Olympus DP72 acoplada, Japão).

## **2.7 Microscopia eletrônica de transmissão**

As amostras teciduais foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, a 4°C por 24 h. O material foi clivado e lavado 3 vezes por 10 min em

tampão cacodilato de sódio 0,1 M e incubado em tetróxido de ósmio 1% por 1 h. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 30 min em cada fase. Posteriormente, o material foi infiltrado com acetona e resina epon (TedPella, Estados Unidos) [25mL de Epon 812, 17 mL de anidrido metil náutico (MNA), 8 mL de anidrido dodecenil succínico (DDSA), 32 gotas de 2,4, tridimetilaminametilfenol (DMP) nas proporções de 2:1 por 2 h, 1:1 por 2 h e 1:2 por 2 h]. No dia seguinte, o material foi inserido em resina epon pura, em tubos abertos por 4 h, e posteriormente incluído em nova resina epon, polimerizada em estufa, a 60 °C, por 3 dias.

Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos (60-70 nm) de áreas selecionadas com ultramicrótomo (Leica Ultracut-UCT, Leica Aktiengesellschaft, Áustria) que foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo para observação em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, Brasil) a 80 kV.

## 2.8 Zimografia

Para avaliação da atividade enzimática das metaloproteases de matriz foi utilizada a técnica de zimografia. Para tanto, as amostras foram maceradas em solução de homogeneização (1 mL de PBS 1x). Em seguida, o total de proteína foi quantificado através do método de BCA (Ácido Bicinconínico – Sigma Aldrich, Estados Unidos). Vinte microgramas (20µg) de proteína total da amostra foram submetidos ao ensaio de eletroforese (15 mA por gel durante 4 h) inicialmente em gel de empacotamento 4% e, em seguida, em gel de SDS 10 % contendo gelatina como substrato. O peso molecular das bandas gelatinolíticas foi estimado através de comparação com marcador de peso molecular (Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham, Reino Unido). Logo após, os géis foram incubados em tampão de lavagem (Tris-HCl pH 7,6 + 0,15M NaCl + 2,5 Triton X-100) durante 1 h e foram transferidos para o tampão de ativação (10mM Tris-HCl pH 7,6 + 0,15M NaCl + 2,5 Triton X-100 1% + 5mM CaCl<sub>2</sub> + 0,02% NaN<sub>3</sub>) por 20 h em estufa a 37°C. Posteriormente, os géis foram corados com *comassie blue* (50% metanol, 10% ácido acético, 40% Água miliQ e 0,5% de comassie blue) por 1 h e descorados com uma solução contendo 50% metanol, 10% ácido acético e 40% água destilada até que a banda indicando a degradação da gelatina fosse visualizada. Os géis foram digitalizados em scanner (Epson, Brasil) e a densitometria foi

realizada através do software especializado Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos), com valores expressos em unidade arbitrária (u.a.).

## 2.9 Análise estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pela comparação entre os grupos, e as diferenças entre eles foram testadas.

Todos os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Holm-Sidak. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando valores de  $p < 0,05$ .

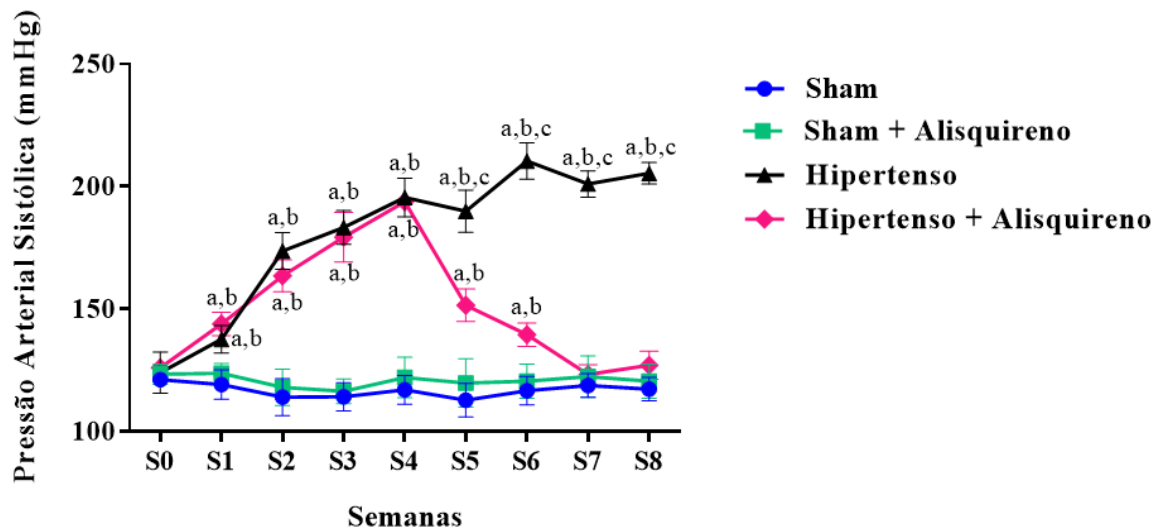
O software *Graphpad Prism* versão 6.0 para *Windows* (GraphPad Software, Estados Unidos) foi utilizado para realizar as análises estatísticas e para confecção dos gráficos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação da pressão arterial sistólica

A PAS dos animais dos grupos Sham e Sham + Alisquireno se manteve constante durante todas as semanas do experimento (Sham:  $117,3 \pm 5$  mmHg; Sham + Alisquireno:  $120,6 \pm 5$  mmHg) e não apresentaram diferenças significativas entre eles ( $p > 0,05$ ). Já a PAS dos animais do grupo Hipertenso aumentou gradativamente e significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir da primeira semana até a oitava (de  $136,8 \pm 5$  mmHg para  $205,5 \pm 4$  mmHg). Da primeira até a quarta semana, os animais do grupo Hipertenso + Alisquireno apresentaram um aumento gradativo dos níveis de PAS (de  $142,6 \pm 3$  mmHg para  $193,2 \pm 2$  mmHg). Na quinta semana, momento em que foi iniciada a administração do Alisquireno, os animais do grupo Hipertenso + Alisquireno apresentaram uma redução da PAS (de  $193,2 \pm 2$  mmHg para  $150,4 \pm 5$  mmHg) e a partir da sétima semana, os níveis de PAS desses animais se equiparou aos níveis de PAS dos animais do grupo Sham e Sham + Alisquireno ( $123,2 \pm 3$  mmHg) (Figura 6).

Figura 6 - Evolução da pressão arterial sistólica em milímetros de mercúrio (mmHg)

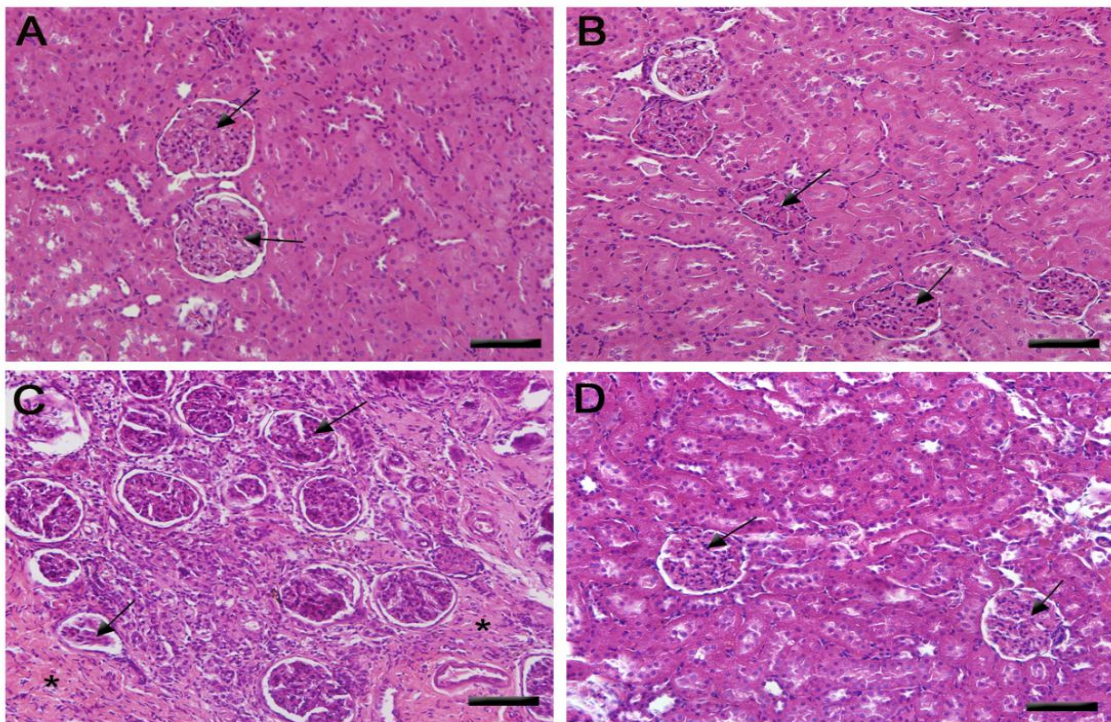


Legenda: (a) representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham, (b) representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham + Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Hipertenso + Alisquireno. Abreviatura: s = semana. n=10 para todos os grupos experimentais.

### 3.2 Avaliação histopatológica e quantificação das áreas de fibrose

A histopatologia foi analisada através da coloração de Hematoxilina-Eosina (Figura 7). Os grupos Sham (Figura 7 A) e Sham + Alisquireno (Figura 7 B) apresentaram a cápsula de Bowman, glomérulos e túbulos contorcidos proximais e distais preservados. No entanto, o grupo Hipertenso (Figura 7 C) apresentou grande área de fibrose intersticial no córtex renal e perda na estrutura dos corpúsculos e túbulos renais. Além disso, os animais do grupo Hipertenso apresentaram lesão em alguns glomérulos. O grupo Hipertenso + Alisquireno (Figura 7 D) apresentou uma diminuição da fibrose intersticial e uma reestruturação do córtex renal quando comparado ao grupo Hipertenso, principalmente dos corpúsculos e túbulos contorcidos proximais e distais.

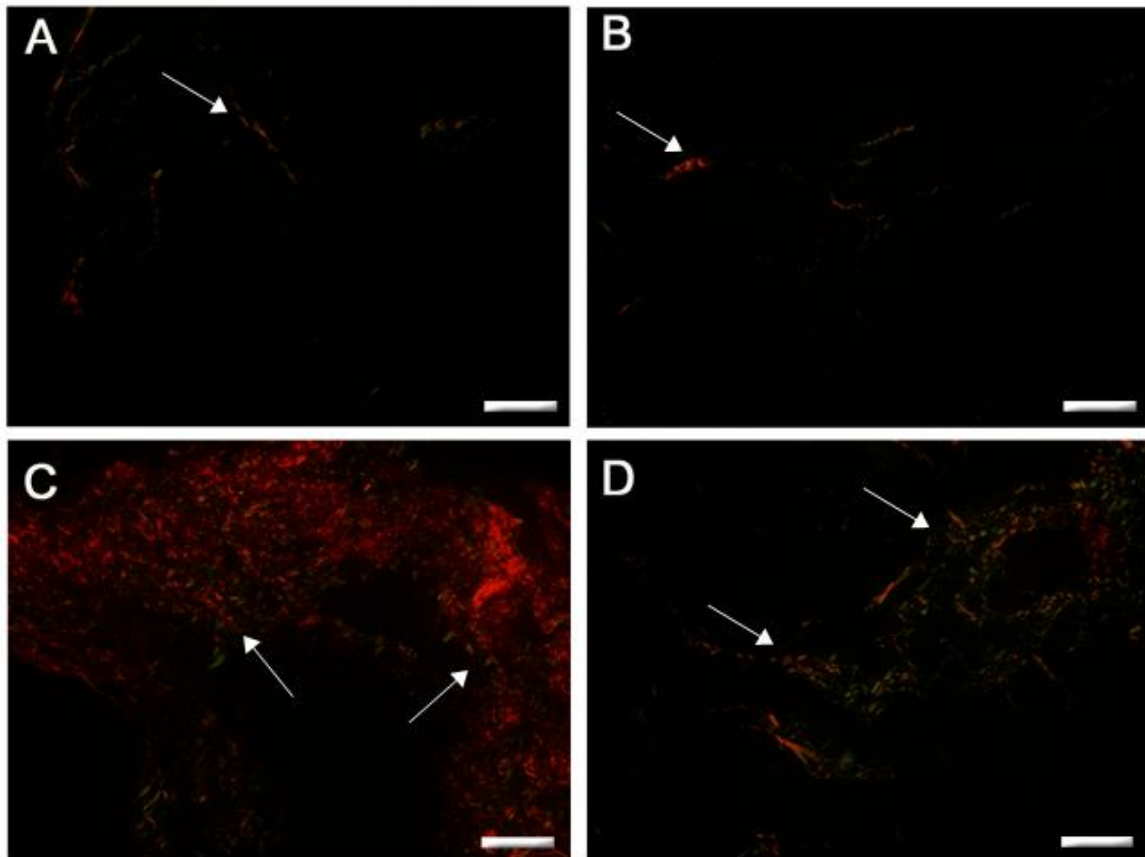
Figura 7 - Avaliação da morfologia do córtex renal em fotomicrografias



Legenda: A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. As setas indicam os glomérulos e os asteriscos indicam áreas de fibrose intersticial. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de calibração: 100  $\mu$ m.

