

**Efeitos da administração a longo prazo de dietas
com diferentes teores de sódio sobre a função renal
de ratos espontaneamente hipertensos.**

Rebeca Caldeira Machado

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular**

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Novembro de 2015

Efeitos da administração a longo prazo de dietas com diferentes teores de sódio sobre a função renal de ratos espontaneamente hipertensos.

Rebeca Caldeira Machado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orietador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

Co-orientadora: Dr^a. Paula Frizera Vassallo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Novembro de 2015

Efeitos da administração a longo prazo de dietas com diferentes teores de sódio sobre a função renal de ratos espontaneamente hipertensos.

Rebeca Caldeira Machado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 17 de Novembro de 2015 por:

Prof. Dr. José Gerado Mill – Orientador/UFES

Prof^a. Dr^a. Paula Frizera Vassallo - Co-orientadora/UFES

Prof^a. Dr^a Nazaré Souza Bissoli Vazquez/UFES

Profa. Dra. Adriana Castello Costa Girardi - USP

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Novembro de 2015

Machado, Rebeca, 1985

Efeitos da administração a longo prazo de dietas com diferentes teores de sódio sobre a função renal de ratos espontaneamente hipertensos.

[Vitória] 2015

VXIII, 125p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2015)

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Paula Frizera Vassallo

1. Sódio. 2. Hipertensão. 3. Lesão renal. 4. Cubilina. 4. Nefrina. 5. ECA/ECA2

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o
conforme suas forças...” Eclesiastes 9:10.

AGRADECIMENTOS

Estes agradecimentos referem-se não somente aos que participaram do desenvolvimento desta tese, mas aos que contribuíram grandemente durante o período de realização do doutorado.

Acima de tudo e de todos, agradeço a Deus que me concedeu vida, grandes oportunidades, renovou as forças quando as barreiras pareciam intransponíveis e tornou todas as coisas possíveis em meu caminho conforme o Seu Poder.

Ao meu esposo Hermano, que “realizou o doutorado” junto comigo, participando de todos os momentos, bons e ruins, sempre ao meu lado com uma boa palavra que foram essenciais para a conclusão desta etapa. Aos meus pais e irmã, pelas orações, por estarem sempre presentes me apoiando e incentivando nos momentos difíceis. Aos tios, primos e amigos pelas orações e por torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. José Geraldo Mill pela oportunidade de realização do doutorado, por me conceder todo suporte e instrução necessários para minha formação profissional. Ao Enildo pela amizade e presente em muitas coletas de dados; às ex-alunas: Ludimila Forechi, Marisa Luz e Rafaella Martins pelo auxílio na coleta de dados, e aos meus companheiros do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular.

À minha co-orientadora e amiga, Dra. Paula Frizera Vassallo, pois estive nos bastidores de forma muito presente sempre que eu precisei. Obrigada pelas horas dedicadas a mim, pelos puxões de orelha e preciosos conselhos.

À Dra. Adriana Girardi por acreditar em nosso trabalho, desenvolver parte dos experimentos em seu laboratório juntamente com seus alunos Renato e Flávia. Também pelas orientações e correções realizadas, não medindo esforços para aperfeiçoamento do estudo.

Ao Prof. Dr. Robson Augusto, por me abrir as portas de seu laboratório, tendo a oportunidade de aprender e a crescer mesmo quando as condições eram adversas.

Agradeço, em especial à técnica e, agora minha amiga, Marilene Oliveira: minha companheira de bancada, sempre ao meu lado, ensinando, instruindo e me auxiliando, horas a fio para que tudo desse certo. Obrigada por tudo, Mari. Agradeço também à aluna de pós-doutorado Érica Guilhen pelo tempo dedicado a me ensinar e a me auxiliar no western blot, pelas caronas e pela companhia durante minha estadia. E à aluna de pós-doutorado Daisy por se dedicar em dar continuidade aos ensaios de western blot.

Ao Prof. Dr. Breno Valentim, pela oportunidade de realização da realização de toda de microscopia em seu laboratório e aquisição das imagens do MET. À ex-aluna de mestrado Isabella Binotti que me ensinou a técnica de histologia. Ao aluno de mestrado Tadeu Zanardo pelo processamento das amostras de microscopia eletrônica, sempre prestativo e companheiro.

À minha amiga, aluna de doutorado da pós-graduação, Flavia Freitas, que, pacientemente, me ensinou a analisar as imagens microscopia renal. E, também à prof^a Ágata Gava, que, por muitas vezes sanou minhas dúvidas.

Aos colegas do laboratório de eletromecânica cardíaca e, especialmente, aos professores Ivanita Stefanon e Dalton Vassallo. Cada um, de uma forma particular, contribuiu em minha jornada até aqui.

Aos outros colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, professores, técnicos, equipe da secretaria, da limpeza, e dos laboratórios pelas diversas horas divididas.

Às agências de fomento CNPq e FAPES.

RESUMO

Introdução: A alta ingestão de sódio contribui significativamente para o desenvolvimento da hipertensão e suas complicações. Dentre estas, a doença renal crônica. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelos danos renais e pela renoproteção produzidos por dietas de alto e baixo sal, respectivamente, são pouco compreendidos. **Objetivo:** Investigar os efeitos a longo prazo de dietas com diferentes teores de cloreto de sódio sobre a função renal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) focando nos mecanismos moleculares envolvidos no manejo renal de albumina e componentes do sistema renina angiotensina renal (SRA). **Métodos:** ratos SHR machos recém-desmamados (4 semanas) foram alimentados durante 6 meses com dietas diferindo apenas no teor de NaCl: dieta padrão de sal (NS: 0.3 %), dieta de baixo sal (LS: 0.03%) e dieta de alto teor de sal (HS: 3%). Foram realizadas análises de função e morfologia renal, avaliação da expressão de componentes-chave envolvidos no manejo renal de albumina, incluindo as proteínas da *slit membrane* (nefrina e podocina) e do aparato endocítico do túbulo proximal (megalina e cubilina). Além disso, a expressão e a atividade dos componentes do RAS (enzima conversora de angiotensina ACE, ACE2, AT1, AT2 e *Mas*) também foram examinados. **Resultados:** HS agravou a hipertensão nos ratos SHR, provocou hipertrofia glomerular, diminuição da expressão renal de nefrina e ECA2, levou à perda da integridade morfológica dos processos podais e ao aumento da proteinúria caracterizado pela perda de albumina e proteínas de alto peso molecular. Por outro lado, a hipertensão grave foi atenuada e disfunção renal foi prevenida pela dieta LS, já que, a proteinúria foi muito menor nestes animais quando comparados aos SHR NS. Tais achados foram associados com uma diminuição da razão de proteína e de atividade das enzimas ECA/ECA2 nos rins e aumento da expressão renal de cubilina. **Conclusão:** Portanto, os resultados sugerem que a dieta a baixa ingestão de sódio atenua a progressão da hipertensão em ratos SHR e preserva a função renal. Os mecanismos que parcialmente podem explicar estes resultados incluem a modulação intra-renal do balanço ECA/ECA2 e o aumento da expressão renal de cubilina. Contudo, a alta ingestão de sódio agrava a lesão renal hipertensiva e reduz a expressão de nefrina, um componente chave *slit diaphragm*.

Palavras chave: sódio, hipertensão, lesão renal, cubilina, nefrina, ECA, ECA2

ABSTRACT

Introduction: High salt intake markedly contributes to hypertension development and its complications, including the chronic kidney disease. However, the molecular mechanisms responsible for renal damages and renal protection produced by high and low salt diets, respectively, are poorly understood. **Objective:** Investigate the long term effects diets with different sodium chloride content on the kidney function of spontaneously hypertensive rats (SHR) focusing the molecular mechanisms involved in the renal handling of albumin and components of the renal renin angiotensin system (RAS). **Methods:** Newly weaned (4 weeks) male SHR were fed for 6 months with diets differing only in NaCl content: standard salt diet (NS: 0.3%), low salt diet (LS: 0.03 %), and high salt diet (HS: 3 %). Analysis of renal morphology and function, evaluation of the expression of key molecular components involved in the renal handling of albumin, including proteins of the slit diaphragm (nephrin and podocin) and the endocytic receptor apparatus of proximal tubule (megalin and cubilin) were performed. Furthermore, expression and activity of RAS components (angiotensin converting enzyme -ACE-, ACE2, AT1, AT2 and *Mas*) were also examined. **Results** HS produced glomerular hypertrophy and decreased ACE2 and nephrin expressions, loss of morphological integrity of the podocyte processes, and increased proteinuria, characterized by loss of albumine and high molecular weight proteins. Conversely, severe hypertension was attenuated and renal dysfunction was prevented by LS since proteinuria was much lower than in the NS SHRs. This was associated with a decrease in kidney ACE/ACE2 protein and activity ratio and increased cubilin renal expression. **Conclusion:** Taken together, these results suggest that low sodium intake attenuates hypertension progression in SHRs and preserves renal function. The mechanisms could partially explaining these findings include modulation of the intrarenal ACE/ACE2

balance and the increased cubilin expression. While, high sodium intake worsens hypertensive kidney injury and decreases the expression nephrin.

Key words: Sodium, hypertension, renal damage, cubilin, nephrin, ACE, ACE2

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Visão clássica da cascata renina-angiotensina (azul) e a visão da recente cascata sistema renina-angiotensina com novos componentes identificados.....22
- Figura 2 - Estrutura do corpúsculo renal (evidenciado a cápsula de Bowman e tufo glomerular capilar): A e eletromicrografia da barreira de filtração glomerular.....26
- Figura 3 - Figura esquemática e simplificada da *slit membrane* e evidenciados o complexo molecular nefrina, podocina e CD2AP.....28
- Figura 4 - Figura esquemática do protocolo experimental.....42
- Figura 5 - Fotos típicas de glomérulos corados com ácido periódico de Schiff (APS).....46
- Figura 6 - Foto típica de túbulos da região córtex renal para quantificação do colágeno intersticial.....46
- Figura 7 - Foto ilustrativa do modelo de gaiola metabólica utilizado no estudo.....48
- Figura 8 - Avaliação da excreção urinária de proteínas totais e albumina nos três grupos de SHR.....60
- Figura 9 - Perfil excreção urinária de proteínas nos três grupos de SHR em gel SDS-PAGE.....61
- Figura 10 - Expressão proteica de nefrina (A) e podocina (B) no rim de ratos SHR tratados com dietas com diferentes teores de sal.....62

Figura 11 - Foto da ultraestrutura da Barreira de Filtração Glomerular.....	62
Figura 12 - Avaliação da expressão proteica de megalina e cubilina em tecido renal dos animais SHR.....	63
Figura 13 - Análise Histológica. Fotomicrografias de secções do rim corados com APS.....	64
Figura 14 - Atividade das enzimas ECA e ECA-2 no rim de animais SHR sob dietas com diferentes teores de sal.....	65
Figura 15 - Expressão renal das enzimas ECA e ECA2 nos animais SHR sob dietas com diferentes teores de sal.....	66
Figura 16 - Expressão proteica renal dos receptores AT1, AT2 e <i>Mas</i> nos animais SHR submetidos diferentes teores de sal na dieta.....	67
Figura 17 - Modelo hipotético de mecanismo envolvido nos efeitos renais provocados pela modulação do teor de cloreto de sódio na dieta.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	Alfa smooth muscle actine
AP	Aminopeptidase
APA	Aminopeptidase A
APN	Aminopeptidase N
Ang I	angiotensina I
Ang II	angiotensina II
Ang III	angiotensina III
Ang-(1-7)	angiotensina 1-7
AT1	receptor 1 de Ang II
AT2	receptor 2 de Ang II
AT4	receptor 4 de Ang II
APS	Ácido Periódico de Schiff
AMN	Aminionless
BFG	Barreira de Filtração Glomerular
BRAs	Bloqueadores do receptor AT1
CP	Carboxipeptidase
CPP	Carboxipeptidase P
PC	Picosirius Red
DASH	Dietary Approaches to Stop Hypertension
DCV	Doenças Cardiovasculares
EP	Endopeptidase
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima 2 Conversora de Angiotensina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HS	Grupo dieta de alto sal
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IECA	Inibidores da ECA
LS	Grupo dieta de baixo sal
<i>Mas</i>	Receptor mas de Ang-(1-7)
Mrg	Receptor de alamandina
MBG	Membrana Basal Glomerular

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NS	Grupo dieta padrão
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
NEP	Neprilisina
PA	Pressão Arterial
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PO	Prolil oligopeptidase
PRCP	Prolil carboxipeptidase
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SCr	Concentração de creatinina no soro
UCr	Concentração de creatinina urinária
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante beta 1
TOHP	Trials of Hypertension Prevention

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	PAPEL DOS RINS NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	19
1.2	1.2 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	20
1.2.1	1.2.1 O sistema renina angiotensina renal	24
1.3	FISIOPATOLOGIA RENAL DA HIPERTENSÃO ARTERIAL	25
1.3.1	Proteinúria: bases funcionais e moleculares	25
1.3.1.1	A barreira de filtração glomerular	25
1.3.1.2	Endocitose de proteínas filtradas	29
1.4	O CONSUMO DE SAL NA POPULAÇÃO	33
1.5	O CONSUMO DE SAL E O SISTEMA CARDIOVASCULAR	34
2.	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
3.2	AVALIAÇÃO NÃO INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	42
3.3	COLETA DE SANGUE E TECIDOS	43
3.4	HISTOLOGIA RENAL	43
3.4.1	Coloração com Ácido Pródico de Schiff (APS)	44
3.4.2	Coloração com Picrosirius Red (PC)	44
3.4.3	Análise Microscópica	45
3.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	46
3.6	PARÂMETROS METABÓLICOS E DE FUNÇÃO RENAL	47
3.6.1	Ritmo de Filtração Glomerular	48
3.6.2	Excreção Urinária de Sódio e Potássio	49
3.6.3	Excreção Urinária de Proteínas Totais	50
3.6.4	Excreção Urinária de Albumina	50

3.6.5	Eletroforese de Proteínas Totais na Urina	51
3.7	ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA	52
3.8	ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2	52
3.9	EXPRESSÃO RENAL DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i> .	53
3.9.1	Homogeneização dos tecidos e extração proteica	54
3.9.3	Eletroforese	54
3.9.4	Bloqueio e Incubação com os anticorpos	55
3.9.5	Detecção das Bandas	55
3.10	ANALISE ESTATÍSTICA	56
	4. RESULTADOS	57
4.1	MEDIDAS PONDERAIS E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	58
4.2	PARÂMETROS METABÓLICOS E DE FUNÇÃO RENAL	59
4.2.1	Excreção urinária de proteínas totais e albumina	59
4.2.2	Expressão proteica de nefrina e podocina	61
4.2.3	Ultraestrutura da Barreira de Filtração Glomerular	62
4.2.4	Expressão proteica de megalina e cubilina	63
5.2.5	Análise Histológica	63
4.4	AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	65
4.4.1	Avaliação da atividade e expressão intra-renal das enzimas conversoras de angiotensina: ECA e ECA2	65
4.4.2	Expressão proteica intra-renal dos receptores AT1, AT2 e <i>Mas</i>	66
5.	DISCUSSÃO	68
5.1	COMPORTAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E PARÂMETROS PONDERAIS	69
5.2	PARÂMETROS METABÓLICOS E DE FUNÇÃO RENAL	71

5.3	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	75
6.	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A	103
	ANEXO I	109

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), mundialmente, afeta em torno de um bilhão de pessoas, sendo considerada um problema grave e global de saúde pública e um dos principais fatores de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (WHO, 2013). A HAS é designada, segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010), como uma doença multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Valores de pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mm Hg ou de pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mm Hg são considerados elevados e constituem o lado mais facilmente identificável desta doença. A HA é definida como essencial (ou primária) quando não há causas conhecidas para elevação da PA, tais como, tumores da adrenal, uso crônico de corticosteróides, aldosteronismo primário, entre outras. Na HA essencial que, na verdade, acomete a maioria dos pacientes hipertensos, está presente uma ampla gama de causas subjacentes contribuindo para seu desenvolvimento, incluindo a hereditariedade, a alta ingestão de sódio, o estresse, a obesidade, o tabagismo, a idade, a raça e o sedentarismo, entre outras (Mullins, 2006). No Brasil, a HAS apresenta prevalência estimada de 30% na população adulta (Picon et al. 2012). Desde a década de 50 do século passado, a HA é uma doença passível de tratamento com medidas de caráter geral ou com medicamentos. Entretanto, grande parte destes hipertensos não possui controle pressórico adequado aumentando o risco de complicações como doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e insuficiência renal crônica. Tais complicações acarretam elevados custos médicos e socioeconômicos. O custo anual estimado para o tratamento da HAS no Sistema Único de Saúde (SUS) é de US\$ 398,9 milhões e representa 1,43% dos gastos totais do SUS (Dib et al. 2010). A mortalidade por DCV aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma contínua e independente (Lewington et al. 2002). Diversos estudos demonstram uma drástica redução da morbimortalidade cardiovascular com o tratamento adequado da HAS (Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents, 1997; The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, detection evaluation and treatment of high blood pressure, 1997)

Os efeitos deletérios da PA elevada manifestam-se em diversos órgãos, denominados de "órgãos-alvo". Dentre estes destacam-se os rins, que possuem papel fundamental na regulação da PA. A HAS não tratada expõe os rins a altas pressões de perfusão

desencadeando fibrose crônica do parênquima levando à perda funcional deste órgão e determinando um quadro grave de doença renal terminal. De acordo com o Ministério da Saúde, aproximadamente 60% dos cerca de 120 mil pacientes em programa de diálise no SUS apresentam HAS não tratada como causa base da doença renal crônica (BRASIL, 2002; 2006), registrando-se aproximadamente 10 mil óbitos no ano 2007, sendo considerada como a segunda causa mais frequente de insuficiência renal crônica terminal (Mazzuchi et al. 1993; Held et al. 1991; Coresh et al. 2003). Portanto, é extremamente importante o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos de associação entre a HA e a doença renal crônica para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes

1.1 PAPEL DOS RINS NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A regulação da pressão sanguínea é um processo complexo e integrado por vários mecanismos atuando paralelamente, cada um com sua própria dinâmica e com seus próprios efetores. Os mecanismos de ação imediata são responsáveis pela regulação a curto e médio prazo, pois envolvem processos plenamente ativos em segundos, minutos ou horas. Estes incluem os mecanismos de regulação de fluxo local que mantêm a perfusão tecidual (tônus miogênico, fatores metabólicos e endoteliais), bem como mecanismos neurais e hormonais comandados por receptores cardiovasculares (barorreceptores e quimiorreceptores), dentre outros receptores, cuja ativação determina alterações reflexas imediatas do débito cardíaco, resistência periférica capacitância e retorno venoso. Ambos os mecanismos são capazes de responder rapidamente a variações bruscas da hemodinâmica circulatória, sendo responsáveis pela regulação momento a momento da PA e mantêm o fluxo sanguíneo adequado nos diferentes tecidos e nas mais diversas situações comportamentais. A regulação da pressão arterial de longo prazo (ou seja, dias a meses), depende da capacidade dos rins de controlar a excreção de sódio e água por meio da natriurese pressórica. Isto é, em situações de elevação da pressão arterial, o rim é capaz de elevar a excreção de sódio e água promovendo uma redução do volume sanguíneo e débito cardíaco e, conseqüentemente, baixando a pressão arterial até que esta seja restaurada ao valor de controle prévio ao aumento. O raciocínio inverso também é verdadeiro. Em situações de redução da pressão arterial, os rins excretam menor

quantidade de sódio e água fazendo com que o volume sanguíneo aumente e a pressão arterial retorne aos níveis normais (Zats, 2002). Portanto, o equilíbrio entre a ingestão de sal e sua excreção renal é criticamente importante para estabilidade da pressão arterial a longo prazo.

Ao longo de décadas, predominou o conceito, proposto por Guyton e cols. (1980; 1990), de que o rim seria o principal regulador da pressão arterial em longo prazo. Anormalidades no mecanismo renal de pressão/diurese/natriurese resultaria em aumento sustentado dos níveis pressóricos. De acordo com este conceito, a hipertensão arterial resulta de uma falha na capacidade dos rins de excretar sódio em resposta ao aumento da ingestão deste eletrólito ou a uma alteração nas características da natriurese pressórica, sendo necessárias pressões arteriais mais elevadas para ocorrer a excreção da mesma quantidade de sódio. De fato, uma série de evidências dão respaldo à teoria da origem renal da HAS. Estudos experimentais mostram que o transplante renal entre cepas de animais hipertensos e normotensos, desencadeiam hipertensão nos receptores, evidenciando que a hipertensão "segue o rim" (Dahl e Heine, 1975; Bianchi et al., 1970; Grisk et al., 2002). Observações semelhantes foram realizadas em estudo clínico com pacientes em diálise nos quais a HAS foi corrigida com o transplante renal oriundo de doadores normotensos (Curtis et al., 1983).

Vários sistemas e seus efetores contribuem para a participação renal na regulação da PA, cabendo destaque ao sistema renina angiotensina (SRA), às catecolaminas e à vasopressina como retentores de sódio e aos espoliadores de sódio, representados pelo fator natriurético atrial, sistema L-arginina/óxido nítrico, sistema caliceína-cinina e prostaciclina. Estes compostos podem alterar a pressão arterial modulando diretamente a resistência vascular periférica ou o débito cardíaco, ou indiretamente regulando a excreção renal de sódio.

1.2 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Dentre todos os sistemas supracitados envolvidos no balanço hidroeletrólítico e na regulação renal da PA, o SRA, descrito há mais de 70 anos (Page and Helmer, 1940),

ainda hoje merece destaque por possuir potentes componentes vasoativos, amplo espectro de atuação, além de seu papel crítico na regulação da PA e na homeostase de sódio. A angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo, é o principal componente do SRA. Esta, é formada a partir da clivagem do angiotensinogênio de origem hepática em um peptídeo de 10 aminoácidos, angiotensina I (Ang I), pela enzima renina. Em seguida, a Ang I é clivada em Ang II por uma enzima presente principalmente no endotélio pulmonar, denominada enzima conversora de angiotensina (ECA). A renina é sintetizada pelas células justa glomerulares dos rins situadas nas paredes das arteríolas aferentes imediatamente proximais aos glomérulos. Fisiologicamente, a renina, que inicia as reações em cascata, é secretada em situações de queda da pressão arterial ou de diminuição da concentração de sódio que sensibilizam as células justa glomerulares a secretarem renina. A Ang II eleva a pressão arterial por vasoconstrição arteriolar e por retenção de sódio e água por meio do aumento da reabsorção tubular. Esta última, ocorre de forma direta e indiretamente pela indução da secreção, pelas glândulas suprarrenais, de aldosterona, que é um hormônio retentor de sódio por excelência. Uma vez formada, a Ang II liga-se em seus receptores específicos de superfície celular. Dois tipos principais de receptores são bem caracterizados, AT₁ e AT₂, que estão distribuídos em tecidos periféricos como no sistema nervoso central (Ardaillou et al. 1999; Unger et al. 2002). O receptor AT₁, um receptor transmembrana acoplado à proteína G, localiza-se predominantemente nos rins, coração, células do músculo liso vascular e adrenais. Sua ativação resulta em secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, liberação de catecolaminas pela medula adrenal, constrição do músculo liso vascular, anti-diurese e anti-natriurese (Dinh et al. 2001, Carey e Siragy; 2003). O receptor AT₂, é também um receptor transmembrana, presente principalmente na medula adrenal, endotélio vascular, útero, ovários e cérebro (Inagami, 1999). A ativação deste receptor determina ações opostas à ativação de AT₁, havendo, portanto, um contrabalanço dos efeitos mediados por AT₁ (Unger et al. 2002).

Nos últimos anos, muito se avançou no conhecimento do SRA em órgãos específicos tais como coração, vasos e especialmente rins (Seikaly et al. 1990; Navar et al. 1994). Considera-se hoje a existência, além do SRA endócrino e SRA locais capazes de produzir Ang II de forma independente dos componentes circulantes e assumir mecanismos de ação parácrinos, autócrinos e, até mesmo intrácrinos. Além do papel

fisiológico descrito, a Ang II produzida localmente, via AT₁, pode induzir proliferação celular, inflamação e até apoptose, além de ativar múltiplas vias de sinalização intracelular que contribuem para lesão tecidual (Kobori et al. 2007). Portanto, é de particular relevância o estudo do papel do SRA na fisiopatologia da hipertensão.

Outros peptídeos, fragmentos de angiotensinas I e II, que podem ser gerados no sistema cardiovascular e em diversos órgãos, têm sido identificados na última década. Estes, são sequências menores dos peptídeos angiotensinérgicos que influenciam a função de diversos órgãos e sistemas atuando em vias alternativas à via clássica: ECA / Ang II / AT₁, incluindo Angiotensina-III [Ang III ou Ang-(2-8)], Angiotensina-IV [Ang IV ou Ang-(3-8)], Angiotensina-(1-7) e o peptídeo mais recentemente descoberto alamandina (Lauter et al. 2013). (Figura 1). Estes peptídeos podem ter ações similares ou opostas à Ang II. A identificação de novos peptídeos e a detecção dos SRA locais trouxeram à luz o conceito de que o SRA é um sistema que regula muito mais funções biológicas do que se acreditava previamente.

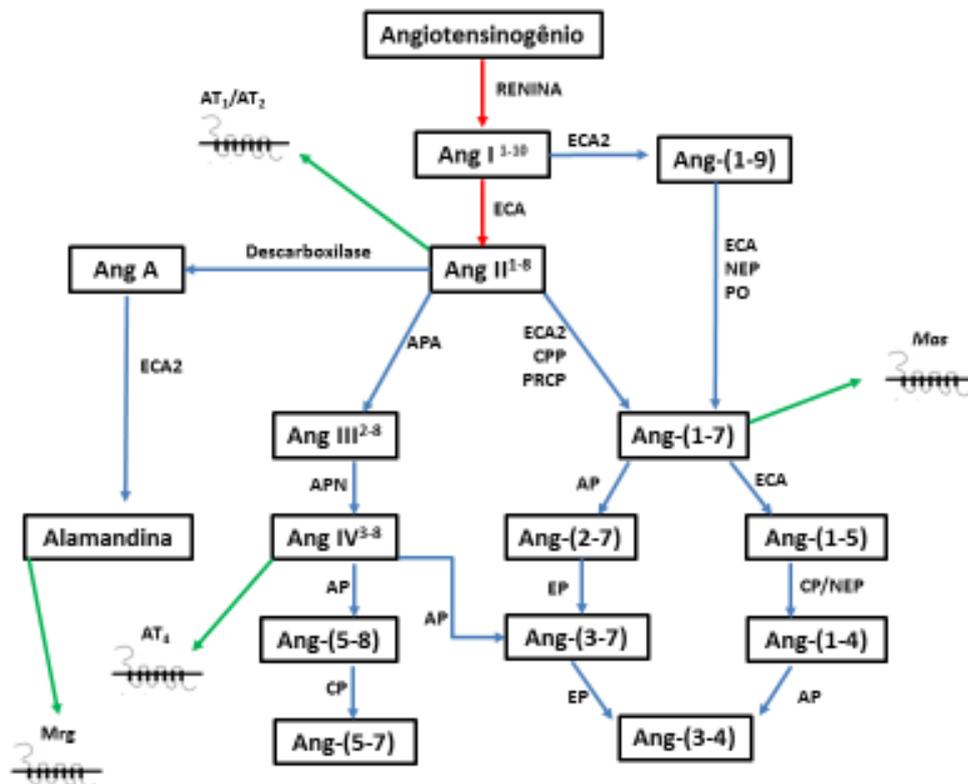


Figura 1: Visão clássica da cascata renina-angiotensina (vermelho) e a visão da recente cascata sistema renina-angiotensina com novos componentes identificados (azul). AP: Aminopeptidase; APA: Aminopeptidase A; APN: Aminopeptidase N; CP: Carboxipeptidase; EP: Endopeptidase; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; CPP: Carboxipeptidase P; PRCP: Prolil carboxipeptidase; NEP: Neprilisina; PO: Prolil oligopeptidase; *Mas*: receptor *Mas* de Ang-(1-7); *Mrg*: receptor de alamandina; AT₄: receptor de Ang IV. Adaptado de Ferrão et al. 2014.

Uma importante via alternativa que tem sido extensivamente investigada e possui ações biológicas que se opõem à via clássica ECA / Ang II / AT₁, é o eixo ECA2/ Ang (1-7) / Mas da cascata do SRA. Diversos estudos atribuem, à esta rota alternativa, ações protetoras ao sistema cardiovascular. Sendo assim, essa via tem sido considerada como um importante alvo terapêutico no tratamento da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares e renais (Santos et al. 2003).

A ECA2 é uma glicoproteína transmembrana que possui 805 aminoácidos em sua estrutura, um único centro catalítico e compartilha 42% de homologia com a ECA somática. A ECA2, diferentemente da ECA, é uma monocarboxipeptidase cuja atividade não é alterada pelos fármacos inibidores da ECA (IECA) (Donoghue et al. 2000; Tipnis et al. 2000). No sistema cardiovascular, é expressa no coração e vasos sanguíneos, além de ser amplamente expressa nos rins. A ECA2 está presente também em testículos, pulmão, fígado, sistema nervoso central e placenta (Soler et al. 2008). A geração da Ang (1-7) pela ECA2 pode ser realizada diretamente a partir da metabolização direta da Ang II, ou pela clivagem de Ang I, gerando o peptídeo Ang 1-9 que, posteriormente, pode ser convertido em Ang (1-7) (Donoghue et al. 2000; Tipnis et al. 2000). Entretanto, Vickers e cols. (2002) demonstraram que a eficiência catalítica da ECA2 é 400 vezes maior para Ang II, quando comparada a Ang I, sendo, portanto, a via preferencial desta enzima a conversão de Ang II em Ang (1-7). Desta forma, a ECA2 está associada com a redução dos níveis de Ang II e com a elevação dos níveis de Ang (1-7). A importância biológica do heptapeptídeo Ang (1-7) se tornou evidente quando Santos e cols. (2003) caracterizaram, por meio da utilização de um antagonista seletivo da Ang (1-7), um receptor acoplado à proteína G específico para Ang (1-7): o receptor *Mas*. Neste trabalho, a ausência de ligação da Ang (1-7) com seu receptor aboliu sua ação antidiurética em tecido renal, e vasorelaxante em anéis aórticos de camundongos *knockout* para o receptor *Mas*.

Diversas ações locais da via Ang (1-7) / *Mas* no sistema cardiovascular já foram descritas. Estudos experimentais mostram que Ang (1-7) é uma componente chave contra regulatório do SRA capaz de modular as ações da ECA (Deddish et al. 1998; Tom et al. 2001), competir com Ang II pela ligação em seus receptores AT₁, de forma a inibir as ações da Ang II (Rowe et al. 1995; Mahon, 1994) e até mesmo alterar a sinalização dos efeitos da Ang II (Chansel e cols 2001). Efeitos cardioprotetores

incluem redução de fibrose miocárdica e efeitos antiarritmogênicos (Santos et al. 2004). Adicionalmente, a formação de Ang (1-7) no endotélio promove manutenção da função endotelial (Xu et al. 2008), vasodilatação com redução da resistência periférica total (Sampaio et al. 2003) e efeitos antiproliferativos sobre as células do músculo liso vascular (Freeman et al. 1996). No sistema nervoso central, a Ang (1-7) é capaz de facilitar o controle da frequência cardíaca pelo barorreflexo em áreas envolvidas no controle da pressão arterial (Campagnole-Santos et al. 1992; Henrigger-Walther et al. 2001).

1.2.1 O sistema renina angiotensina renal

O conhecimento do SRA é essencial para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças cardiovasculares. Nos últimos anos, tem existido especial interesse no papel do SRA na fisiopatologia da HAS com o foco no papel de SRA órgãos específicos, sobretudo os rins, onde todos os componentes do SRA estão presentes e há produção intra-renal de Ang II por mecanismos independentes do sistema endócrino. De fato, muitas evidências mostram que o SRA renal tem importante participação nos mecanismos de geração da hipertensão arterial. A identificação do eixo ECA2 / Ang (1-7) / Mas e seus efeitos antagonistas aos efeitos deletérios da Ang II, torna possível o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento da hipertensão e das doenças cardiovasculares. Um estudo experimental desenvolvido por Crowley et al. (2006) mostrou que a Ang II promove hipertensão principalmente por meio da ativação de receptores AT₁ no rim. Ao transplantar rins com ausência somente de receptores AT₁ renais em animais controles, a infusão subsequente de altas doses de Ang II não promoveu hipertensão ou hipertrofia cardíaca. Por outro lado, os animais que receberam enxertos de rins com receptores AT₁, mas que possuíam completa ausência de AT₁ no restante do organismo desenvolveram hipertensão e hipertrofia cardíaca. Com este experimento foi demonstrado o papel essencial dos rins na patogênese da hipertensão arterial desenvolvida por ação da Ang II. Corroborando estes achados, recentemente Gonzalez-Villalobos (2013) investigaram a resposta de camundongos com ausência de ECA renal à hipertensão experimental. Neste estudo, os autores mostraram que a ausência de ECA renal elimina o desenvolvimento de hipertensão arterial induzida pela infusão de Ang II. Tais achados evidenciam o papel fundamental da ECA renal

nas respostas renais frente a estímulos hipertensivos. Os rins expressam todos os componentes principais do RAS, incluindo angiotensinogênio, renina e ECA (Bruneval et al. 1986; Gomez et al. 1988; Ingelfinger et al. 1990). A ativação local do SRA cursa com lesão renal, principalmente por meio da ligação de Ang II ao seu receptor AT₁ com ativação de diversas vias de sinalização relacionadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, de proteínas de matriz extracelular e de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose renal, glomerulosclerose e atrofia tubular, como TGF- β (fator de crescimento transformante beta 1) (Gorin et al. 2001; 2003; 2004; Sanders, 2006). Por outro lado, observou-se, em camundongos, que a ECA2 é altamente expressa nos rins e que sua atividade no córtex renal é ainda maior do que no tecido cardíaco (Wysocki et al. 2006). Nos glomérulos, a ECA2 está principalmente presente em células epiteliais e podócitos e, em menor extensão, em células mesangiais. Já a localização da ECA no glomérulo restringe-se às células endoteliais. Nos túbulos, Ye et al. (2004) localizaram ECA e ECA2 na borda em escova de túbulos proximais. Su et al. (2006) detectaram a presença do receptor *Mas* também nas células do túbulo proximal e demonstraram que Ang (1-7) é capaz de inibir a fosforilação de MAP kinases mediada por Ang II e suprimir parcialmente o aumento do TGF- β . Tais achados sugerem que a produção de Ang (1-7) pela ECA2 possui efeito contra regulatório aos efeitos da Ang II localmente gerada nos túbulos proximais. Corroborando estes dados, outro estudo em camundongos mostrou desenvolvimento de glomerulosclerose com a deleção do gene da ECA2. Estes efeitos foram bloqueados com antagonistas do receptor AT₁(BRA) o que mais uma vez evidenciou o desenvolvimento de lesão renal dependente de Ang II (Oudit et al. 2006).