A análise da deposição de fibras colágenas foi realizada nos cortes corados com Picro Sirius Red (Figura 8). Os resultados evidenciaram que o grupo Hipertenso (Figura 8 C) apresentou um aumento da expressão de colágeno perivascular, peritubular e pericapsular quando comparado aos animais dos grupos Sham (Figura 8 A), Sham+Alisquireno (Figura 8 B), indicando fibrose tecidual no grupo hipertenso. No grupo Hipertenso+Alisquireno (Figura 8 D) observa-se menor depósito de colágeno, comparado ao grupo Hipertenso. A quantidade de colágeno no grupo hipertenso tratado foi bem próxima aos resultados encontrados nos animais do grupo Sham.

Figura 8 - Avaliação da deposição de fibras colágenas em fotomicrografias do córtex renal observadas em microscopia de luz polarizada



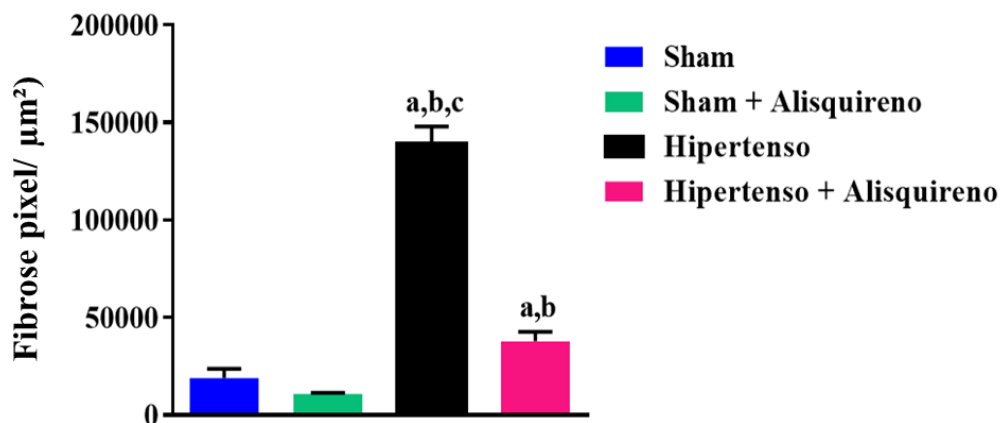
Legenda: A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: Hipertenso; D: Hipertenso + Alisquireno. As setas indicam as fibras colágenas. Coloração: Picro Sirius Red. Barra de calibração 50  $\mu$ m.

Através da quantificação das áreas de fibrose (Figura 9), observou-se que o grupo Hipertenso apresentou um aumento significativo da deposição de colágeno quando comparado aos grupos Sham e Sham + Alisquireno. O grupo Hipertenso + Alisquireno



demonstrou uma redução expressiva da deposição de colágeno em relação ao grupo Hipertenso. Apesar dessa redução, o grupo Hipertenso + Alisquireno apresentou diferença significativa em relação aos grupos Sham e Sham + Alisquireno. Os grupos Sham e Sham + Alisquireno não apresentaram diferença significativa entre eles.

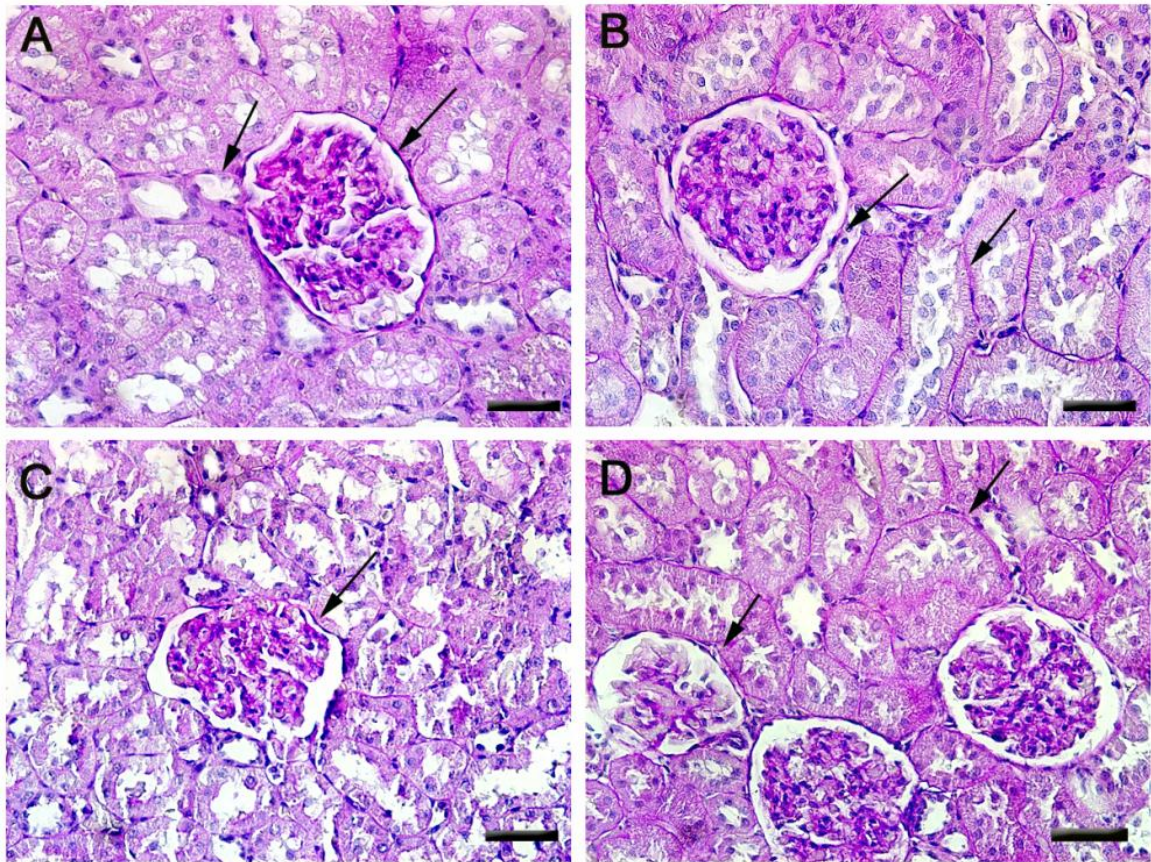
Figura 9 - Quantificação da deposição de fibras colágenas do córtex do rim esquerdo em pixels/ $\mu\text{m}^2$



Legenda: (a)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham, (b)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham + Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Hipertenso + Alisquireno.  $n=7$  para todos os grupos experimentais.

Para avaliação da membrana basal do córtex dos rins esquerdos, foi utilizada a coloração pela técnica do Ácido Periódico Schiff (Figura 10). Os grupos Sham (Figura 10 A) e Sham + Alisquireno (Figura 10 B) apresentaram membrana basal bem corada envolvendo a cápsula de Bowman e os túbulos contorcidos proximais e distais. O grupo Hipertenso (Figura 10 C) evidenciou menor intensidade de coloração na membrana da cápsula de Bowman e ao redor dos túbulos contorcidos, indicando uma desestruturação do córtex no tecido renal e uma fragmentação da membrana basal em sua extensão. Entretanto, o grupo Hipertenso + Alisquireno (Figura 10 D) apresentou uma reestruturação da membrana basal dos glomérulos e dos túbulos contorcidos.

Figura 10 - Avaliação da membrana basal do córtex do rim esquerdo em fotomicrografias



Legenda: A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. As setas evidenciam a membrana basal em cor magenta. Coloração: Ácido Periódico-Schiff. Barra de calibração 100  $\mu$ m.

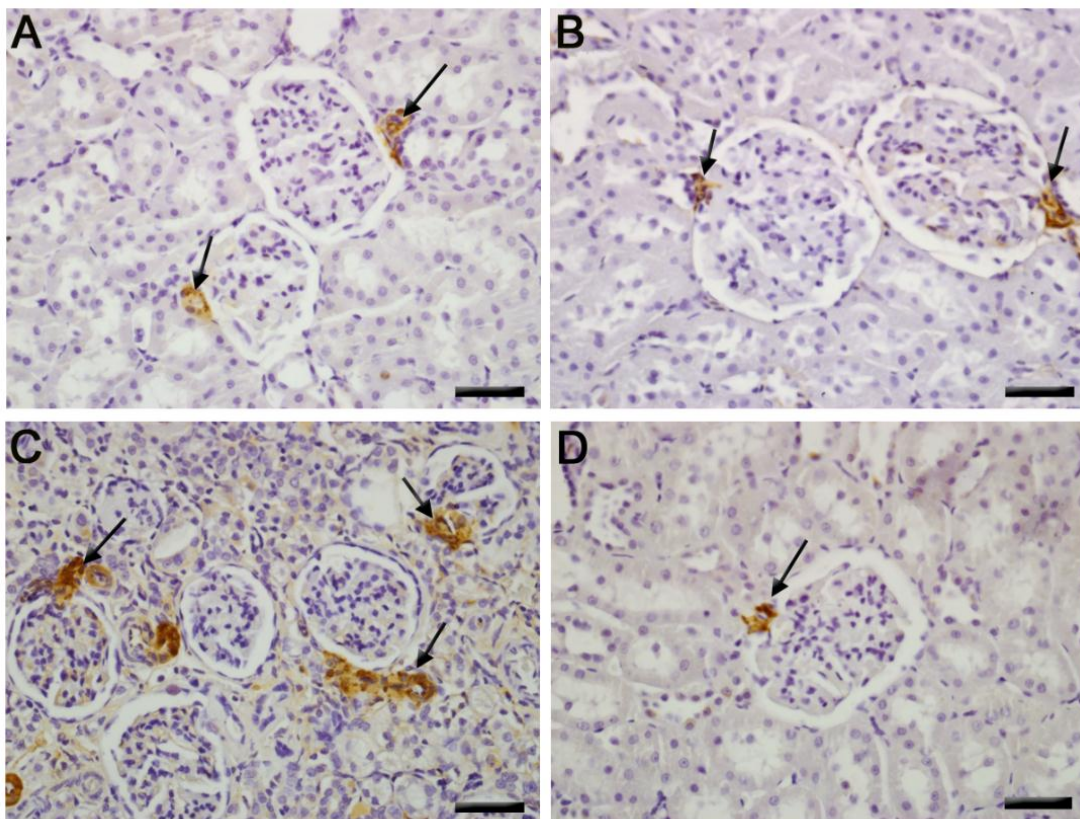
### 3.3 Avaliação e quantificação de alterações na expressão de renina, laminina e citocinas por imunohistoquímica

Em estudo imunohistopatológico do tecido renal, a imunomarcação positiva do anticorpo anti-renina, foi constatada nas células justaglomerulares no córtex renal em todos os grupos experimentais (Figura 11). O grupo Hipertenso (Figura 11 C) apresentou marcação mais evidenciada nas células justaglomerulares, quando comparado aos grupos Sham (Figura 11 A) e Sham + Alisquireno (Figura 11 B). Em contrapartida, foi observada uma diminuição das áreas de marcação no grupo Hipertenso tratado com Alisquireno (Figura 11 D) quando comparado ao grupo Hipertenso. Através da quantificação do anticorpo anti-renina, observou-

se um aumento significativo no número de células marcadas no grupo Hipertenso em relação aos demais grupos, como mostra a Figura 13 A.