1.3 FISIOPATOLOGIA RENAL DA HIPETENSÃO ARTERIAL

1.3.1 Proteinúria: Bases Funcionais e Moleculares

1.3.1.1 A barreira de filtração glomerular

A massa de tecido renal funcional é constituída principalmente por néfrons. Cada néfron apresenta um componente esférico filtrante, chamado corpúsculo renal e um túbulo com vários segmentos distintos em suas características estruturais e

imunohistoquímicas. O corpúsculo renal consiste em um tufo compacto de alças capilares interconectadas, o glomérulo (ou capilares glomerulares), suprido pela arteríola aferente, drenado pela arteríola eferente, e rodeado por uma cápsula oca em forma de balão: a cápsula de Bowman (Figura 2A). Esta possui dois folhetos: um interno (visceral) ligado aos capilares e outro externo (folheto parietal) formando os limites do corpúsculo renal. Entre os dois folhetos há o espaço capsular (espaço de Bowman) que recebe o líquido filtrado através dos capilares glomerulares (Zatz 2000; Eateon, Pooler, 2006).

O corpúsculo renal é responsável pela etapa inicial de formação da urina, onde ocorre o processo de ultrafiltração do plasma, no qual a água, os eletrólitos e pequenas moléculas passam ao espaço de Bowman, enquanto que os elementos figurados do sangue e as proteínas dissolvidas no plasma ficam retidos. A esta função, dá-se o nome de "barreira glomerular", a qual é essencial para que o fluido que passa para o espaço capsular seja quase inteiramente desprovido de proteínas (Zatz. 2000; Eateon, Pooler, 2006). Danos à barreira de filtração glomerular (BFG) resulta em proteinúria e hipoalbuminemia muitas vezes determinando aparecimento de edema e síndrome nefrótica (Hallman et al. 1956; Norio, 1966).

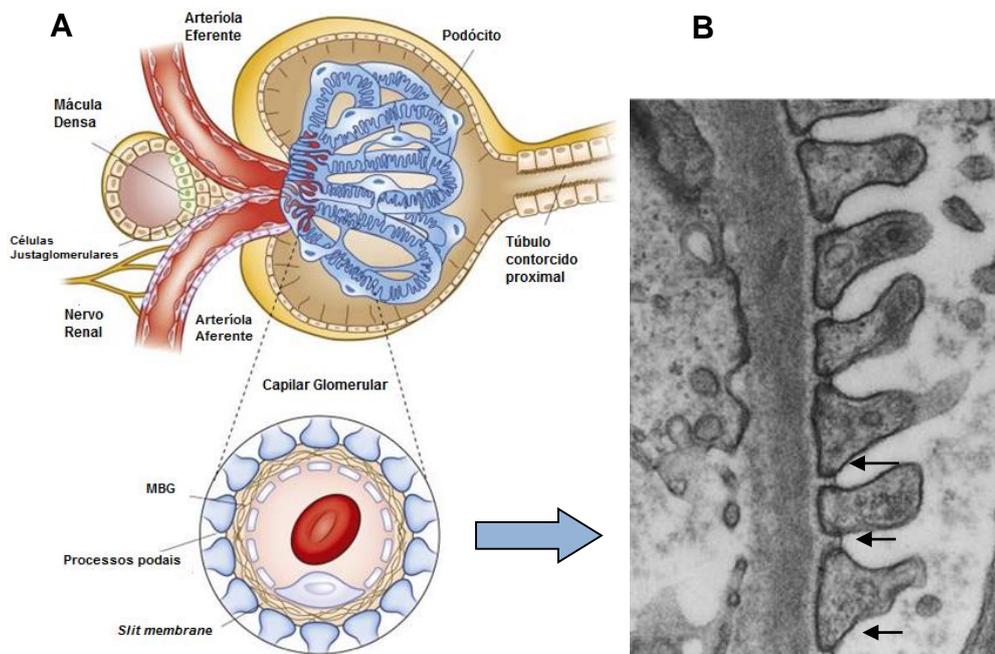


Figura 2: Estrutura do corpúsculo renal (evidenciado a cápsula de Bowman e tufo glomerular capilar): A e eletromicrografia da barreira de filtração glomerular (B). Setas indicam a slit membrane localizada entre os processos podais. Adaptado de: Pollak, et al. 2014 e Eateon, Pooler, 2006).

A BFG, através da qual todas as substâncias filtradas devem passar, é composta por três camadas: o endotélio dos capilares glomerulares (fenestrado com poros de 70 nm) o qual é incapaz de discriminar eficientemente as macromoléculas pelo seu tamanho. Uma segunda camada, a membrana basal glomerular (MBG), recobre as células endoteliais dos capilares glomerulares, sendo a única estrutura contínua que separa o sangue capilar do espaço de Bowman, oferece resistência à filtração de macromoléculas. Finalmente, a MBG é revestida por uma camada de células epiteliais altamente especializadas voltadas para o espaço de Bowman, chamadas de podócitos, os quais apresentam prolongamentos em forma de tentáculos, os pedicelos (ou processos podais). A arquitetura dos processos podais consiste em filamentos de actina altamente organizados e proteínas ligadoras de actina (Kerjaschki, 2001). São separados por fendas conectadas por uma delicada membrana, denominada de *slit membrane* (ou *slit diaphragm*) que cobre os espaços entre os pedicelos. Esta membrana constitui a última e a mais eficiente barreira de filtração para macromoléculas (Zatz 2000; Eateon, Pooler, 2006). É a *slit membrane* que permite, a partir do lúmen capilar, a passagem de água e solutos de baixo peso molecular para o espaço de Bowman e restringe o fluxo de macromoléculas na formação inicial de urina. A importância da *slit membrane* na permeabilidade glomerular às macromoléculas foi mostrada por Orikasa et al. (1988). Neste estudo, a administração única de anticorpo monoclonal anti-*slit membrane* em ratos, induziu proteinúria maciça, indicando a importância desta membrana na retenção de proteínas do plasma.

Nos últimos anos, muitos componentes moleculares envolvidos na estrutura da *slit membrane* foram identificados. Dentre estes se destacam a nefrina e a podocina. A nefrina é uma proteína transmembrana com peso molecular de aproximadamente 200 kDa, codificada pelo gene NPHS1, considerada a principal proteína estrutural da *slit membrane* atuando como molécula de adesão e sinalização. Estudos mostram que sua ausência ou substituição de seus aminoácidos resulta em nefrose com perda da *slit membrane* e maciça proteinúria (Kestila et al. 1998; Lenkkeri et al. 1999). Propõe-se que agregados dos domínios extracelulares de nefrina dispostos longitudinalmente constituam a *slit membrane* (Akhtar et al. 2004). Podocina também é uma proteína transmembrana, codificada pelo gene NPHS2, possui peso molecular de aproximadamente 42 kDa, é expressa exclusivamente nos podócitos, localiza-se na

membrana dos processos podais, no local de inserção da *slit membrane*, onde se liga ao domínio citoplasmático da nefrina e da proteína CD2AP (outro componente molecular da *slit membrane*) (Figura 3). A podocina é importante para a estabilização deste complexo protéico e auxilia na interação da nefrina com o citoesqueleto (Boute et al. 2000; Huber et al. 2001, Jalanko, 2003). Mutações no gene da podocina levam a uma síndrome nefrótica autossômica com glomerulosclerose segmentar focal (Frishberg et al. 2002).

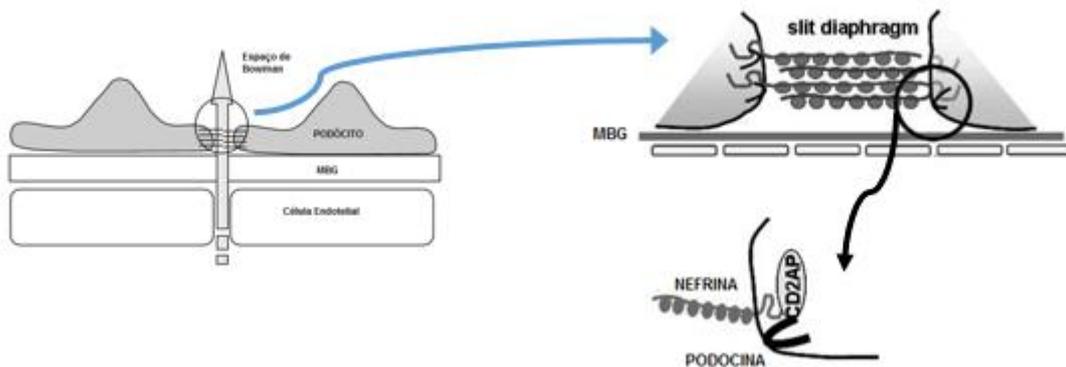


Figura 3: Figura esquemática e simplificada da *slit membrane* e evidenciados o complexo molecular nefrina, podocina e CD2AP. Adaptado de: Hattori S. et al, 2011; Tossidou I et al. 2010).

Os mecanismos pelos quais a parede dos capilares glomerulares (e de grande parte dos demais capilares do organismo) restringe o fluxo de macromoléculas têm sido propostos ao longo dos últimos anos. Na década de 50, Pappenheimer et. al (1951) desenvolveram a teoria dos poros, segundo a qual as paredes dos capilares seriam atravessadas por poros cilíndricos, sendo o tamanho destes poros o fator limitante para passagem de macromoléculas. Assim, o solvente (água) teria passagem livre pelos poros, enquanto que os solutos seriam retidos de acordo com suas dimensões. Um estudo de tomografia eletrônica revelou que os poros glomerulares possuem diâmetro aproximado de 3.5 nm (Wartiovaara et al. 2004). Os modelos de “heteroporos”, que consideram a parede do capilar glomerular como uma membrana perfurada por poros com diâmetros diferentes (Deen et al. 1985), também têm sido aceitos. A discriminação de moléculas de acordo com seu tamanho, realizada pela barreira glomerular, garante uma filtração muito baixa de proteínas. Posteriormente, estudos com moléculas modificadas de dextran com diferentes características de carga elétrica revelaram que moléculas de dextran sulfato (alta densidade de carga

negativa) eram menos filtradas através da membrana glomerular, ao passo que, moléculas de dextran com radicais dietilaminoetil (alta densidade de carga positiva), apresentavam filtração glomerular mais elevada. Tais achados indicaram a existência de uma verdadeira barreira eletrostática na parede glomerular capaz de repelir, por interação eletrostática, os poliânions que constituem a maioria das moléculas de proteína do plasma (Brenner et al. 1978; Ohlson et al. 2000).

3.1.1.2 Endocitose tubular de proteínas filtradas

Em indivíduos normais, a função de barreira do glomérulo permite que o fluido que passa para o espaço capsular e forma o ultrafiltrado, seja quase inteiramente desprovido de proteínas. As proteínas filtradas no glomérulo são quase totalmente reabsorvidas nos túbulos proximais por processo de endocitose mediada por receptor. Subsequentemente são levadas aos lisossomos, onde são hidrolisadas, e os aminoácidos resultantes retornam à circulação em direção ao fígado, sendo este o principal órgão responsável por repor as proteínas filtradas. Normalmente, uma quantidade diminuta é perdida na urina (proteinúria). A albumina, a mais abundante proteína plasmática, possui peso molecular de 65 KDa. Apesar da eficiência da barreira, aproximadamente 200 g de albumina são filtradas diariamente nos glomérulos, e somente cerca de 30 mg são perdidas por dia, o que representa menos da metade da quantidade de proteínas de origem glomerular que chega à urina. A maior parte é constituída de proteínas de peso molecular mais baixo que sofrem pouca restrição na parede glomerular (proteínas de peso molecular inferior a 40 KDa e raio inferior a 30 Å). Um aumento persistente da excreção urinária de proteínas pode ter origem patológica, e, a avaliação da proteinúria constitui um valioso indicativo de alteração renal (Zatz, 2000)

No processo de endocitose mediada por receptor, as moléculas de proteína ligam-se a receptores específicos na superfície luminal da célula tubular, em regiões especializadas da membrana que possuem a porção citoplasmática revestida de clatrina. Nesta região, ocorre a internalização do complexo ligante-receptor. Este é levado aos lisossomos, onde as proteínas ligantes são hidrolisadas e os receptores retornam para membrana luminal. Em nível molecular, a endocitose de proteínas, sobretudo de albumina, mediada por receptor no túbulo proximal, envolve vários

receptores já identificados, especialmente dois receptores multiligantes: a megalina e a cubilina, responsáveis constitutivamente pela reabsorção de uma ampla variedade de macromoléculas plasmáticas filtradas. Dentre as moléculas ligantes dos receptores endocíticos megalina e cubilina, intensamente estudadas, destacam-se: proteína de ligação da vitamina B12 e da vitamina D, proteína de ligação do retinol, proteínas de transporte de ferro como transferrina, mioglobina e hemoglobina (Christensen e Gburek, 2004).

A megalina é uma proteína transmembrana de 600 KDa com um longo domínio amino-terminal extracelular, um único domínio transmembrana, e uma curta cauda citoplasmática carboxiterminal. É altamente expressa no aparato endocítico do túbulo proximal, pertencente à família do receptor de lipoproteína de baixa densidade e se liga a muitas proteínas estruturalmente diferentes. Foi originalmente identificada, em 1982 como o antígeno da nefrite de Heymann, um modelo de glomerulonefrite membranosa em ratos (Kerjaschki e Farquhar, 1982). A megalina é também expressa em outros epitélios de absorção, como no intestino delgado, nas células secretoras da paratireóide, no endométrio, nos pneumócitos tipo II, dentre outros (Gueth-Hallonet et al. 1994; Sahali et al. 1993).

Muito do que se sabe das funções da megalina vem de estudos em animais *knockout* para esta proteína. Estes animais apresentam proteinúria caracterizada pela perda de várias proteínas séricas de baixo peso molecular. Além disso, em algumas doenças que cursam com proteinúria há redução na expressão renal de megalina (Tojo et al. 2001; Obermuller et al. 2001; Piwon et al. 2000). Modelos experimentais de doenças cardiovasculares revelam que, em condições como diabetes (Tojo et al. 2001; Tojo et al. 2003) e hipertensão (Inoue et al. 2013), que cursam com progressiva proteinúria, a expressão renal de megalina está reduzida. Estes achados evidenciam a importância da via endocítica para a reabsorção no túbulo proximal de macromoléculas filtradas.

A cubilina, outro receptor endocítico multiligante, é uma proteína de 460 KDa, com domínio transmembrana ausente e pouca homologia estrutural com outros receptores já conhecidos. Possui semelhança com o fator intrínseco do receptor para vitamina B12 (Seetharam et al 1997). Assim como a megalina, é altamente expressa no aparato

endocítico nos túbulos renais. A importância da cubilina na reabsorção tubular de proteínas é evidenciada em estudos que demonstraram que em cães com defeito no processamento e inserção apical de cubilina nas células epiteliais intestinais e renais, ocorre uma síndrome de mal absorção de vitamina B12, assim com proteinúria com predominância de albuminúria (Fyfe et al. 1991a,b; Birn et al 2000). Além destes, a relevância funcional da cubilina na endocitose mediada por receptor também é baseada em observações realizadas em pacientes com a síndrome Imlerslund-Grasbeck, a qual resulta em anemia por mal absorção de vitamina B12 e proteinúria tubular, provocada por mutações no gene da cubilina ou de amnionless (AMN), uma proteína de 50 kDa necessária à expressão normal de cubilina na borda escova dos túbulos proximais. Portanto, a megalina e a cubilina constituem dois importantes receptores endocíticos fortemente expressos no aparato endocítico do túbulo renal proximal. A ausência ou disfunção de qualquer um dos receptores está associada com significativa proteinúria tubular, mostrando que ambas são importantes para a absorção normal de proteínas filtradas, incluindo a albumina. Embora estruturalmente muito diferentes, ambos receptores estão funcionalmente relacionados. Além de possuírem ligantes em comum, sugere-se que a megalina medeia a endocitose e o tráfego intracelular de cubilina (Moestrup et al. 1998)

Tradicionalmente, a proteinúria de origem renal pode ser caracterizada como: A) proteinúria glomerular, em que há alteração na barreira de filtração glomerular e, conseqüentemente, presença de proteínas que normalmente não seriam filtradas (ou filtradas em quantidade limitada) no ultrafiltrado glomerular. B) proteinúria tubular, onde o defeito de base é na reabsorção tubular, resultando na excreção de proteínas que normalmente seriam eficientemente reabsorvidas nos túbulos renais via endocitose mediada por receptor. A sobrecarga de proteínas no fluido tubular inicia uma cascata de eventos que levam à lesão tubular e intersticial, inflamação e fibrose (Christensen e Gburek, 2004), conduzindo, portanto, a uma progressiva doença renal associada a desfechos cardiovasculares. Portanto, a quantificação de proteinúria, particularmente, albuminúria é um importante indicador prognóstico em diversas doenças (Viberti et al. 1982)

Frequentemente, algum grau de disfunção renal está presente em pacientes com hipertensão arterial, variando desde microalbuminúria (excreção urinária de albumina

entre 30 a 300 mg/dia) até a doença renal terminal (McClellan, 2005). Sabe-se que a pressão arterial elevada promove um aumento da pressão intraglomerular, desencadeando lesão mediada por hiperfiltração levando a perda transglomerular de proteínas caracterizada por proteinúria. Além de alterações hemodinâmicas, outros mecanismos podem desencadear a doença renal na hipertensão, tais como lesão em células endoteliais glomerulares (Luft et al. 1995) tráfego de macromoléculas pelo mesângio (Remuzzi et al. 1990) e alteração na função tubular (Mountokalakis, 1997; Rodicio et al. 1998). Um recente trabalho experimental mostrou que a progressão da microalbuminúria em ratos hipertensos está associada à redução da expressão de componentes chaves do aparato endocítico no túbulo proximal, incluindo megalina e cubilina (Inoue et al. 2013). Adicionalmente, Bonnet et al. (2002) mostraram que neste mesmo modelo de hipertensão experimental, os animais apresentam uma redução precoce na expressão glomerular de nefrina em relação aos animais controle normotensos, antes mesmo de se detectar alterações na excreção urinária de albumina.

Diversas evidências na literatura mostram que os inibidores da ECA e antagonistas dos receptores AT1 possuem propriedades antiproteinúricas adicionais em relação a outros anti-hipertensivos (Viberti et al. 1994; Burnier et al 2006; Ruggenti et al. 2004). De fato, tem-se tornado evidente que as ações antiproteinúricas dos bloqueadores do SRA, vão além do efeito na correção da hipertensão arterial e das alterações hemodinâmicas intrarenais. Recente estudo de Arruda-Junior et al (2014), mostrou que o tratamento com o bloqueador do receptor AT1, losartan, em animais hipertensos, promoveu um efeito renoprotetor adicional com aumento da expressão de megalina no córtex renal destes animais. Bonnet et al. (2001), em modelo experimental de hipertensão e diabetes, mostraram que o tratamento com bloqueador do receptor AT1 preveniu a redução da expressão de nefrina e o desenvolvimento de albuminúria. Entretanto, apesar das evidências da participação do SRA nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de lesão renal, há ainda muitas lacunas a serem entendidas.

1.4O CONSUMO DE SAL NA POPULAÇÃO.

A alta ingestão de sódio tem sido considerada um fator importante para o desenvolvimento de hipertensão e suas complicações, incluindo lesão vascular, cardíaca e renal. Sendo assim, a redução da ingestão de sal tem sido recomendada para toda a população, particularmente para os portadores de hipertensão arterial ou doença renal crônica como medida de caráter geral visando não só a redução da PA, como também a proteção renal (Cutler et. al 1997).

Sabe-se que o sódio é o principal cátion do fluido extracelular, sendo um nutriente essencial e necessário em diversas funções do organismo, tais como: manutenção do volume e osmolaridade do meio extracelular, equilíbrio ácido-básico e transmissão dos impulsos nervosos. Em indivíduos saudáveis, praticamente todo sódio ingerido é absorvido, e a excreção urinária é o principal mecanismo de manutenção de seu equilíbrio no organismo (Holbrook et al 1984). Apesar de ser um nutriente fisiologicamente essencial, o consumo de sódio médio da população é bem acima das necessidades fisiológicas estimado em 200-500 mg/dia. Na maioria das populações, o consumo do mineral encontra-se acima de 2,3 g/dia (Holbrook et al 1984; He, MacGregor 2009).

O “sal” comum de cozinha é composto principalmente por cloreto de sódio. O sódio ingerido pode também ser proveniente daquele encontrado naturalmente em vários alimentos, tais como leite, carnes e vegetais de modo geral. Outra fonte de sódio alimentar é o presente em alimentos processados, como pães, biscoitos, carnes processadas, salgadinhos e em condimentos, tais como, soja e molhos. (Webster et al. 2010; Ni Mhurchu et al. 2011; Centers for Disease Control and Prevention, 2011). Assim, os principais contribuintes para o consumo de sódio na dieta dependem do contexto cultural e hábitos alimentares de uma população (Brown et al. 2009). Em países desenvolvidos, estima-se que a maior parte do sódio consumido provenha de alimentos processados. Já em países em desenvolvimento, a maior parte do sódio consumido seria proveniente do sal adicionado no preparo dos alimentos e do uso de condimentos que contenham sal (Anderson et al. 2010). Mundialmente, é estimado que a população consuma, em média, quantidades muito superiores do consumo mínimo necessário para função corporal, e, em muitos países, acima do valor

recomendado pela Organização mundial de Saúde: 2 g de sódio / dia, o equivalente a 5 g de sal / dia) (WHO, 2003; WHO, 2012).

No Brasil, um estudo de base populacional realizado por Molina et al. em 2003, na cidade de Vitória/ES, estimou, a partir da excreção urinária de sódio de 12 horas, o consumo diário de sal em adultos. Este alcançou em média 12 g / dia. Outro estudo realizado por Sarno et al. (2009), por meio da análise de dados de aquisição de alimentos pelos domicílios em diversos setores censitários do País, demonstrou que a quantidade diária de sódio disponível para consumo nos domicílios brasileiros foi de 4,5 g por pessoa (ou 4,7 g para uma ingestão diária de 2.000 kcal), excedendo, largamente a recomendação máxima para esse nutriente em todas as macroregiões brasileiras e em todas as classes de renda. Além disso, a maior parte do sódio disponível para consumo em todas classes de renda provenha do sal de cozinha e de condimentos à base desse sal.

1.5 O CONSUMO DE SAL E O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Diversas evidências na literatura têm demonstrado a associação entre o consumo excessivo de sal e doenças cardiovasculares (Strazzullo et al, 2009; WHO, 2007), além de outros agravos, tais como, neoplasia de estômago e osteoporose (He, MacGregor 2009). Muitos estudos epidemiológicos demonstram que a alta ingestão de sódio é um importante fator para o aumento da pressão arterial na população, e, portanto, no surgimento de doenças cardiovasculares. O estudo INTERSALT (1988), ao avaliar o consumo de sódio em mais de 10.000 indivíduos em 52 locais do mundo, revelou a associação entre o consumo médio de sódio e a pressão arterial média. Além disso, tal estudo também observou associação positiva entre o consumo de sódio e o aumento da pressão com a idade. A concepção de que uma dieta com baixa ingestão de sódio associa-se com menor pressão arterial vem do estudo DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) que demonstrou uma diminuição da pressão arterial em resposta à redução dietética de sódio (Sacks et al. 2001). Diversas evidências corroboram que a redução da ingestão de sódio esteja associada com a prevenção de doenças cardiovasculares. O estudo de intervenção *Trials of Hypertension Prevention* (TOHP), demonstrou que a redução de sódio na dieta (1,9 g

de sódio / dia: TOHP I, e 2,5 g de sódio / dia: TOHP II), juntamente com educação integral e aconselhamento na redução da ingestão, após 10 a 15 anos de acompanhamento, levou à redução da PA e, aproximadamente, à diminuição de 30% na incidência de eventos cardiovasculares (Cook et al. 2007). Bibbins-Doming et al. (2011) quantificaram, por simulação computacional uma estimativa dos efeitos benéficos de uma redução de sal na dieta de até 3 g/dia (1,2 g / dia de sódio) em diversos desfechos sociais e de saúde da população americana. Dentre estes, tal mudança dietética resultaria em redução de 66 a 120 mil casos de eventos coronarianos, redução de 99 mil casos de infarto do miocárdio, redução de até 92 mil mortes e economia de até 24 bilhões /ano nos gastos com saúde.

Diversos estudos clínicos e experimentais evidenciam que o excessivo consumo de sal promove danos cardiovasculares que vão além da elevação da PA (Tuomilehto et al. 2001), produzindo lesão direta no coração, vasos e rins (Veragic et al. 2006; Marcier et AL. 2007; Endemann et AL. 2004). Yu et. al (1998) demonstraram que a alta ingestão de sal na dieta levou à fibrose generalizada e aumento dos níveis de TGF- β 1 no coração e nos rins de ratos normotensos e hipertensos sugerindo um efeito específico do sal sobre o desenvolvimento de fibrose, possivelmente por um mecanismo dependente de TGF- β 1. Com intuito de se investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos adversos da sobrecarga de sal sobre o sistema cardiovascular, Veragic et al. (2008) avaliaram se o SRA poderia estar relacionado no desenvolvimento de tais efeitos. Para isso, trataram, ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) com dieta contendo 8% de sal, com candesartan, um bloqueador do receptor AT1. O candesartan não preveniu o aumento da PA induzido pelo alto sal, contudo foi capaz de atenuar o remodelamento ventricular, a fibrose miocárdica e o desenvolvimento de disfunção diastólica, além de prevenir a proteinúria e hipertrofia renal induzidas pelo sal. Demonstrando, portando, a participação da Ang II, por meio do receptor AT1, nos efeitos do excesso de sal, independentes da pressão, sobre a lesão de órgãos alvo.

No que diz respeito aos efeitos do consumo de sal sobre a função renal, estudos clínicos e experimentais fornecem evidências de que uma dieta com alto teor de sal é um determinante independente de lesão renal (Du Cailar et al. 2002; Swift et al. 2005; Verhave et al. 2004; Varagic et al. 2008). Matavelli et al. (2007) demonstraram que

ratos SHR submetidos a sobrecargas crescentes de sal (4, 6 e 8% na dieta) durante 2 meses, desenvolvem disfunção renal precoce e grave com elevados graus de proteinúria e albuminúria, refletindo e a exacerbação da doença hipertensiva promovida pela alta ingestão de sal. Classicamente, sabe-se que, em condições fisiológicas, a sobrecarga renal de sal inibe a liberação de renina das células justaglomerulares reduzindo a concentração circulante de Ang II. Contudo, estudos têm demonstrado que apesar da sobrecarga na ingestão de sal, a atividade dos SRAs pode não estar suprimida ou até mesmo pode estar aumentada (Drenjančević-Perić et al 2011). De fato, além do papel crítico do SRA na regulação da pressão sanguínea e balanço hidro salino, muitos dos efeitos deletérios relacionados à sobrecarga de sal sobre o sistema cardiovascular, poderiam estar relacionados ao aumento da expressão local dos componentes locais do SRA, sobretudo nos rins. Em estudo com animais SHR, a sobrecarga de 8% de sal na dieta durante 4 semanas agravou a hipertensão e a lesão renal nestes animais. Além disso, apresentaram maiores níveis de Ang II no plasma. O tratamento com o losartan foi eficaz em reduzir todos os efeitos, exceto o aumento da PA provocado pelo alto sal (Susic et al. 2011). Stewen et al (2003) mostraram aumento da densidade do receptor AT1 em córtex renal de ratos SHR submetidos a uma dieta crônica de alto sal. Um interessante estudo de Rosón et al. (2008) examinou os efeitos de baixas doses de Ang II em animais submetidos à sobrecarga salina sobre a expressão de citocinas pró inflamatórias e pró fibróticas. Observou-se que Ang II exacerbou a expressão renal de TGF- β 1, α -SMA e NF-KB em resposta a sobrecarga aguda de sal, independentemente de alterações na pressão sanguínea. Estes achados evidenciam a íntima relação entre Ang II, alta ingestão de sal e inflamação e fibrose renais. Entretanto, a cadeia de eventos entre a alta ingestão de sal, o SRA e a inflamação e fibrose renais ainda é mal compreendida.

Com o conhecimento adquirido ao longo de anos sobre os efeitos da ingestão de sal sobre a saúde humana, importantes organizações de saúde (PAHO/WHO) consistentemente recomendam a redução da ingestão de sal para a prevenção de eventos cardiovasculares (WHO, 2003; WHO, 2012, PAHO 2013). De fato, existe recomendação rigorosa para restrição de sódio na dieta, especialmente para hipertensos e portadores de doença renal estabelecida (VI diretrizes brasileiras de hipertensão (2010); Brasil, 2014). Apesar disso, recentemente, alguns estudos têm

questionado os efeitos benéficos da redução da ingestão deste mineral. Em estudo sobre a relação de consumo de sódio e doenças cardiovasculares, surpreendentemente foi demonstrado que o menor consumo de sódio estava associado a uma maior taxa de mortalidade e de eventos cardiovasculares (Stolarz-Skrzypek et al. 2011). Outro relato recente examinou o impacto do alto consumo de sal sobre mortalidade. Neste trabalho, os pesquisadores não observaram evidências consistentes de que a redução na ingestão de sal tenha reduzido mortalidade por todas as causas ou a morbidade por DCV em pacientes normotensos ou hipertensos (Taylor et al. 2011). Com o objetivo de avaliar os benefícios e riscos de modificações na ingestão de sal na dieta de pacientes portadores de doença renal crônica (DRC), o grupo *The Cochrane Collaboration* publicou no presente ano (McMahon et al. 2015) um estudo de revisão que incluiu ensaios randomizados que compararam níveis de ingestão de sal nesse grupo de pacientes. Os autores concluíram que ainda existem muitas lacunas no que diz respeito à restrição no consumo de sal, a longo prazo, em pacientes portadores de DRC. E que as evidências até o momento não foram capazes de determinar os efeitos diretos da restrição de sódio em desfechos como mortalidade e evolução para insuficiência renal terminal (IRT). Além disso, apesar da redução considerável da PA e da proteinúria, ainda não é claro se tais efeitos se mantêm a longo prazo, ou se refletem efetivamente em redução na incidência de IRT.

A HA primária é uma doença que possui origem multifatorial e que, quando não adequadamente controlada, pode levar a diversas complicações. Vários modelos experimentais foram desenvolvidos ao longo do tempo na tentativa de se melhor estudar tais complicações em diferentes órgãos e sistemas. Dentre os modelos experimentais de hipertensão de origem genética, destaca-se o modelo de hipertensão espontânea: SHR (*spontaneously hypertensive rats*), desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963). Sua importância se dá pela similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão primária no homem, sendo considerado um excelente modelo da HA essencial do homem (Trippodo, Frohlich, 1981). Portanto, o presente estudo utilizou este modelo experimental de hipertensão a fim de investigar como dietas com diferentes teores de sal interferem na evolução das lesões renais produzidas, a longo prazo, pela hipertensão arterial. Para tanto, comparamos os efeitos de dietas com teor normal de sódio com dietas isocalóricas e isoproteicas com teor reduzido ou aumentado de sódio.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do consumo a longo prazo de sal (sódio) sobre o funcionamento dos rins de ratos com hipertensão arterial e, mecanismos moleculares envolvidos com tais efeitos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos, a longo prazo, da ingestão crônica de três dietas isocalóricas e isoproteicas, uma contendo níveis normais de sódio com outras com conteúdo de sódio reduzido ou aumentado, em ratos espontaneamente hipertensos. Especificamente, os seguintes parâmetros foram avaliados:

2.3.1 A evolução da pressão arterial ao longo de 6 meses de tratamento;

2.3.2 A excreção urinária de proteínas;

2.3.3 A expressão de proteínas envolvidas na endocitose mediada por receptor e na barreira de filtração glomerular

2.3.4 As adaptações dos componentes do SRA renal: enzimas ECA e ECA2 e receptores AT1, AT2 e *Mas*

2.3.5 As modificações estruturais dos rins.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos SHR, machos, desmamados com 4 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso a água e ração em gaiolas apropriadas com no máximo 4 animais por gaiola.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal e previamente aprovado pelo Comitê Institucional de Pesquisa em Animal da Universidade Federal do Espírito Santo sob o número 178/08.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O estudo foi desenvolvido em três grupos experimentais que receberam ração para roedores cuja única diferença foi o conteúdo de cloreto de sódio. O grupo controle recebeu a dieta padrão (NS) contendo 0.3% g/g de NaCl. O segundo grupo recebeu dieta de baixo sal (LS) contendo 0.03% g/g de NaCl, ou seja, com conteúdo de sódio dez vezes menor do que a dieta padrão. O terceiro grupo recebeu dieta de alto sal (HS), contendo 3% g/g NaCl. Todas as dietas foram especialmente preparadas para o projeto (Prag Soluções®, São Paulo).

As dietas foram introduzidas imediatamente após o desmame sendo mantida por 6 meses. A PAS medida por pletismografia foi obtida em 3 momentos: no desmame e no 3º e 7º mês de idade dos animais. Ao final do período de tratamento, os animais foram sacrificados para coleta de material para análises (Figura 4).