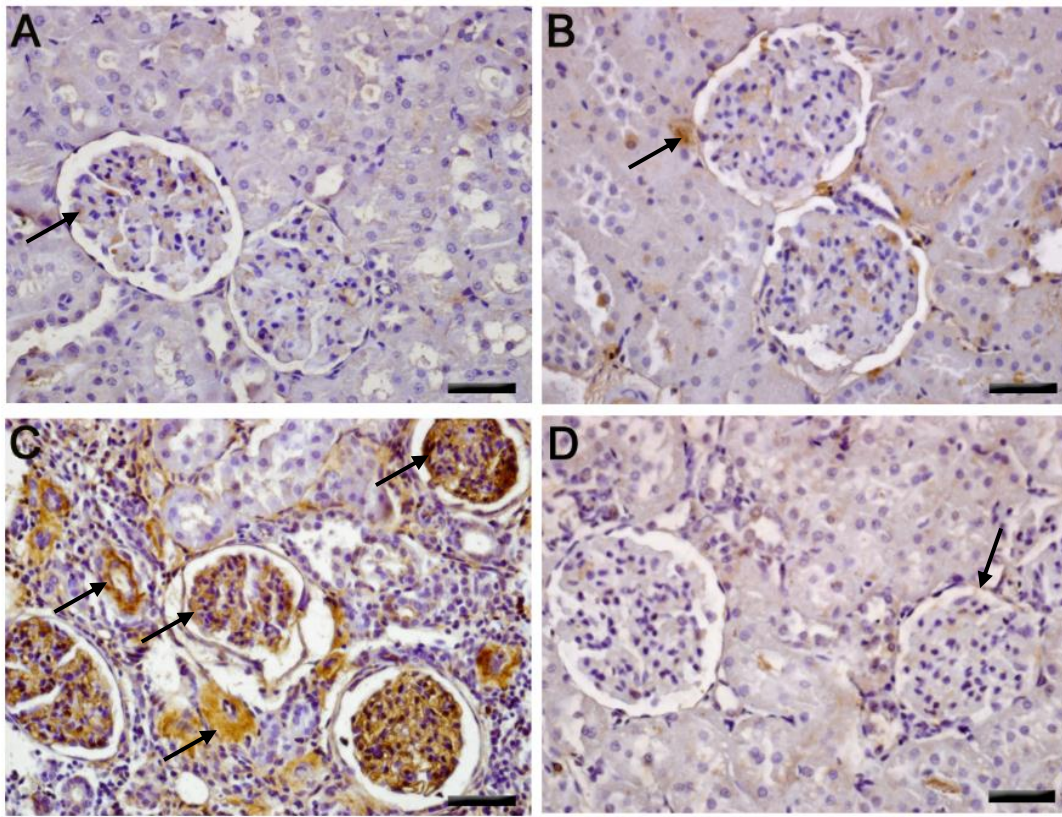
Na avaliação da imunomarcagem com anticorpo anti-laminina (Figura 12), o grupo Hipertenso apresentou mais áreas com intensa marcação das células pelo anticorpo tanto na região glomerular quanto na região tubular (Figura 12 C) comparado aos grupos Sham (Figura 12 A) e Sham + Alisquireno (Figura 12 B), que tiveram poucas células marcadas. Já no grupo Hipertenso tratado com Alisquireno (Figura 12 D), foi observada uma diminuição dessa marcação quando comparado ao grupo Hipertenso, e semelhante ao grupo Sham. Através da quantificação do anticorpo anti-laminina, observou-se um aumento significativo no número de células marcadas no grupo Hipertenso em relação aos demais grupos, como mostra a Figura 13 B.

Figura 11 - Imunomarcagem no córtex renal com o anticorpo anti-renina



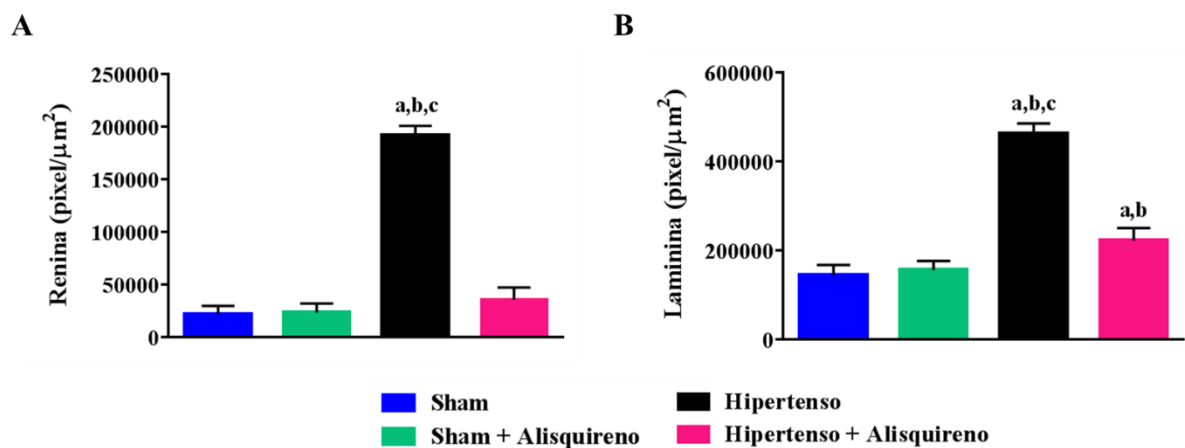
Legenda: Fotomicrografias dos grupos A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. As setas indicam a imunomarcagem positiva nas células justaglomerulares. Barra de calibração: 100  $\mu$ m.

Figura 12 - Imunomarcação no córtex renal com o anticorpo anti-laminina



Legenda: Fotomicrografias dos grupos A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. As setas indicam a imunomarcação positiva. Barra de calibração: 100  $\mu\text{m}$ .

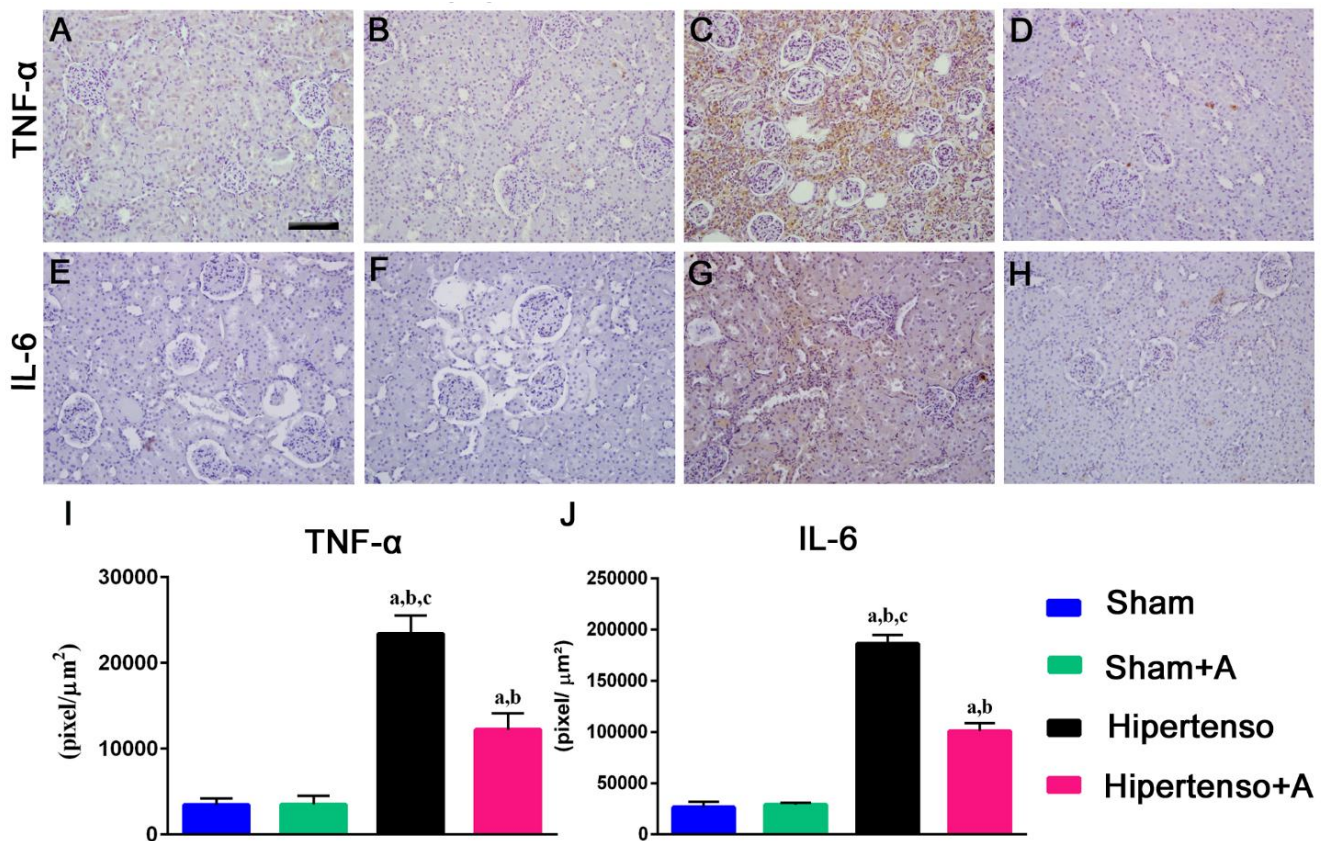
Figura 13 - Quantificação da imunomarcação no tecido renal (pixel/  $\mu\text{m}^2$ )



Legenda: A: Quantificação da imunomarcação com o anticorpo anti-renina. B: Quantificação da imunomarcação com o anticorpo anti-laminina. Em ambos os gráficos (A e B): (a)  $p < 0,05$  em rela o ao grupo Sham, (b)  $p < 0,05$  em rela o ao grupo Sham+Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em rela o ao grupo Hipertenso + Alisquireno.  $n=7$  para todos os grupos experimentais.

Na imunomarcção específica para TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 14), os grupos Sham e Sham + Alisquireno evidenciaram uma pequena expressoão dessas citocinas. Em contrapartida, o grupo Hipertenso (Figuras 14 C e 14 G) apresentou muitas áreas de intensa marcação tanto de TNF- $\alpha$  quanto de IL-6 nos túbulos proximais e distais. Entretanto, essas marcações foram menos frequentes no grupo Hipertenso tratado com Alisquireno (Figuras 14 D e 14 H). A quantificação de ambas as citocinas estão representadas na Figura 14 I e 14 J e corroboram os achados descritos acima, constando aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 no grupo Hipertenso quando comparado aos demais grupos.

Figura 14 - Imunomarcção e quantificação dos anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-6 no córtex renal dos grupos experimentais

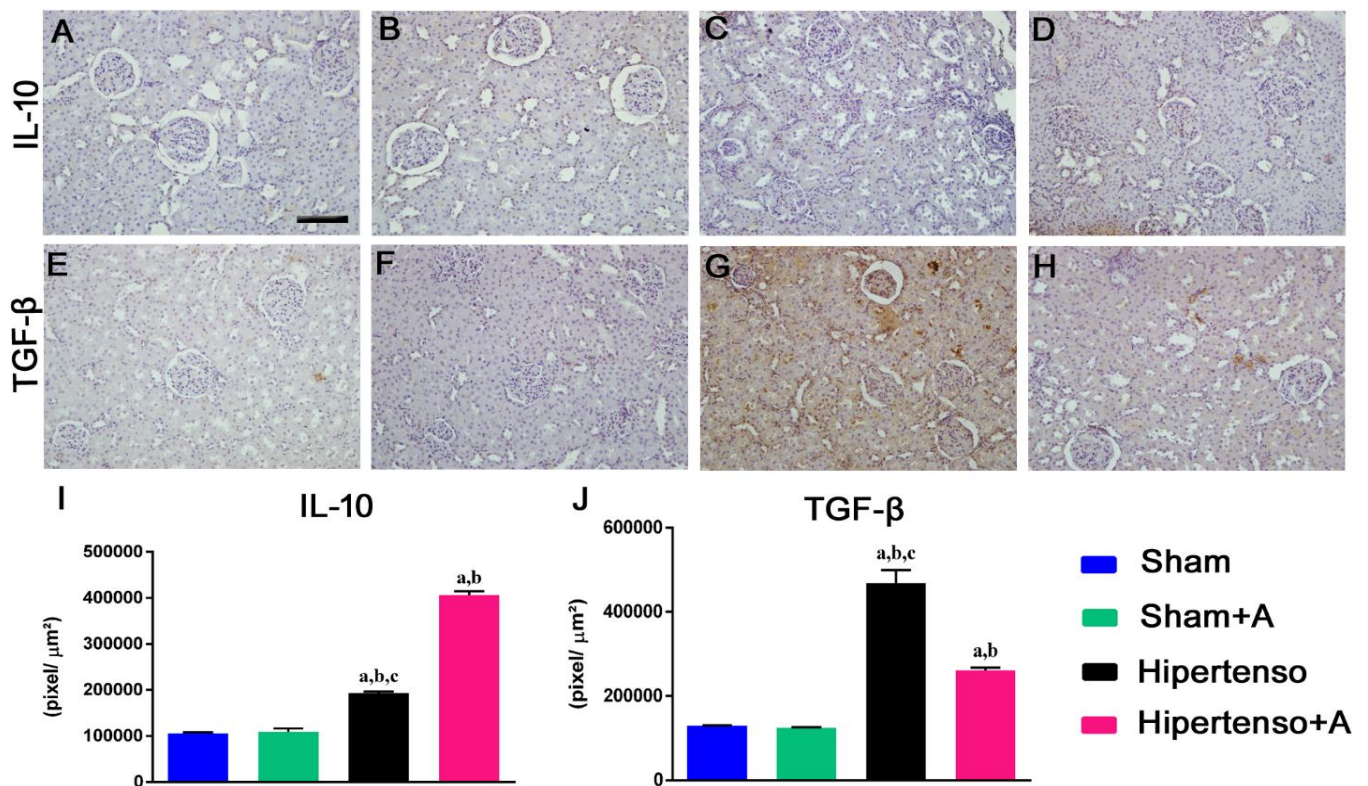


Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção específica para TNF- $\alpha$ : A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. Fotomicrografias da imunomarcção específica para IL-6: E: grupo Sham; F: grupo Sham + Alisquireno; G: grupo Hipertenso; H: grupo Hipertenso + Alisquireno. Barra de calibração: 100  $\mu\text{m}$ . I: Quantificação da imunomarcção (pixel/  $\mu\text{m}^2$ ) para o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . J: Quantificação da imunomarcção (pixel/  $\mu\text{m}^2$ ) para o anticorpo anti-IL-6. (a)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham, (b)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Hipertenso + Alisquireno.  $n=7$  para todos os grupos experimentais.

A Figura 15 evidencia a imunomarcção com os anticorpos anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$ . Tanto o grupo Sham (Figuras 15 A e 15 E, respectivamente) quanto o grupo Sham+Alisquireno (Figuras 15 B e 15 F, respectivamente) apresentaram pouca intensidade na marcação específica para IL-10 e TGF- $\beta$ . Na imunomarcção específica para IL-10, foi observado que o grupo Hipertenso + Alisquireno (Figura 15 C) apresentou um aumento da expressão dessa citocina comparado ao grupo Hipertenso (Figura 15 D). No grupo Hipertenso marcado com anti-TGF- $\beta$  (Figura 15 G) foi observada intensa marcação do anticorpo tanto nos túbulos proximais e distais, quanto nos glomérulos. Entretanto, essa marcação foi menos frequente no grupo Hipertenso tratado com Alisquireno (Figura H).

Através da quantificação da imunomarcção com os anticorpos anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$  (Figuras 15 I e 15 J, respectivamente), foi observado um aumento significativo da expressão de IL-10 no grupo Hipertenso + Alisquireno e de TGF- $\beta$  no grupo Hipertenso em relação aos demais grupos.

Figura 15 - Imunomarcção e quantificação dos anticorpos anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$  no córtex renal dos grupos experimentais



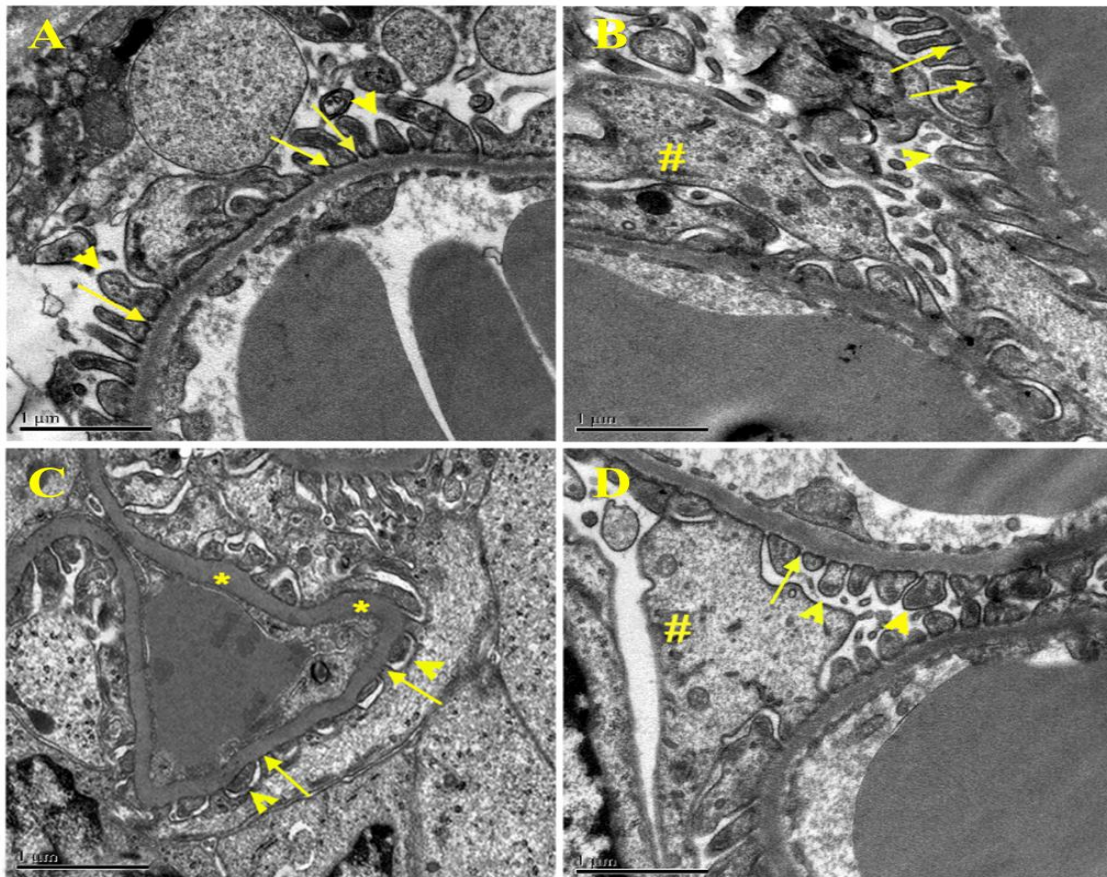
Legenda: Fotomicrografias da imunomarcção específica para IL-10: A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. Fotomicrografias da imunomarcção específica para TGF- $\beta$ : E: grupo Sham; F: grupo Sham + Alisquireno; G: grupo Hipertenso; H: grupo Hipertenso + Alisquireno.

Hipertenso; H: grupo Hipertenso + Alisquireno. Barra de calibração: 100  $\mu\text{m}$ . I: Quantificação da imunomarcção (pixel/  $\mu\text{m}^2$ ) com o anticorpo anti-IL-10. J: Quantificação da imunomarcção (pixel/  $\mu\text{m}^2$ ) com o anticorpo anti-TGF- $\beta$ . (a)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham, (b)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Hipertenso + Alisquireno.  $n=7$  para todos os grupos experimentais.

### 3.4 Avaliação da ultraestrutura renal

Na análise da ultraestrutura renal (Figura 16), os animais do grupo Hipertenso apresentaram retração dos pedicelos (cabeça de seta), alteração morfológica da fenda de filtração (setas) e espessamento da membrana basal glomerular (asterisco) (Figura 16 C) quando comparados aos grupos Sham (Figura 16 A) e Sham + Alisquireno (Figura 16 B). Nestes, evidenciou-se a integridade dos pedicelos e do diafragma da fenda de filtração, assim como da membrana basal glomerular e do capilar fenestrado. No grupo Hipertenso tratado com Alisquireno foi observada uma recuperação da estrutura da membrana basal e da morfologia dos pedicelos (Figura 16 D).

Figura 16 -Análise da ultraestrutura renal

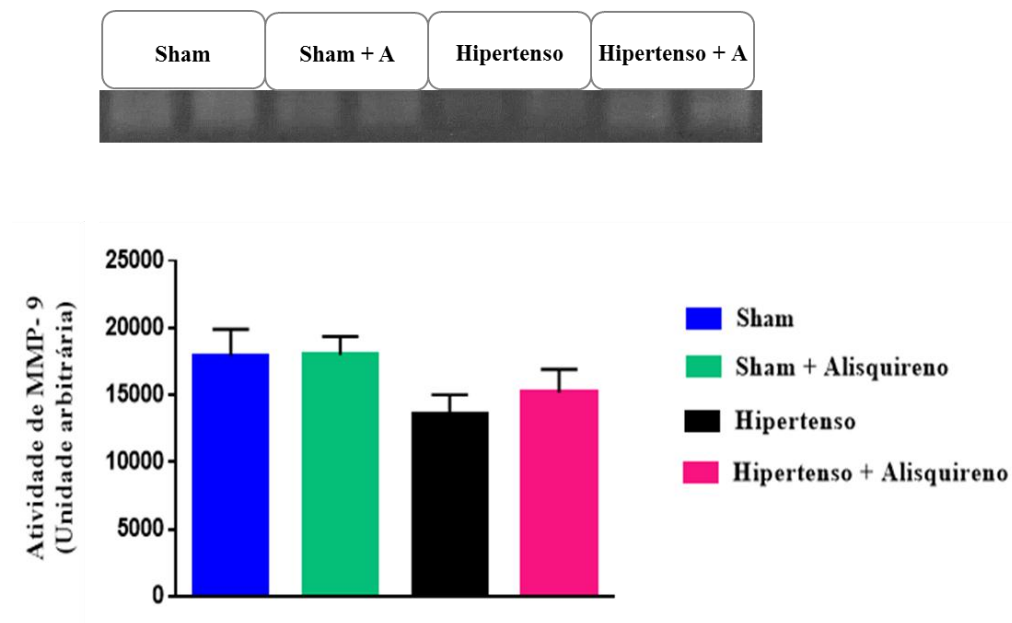


Legenda: A: grupo Sham; B: grupo Sham + Alisquireno; C: grupo Hipertenso; D: grupo Hipertenso + Alisquireno. Estão indicadas a fenda de filtração (setas), os pedicelos (cabeças de seta), a membrana basal glomerular (\*) e o corpo celular do podócito (#). Barra de calibração: 1  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 Quantificação da atividade de MMP-9

Na análise da atividade de metaloproteinase-9 (MMP-9) não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 17). Entretanto, o grupo Hipertenso apresentou uma tendência na diminuição dos níveis de MMP-9 quando comparado aos grupos Sham e Sham + Alisquireno.

Figura 17 - Análise da atividade de MMP-9 (unidade arbitrária)



Legenda: n=7 para todos os grupos experimentais.

### 3.6 Análises bioquímicas do plasma e da urina

#### 3.6.1 Análise com tira reagente

A análise qualitativa da urina foi realizada com a tira reagente. Os parâmetros avaliados foram descritos na Tabela 1, sendo os resultados expressos em cruces (+), números ou ausência de determinado parâmetro. Dentre os parâmetros avaliados, o urobilinogênio, bilirrubina, nitrito, corpos cetônicos e glicose foram negativos em todos os grupos



experimentais e o pH apresentou valores próximos a 7,0. Em relação à análise de proteínas, o grupo Hipertenso apresentou um aumento da mesma na urina quando comparado aos grupos Sham e Sham + Alisquireno. Já o grupo Hipertenso + Alisquireno apresentou uma redução de proteínas urinárias. A presença de leucócitos foi detectada em todos os grupos, porém os animais do grupo Hipertenso apresentaram um aumento dos mesmos, enquanto que no grupo Hipertenso + Alisquireno, este número reduziu, assim como observado nos grupos Sham e Sham + Alisquireno. A densidade urinária variou entre os grupos, porém os valores encontrados estão dentro da faixa de normalidade.