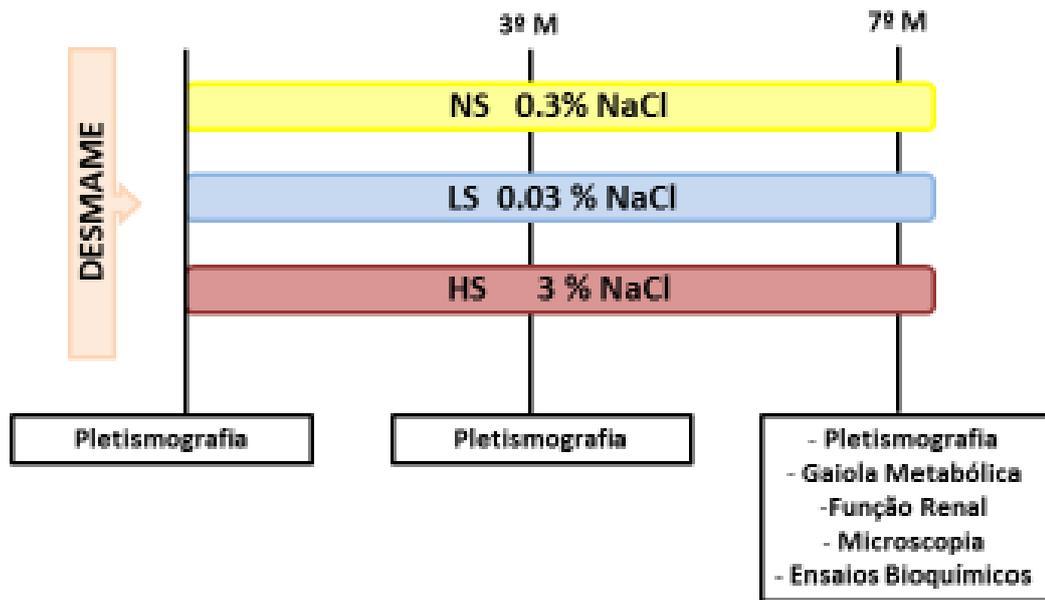


Figura 4: Figura esquemática do protocolo experimental. NS: dieta padrão. LS dieta de baixo sal. HS: dieta de alto sal.

3.2 AVALIAÇÃO NÃO INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida não invasiva da PAS foi realizada no animal acordado por pletismografia de cauda (II TC Life Science Inc, Woodland Hills, CA, EUA) no desmame e na idade de 3 e 7 meses. Tendo em vista a dificuldade de se obter a PAS em ratos com até 1 mês de idade, neste grupo os dados foram coletados em sub amostra de 8 animais. Os ratos foram acondicionados em contentores de acrílico e a região proximal da cauda era encaixada em manguito de borracha conectado ao esfigmomanômetro com insuflação e desinsuflação automática em intervalos de 40 segundos, aproximadamente. Os pulsos sistólicos eram captados por um transdutor e enviados ao computador onde eram visualizados em tela. A PAS de cada animal era dada pela média de duas a cinco medidas obtidas em situação estável. As medidas eram obtidas após os animais passaram por um período de adaptação ao sistema de medida no qual eram submetidos à mesma situação de medida de pressão por 10 minutos em dia diferente à aquisição do registro.

3.3 COLETA DE SANGUE E TECIDOS

Ao final do período de tratamento com as dietas, os ratos foram profundamente anestesiados com cetamina (70 mg.kg⁻¹, ip, Agener - União Brasil) e xilazina (10 mg.kg⁻¹, ip, Bayer, Brasil) por via intraperitoneal. A artéria carótida foi canulada para coleta de sangue. O soro foi colhido em tubos contendo ativador de coagulação e centrifugado a 4 °C durante 15 min a 1400 g para separação de soro e elementos celulares. O plasma foi colhido em tubos contendo uma solução com coquetel de inibidores de proteases para dosagem de peptídeos circulantes (APÊNDICE A). Posteriormente, os animais foram sacrificados por abertura do tórax e remoção dos órgãos (coração, rins, aorta abdominal e vasos mesentéricos). Todos foram rapidamente lavados em solução salina fria e pesados. As amostras de sangue e dos tecidos destinadas para as análises bioquímicas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e crio preservadas a - 80 °C. Em um subgrupo de animais, sacrificados da mesma forma descrita acima, foram retirados o coração e o rim direito para análises de microscopia, ambas realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins da UFES (Seção 3.4 e 3.5). Para o desenvolvimento desta tese foram feitos os estudos bioquímicos e funcionais realizados nos rins. Os efeitos das dietas com diferentes teores de sal sobre a reatividade vascular do leito mesentérico foram estudados em paralelo. Algumas análises preliminares em tecido cardíaco destes animais estão contidas no APÊNDICE A deste trabalho.

3.4 HISTOLOGIA RENAL

Os espécimes foram fixados em tampão fosfato (pH=7.4) contendo paraformaldeído 4%. Estes foram cortados transversalmente e alocados em cassetes histológicos para o processamento automatizado dos tecidos (as amostras foram alocadas em cassetes histológicos, para processamento histológico em um processador automático de tecidos (histotécnico - *LUPE®*, Brasil - *PT05*) em baterias de desidratação crescente em álcool (70%, 80%, 90% e 3 repetições de 100%), passagem em solução álcool-xilol (1:1), diafanização em xilol puro (3 repetições) e inclusão em parafina histológica. Todos os banhos duraram 1 hora cada, totalizando um protocolo de 12 horas de inclusão. O material foi emblocado em moldes histológicos de alumínio parafinizados

e armazenados sob refrigeração (4°C) até o momento da microtomia realizada em micrótomo rotativo manual (Leica Biosystems, Alemanha, 2125RT). Foram obtidos cortes de 4 µm de espessura os quais foram montados em lâminas convencionais. Para realização das colorações, os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização química em xilol (3 passagens de 3 minutos cada) e hidratados com concentrações crescentes de álcool etílico (álcool 50% em xilol, álcool 96% em água e álcool 100%) com passagens de 3 minutos em cada solução e por fim em água corrente por 5 minutos. Após, os cortes foram submetidos a dois procedimentos distintos de coloração: Ácido Periódico de Schiff (APS) para análise morfológica e de expansão mesangial e Picrosirius Red (PC) para avaliação de fibrose intersticial. Em seguida, os cortes foram desidratados com passagem em álcool 100%, solução de álcool-xilol (50%) e baterias de xilol PA. Todas as passagens foram realizadas com o tempo de três minutos. A montagem final das lâminas foi feita em meio não-aquoso DPX [p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (Sigma-Aldrich, USA).

3.4.1 Coloração com Ácido Periódico de Schiff (APS)

Para avaliação da morfometria e expansão mesangial (ou score de glomerulosclerose) foi utilizada a coloração de APS. Esta é capaz de corar em rósea intenso glicosaminoglicanos presentes na matriz mesangial, o que permite a contrastação do rósea claro corado nas demais áreas glomerulares. Para tanto, após desparafinização, os cortes foram tratados com ácido periódico por 5 minutos e lavados em água corrente durante 5 minutos. Posteriormente, foram tratados com reagente de Schiff por 20 minutos e em seguida com solução de metabissulfito por 3 minutos. Por fim, submetidos a banho de água corrente por 10 minutos para posterior desidratação e montagem das lâminas.

3.4.2 Coloração com picrosirius red (PC)

A coloração com PC é um procedimento específico para visualização do colágeno. O corante possui grupamentos ácidos que reagem com grupamentos básicos presentes nas moléculas de colágeno. Quando observado em luz não polarizada, as fibras colágenas se coram em vermelho e todo restante em amarelo. Após a desparafinização e hidratação, o material foi tratado por 1 hora com solução 0.1% de

Picrosirius Red dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Em seguida, foram submetidos a uma passagem em solução 0.01N HCl, rapidamente lavados em água corrente e contra corados com Hematoxicilina de Harris filtrada durante 3 minutos. Por fim, submetidos a banho de água corrente por 10 minutos para posterior desidratação e montagem das lâminas.

3.4.3 Avaliação microscópica

A avaliação microscópica dos cortes foi realizada em microscópio óptico (Olympus Corporation, Japão) acoplado a uma câmera digital AxioCam (Carl Zeiss MicroImaging, Alemanha) com ampliação de 400x. A aquisição das imagens foi realizada com auxílio do AxioVision Imaging System 4.8 software (Carl Zeiss MicroImaging, Alemanha). A análise das imagens foi realizada com o auxílio do programa Image J (National Institute of Health, EUA, domínio público), calibrado em micrometros.

Para avaliação morfológica, foram mensurados os parâmetros de área da cápsula glomerular, área do tufo glomerular e espaço de Bowman. Um total de 20 glomérulos com polo vascular e urinário detectável foram examinados para cada animal. Em seguida, nestes mesmos glomérulos, foi mensurada a porcentagem média de áreas APS-positivo, que foi correspondente das áreas ocupadas por células mesangiais intraglomerulares. Conforme fórmula abaixo.

$$\left(\frac{\text{Área corada com APS}}{\text{Área Tufo Glomerular}} \right) \times 100$$

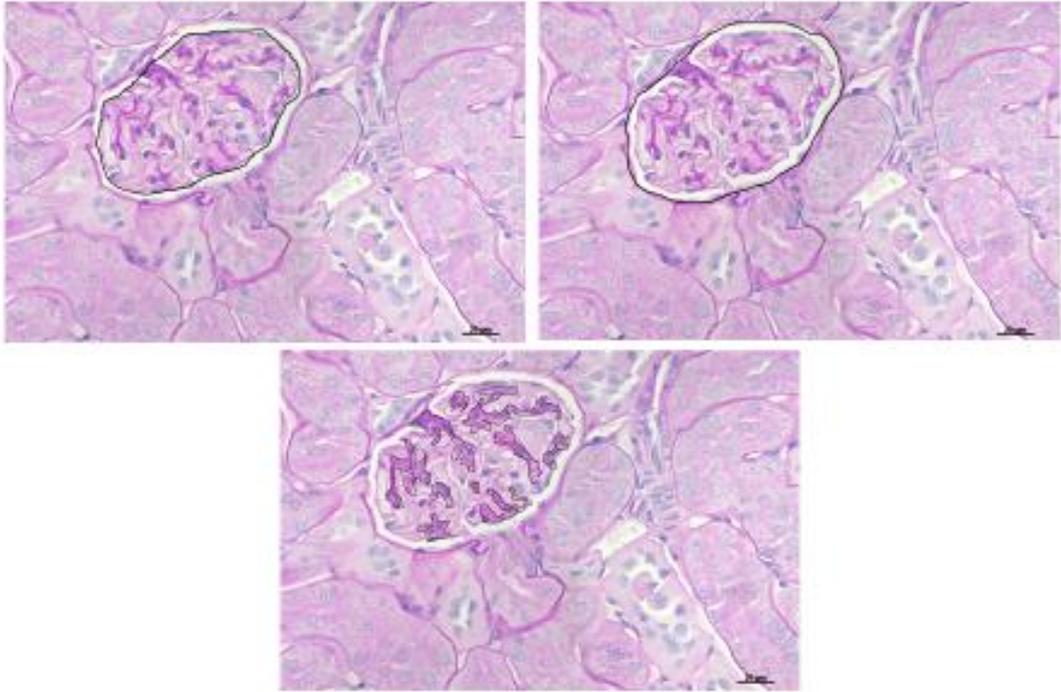


Figura 5: Fotos típicas de glomérulos corados com ácido periódico de Schiff (APS). Em preto está representada a delimitação da área do tufo glomerular (esquerda), capsula glomerular (direita) e área mesangial intraglomerular APS-positivo. Barra de escala= 20 μ m.

Para avaliação da extensão da fibrose intersticial foram capturadas, para cada animal, 20 imagens aleatórias a partir de todo córtex renal incluindo túbulos proximais. A fração da área corada por Picosírius em vermelho representou a fibrose intersticial.

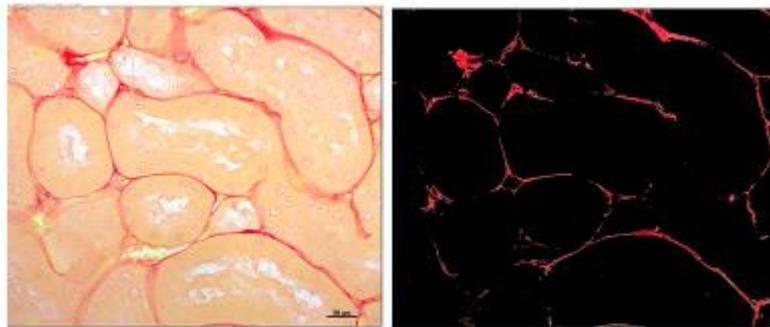


Figura 6: Foto típica de túbulos da região córtex renal para quantificação do colágeno intersticial (esquerda). Foto após aplicação da ferramenta “color threslohd” evidenciando somente as áreas coradas com Picosírius (direita) Barra de escala= 20 μ m.

3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a análise de ultraestrutura renal, as amostras de córtex foram cortadas transversalmente e fixadas em solução contendo paraformaldeído a 2% e

glutaraldeído a 2,5%. Posteriormente, foram armazenadas a 4°C *overnight*. Após, foi realizada lavagem em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M por 10 minutos, com três repetições. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% (proporção de 1:1) durante 1 h ao abrigo da luz. Após etapas de lavagem com tampão cacodilato 0,1M e água destilada (três lavagens de 30 minutos, cada), as amostras foram desidratadas em graus crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), com 30 minutos cada passagem, e em seguida, embebidas em resina epóxi / EPON (EMbed 812, Electron Microscopy Sciences) à temperatura ambiente. Para tanto procedeu-se baterias de acetona 100% + EPON (2:1) por 12 horas, seguida de acetona 100% + EPON (1:1) por 6 horas, novamente, acetona 100% + EPON (2:1), EPON puro por 12 horas à temperatura ambiente, e por fim mantidas à 60 °C por trinta e seis horas. Após polimerização, os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo (*RMC PowerTome, USA*). As regiões de interesse foram identificadas em cortes semi-finos de 0,5 µm coradas com azul de toluidina. As seções (60-80 nm) foram coletadas em grades de cobre e duplamente contrastadas com soluções de acetato de uranila e citrato de chumbo antes de visualizar com MET (JEOL JEM-1400, Japão) operado a 60-70 kV.

3.6 PARÂMETROS METABÓLICOS E DE FUNÇÃO RENAL

Na última semana do tratamento com as dietas, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais (Tecniplast R) por 24 horas e nas 24 horas subsequentes foi feita a avaliação do consumo de água e ração e da excreção urinária. O volume urinário de 24 h foi medido e uma alíquota foi armazenada em freezer -20°C para análises posteriores de função renal. O peso do animal foi medido assim que o animal foi retirado da gaiola metabólica.



Figura 7: Foto ilustrativa do modelo de gaiola metabólica utilizado no estudo.

Para avaliação da função renal, os seguintes parâmetros foram determinados: fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular (RFG) estimado pela depuração de creatinina endógena, excreção urinária de sódio, potássio, proteínas totais e albumina, e relação albumina/creatinina e proteínas totais/creatinina na urina. Estes parâmetros foram obtidos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - InCor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP.

3.6.1 Ritmo de Filtração Glomerular

A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina sendo liberada continuamente para o sangue, principalmente a partir do músculo esquelético. É livremente filtrada no capilar glomerular, não é reabsorvida e apenas uma pequena quantidade é secretada no túbulo proximal. Por estas características, a depuração de creatinina (ou *clearance* de creatinina) é comumente utilizada na prática clínica como uma estimativa do RFG. O qual é um determinante clínico válido para avaliação da função renal. As concentrações de creatinina na urina e no soro foram realizadas utilizando kit colorimétrico da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil) de acordo com instruções do fornecedor. A determinação analítica em ambas amostras foi realizada

por método cinético baseado na reação da creatinina com ácido pícrico formando um complexo de cor amarelo avermelhada que é medido fotometricamente a 510 nm (Reação de Jaffé). Utilizando-se um padrão de concentração de creatinina conhecido, é possível determinar a concentração do analito na amostra, conforme fórmula abaixo e segundo lei de Lambert-Beer.

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times [\text{] padrão}$$

[] padrão = Concentração de creatinina no padrão (mg/dL)

De posse das concentrações de creatinina na urina e no soro, foi calculado o RFG a partir da depuração endógena desta substância, conforme equação abaixo. Onde U_{Cr} é a concentração de creatinina urinária em mg/dL. S_{Cr} corresponde à concentração de creatinina no soro em mg/dL. V corresponde ao fluxo urinário obtido pela divisão do volume de urina coletado pelo tempo de coleta relativa às 24 horas (ou seja, 1440 minutos). Este valor foi corrigido para o peso de cada animal. O fluxo urinário dado, portanto, em mL/dmin/100g.

3.6.2 Excreção de sódio e potássio

$$\text{RFG (mL/min/100g)} = \frac{U_{Cr} \times V}{S_{Cr}}$$

A concentração urinária de sódio e potássio e os níveis séricos de sódio foram determinados por eletrodo específico Radiometer ABL800 Flex 121 blood gas analyzer (Radiometer Medical, Brønshøj, Denmark). A excreção urinária de sódio e potássio foi calculada a partir das dosagens urinárias e do volume total de urina produzida em 24 h.