Tabela 1 - Análise qualitativa de diversos parâmetros da urina

<b><u>Parâmetros</u></b>	<b>Sham</b>	<b>Sham + Alisquireno</b>	<b>Hipertenso</b>	<b>Hipertenso + Alisquireno</b>
<b>Cor</b>	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo	Amarelo
<b>Urobilinogênio</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Bilirrubina</b>	(2 +)	(2 +)	(2 +)	(2 +)
<b>Proteínas</b>	(1 +)	(1 +)	(3 +)	(2 +)
<b>Nitrito</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Cetonas</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Glicose</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>pH</b>	7	7	7	7
<b>Densidade</b>	1000	1000	1020	1005
<b>Leucócito</b>	(1 +)	(1 +)	(2 a 3 +)	(1 +)

### 3.6.2 Dosagens bioquímicas do plasma

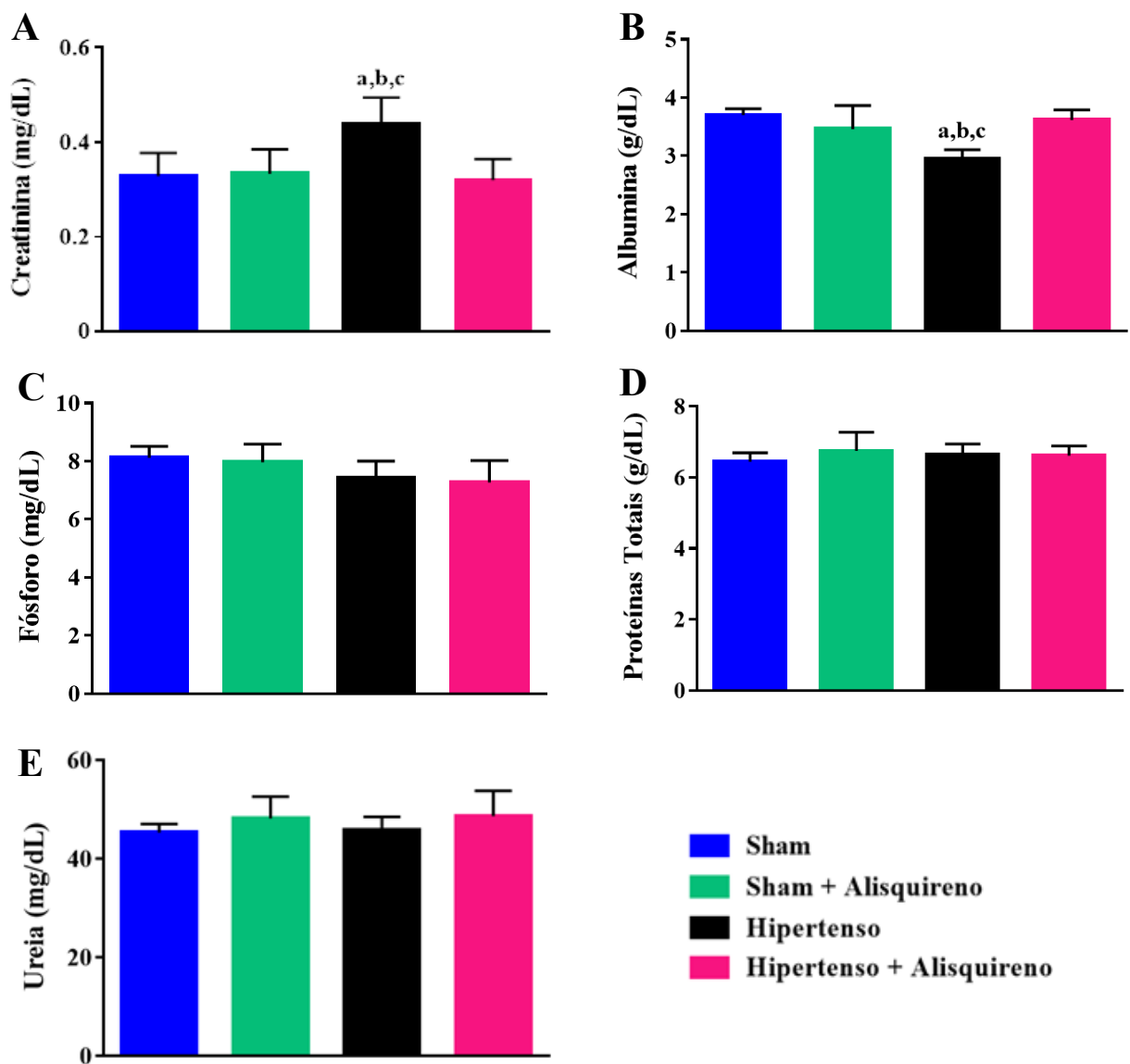
Os níveis plasmáticos de creatinina, albumina, fósforo, proteínas totais e ureia foram avaliados nos ratos dos quatro grupos experimentais (Figura 18). Os níveis de fósforo (Figura 18 C), proteínas totais (Figura 18 D) e ureia (Figura 18 E) não apresentam diferença significativa entre os grupos.

Os resultados referentes aos níveis de creatinina (Figura 18 A) evidenciaram um aumento significativo no grupo Hipertenso comparado aos demais grupos. Os grupos Sham,

Sham + Alisquireno e Hipertenso + Alisquireno não apresentaram diferença estatística entre si.

Já os níveis de albumina plasmática (Figura 18 B) apresentaram uma diminuição significativa no grupo Hipertenso quando comparado aos grupos Sham, Sham + Alisquireno e Hipertenso + Alisquireno, que não apresentaram diferença estatística entre si.

Figura 18 - Parâmetros bioquímicos no plasma



Legenda: A: níveis de creatinina (mg/dL); B: níveis de albumina (g/dL); C: níveis de fósforo (mg/dL); D: níveis de proteínas totais (g/dL); E: níveis de ureia (mg/dL). (a)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham, (b)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham + Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Hipertenso + Alisquireno.  $n=7$  para todos os grupos experimentais.

### 3.6.3 Dosagens bioquímicas da urina

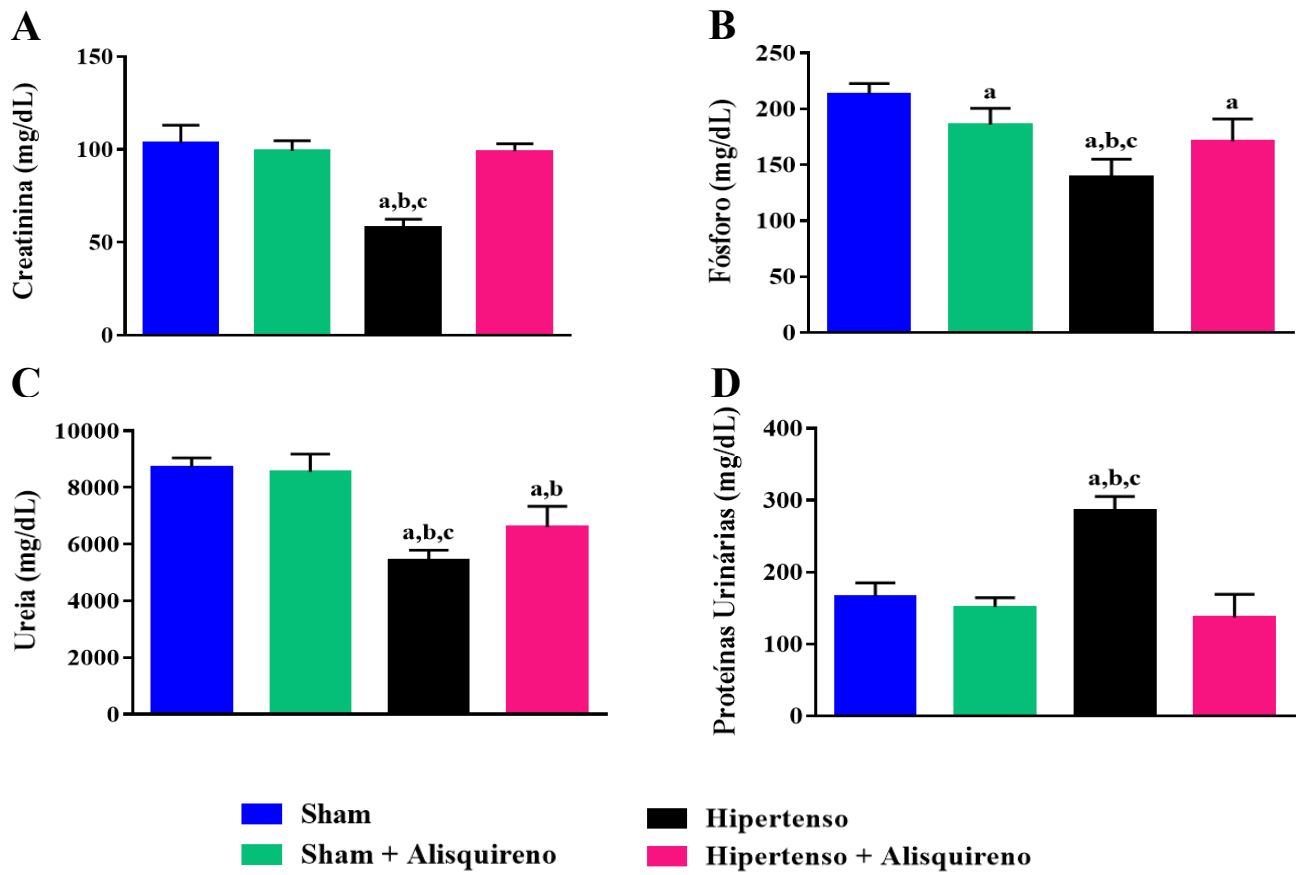
Os níveis de creatinina, fósforo, ureia e proteínas urinárias foram avaliados nos ratos de todos os grupos experimentais (Figura 19). Os níveis de creatinina (Figura 19 A) evidenciam uma diminuição significativa de sua excreção no grupo Hipertenso quando comparado aos demais grupos, que não apresentaram diferença entre si.

Os resultados referentes aos níveis de fósforo (Figura 19 B) mostram uma diminuição significativa nos grupos Sham + Alisquireno, Hipertenso e Hipertenso + Alisquireno comparados ao grupo Sham. Porém, apenas o grupo Hipertenso apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos Sham + Alisquireno e Hipertenso + Alisquireno.

O grupo Hipertenso apresentou diminuição significativa nos níveis de ureia (Figura 19 C) quando comparado aos grupos Sham, Sham + Alisquireno e Hipertenso + Alisquireno, sendo que este último apresentou diferença estatística em relação aos grupos Sham e Sham + Alisquireno.

Os níveis de proteínas urinárias (Figura 19 D) apresentaram um aumento significativo no grupo Hipertenso comparado aos grupos Sham, Sham + Alisquireno e Hipertenso + Alisquireno, que não apresentaram diferença estatística entre si.

Figura 19 - Parâmetros bioquímicos na urina



Legenda: A: níveis de creatinina (mg/dL); B: níveis de fósforo (mg/dL); C: níveis de ureia (mg/dL); D: níveis de proteínas urinárias (mg/dL). (a)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham, (b)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham + Alisquireno e (c)  $p < 0,05$  em relação ao grupo Hipertenso + Alisquireno.  $n=7$  para todos os grupos experimentais.

## 4 DISCUSSÃO

O modelo de hipertensão renovascular 2R1C, desenvolvido por Goldblatt em 1934, é amplamente utilizado para o estudo experimental da fisiopatologia da hipertensão e drogas anti-hipertensivas (Amat *et al.*, 2014). Este modelo está associado a redução do fluxo sanguíneo que, conseqüentemente, estimula a secreção de renina levando a superativação do SRAA e aumento da pressão arterial. Além disso, a hipoperfusão renal crônica provoca atrofia do rim, inflamação, fibrose intersticial e atrofia tubular (Oliveira-Sales e Boim, 2016). No presente estudo, observamos que a estenose da artéria renal esquerda provocou elevação da pressão arterial sistólica, perda da função renal, aumento da expressão de renina, laminina e de citocinas pró-inflamatórias, além de uma fibrose severa, desestruturação tubular e alterações na membrana basal glomerular.

Tem-se reportado que a superativação do SRAA é um dos fatores de risco importantes na isquemia renal. Estudos anteriores (Efrati *et al.*, 2012; Kontogiannis e Burns, 1998; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012) demonstram que o SRAA é superativado e o nível sérico de Ang II é significativamente elevado nos animais com danos renais. Além disso, o SRAA local também desempenha um papel importante na lesão cardíaca ou renal (Kontogiannis e Burns 1998; Oyamada *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011). Pesquisadores têm sustentado a hipótese de que o efeito vasoconstritor de Ang II exacerba os efeitos associados à isquemia do rim (Allred *et al.*, 2000; Jerkic *et al.*, 2004). Além disso, Ang II pode causar estresse oxidativo (Kim *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2003) e agravar a progressão da inflamação provocada pela lesão renal (Thurman, 2007). Conforme mostrado no nosso estudo, foi determinado que a administração de Alisquireno em animais hipertensos pode, efetivamente, inibir a ativação de SRAA, através da diminuição da expressão de renina, minimizando o dano renal.

O desenvolvimento da hipertensão sistêmica nos animais 2R1C está associado ao aumento da secreção de renina pelas células justaglomerulares renais. Sabe-se que o modelo de hipertensão renovascular 2R1C é dependente de Ang II com hipersecreção de renina, acarretando no desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (Kashyap *et al.*, 2016). Após o tratamento com Alisquireno, neste estudo, a expressão de renina foi normalizada devido à supressão da atividade do SRAA acarretando na redução da PAS dos animais hipertensos 2R1C. Além disso, nossos achados evidenciaram que o tratamento com Alisquireno induziu o remodelamento do tecido renal, melhorando significativamente sua

morfologia, diminuindo a fibrose intersticial e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TGF- $\beta$ . Já foi descrito na literatura que o Alisquireno melhora parâmetros fisiológicos, como a diminuição da PAS, e possui ação protetora renal através da supressão da produção de colágenos do tipo III e IV e redução da expressão de TGF- $\beta$ , sendo este o mediador chave na progressão da patogênese da fibrose renal, através da estimulação da produção de matriz extracelular (Bottinger, 2007; De Zeeuw *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2007; Lan, 2003; Nussberger *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). De acordo com estudos anteriores, os efeitos fibróticos do TGF- $\beta$  podem ser resumidos em dois eventos celulares: apoptose e transição de células epiteliais para mesenquimais. A indução da apoptose pelo TGF- $\beta$  está associada a depleção de podócitos, glomeruloesclerose, perda dos capilares glomerulares ou peritubulares, além de atrofia tubular (Cho, 2010; Meier *et al.*, 2007). Deste modo, observamos que a administração do Alisquireno promoveu diminuição dos níveis de TGF- $\beta$  e, conseqüentemente, o remodelamento renal, diminuindo a fibrose do tecido.

Um dos mecanismos regulatórios da fibrose são as proteases que atuam na degradação da matriz extracelular, como as metaloproteinasas da matriz. As MMPs são uma grande família de enzimas que incluem colagenases, gelatinases e elastases intersticiais. Elas degradam uma ampla quantidade de componentes da matriz extracelular e estão envolvidas em uma variedade de processos no qual o remodelamento tecidual desempenha um papel principal. As subfamílias de MMPs mais comumente citadas em trabalhos que envolvem fibrose renal são a MMP-2 e MMP-9, que compartilham a habilidade de degradar os colágenos dos tipos IV e V. No glomérulo, células epiteliais sintetizam tanto MMP-2 quanto MMP-9, enquanto células mesangiais produzem apenas MMP-2. Mudanças na expressão ou atividade dessas MMPs no glomérulo estão diretamente relacionadas com uma matriz extracelular alterada, que pode levar a diminuição ou perda da função renal (Lelongt, *et al.*, 2001).

Os inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) desempenham um papel importante na manutenção do balanço entre a deposição e degradação da matriz extracelular. Quatro membros da família TIMP foram caracterizados e designados como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (Cai *et al.*, 2008), sendo o TIMP-1 e o TIMP-2 os principais inibidores de MMP-9 e MMP-2, respectivamente. Com a diminuição dos níveis de MMPs e aumento de TIMPs, a degradação de matriz é inibida. A alta prevalência de TIMP nos rins já foi relacionada a diversas doenças renais humanas, estando associado com o avanço da fibrose. Nossos resultados referentes a atividade de MMP-9 não apresentaram diferença significativa

entre os grupos experimentais, porém evidenciaram uma tendência na diminuição da mesma no grupo Hipertenso. Este dado sugere, indiretamente, que os níveis de TIMP podem estar aumentados no tecido renal, uma vez que foi constatada uma redução da atividade de metaloproteinases, aumento da deposição de colágeno e expressão de laminina, além de estabelecimento de fibrose intersticial. Cai *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2010) e Lelongt *et al.* (2001) relataram que uma diminuição de MMPs está correlacionada com a progressão de doenças renais e com a acumulação da matriz extracelular, aceleração da inflamação e aumento dos níveis de TGF- $\beta$ , que pode aumentar os níveis de TIMP.

A laminina é o principal componente da membrana basal e conecta as células aos demais componentes da membrana, assim como modula a proliferação, diferenciação e motilidade celular (Kumar, 2013). Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo da síntese de laminina perivascular no grupo Hipertenso através da detecção e quantificação da mesma por imunohistoquímica. De acordo com estudos anteriores, este aumento está associado a processos fisiopatológicos que acometem o néfron, como a progressão de células mesangiais e o consequente desenvolvimento de sua matriz, provocando espessamento da membrana basal (Pinto, 1998). O aumento da pressão e da filtração glomerular nos néfrons provoca lesões escleróticas, ou seja, a substituição do tecido normal por tecido conjuntivo, iniciando com o acúmulo de matriz extracelular (Guyton & Hall, 2003). A expansão mesangial é uma consequência desta acumulação, e provoca o aumento da deposição de componentes como colágeno, laminina e fibronectina, devido ao aumento da produção desses elementos e/ ou diminuição da degradação (Fioretto e Mauer, 2007). Além disso, a Ang II pode agravar a expansão mesangial, culminando na progressão da doença renal. Os efeitos da Ang II incluem proliferação das células mesangiais e indução na expressão de TGF- $\beta$ , que resultam no aumento da síntese de matriz extracelular (Brenner, 2003).

Outrossim, a análise da ultraestrutura renal evidenciou que os animais do grupo Hipertenso apresentaram retração dos pedicelos, os prolongamentos secundários do podócito, perda da integridade da fenda de filtração glomerular e espessamento da MBG. Este último corrobora o aumento da expressão de laminina. Evidências demonstram que lesões aos podócitos estão intimamente correlacionadas com a proteinúria e, consequente, perda da função renal, uma vez que os pedicelos estão interligados entre si por um diafragma em fenda, que é a principal barreira de filtração (Pavenstadt *et al.*, 2003; Wartiovaara *et al.*, 2004). Em nosso estudo, os animais hipertensos tratados com Alisquireno evidenciaram integridade dos pedicelos e da fenda de filtração, assim como normalização da MBG.

Adicionalmente, demonstramos uma redução do quadro inflamatório do rim, através do aumento da expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e da diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6, citocinas pró-inflamatórias, em ratos hipertensos 2R1C tratados com Alisquireno. A IL-10 é uma citocina que atua de forma anti-inflamatória, por exemplo, inibindo a produção de outras citocinas, pró-inflamatórias, e estimulando células anti-inflamatórias, como células T reguladoras e macrófagos (Moore *et al.*, 2001; Wang e Harris, 2011). Uma deficiência na expressão de IL-10 pode agravar o desenvolvimento da doença renal crônica através da progressão da aterosclerose (George *et al.*, 2004). Em nosso modelo de hipertensão 2R1C, o grupo Hipertenso apresentou uma diminuição da expressão de IL-10, enquanto os animais Hipertensos tratados com o Alisquireno apresentaram maior expressão desta citocina.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, nosso estudo demonstrou que os animais com hipertensão apresentaram um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6, principalmente na região tubular, sugerindo que essas citocinas podem desempenhar um papel no desenvolvimento da hipertensão inflamatória (Cottone *et al.*, 1998; Dzielak, 1992). Já foi visto que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel na manutenção da inflamação através da indução de moléculas de adesão, fatores quimiotáticos e citocinas, além de atuar na infiltração e ativação de macrófagos no rim remanescente. Em ratos com insuficiência renal, o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  foi observado principalmente nos túbulos renais e células intersticiais, sugerindo que o aumento da expressão dessa citocina está associado à fibrose intersticial (Taal *et al.*, 2000).

Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 estão correlacionados com o aumento e variabilidade da PAS, propondo que a inflamação pode ser um mediador entre as alterações nos níveis da PAS e os danos do órgão alvo (Kim *et al.*, 2008). Estudos anteriores demonstraram um aumento na produção de fatores inflamatórios, como IL-6 e TNF- $\alpha$  em ratos hipertensos pelo modelo 2R1C (Bivol *et al.*, 2008; Matavelli *et al.*, 2011) e em pacientes com hipertensão renovascular (Alhadad *et al.*, 2007). Entretanto, os animais hipertensos tratados com Alisquireno apresentaram redução significativa da marcação de TNF- $\alpha$  e IL-6, sugerindo que o Alisquireno é capaz de reduzir o quadro inflamatório estabelecido pela estenose da artéria renal.

Em nossos resultados de avaliação da função renal por análises bioquímicas do plasma e urina, os animais do grupo Hipertenso apresentaram um aumento significativo nos níveis de proteínas totais e creatinina plasmática, além de diminuição da excreção de



creatinina, fósforo e ureia. Entretanto, no grupo Hipertenso tratado com Alisquireno foi observado uma restauração dos níveis plasmáticos e urinários dos marcadores citados.

Um importante marcador de função renal é a determinação dos níveis plasmáticos e urinários de creatinina. A creatinina é um produto oriundo do metabolismo muscular e da ingestão de carne. Aproximadamente 98% da creatina é mantida no músculo e aproximadamente 1,6% desta é convertida em creatinina por dia, sendo rapidamente excretada pelo rim. Dessa forma, a produção e liberação de creatinina pelo músculo são praticamente constantes. A creatinina é livremente filtrada pelo glomérulo e não é reabsorvida nem metabolizada pelo rim. Entretanto, aproximadamente 25% da creatinina urinária é proveniente da secreção tubular, sendo esta menos significativa quanto menor for a taxa de filtração glomerular (Johnson, 2008). Adicionalmente, seu nível plasmático aumenta quando há deficiência na capacidade de filtração renal, sugerindo que existem danos aos néfrons (Abensur, 2011). Em nossa análise, o tratamento com Alisquireno foi capaz de reduzir a creatinina plasmática e aumentar a urinária a níveis próximos dos animais do grupo Sham. Nossos achados sobre os níveis de creatinina suportam dados da literatura que associaram a alteração renal ao aumento dos níveis plasmáticos de creatinina, bem como o tratamento com Alisquireno à eficiência na redução desses níveis (Wang *et al.*, 2012).

A ureia constitui o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo que 90% deste analito é excretado pelos rins e o restante eliminado pelo trato gastrointestinal e pela pele. Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não ser reabsorvida nem secretada ativamente, a ureia é um marcador fraco da filtração glomerular, pois 40% a 70% retornam para o plasma por um processo de difusão passiva tubular, que é dependente do fluxo urinário. Dessa forma, a estase urinária leva a um maior retorno de ureia ainda nos túbulos renais e a uma subestimação da taxa de filtração glomerular (Johnson, 2008). Por isso, este é um parâmetro pouco utilizado para avaliação da função renal. Outros fatores podem mudar significativamente os valores séricos da ureia sem terem relação com a função renal, como a ingestão proteica, a taxa de produção hepática, infecção, depleção de sódio e uso de determinados medicamentos (Vidigal, 2009; Stevens e Levey, 2005). Em nossos resultados, não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de ureia entre os grupos experimentais. Entretanto, foi observado uma diminuição da excreção de ureia na urina no grupo Hipertenso, enquanto que o grupo Hipertenso tratado com Alisquireno apresentou um aumento desses níveis.

O fósforo é o sexto elemento mais abundante no organismo e existe em combinações orgânicas dentro das células e inorgânico no plasma (ligado ao cálcio e magnésio). Dentre

suas inúmeras funções, pode ser destacada sua participação no metabolismo energético. Lesões progressivas nos néfrons estão diretamente relacionadas com a diminuição da excreção renal de fosfato e ao aumento do fósforo sérico. Este aumento causa diminuição do cálcio circulante e, conseqüentemente, estimula a secreção do paratormônio na tentativa de aumentar os níveis de cálcio. A retenção de fósforo é um fator preponderante na redução da capacidade renal de produzir 1,25- dihidroxicolecalciferol D3 (calcitriol). Como consequência da diminuição do calcitriol, ocorre uma redução da absorção intestinal e da reabsorção óssea de cálcio, hipocalcemia e aumento da secreção do paratormônio. Na tentativa de aumentar as concentrações séricas de cálcio, ocorre o aumento da reabsorção renal de cálcio e da reabsorção de cálcio dos ossos e reabsorção do trato gastrointestinal. Na doença renal crônica, sem o rim funcional, o fósforo não é excretado e o processo se agrava (Berndt & Knox 1992; Knochel 1992). Em nossa análise, o grupo Hipertenso apresentou diminuição significativa da excreção urinária de fósforo quando comparado aos demais grupos

A proteinúria, ou seja, a presença de proteínas na urina, é tóxica para os túbulos e pode provocar inflamação tubulointersticial, além de estar associada a danos no rim através da estimulação de efeitos pró-inflamatórios. Sendo assim, este marcador bioquímico é considerado um forte parâmetro para identificação da progressão da DRC (Gorritz e Martinez-Castelao, 2012). Em nossas análises, foi observada proteinúria nos animais do grupo Hipertenso tanto através do método qualitativo, pela tira reagente, quanto do método quantitativo, através da análise bioquímica plasmática e urinária. No grupo Hipertenso tratado com Alisquireno, a proteinúria reduziu significativamente, equiparando-se aos valores encontrados no grupo Sham. Portanto, esses dados mostram que o tratamento com Alisquireno foi capaz de reverter a lesão renal causada pela estenose da artéria no grupo Hipertenso, no qual havia intensa liberação de proteínas na urina, que estavam concentradas no plasma. Estudos anteriores associaram a administração do Alisquireno com o aumento da excreção urinária de sódio (Fisher *et al.*, 2008) e redução da proteinúria, evitando a progressão da disfunção renal (Li *et al.*, 2012; Moriyama *et al.*, 2012).