3.6.3 Excreção urinária de proteínas totais

A presença de proteinúria é, frequentemente, associada com doença renal e sua determinação é importante para avaliação da função renal. A determinação espectrofotométrica de proteínas totais na urina baseia-se na reação de vermelho de pirogalol com molibdato de sódio dando origem a um complexo que, em meio ácido, quando combinado às proteínas, desenvolve um cromóforo azul, cuja concentração pode ser determinada quando a absorvância da solução é medida a 600nm. A absorvância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Utilizando-se um padrão de concentração proteica conhecido, é possível determinar a concentração de proteínas totais na amostra de urina conforme fórmula abaixo e segundo lei de Lambert-Beer.

$$\text{Proteínas (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times [\] \text{ padrão}$$

[] padrão = Concentração de proteínas no padrão (mg/dL)

Para determinação de proteinúria foi utilizada a urina de 24 horas e Kit Sensiprot de dosagem de proteínas totais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). A dosagem foi realizada conforme instruções do fabricante.

3.6.4 Excreção Urinária de Albumina

A determinação quantitativa de albumina urinária foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) direto competitivo utilizando kit específico para urina de rato (Nephrat kit Exocell, Philadelphia, PA). O ensaio baseia-se na adição da amostra líquida e de anticorpo conjugado anti-albumina a uma placa previamente revertida de albumina de rato. A reação antígeno-anticorpo competitiva se dá na ligação do anticorpo, tanto com a albumina revestida na placa, quanto com a albumina da amostra. Após remoção da parte líquida por lavagem, apenas os conjugados ligados à placa permanecem e são detectados por meio da adição de um cromógeno. A

intensidade da cor quantificada fotometricamente é inversamente proporcional ao logaritmo da concentração de albumina na amostra.

A fim de se evitar valores subestimados de excreção de proteínas totais e albumina em virtude de possíveis diferenças no RFG e/ou perda urinária, os valores de proteinúria e albuminúria foram normalizados pela concentração de creatinina urinária.

3.6.5 Eletroforese de proteínas totais na urina

De posse da concentração da creatinina urinária, foi aplicado um volume de urina correspondente de 40 µg de creatinina em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) que permite a separação de proteínas de acordo com o peso molecular. As amostras foram previamente diluídas em tampão Laemmli e aquecidas em banho seco a 94 °C para desnaturação proteica até sua estrutura primária. Em seguida, foram carregadas em gel de entrada com concentração de 3% de acrilamida e percorreram gel de separação eletroforética com concentração de 12% de acrilamida previamente imersos em tampão de corrida eletroforética (25mM de Tris HCl, 192mM de glicina e 0.1% de SDS, pH = 7.4). Além das amostras, foi adicionado ao gel um padrão de peso molecular de proteínas (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope, Bio-Rad) para estimar o peso das proteínas presentes na urina. O sistema montado, por sua vez, foi submetido a uma corrente elétrica constante de 100V por período de 2 horas (PowerPac™ HC, BioRad CA, Estados Unidos da América, EUA). Após a corrida eletroforética, o gel contendo as amostras de urina foi corado com nitrato de prata (kit ProteoSilver Plus Silver Stain, Sigma-Aldrich - Brasil) conforme instruções do fabricante.

Com objetivo de normalização dos resultados de concentração tecidual dos analitos estudados por miligramas de proteínas, a dosagem de proteínas totais nas amostras de tecido renal utilizados para os ensaios foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada homogenado obtido nos ensaios, foi retirada uma alíquota de 100 µl para determinação das proteínas totais. As curvas padrão foram construídas utilizando albumina de soro bovino na concentração de 1mg/mL.

3.7 ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

A atividade da ECA no rim foi realizada por ensaio fluorimétrico, como anteriormente descrito (Santos et al., 1985). O rim foi armazenado em temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da homogeneização. O rim esquerdo de cada animal foi repartido em pequenas porções de aproximadamente 200mg de tecido. Tal procedimento foi realizado em gelo seco com objetivo de preservar o tecido congelado. As porções do tecido foram homogeneizadas em tampão de ensaio Borato 0.4 M, pH 7.2 contendo 0.34 M de sacarose, com o auxílio de um homogeneizador (Turax). Para a completa dissolução dos resíduos foi utilizado aparelho de ultra-som (Vibra Cell, Sonics e Materials Inc). Os homogenatos foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e o sobrenadante foi utilizado para a análise. Parte deste foi reservado para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Inicialmente, 10 μL do sobrenadante foram incubados com 490 μL de tampão de ensaio borato contendo 5 mM de Hip-His-Leu durante 30 minutos em 37°C . Esta reação foi interrompida por meio da adição de 1200 μL NaOH a 0,34 N. Em seguida, foi adicionado 100 μL o-ftaldialdeído (20 mg / ml em metanol), o qual se liga ao produto da reação de His-Leu, e permite uma leitura fluorimétrica. Após 10 minutos, 200 μL 3 N de HCl foi adicionado para acidificar a solução e, em seguida, realizou-se a centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram lidos em ELISA Reader (BioTek Synergy TM 2; Biotek, VT, EUA), utilizando os seguintes comprimentos de onda (365 nm de excitação e 495 nm de emissão). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A concentração de proteínas foi realizada em todas as amostras. A atividade da ECA foi expressa em nmol His-Leu / min / μg de proteína.

3.8 ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA2 (ECA2)

A atividade enzimática da ECA2 renal foi determinada utilizando-se substrato fluorescente sintético (FPS VI), Mca-YVADAPK (Dnp) OH (catálogo n ° ES007; R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) como previamente descrito (Huentelman et al., 2004). As amostras do tecido renal foram homogeneizadas com tampão de ensaio (75 mmol l^{-1} Tris-HCl (pH 7.5), 1 mol l^{-1} NaCl and 0.5 mmol l^{-1} ZnCl_2) com auxílio de um homogeneizador (Turax), utilizando-se 1mL do tampão de ensaio para 50mg de tecido. Os homogenatos foram centrifugados a 20.000 g por 40 minutos. O

sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas totais e para o ensaio enzimático. Para o ensaio, utilizou-se uma solução de captopril (10 μ M de captopril em tampão de ensaio) para inibição da ECA.

O ensaio enzimático foi realizado em duplicata em microplaca de 96 poços. Procedeu-se com as seguintes etapas: inicialmente foram adicionados 1 μ l de solução de captopril e 2 μ l de NaCl 5M. Em seguida, foi adicionado 70 μ g de proteínas do tecido renal e um volume de tampão de ensaio suficiente para completar 90 μ l em cada poço, e por fim, incubação por 10 minutos. O substrato fluorogênico (10 μ l do substrato 50 μ M) foi adicionado imediatamente antes da leitura da placa simultaneamente nos poços com auxílio de pipeta multicanal. A fluorescência foi emitida por clivagem do peptídeo FPS VI mensurada utilizando um leitor de microplacas (BioTekSynergy™ 2; BioTek, Winooski, VT, EUA) a cada minuto durante 60 min imediatamente após a adição de substrato peptídico fluorogênico a 37 ° C em 320 nm de excitação e 405 nm de emissão. A fluorescência total foi corrigida para a quantidade de proteínas totais determinada pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976). Os dados foram apresentados em unidades de fluorescência por minuto normalizado pela proteína total.

Os ensaios de atividade das enzimas ECA e ECA2, bem como a expressão proteica dos receptores AT1, AT2 e *Mas* foram realizados no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

3.9 EXPRESSÃO RENAL DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*.

A técnica de *Western blotting* foi utilizada para determinar a influência das dietas sobre a expressão renal dos componentes do SRA: enzimas ECA e ECA2, receptores AT1, AT2 e *Mas*, bem como das proteínas nefrina, podocina, cubilina e megalina. Os fragmentos de rim permaneceram armazenados em temperatura de - 80 °C até o momento da homogeneização. Abaixo, o protocolo detalhado que foi utilizado para AT1, AT2 e *Mas*.

3.9.1 Homogeneização dos tecidos e extração proteica

A homogeneização do tecido renal congelado foi realizada com auxílio de um homogeneizador (Turax), em tampão de lise (Triton 1%, PBS, deoxilato de sódio 0.05%, Dodecilsulfato de sódio - SDS 0.1% em meio aquoso) acrescidos de um comprimido contendo inibidores de proteases (Complete Mini, Roche Diagnostics – Alemanha) para cada 10 mL de tampão de lise, além de Na₂VO₄ 1M e NaF 5M na proporção 1mL/100mg de tecido. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 20 minutos. As proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford para posterior ensaio de Western Blot.

3.9.2 Eletrofose

Para realização do Western Blot foi determinado a aplicação de 100 µg de proteínas de cada amostra em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) que permite a separação de proteínas de acordo com o peso molecular. As amostras foram previamente diluídas em tampão Laemmli e aquecidas em banho seco a 94 °C para desnaturação proteica até sua estrutura primária. Em seguida, foram carregadas em gel de entrada com concentração de 4% (0,5 M Tris HCl pH:6,8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) e percorreram gel de separação eletroforética com concentração de 10% (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em tampão de corrida eletroforética (25mM de Tris HCl, 190mM de glicina e 0.1% de SDS). O sistema montado, por sua vez, foi submetido a uma corrente elétrica constante de 100V por 2 horas (PowerPac™ HC, BioRad CA, Estados Unidos da América, EUA).

Ao término da corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Ras, Hercules, CA EUA). Para tanto, foi montado um sistema "sanduíche" contendo o gel, a membrana e o papel *Whatman* embebido com solução de transferência (Tris-25 mM, Glicina-190 mM, Metanol-20%, SDS-0,1%). O sistema (Trans-Blot SD Cell BioRad, EUA) foi submetido a uma corrente constante de 100 V por 2 horas. Tal processo de transferência foi realizado a uma temperatura de aproximadamente 4°C. A transferência foi confirmada pela presença da coloração das bandas do marcador de peso molecular na membrana.

3.9.3 Bloqueio e incubação com os anticorpos

Após a transferência, foi realizado o bloqueio não específico da membrana com 5% de leite desnatado em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,6) por um período de 1 hora sob agitação constante para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T (3 vezes de 10 minutos cada) para posterior etapa de incubação das membranas *overnight*, a 4 °C com os anticorpos primários de interesse. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-AT1, anti-AT2, anti-*Mas* e GAPDH. Passado o período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T sob agitação a fim de se remover o excesso de anticorpo primário e evitar possíveis ligações inespecíficas. Posteriormente as membranas foram incubadas durante 1h sob agitação, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo (imunoglobulina IgG anti-camundongo ou anti-coelho) de acordo com as descrições de produção do anticorpo primário. Descrição da fonte dos anticorpos e diluições estão na tabela 1.

3.9.4 Detecção das bandas de proteínas

A detecção das bandas de proteína foi realizada por meio de um sistema de scanner de fluorescência (Odyssey - Li-cor, Estados Unidos da America) de acordo com o comprimento de onda do anticorpo secundário, e a quantificação por intensidade de fluorescência calculada por densitometria por meio do software do aparelho. Após a quantificação das bandas, realizou-se a normalização destas pelo controle endógeno GAPDH.

O protocolo de realização de western blot para as proteínas ECA, ECA2, megalina, cubilina, nefrina e podocina foi similar ao descrito acima, com método de detecção das bandas diferentes, realizado por detecção enzimática com enzima peroxidase, utilizando anticorpo secundário conjugado a peroxidase e incubação com reagente para imuno-deteção por meio de luminescência, ECL (Amersham). A visualização das bandas foi realizada em fotodocumentador (GE Healthcare) e a captura das imagens por software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). A tabela abaixo apresenta a lista de todos os anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.

Tabela 1 - Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados no estudo

ANTICORPO	DILUIÇÃO (V/V)	FONTE
AT ₁	1:1000	Millipore
AT ₂	1:500	Millipore
<i>Mas</i>	1:300	Alomone
GAPDH	1:10000	Millipore
2 ^{ário} fluorescente	1:1000	Li-cor, EUA
ECA	1:1000	Santa Cruz, CA, USA
ECA2	1:1000	Abcam, Cambrige, UK
Megalina	1:50000	Doação (Dr. Daniel Biemesderfer, Yale University)
Cubilina	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
Nefrina	1:2000	Abcam
Podocina	1:2000	Abcam
actina	1:50000	Merck
HRP	1:2000	Life Technologies

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O padrão de normalidade para distribuição das variáveis foi realizado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis são apresentadas como média \pm erro padrão da média (EPM) e a comparação de médias foi feita por análise de variância de uma via seguida do teste post hoc de Bonferroni. A variável com distribuição não gaussiana, albuminúria/creatinina foi utilizado a ANOVA não paramétrica Kruskal-Wallis seguida do teste post-hoc de Dun. Os testes estatísticos e construção dos gráficos foram realizados no software PRISMA versão 13.0.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 MEDIDAS PONDERAIS E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Durante o protocolo experimental, o ganho de peso dos animais do grupo LS foi menor quando comparado aos outros grupos. Observa-se na Tabela 2, que o peso corporal e comprimento dos animais neste grupo, no 7^o mês de idade, foi menor em relação aos demais (NS: 310 ± 6 g, n=13; 326 ± 8; n = 11, LS: 240 ± 8 g, n=11), assim como o peso do rim. Contudo, o peso do rim normalizado pelo peso corporal foi similar entre os grupos.

Em relação a evolução da PAS nos grupos submetidos às diferentes dietas. No desmame, os animais apresentaram PAS 130 ± 5 mmHg. A PAS aumentou significativamente em todos os grupos durante o período de 6 meses de acompanhamento. Entretanto, a dieta LS foi capaz de promover uma significativa atenuação da elevação da pressão no decorrer do tratamento. Até o terceiro mês de idade, os animais que receberam NS e HS tiveram elevação da PAS similares. No sétimo mês de idade, contudo, a dieta de alto sal promoveu um aumento mais pronunciado da PAS em relação aos outros grupos. (NS: 208 ± 4; LS: 166 ± 3; HS: 227 ± 7 mmHg; p < 0.05).

Tabela 2: Parâmetros morfométricos e evolução da PAS

	NS	LS	HS
Peso Corporal (g)	310 ± 6	240 ± 8*†	326 ± 8
Peso do Rim Esquerdo (mg)	1250 ± 84	908 ± 33*†	1307 ± 38
Rim Esquerdo/PesoCorporal (mg/g)	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Comprimento (cm)	21.9 ± 0.1	20.1 ± 0.3	21.4 ± 0.2
PAS no desmame (mmHg)	130 ± 5	-	-
PAS 3 ^o mês (mmHg)	184 ± 2	153 ± 5 *†	182 ± 6
PAS 7 th mês (mmHg)	208 ± 4	166 ± 3 *†	227 ± 7*‡

Valores apresentados como média ± EPM. NS: grupo dieta padrão (n = 13). LS: grupo dieta baixo sal (n= 14). HS: grupo dieta de alto sal (n= 11). PC: peso corporal. cm: centímetros. PAS: pressão arterial sistólica * P < 0.05 vs. NS; † P < 0.05 vs. HS; ‡ P < 0.05 vs LS.

4.2 PARÂMETROS METABÓLICOS E DE FUNÇÃO RENAL

O teor de sal não interferiu no consumo de ração aferido por 24 horas na gaiola metabólica. Como esperado, a ingestão de água, o fluxo urinário e a excreção de sódio, avaliados por 24 horas foram afetados quantidade de sal na dieta do grupo HS em relação ao NS e LS. Entretanto, não alterou o RFG. A excreção de potássio foi similar entre os grupos (Tabela 3).

Table 3: Parâmetros metabólicos

	NS	LS	HS
Ingestão de ração (g/24h)	17 ± 1	17 ± 1	16 ± 1
Ingestão de água (mL/24h)	35 ± 1	27 ± 1	77 ± 4*‡
Fluxo urinário (mL/24h/100g)	6.2 ± 0.4	5.0 ± 0.3	26.1 ± 1.5*‡
RFG (mL/min/100g)	0.60 ± 0.1	0.78 ± 0.1	0.71 ± 0.1
Na ⁺ sérico (mEq/L)	138 ± 1	136 ± 2	141 ± 1
Na ⁺ urinário (mEq/24h/100g)	0.20 ± 0.01	0.03 ± 0.01*†	7.1 ± 0.5*‡
K ⁺ urinário (mEq/24h/100g)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.3

Valores apresentados como média ± EPM. NS: grupo dieta padrão (n= 12). LS: grupo dieta de baixo sal (n = 14). HS: grupo dieta de alto sal (n= 14). PC: peso corporal. Rim E: rim esquerdo. * P < 0.05 vs. NS; † P < 0.05 vs. HS; ‡ P < 0.05 vs LS.

4.2.1 Excreção urinária de proteínas totais e albumina

Como observado na figura 8, a análise de espectrofotometria e ELISA de captura das amostras de urina de 24h revelaram que os animais submetidos à dieta de alto sal apresentaram maior excreção urinária de proteínas totais e de albumina. Após a normalização pela creatinina observamos que a dieta restritiva de sal promoveu uma atenuação da perda de proteínas, especialmente de albumina. (Figura 8).