Através da análise qualitativa com a tira reagente, foi detectado aumento dos níveis de leucócitos na urina de ratos hipertensos, condição denominada leucocitúria. Em doenças renais, como a DRC, ocorre alterações morfológicas na barreira de filtração glomerular, permitindo a passagem de leucócitos para a urina (Johnson *et al.*, 2004). No entanto, após o tratamento com Alisquireno, foi observada uma diminuição considerável na quantidade de leucócitos no grupo Hipertenso, igualando aos valores detectados no grupo Sham.

Portanto, de acordo com os dados obtidos, este estudo mostra que o tratamento diário com Alisquireno, por via oral, promoveu a redução da pressão arterial sistêmica, recuperação do parênquima renal e da barreira de filtração glomerular, atenuando a fibrose intersticial, além de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias no córtex do rim de ratos com hipertensão renovascular. Adicionalmente, foi capaz de melhorar a função renal, através da restauração dos níveis plasmáticos de creatinina, e dos níveis urinários de proteínas, creatinina, fósforo e ureia. Sendo assim, a administração de Alisquireno pode ser considerada uma alternativa terapêutica no tratamento de pacientes hipertensos com doença renal.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a administração de Alisquireno em ratos com hipertensão renovascular 2R1C promove:

- a) Controle dos níveis da PAS e da atividade do SRAA com a diminuição da síntese e liberação de renina;
- b) Remodelamento da morfologia estrutural e ultraestrutural do tecido renal minimizando a fibrose intersticial e restaurando a membrana basal glomerular e a matriz extracelular;
- c) Redução do quadro inflamatório através da diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-6, e aumento da expressão de citocina anti-inflamatória, IL-10;
- d) Restauração da função renal por diminuição da excreção urinária de proteínas e concentração plasmática de creatinina.

Deste modo, nossos achados sugerem que o tratamento com Alisquireno possui efeitos benéficos na estrutura e funcionalidade do rim, melhorando os efeitos sistêmicos e locais causados pela estenose da artéria renal esquerda.

## REFERÊNCIAS

- Abensur, H. Biomarcadores na nefrologia. Roche. 2011.
- Acierno, M.J.; Labato, A. Hypertension in renal disease: diagnosis and treatment. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Baton Rouge, v. 20, P. 23-30, 2005.
- Aires, M. M. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008; 3ª ed.
- Alhadad A, Guron G, Fortuna-Nowakowska E, Saeed A, Mattiasson I, Jensen G, Lindblad B, Gottsater A, Herlitz H. Renal angioplasty causes a rapid transient increase in inflammatory biomarkers, but reduced levels of interleukin-6 and endothelin-1 1 month after intervention. *J Hypertens* 2007;25:1907–1914.
- Allred, A.J., Chappell, M.C., Ferrario, C.M., Diz, D.I., 2000. Differential actions of renal ischemic injury on the intrarenal angiotensin system. *Renal Physiology— American Journal of Physiology* 279, F636–645.
- Al-Suraih M, Grande JP. Management of renal artery stenosis: What does the experimental evidence tell us? *World J Cardiol.* 2014; 6(8): 855-60.
- Amat N, Amat R, Abdureyim S, Hoxur P, Osman Z, Mamut D, Kijjoa A. Aqueous extract of *dioscorea opposita thunb* normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:36
- Atlas, SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007; (8 Suppl B): 9-20.
- Azizi M, Webb R, Nussberger J, Hollenberg NK. Renin inhibition with aliskiren: Where are we now, and where are we going? *J Hypertens.* 2006; 24(2):243–256.
- Berndt T, Knox F. Renal regulation of phosphate excretion. In: Giebisch G (ed) *The kidney: physiology and pathophysiology*. Raven Press, New York. 1992; 2511–2532
- Bivol LM, Berge RK, Iversen BM. Tetradecylthioacetic acid prevents the inflammatory response in two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294:R438–R447.
- Bottinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol.* 2007; 27: 309-20. 3.
- Brenner BM. Nephrology forum: Retarding the progression of renal disease. *Kidney International.* 64(1): 370–378, 2003.
- Brown, S.A. Pathophysiology of systemic hypertension. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6th. Philadelphia: W. B. Saunders, 2005, v.1, cap. 129, p.472-476.

- Cai, G. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 exacerbated renal interstitial fibrosis through enhancing inflammation. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2008; 23(6): 1861-1875.
- Cervenka L., Vaneckova I., MALY J., Horacek V., El-Cahr S.S. Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT2 receptor. *J.Hypertens*. 2003; 21: 1531-1538.
- Chade AR, Rodriquez-Porcel M, Grande JP, Zhou XJ, Sica V, Napoli C, Sawamura T, Textor SC, Lerman A, Lerman LO. Mechanisms of renal structural alterations in combined hypercholesterolemia and renal artery stenosis. *Arteroscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1295– 1301.
- Chen Y, Meng L, Shao H, Yu F. Aliskiren vs. other antihypertensive drugs in the treatment of hypertension: a meta-analysis. *Hypertens Res*. 2013; 36(3):252-261.
- Cheng, X. et al. Fosinopril and valsartan intervention in gene expression of klotho, MMP-9, TIMP-1, and PAI-1 in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Central South University*. 2010; 35(10): 1048-1056.
- Cho, M. H. Renal fibrosis. *Korean Journal of Pediatrics*. 2010; 53(7): 735-740.
- Chou CL, Pang CY, Lee TJ, Fang TC. Direct renin inhibitor prevents and ameliorates insulin resistance, aortic endothelial dysfunction and vascular remodeling in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens Res* 2013; 36:123-128.
- Cole J, Ertoy D, Lin H, Sutliff RL, Ezan E, Guyene TT, Capecchi M, Corvol P, Bernstein KE. Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000; 106(11): 1391-1398.
- Cottone S, Vadalà A, Vella MC, Mulé G, Contorno A, Cerasola G. Comparison of tumor necrosis factor and endothelin-1 between essential and renal hypertension patients. *J Hum Hypertens*. 1998;12:351–354.
- Darke, P.; Bonagura, J.D.; Kelly, D.F. Doenças cardiovasculares. *Cardiologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000, cap. 21, p. 134-135.
- De Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, Snapinn S, Cooper ME, Mitch WE, Brenner BM. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. *Kid Int*. 2004;65:2309 – 2320.
- Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*. 1991; (4 Suppl): II 100-5.
- Dzielak DJ. The immune system and hypertension. *Hypertension* 1992;19(Suppl. 1):I36–I44.
- Efrati, S., Berman, S., Hamad, R.A., Siman-Tov, Y., Ilgiyaev, E., Maslyakov, I., Weissgarten, J., 2012. Effect of captopril treatment on recuperation from ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. *Nephrology Dialysis Transplantation* 27, 136–145.

Escobar C, Echarri R, Barrios V. Emerging drug combinations to optimize renovascular protection and blood pressure goals *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* 2012; 5:69-80.

Faber JE, Brody MJ. Neural contribution to renal hypertension following acute renal artery stenosis in conscious rats. *Hypertension* 1983; 5: 1155-64.

Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, Mueller DN, Feldt S, Cumin F, Maniara W, Persohn E, Schuetz H, Jan Danser AH, Nguyen G. *Hypertension*. 2008; 52:130–136.

Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Seminars in Nephrology*. 27 (2): 195-207, 2007.

Fisher ND, Jan Danser AH, Nussberger J, Dole WP, Hollenberg NK. Renal and hormonal responses to direct renin inhibition with aliskiren in healthy humans. *Circulation*. 2008; 117:3199 –3205.

Fogari R, Zoppi A. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6:869-82.

Foss MLK, SJ. *Bases da Fisiologia do Exercício*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Freudenthaler SM, Schenck T, Lucht I, Gleiter CH. Feneterol stimulates human erythropoietin production via activation of the renin angiotensin system. *Br J Clin Pharmacol*. 1999; 48(4): 631-4.

Friedrich S, Schmieder RE. Review of direct renin inhibition by aliskiren. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*. 2013; 14(3): 193–196.

Fujii J, Kurihara H, Yamaguchi H, Terasawa F and Murata K: A persistent hypertension due to unilateral renal-artery constriction in the rabbit. *Jpn Circ J* 31: 1197-1200, 1967.

Fyhrquist, F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008; 264(3): 224-36.

George S, Ruan XZ, Navarrete C, Turner D, Reynard M, Sweny P, Hamilton G, Wheeler DC, Powis SH, Moorhead JF, Varghese Z. Renovascular disease is associated with low producer genotypes of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Tissue Antigens* 2004;63:470–475.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistente elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934. 28;59(3):347-79.

Gorritz JL, Martinez-Castelao A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplant Rev (Orlando)*. 2012; 26(1):3-13.

Grauer, G.F. [2009]. Diagnosis, management of hypertension, proteinúria in dogs with chronic renal disease. *DVM Newsmagazine*, Cleveland, Ohio-USA April 2009.

Grauer, G.F. et al.; Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Fort Collins, v. 14, n. 5, p. 526-533, 2000.

Gregory, F.G. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Veterinary Clinical Small Animal*, Florida, v. 35, p. 281-296, 2005.

Gregory, F.G. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Veterinary Clinical Small Animal*, Florida, v. 35, p. 281-296, 2005.

Gupta S, ET AL., Correlation of renin angiotensin system (RAS) candidate gene polymorphisms with response to Ramipril in patients with essential hypertension. *J Postgrad Med*. 2015, 61(1): 21-6.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Text Book of Medical Physiology*. Filadelfia: Elsevier Saunders, 2006; 11<sup>a</sup> ed.

Hall JE. Historical Perspective of the rennin- angiotensin system. *Molecular Biotechnology*. 2003; 24: 27-38.

Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. *Hypertension*. 2008;52:563-72.

Jaakko Patrakka, Karl Tryggvason. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. 2010; *BBRC* 396:164-9.

Jacob, F. et al. Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Minnesota, v. 222, n. 3, p. 322-329, 2003.

Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013;382:260-72.

Jerkic, M., Miloradovic, Z., Jovovic, D., Mihailovic-Stanojevic, N., Elena, J.V., NasticMiric, D., Grujic-Adanja, G., Rodriguez-Barbero, A., Markovic-Lipkovski, J., Vojvodic, S.B., Manero, M.V., Prieto, M.P., Lopez-Novoa, J.M. Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004;19, 83–94.

Johnson AM. Aminoácidos e proteínas. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Fundamentos de Química Clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 295-325

Johnson CA, Levey AS, Coresh J, Levin A, Lau J, Eknoyan G. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease in adults: Part II. Glomerular filtration rate, proteinuria, and other markers. *Am Fam Physician*. 2004;70(6):1091-7.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013; 12<sup>a</sup> ed. p.371-388.



Kashyap S, Boyilla R, Zaia PJ, Ghossan R, Nath KA, Textor SC, Lerman LO, Grande JP. Development of renal atrophy in murine 2 kidney 1 clip hypertension is strain independent. *Res Vet Sci.* 2016; 107:171-7.

Kelly DJ, ZhaNG Y, Moe G, Naik G, Gilbert RE. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. *Diabetologia*, 2007.

Kim KI, Lee JH, Chang HJ, et al. Association between blood pressure variability and inflammatory marker in hypertensive patients. *Circ J.* 2008;72:293–298.

Klag, M.J. et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *The New England Journal of Medicine*, Baltimore, v. 334, p. 13-18, 1996.