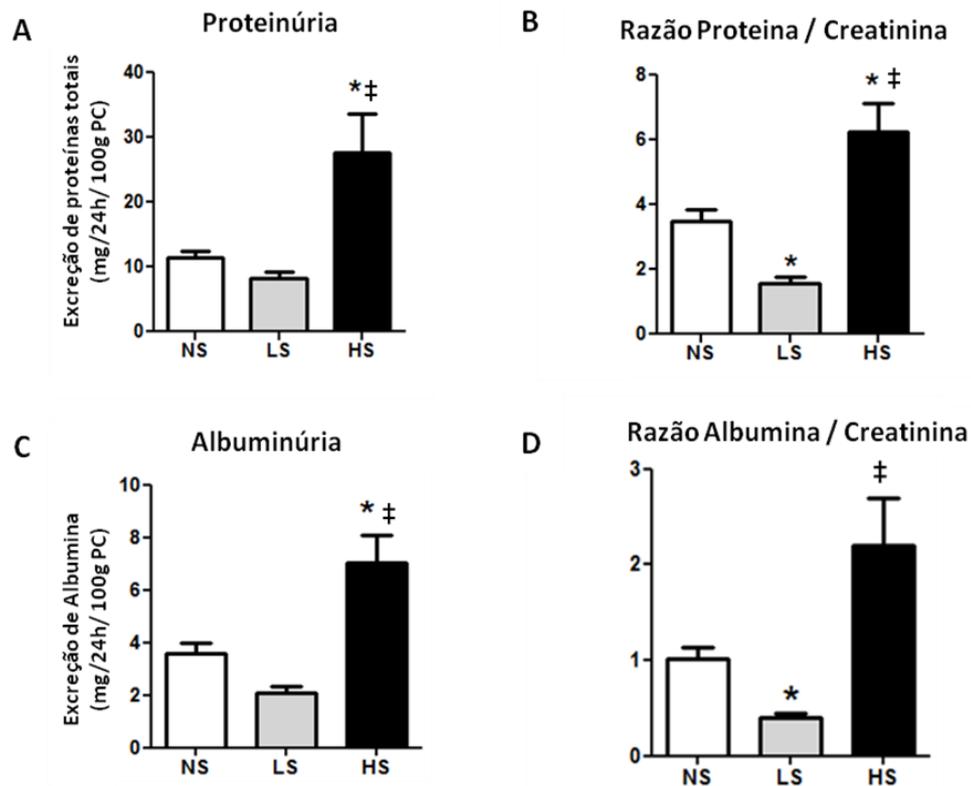


Figura 8: Avaliação da excreção urinária de proteínas totais e albumina nos três grupos de SHR. (A,B) proteinúria e razão proteínas/creatinina. NS: grupo dieta padrão. HS: grupo dieta de alto sal, LS: grupo dieta de baixo sal. (C,D) albuminúria e razão albumina/creatinina. Valores apresentados como média \pm EPM. * $P < 0.05$ vs. NS; ‡ $P < 0.05$ vs LS. (NS n = 10, LS n = 14, HS n = 11).

A figura 9, apresenta o padrão de excreção urinária de proteínas nos grupos experimentais em gel SDS-PAGE. Nota-se que, em consonância aos dados apresentados na figura 8, a dieta de LS reduziu a excreção de proteínas até mesmo em relação ao grupo NS. Por outro lado, foi detectada a excreção de proteínas de peso molecular maior que albumina nos animais submetidos à dieta HS. Este achado pode sugerir uma proteinúria glomerular com danos à barreira de filtração renal nestes animais.

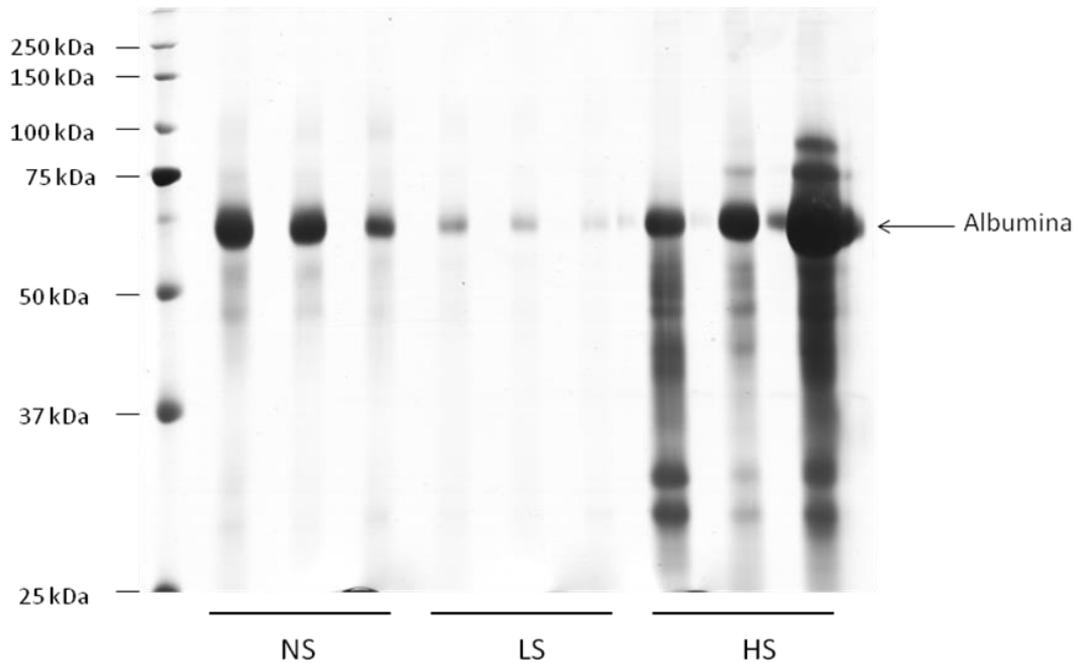


Figura 9: Perfil de excreção urinária de proteínas nos três grupos de SHR em gel SDS-PAGE. Amostras de urina de 24 hora de SHR foram submetidos ao gel SDS-PAGE corados com nitrato de prata. N = 3; NS: grupo dieta padrão, HS: grupo dieta de alto sal, LS: grupo dieta de baixo sal. Seta representa banda de albumina na corrida eletroforética.

4.2.2 Expressão Proteica de nefrina e podocina

Em virtude de nossos resultados sugerirem uma proteinúria glomerular nos SHR que receberam dieta de alto sal, e, em contrapartida, uma atenuação da proteinúria pela restrição da ingestão de sal, decidimos investigar a expressão de nefrina e podocina, sendo estas, importantes componentes da barreira de filtração glomerular. A figura 10 mostra que, a expressão de nefrina diminuiu aproximadamente 50% nos SHRs que receberam dieta de alto sal, quando comparado com os animais submetidos as outras dietas sem haver modificação na expressão da podocina. Já a restrição de sal na dieta não afetou a expressão proteica destas moléculas.

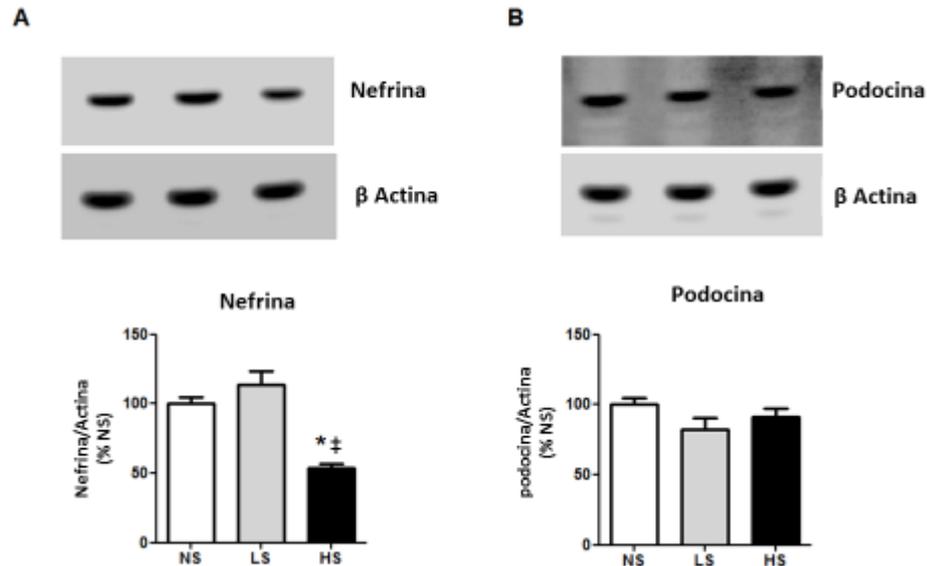


Figura 10: Expressão proteica de nefrina (A) e podocina (B) no rim de ratos SHR tratados com dietas com diferentes teores de sal. NS: dieta padrão. HS: grupo dieta de alto sal, LS: grupo dieta de baixo sal. Valores apresentados como média \pm EPM. N = 6/grupo. *P<0.05 vs. NS; ‡ P < 0.05 vs LS.

4.2.3 Ultraestrutura da Barreira de Filtração Glomerular (BFG)

A sugestão de dano à BFG nos animais submetidos à dieta de alto sal, tendo em vista a perda de proteínas de alto peso molecular e redução da expressão renal de nefrina, foi confirmada pelas imagens de ultraestrutura glomerular realizada por microscopia eletrônica. Os animais do grupo HS tiveram uma perda da integridade morfológica dos processos podais, juntamente com dano a *slit membrane*.

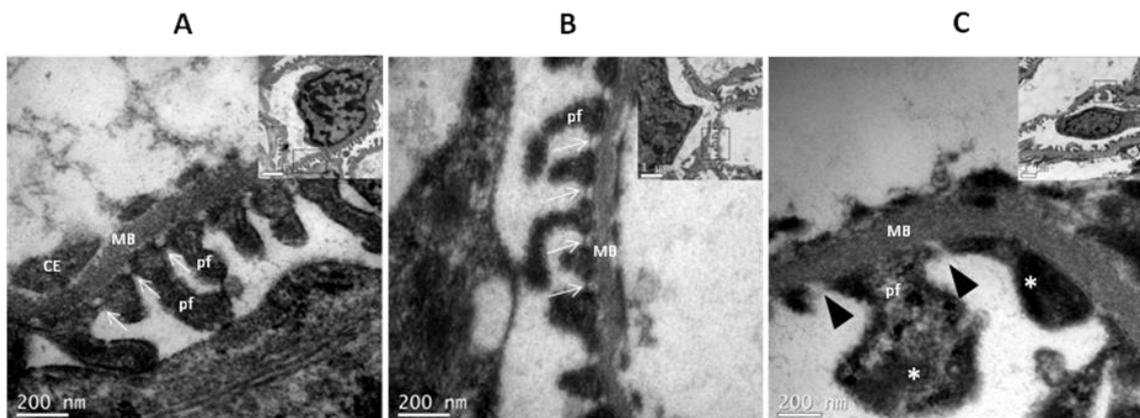


Figura 11: Foto da ultraestrutura da Barreira de Filtração Glomerular. Processos podais (pf), *slit diaphragm* (setas) e MB: membrana basal. (A, B): BFG preservada nos grupos NS (grupo dieta padrão) e LS (grupo dieta de baixo sal), respectivamente. (C): Imagem obtida em animal do grupo HS (grupo dieta de alto sal) com perda da integridade morfológica dos processos podais (fusão /destruição*) juntamente com dano à *slit diaphragm* (seta preta). MB, membrana basal; CE, de células endoteliais.

4.2.4 Expressão proteica dos componentes de megalina e cubilina.

A expressão proteica dos receptores megalina e cubilina, componentes do aparelho endocítico do túbulo proximal, foram avaliados uma vez que, poderiam estar envolvidos na modulação da excreção de proteínas pela ingestão de sal e também poderiam estar associados à preservação da função renal causada pela redução de sal nos animais hipertensos. Os animais que receberam dieta restritiva de sal apresentaram aumento de aproximadamente 60% da expressão proteica em relação aos outros grupos (figura 12). Tal achado poderia explicar pelo menos parcialmente a redução da perda de proteínas observada nestes animais. Contudo, não foi observada diferença estatística entre os grupos na expressão proteica de megalina.

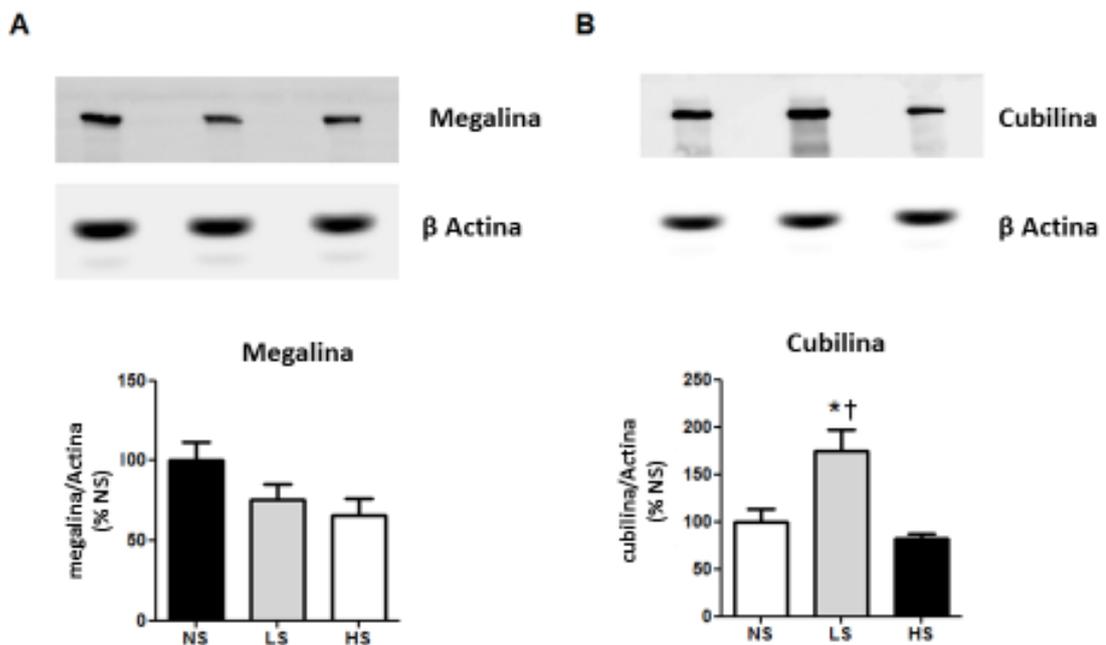


Figura 12: Avaliação da expressão proteica de megalina e cubilina em tecido renal dos animais SHR. (A) Megalina. (B) Cubilina. NS: grupo dieta padrão. HS: grupo dieta de alto sal, LS: grupo dieta de baixo sal. Valores apresentados como média \pm EPM. N = 6/grupo. *P < 0.05 vs. NS; ‡ P < 0.05 vs. LS.

4.2.5 Análise Histológica

Os parâmetros histológicos de morfologia renal e glomeruloesclerose foram investigados em cortes corados com APS. Apesar da avaliação da relação peso renal / peso corporal não ter sido detectado sinal de hipertrofia renal, a medida histológica da área do tufo glomerular, cápsula e espaço de Bowman apresentaram claros sinais

de hipertrofia glomerular no grupo dos animais que recebeu a dieta HS (Tabela 4). Entretanto, o grau de glomerulosclerose e a fibrose intersticial, avaliada pelo percentual da área intersticial corada por PC, não foram afetados pelas alterações do teor de sal na dieta dos animais SHR (Figura 13).

Tabela 4: Análise Histológica

	NS	LS	HS
Área Glomerular, (μm^2)	7182 \pm 335	6223 \pm 141	8791 \pm 336*‡
Área da Capsula de Bowman (μm^2)	8927 \pm 260	7887 \pm 221	10960 \pm 429*‡
Área do Espaço de Bowman (μm^2)	1771 \pm 145	1664 \pm 129	2188 \pm 130‡

NS: grupo dieta padrão, LS: grupo dieta de baixo sal, HS: grupo dieta alto sal. Valores apresentados como média \pm EPM. N = 6/grupo * P < 0.05 vs. NS, ‡ P < 0.05 vs LS.

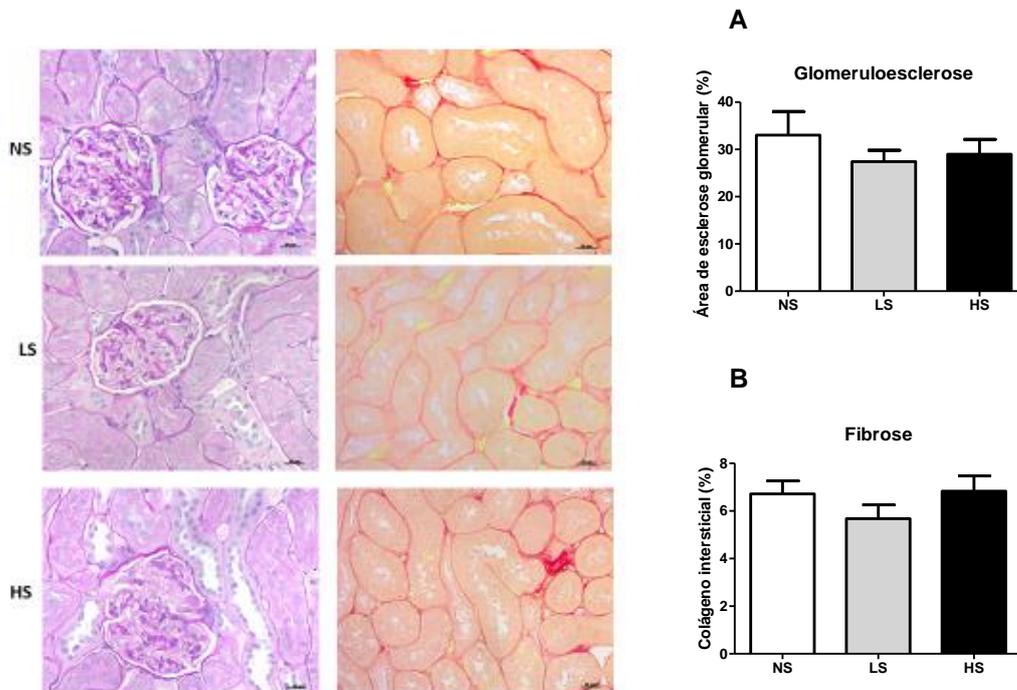


Figura 13: Fotomicrografias de seções do rim corados com APS (esquada) e PC (direita). (A) Índice de glomerulosclerose (porcentagem das APS-positivas na área tufo glomerular) nos grupos, e (B) deposição de colágeno intersticial (porcentagem das APS-positivas). Os dados estão representados como a média \pm SEM. NS: dieta padrão. LS: dieta com baixo teor de sal. HS: dieta rica sal. (n = 6 / grupo). Barra de escala: 20 μm .