Knochel JP. 1992. The Clinical and physiological implications of phosphorus deficiency, p.2533-2562. In: Seldin D.W. & Giebisch G. (Eds), *The kidney: Physiology and pathophysiology*. 2nd ed. Raven Press, New York.

Kontogiannis, J., Burns, K.D., 1998. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *American Journal of Physiology* 274, F79–90.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Patologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.

Lamb EJ, Levey AS, Stevens PE. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: evolution not revolution. *Clin Chem* 2013; 59: 462-465.

Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003; 12: 25-9.

Ledingham JM. The etiology of hypertension. *Practitioner.* 1971; 207(237): 5-19.

Leenen FH and de Jong W: A solid silver clip for induction of predictable levels of renal hypertension in the rat. *J Appl Physiol* 31: 142-144, 1971.

Lelongt, B. et al. Do matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (gelatinases) play a role in renal development, physiology and glomerular diseases? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 2001; 10(1): 7-12.

Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med.* 2005; 146(3): 160-73.

Levey AS, Coresh J, Balk E, et al, for the National Kidney Foundation. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139: 137–47.

Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012; 379: 165-180.

Li SY, Chen YT, Yang WC, et al. Effect of add-on direct renin inhibitor aliskiren in patients with non-diabetes related chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2012. doi:10.1186/1471-2369-13-89.

Lizakowski S, Tylicki L, Rutkowski, B. Direct renin inhibition – a promising strategy for renal protection? *Med Sci Monit.* 2013;19:451–457.

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991; 17: 707-19.

Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin at receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension* 2011;57:308–313.

Meier, M. et al. Deletion of protein kinase C-epsilon signaling pathway induces glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis in vivo. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007; 18(4): 1190-1198.

Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept.* 1999; 81(1-3): 1-10.

Mindel, G.; Morrison, A. R. Is hypertension a disorder of volume control? What is the evidence? *Nephron. physiol.*, v. 101, n.3, p. 63 - 71, 2005.

Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Palatresi S, Bencini C, Del Vecchio C, Mansueto G, Arosio E, Santonastaso CL, Lechi A, Morganti A, Patrono C. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 2002;106:2800–2805.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.

Morais, H.A.; Pereira, P.M. Terapêutica do sistema cardiovascular. *Terapêutica Veterinária.* 2. ed. São Paulo: Roca, 2002, Cap.13, p. 265-284.

Moriyama T, Tsuruta Y, Kojima C, et al. Beneficial effect of aliskiren combined with olmesartan in reducing urinary protein excretion in patients with chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol.* 2012;44:841–5.

Mount DB. Thick Ascending Limbo of the Loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014; 9(11): 1974-86.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Willey JZ, Woo D, Yeh RW, Turner MB. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2015; 131(4):e29-322.

Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest*. 1997; 100(9): 2310-2314.

Musini VM, Fortin PM, Bassett K, Wright JM. Blood pressure lowering efficacy of renin inhibitors for primary hypertension: a Cochrane systematic review. *J Hum Hypertens*. 2009; 23(8): 485-502.

Naftilan AJ, Pratt RE, Eldridge CS, Lin HL, Dzau VJ. Angiotensin II induces c-fos expression in smooth muscle via transcriptional control. *Hypertension* 1989; 13:706-11.

Navar LG, Zou L, Thun AV, Wang CT, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the mystery of Goldblatt Hypertension. *Amer Physiol Soc*. 1998; 13(4): 170-76.

Nobuhiko A, Suganuma E, Babaev VR, Fogo A, Swift LL, Linton MF, Fazio S, Ichikawa I, Kon V. Angiotensin ii amplifies macrophage-driven atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2143–2148.

Nussberger J, Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Chiang Y, Prescott MF. Plasma renin and the antihypertensive effect of the orally active renin inhibitor aliskiren in clinical hypertension. *Int J Clin Pract*. 2007;61(9):1461-8.

Obrador GT, Pereira BJ, Kausz AT. Chronic kidney disease in the United States: an underrecognized problem. *Semin Nephrol* 2002;22: 441-448.

Oliveira-Sales EB, Boim MA. Mesenchymal stem cells and chronic renal artery stenosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310(1):F6-9.

Oliveira-Sales EB, Toward MA, Campos RR, Paton JF. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. *Auton Neurosci* 2014; 183:23–29.

Organização Mundial de Saúde, 2015.

Oyamada, S., Bianchi, C., Takai, S., Robich, M.P., Clements, R.T., Chu, L., Sellke, F.W., 2010. Impact of acute myocardial ischemia reperfusion on the tissue and bloodborne renin-angiotensin system. *Basic Research in Cardiology* 105, 513–522.

Oyewole OI. Chemopreventive role of vitamin C and E on potassium bromated induced renal oxidative damage in rat. *J MedMed Sci*. 2011;2:1189-1192.

Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RA. Angiotensin-(1-7): beyond the cardiol-renal actions. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 124(7): 443-56.

- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83:253–307.
- Pereira BJ. Optimization of pre-ESRD care: the key to improved dialysis outcomes. *Kidney Int* 2000; 57: 351-365.
- Persson F, Rossing P, Schjoedt KJ, Juhl T, Tarnow L, Stehouwer CD, Schalkwijk C, Boomsma F, Frandsen E, Parving HH. *Kidney Int.* 2008; 73:1419 –1425.
- Pimenta E, Oparil S. Prehypertension: epidemiology, consequences and treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2010; 6(1): 21-30.
- Pimenta E, Oparil S. *Ther clin risk manag.* 2009; 5:459-64.
- Pinto LM. Células mesangiais e matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. *Jornal Brasileiro de Nefrologia.* 20(2): 178-185, 1998.
- Polzin, D.J.; Osborne, C.A.; Bartges, J.W. Chronic renal failure. *Textbook of veterinary internal medicine.* 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000, Cap.239, p. 1634-1662.
- Polzin, D.J.; Osborne, C.A.; Ross, S. Chronic renal failure. *Textbook of veterinary internal medicine.* 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2005, Cap.260, p. 1756-1785.
- Pradhan N, Rossi NF. Interactions between the sympathetic nervous system and angiotensin system in renovascular hypertension. *Curr Hypertens Rev.* 2013; 9(2): 121-9.
- Praxedes JN. Diretrizes sobre hipertensão arterial e uso de anti-hipertensivos na doença renal crônica. *J Bras Nefrol* 2004; 26:44-6.
- Pullalarevu R, Akbar G, Teehan G. Secondary hypertension, issues in diagnosis and treatment. *Prim Care.* 2014 41(4): 749-64.
- Rahuel J, Rasetti V, Maibaum J, Rueger H, Goschke R, Cohen NC, Stutz S, Cumin F, Fuhrer W, Wood JM, Grutter MG. Structure-based drug design: the discovery of novel non peptide orally active inhibitors of human renin. *Chem Biol.* 2000;7:493–504.
- Ravera, M.; Re, M.; Deferrari, L.; Vettoretti, S.; Deferrari, G. Importance of blood pressure control in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, 4, S98–S103.
- Riccioni G, Vitulano N, D'orazio N, Bellocchi F. Aliskiren, the first approved renin inhibitor: Clinical application and safety in the treatment of hypertension. *Adv Ther.* 2009 Jul; 26(7):700-10.
- Riccioni G. *Cardiovasc Ther.* 2011; 29:77-87
- Riella, M. C. *Principios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003; 4ª ed.
- Robles NR, Cerezo I, Hernandez-Gallego R. Renin- angiotensin system blocking drugs. *J Cardiovas Pharmacol Ther.* 2014; 19(1):14-33.

Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005; 14(8): 1019-31.

Sarafidis, P.A.; Bakris, G.L. Renin-angiotensin blockade and kidney disease. *Lancet* 2008, 372, 511–512.

Schiffrin, E.L.; Lipman, M.L.; Mann, J.F.E. Chronic Kidney Disease. *Circulation Research*, Dallas, v. 116, p. 85-97, 2007.

Scott, A.N.D. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Small Animal*, Athens, v. 38, p. 157-166, 2008.

Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Martins CT. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica. *J. Bras. Nefrol*. 2016; 2017;39, n.3, 261-266.

Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR. Relatório do censo brasileiro de diálise crônica 2012. *J Bras Nefrol* 2014;36:48-53.

Shankar A, Sun L, Klein BE, Lee KE, Muntner P, Nieto FJ, Tsai MY, Cruickshanks KJ, Schubert CR, Brazy PC, Coresh J, Klein R. Markers of inflammation predict the long-term risk of developing chronic kidney disease: a population-based cohort study. *Kidney Int* 2011;80:1231–1238.

Shimizu, M. H. M. A N-acetilcisteína atenua a progressão da doença renal crônica. 2005. Ribeirão Preto, 105f. Tese de doutorado em medicina. Faculdade de Medicina Ribeirão Preto. Departamento de Clínica Médica. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 95 (1 supl.1): 1-51.

Stevens LA, Levey AS. Measurement of kidney function. *Med Clin North Am*. 2005 May;89(3):457-73.

Stiles, J; Polzin, D.J.; Bistner, S.I. The prevalence of retinopathy in cats with systemic hypertension and chronic renal failure or hyperthyroidism. *Journal American Animal Hospital Association*, London, v. 30, n. 6, p. 564-572, 1994.

Stouffer GA, Pathak A, Rojas M. Unilateral renal artery stenosis causes a chronic vascular inflammatory response in apoe2/2 mice. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2010;121:252–264; 264–256.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(6): 881-900.

Taal, M. W. et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney International*. 2000; 58(4): 1664-1676.

Tigerstedt R, Bergman PQ. Niere und Kreislauf. *Scandin Physiol Soc*. 1898.

- Thurman, J.M., 2007. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical Immunology* 123, 7–13.
- Vaidyanathan S, Jarugula V, Dieterich HA, HOward D, Dole WP. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren. *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47(8):515–531.
- Van Esch JH, Moltzer E, Van Veghel R, Garrelds IM, Leijten F, Bouhuizen AM, Danser AH. *J Hypertens*. 2010; 28:2145-55.
- Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Martire P, Garofoli M, Gentile G, Reboldi G. Aliskiren versus ramipril in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010; 4(3): 193-200.
- Vidigal PG. Investigação laboratorial do paciente com disfunção renal. In: Erichsen E, Viana LG, Faria RMD, Santos SME. *Medicina Laboratorial para o Cl nico*. Belo Horizonte: Coopmed; 2009. p. 439-468.
- Waldmeier F, Glaenzel U, Wirz B, ET AL. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos*. 2007; 35(8):1418–1428.
- Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Feb;10(1):48-56.
- Wang Y, Harris DC. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22: 21–27.
- Wang Z, Liu Y, Han Y, Guan W, Kou X, Fu J, Yang D, Ren H, He D, Zhou L, Zeng C. Protective effects of aliskiren on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013; 718(1-3):160-6.
- Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Makela E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Tryggvason K. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest*. 2004;114:1475–1483.
- Ye, Y., Qian, J., Castillo, A.C., Perez-Polo, J.R., Birnbaum, Y. Aliskiren and valsartan reduce myocardial AT1 receptor expression and limit myocardial infarct size in diabetic mice. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2011; 25, 505–515.
- Yoo TH, Li JJ, Kim JJ, Jung DS, Kwak SJ, Ryu DR, Choi HY, Kim JS, Kim HJ, Han SH, Lee JE, Han DS, Kang SW. Activation of renin angiotensin system within podocytes in diabetes. *Kidney Int.*, v. 71, p. 1019 – 1027, 2007.
- Zhang ZH, Yu Y, Kang YM, Wei SG, Felder RB. Aldosterone acts centrally to increase brain renin-angiotensin system activity and oxidative stress in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1067–H1074.
- Zhu J-R, Sun N-L, Yang K, Hu J, Xu G, Hong H, Wang R, Tu Y-M, Ritter S, Keefe D, on behalf of the trial investigators. Efficacy and safety of aliskiren, a direct renin inhibitor, compared with ramipril in Asian patients with mild to moderate hypertension. *Hypertens Res*. 2012; 35: 28–33.

## ANEXO – Comitê de ética em pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Alterações morfofuncionais, bioquímicas e moleculares em ratos wistar submetidos a hipertensão renovascular e ao tratamento com inibidores do sistema renina-angiotensina e da enzima HMG-COA redutase (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-coa-redutase)", registrada com o nº 019/2017, sob a responsabilidade de **Jorge José de Carvalho** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 28/03/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	100
Peso/Idade	150-180 g / 45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 28 de Março de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