4.3 AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

4.3.1 Avaliação da atividade e expressão intra-renal da ECA e ECA2

A ECA é a principal enzima responsável pela síntese de Ang II. Ao mensurarmos a atividade da ECA no rim dos animais hipertensos, observamos que os animais que receberam dieta restritiva de sal durante os 6 meses apresentaram uma redução da atividade desta enzima em relação aos animais que receberam dieta padrão de sal (figura 14A). A enzima ECA2 é responsável pela geração de Ang (1-7). Este eixo do SRA tem sido considerado atualmente como um componente protetor renal em muitas doenças renais. Como ilustrado na figura 14B, os animais SHR tratados com dieta de baixo sal, apresentaram uma elevação significativa da atividade da ECA2 renal em relação tanto aos animais que consumiram dieta padrão de sal, quanto aos animais de receberam dieta HS. Este perfil de atividade das enzimas resultou em redução da razão ECA/ECA2 renal nos animais que ingeriram LS. Além disso, a expressão renal de ambas as enzimas foi consistente com este achado (Figura 15). Curiosamente, por outro lado, os animais que receberam a dieta HS tiveram significativo aumento da expressão da ECA e redução da expressão de ECA2, resultando em aumento da razão ECA/ECA2. Entretanto, a atividade renal das enzimas não acompanhou o aumento proteico detectado (Figura 15).

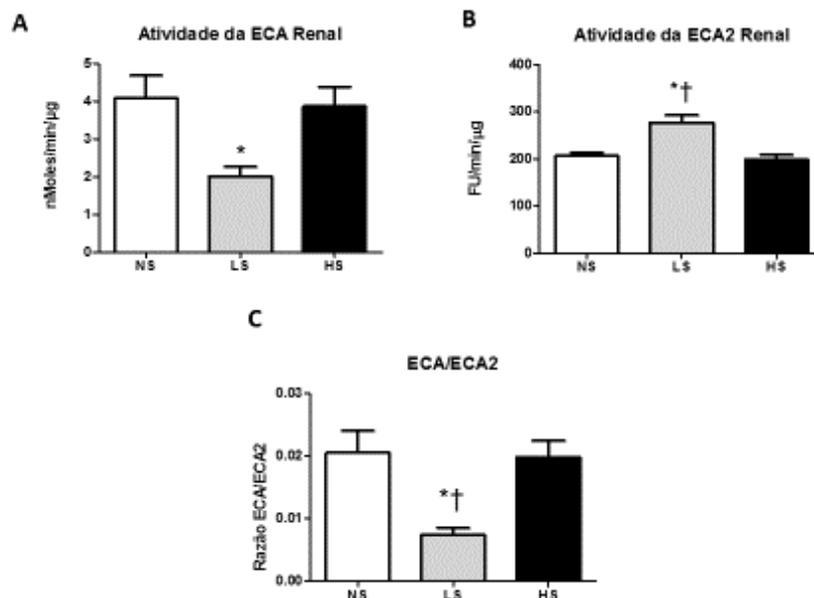


Figura 14: Atividade das enzimas ECA e ECA2 no rim de animais SHR sob dietas com diferentes teores de sal. NS: grupo dieta padrão (n = 12), LS: grupo dieta baixo sal (n = 10), HS: grupo dieta de alto sal (n = 9). Valores apresentados como média ± EPM. * P < 0.05 vs. NS. † P < 0.05 vs. HS.

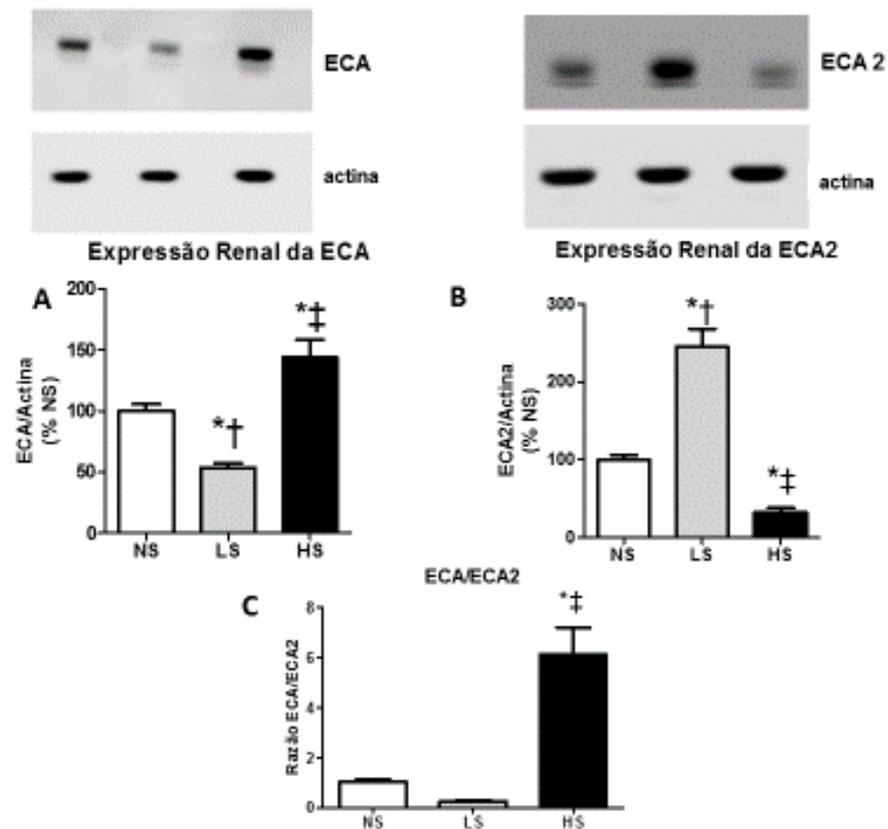


Figura 15: Expressão renal das enzimas ECA e ECA2 nos animais SHR sob dietas com diferentes teores de sal. NS: grupo dieta padrão, LS: grupo dieta baixo sal, HS: grupo dieta alto sal. Valores apresentados como média \pm EPM. * $P < 0.05$ vs. NS. † $P < 0.05$ vs. HS, ‡ $P < 0.05$ vs. LS. N = 6/grupo.

4.3.2 Expressão proteica intra-renal dos receptores AT1, AT2 e Mas

A expressão proteica dos receptores do SRA foi avaliada nos segmentos renais pela técnica de western blot. Como mostra a Figura 16, a variação do consumo de sal na dieta não interferiu na expressão dos receptores AT1, AT2 e Mas no rim de animais SHR.

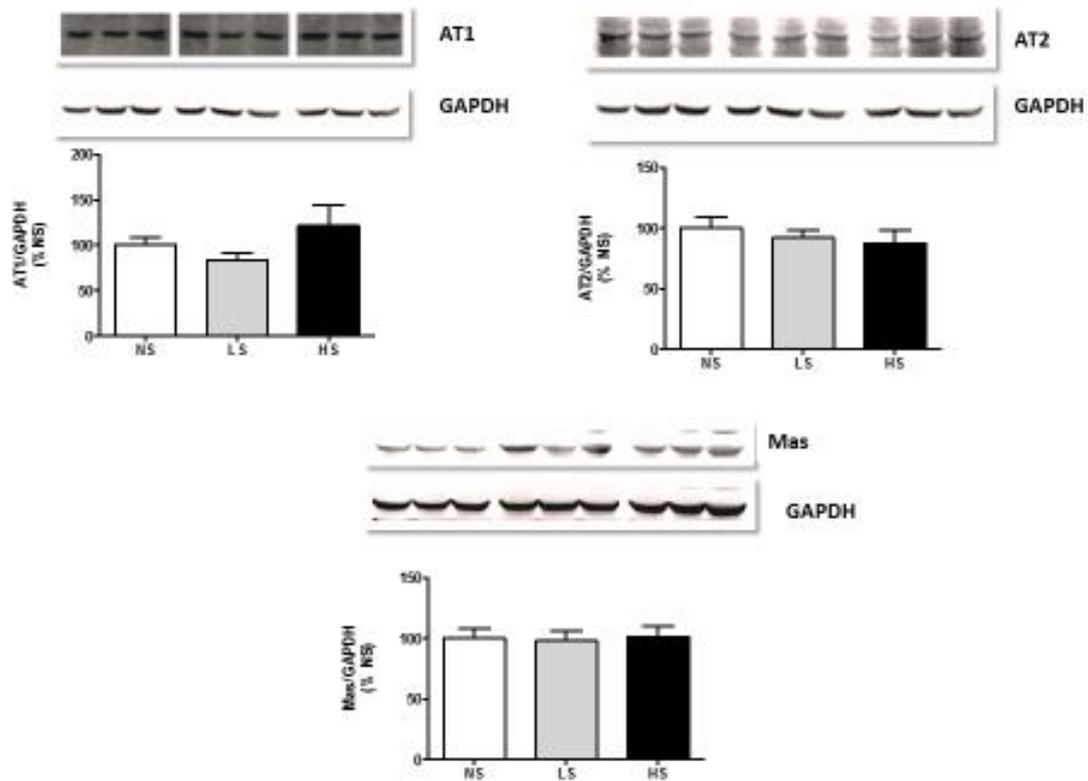


Figura 16: Expressão proteica renal dos receptores AT₁, AT₂ e Mas nos animais SHR submetidos diferentes teores de sal na dieta. NS: grupo dieta padrão, LS: grupo dieta de baixo sal, HS: grupo dieta de alto. Valores apresentados como média ± EPM. N = 4/grupo. AT₁: n = 3/grupo.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é uma das causas mais importantes de desenvolvimento da doença renal crônica. A alta ingestão de sal, por si só, é considerada um importante fator que contribui tanto para o desenvolvimento da hipertensão como para a ocorrência de suas complicações, incluindo a doença renal. Portanto, a restrição da ingestão de sal é recomendada para todos os hipertensos e, especialmente, para os portadores de doença renal (Cutler et al. 1997; KDIGO 2012). Contudo, ainda não são claros os mecanismos pelos quais a redução da ingestão de sal pode proteger tanto a estrutura como a função renal em portadores de hipertensão arterial.

No presente estudo mostramos que o uso crônico de uma dieta de baixo sal iniciada após o desmame, isto é, antes da instalação da hipertensão arterial e mantida por 6 meses em ratos SHR, atenuou o desenvolvimento da hipertensão e determinou preservação da função renal. Estes achados foram acompanhados de redução da relação de atividade ECA/ECA2 e aumento da expressão de cubilina, importante receptor endocítico envolvido na reabsorção de macromoléculas no túbulo proximal. Por outro lado, a ingestão de alto teor de sal durante o mesmo período agravou a hipertensão e a lesão renal nestes animais. Estas modificações foram acompanhadas de um aumento da relação proteica ECA/ECA2, assim como pela diminuição da nefrina, componente chave da *slit membrane* - principal local de filtração glomerular. Os achados permitem sugerir que a manipulação apenas do teor de sal na dieta, em longo prazo, interfere no SRA renal, especialmente nas vias ECA/Ang II e ECA2/Ang (1-7), e estas, por sua vez poderiam modular componentes da barreira de filtração glomerular e do aparato endocítico no túbulo proximal renal.

5.1 COMPORTAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E PARÂMETROS PONDERAIS.

Diversos estudos associam os níveis de pressão arterial com a ingestão de sal. De fato, é bem estabelecida a importante regulação do rim sobre a PA desde os estudos de Guyton e Dahl. Diante destas informações, investigamos o efeito da ingestão crônica de alto e baixo sal sobre a PAS neste modelo experimental de hipertensão

arterial e observamos que a pressão sistólica aumentou significativamente ao longo do tratamento em todos os grupos de animais SHR e, em especial, no grupo que ingeriu a dieta com alto sal, agravando ainda mais a hipertensão severa nestes animais. Por outro lado, a baixa ingestão de sal apenas foi capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertensão durante o acompanhamento dos animais. Além disso, provocou retardo no ganho de peso corporal nestes animais ao longo do estudo.

A relação da ingestão de sódio e pressão arterial é bem consolidada na literatura. Estima-se que uma redução de somente 1.3 g/dia na ingestão de sódio se traduziria em diminuição de 5 mmHg na PAS, em indivíduos entre 25 e 55 anos de idade (Dickinson et. al 2007). Diversos estudos experimentais também evidenciam a elevação da PAS pela alta ingestão de sódio. Gao et al. (2011), observaram uma elevação gradativa da PAS com uma sobrecarga de cloreto de sódio de 4 e 8%, durante 12 semanas, tanto em animais hipertensos, quanto em animais normotensos. Susic et al. (2010), mostraram que alta ingestão de sal não somente elevou a pressão arterial média, como promoveu hipertrofia e fibrose ventricular, assim como lesão renal. Já os estudos que mostram redução da pressão arterial com a baixa ingestão sal em animais hipertensos, datam a década de 80 e mostram que a restrição de sódio durante a fase de desenvolvimento da hipertensão nos animais SHR possui marcante efeito sobre a PAS, o que sugere um efeito da restrição salina sobre a PAS idade dependente. Wilczynski e Leenen (1987) submeteram animais SHR à restrição dietética de sódio (9 e 17 $\mu\text{mol Na/g}$), iniciada em diferentes períodos de seu desenvolvimento. Este estudo mostrou que a dieta com restrição severa (9 $\mu\text{mol Na/g}$) introduzida até 4 semanas de idade, preveniu o desenvolvimento da hipertensão, e esta quando iniciada nos animais com 7 semanas de idade, levou a uma atenuação da hipertensão. Já uma restrição dietética de 17 $\mu\text{mol Na}^+/\text{g}$ foi capaz de somente atenuar a hipertensão nestes animais quando iniciada até 7 semanas de idade. Os resultados de nosso estudo corroboram tais achados. Ao utilizarmos uma dieta de baixo teor de sal equivalente a 13 $\mu\text{mol Na}^+/\text{g}$ introduzida nos animais com 4 semanas de idade foi capaz de atenuar a hipertensão severa nestes animais durante todo período de acompanhamento.

No que diz respeito à redução do peso corporal, semelhante aos achados de nosso estudo, o mesmo trabalho de Wilczynski e Leenen FH (1987) supracitado mostrou

também redução do peso corporal e retardo no crescimento dos animais submetidos à baixa ingestão de sal. Achados similares foram encontrados por Toal e Leenen (1983) e, recentemente, em animais adultos, por Rugale et al. (2003) e Oudot et al. (2013). O estudo de Oudot et al. (2013), mostrou que a baixa ingestão de sódio preveniu a lesão renal e aumento de albuminúria provocados pela frutose associado à melhora na sensibilidade à insulina e de diminuição de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Curiosamente, estes efeitos foram independentes de alterações na pressão arterial. Os autores sugerem que a prevenção da resistência à insulina provocada pela baixa ingestão de sal, seria por meio da redução do peso corporal, especialmente pela redução do tecido adiposo. Contudo, o papel da restrição crônica de sal sobre o desenvolvimento e ganho de peso corporal em animais SHR muito jovens ainda não está claro.

5.2 PARÂMETROS METABÓLICOS E DE FUNÇÃO RENAL

A manutenção do volume do líquido extracelular depende do balanço de sódio, sendo este, o íon mais importante do meio extracelular, e é mantido pelo organismo em níveis séricos estreitos ($\text{Na} = 136$ a 145 mEq/L). O controle do balanço entre ganho (por meio da ingestão) e perda (por meio da excreção) de água e sódio no organismo, evita modificações no volume de líquido extracelular que poderiam se refletir de modo prejudicial na função cardiovascular. No presente estudo, observamos que ambos os grupos de animais submetidos à alta e baixa ingestão de cloreto de sódio, a função de auto regulação renal e o equilíbrio hidroeletrólítico foram preservados, tendo em vista a preservação do RFG e dos níveis de sódio sérico. O excesso de sal ingerido nestes animais pôde ser eliminado à custa de aumento no fluxo urinário levando à maior excreção de sódio. Por outro lado, a restrição salina não provocou deficiência corpórea de sódio, mantendo assim os níveis normais de sódio sérico. Vale destacar que a excreção urinária de potássio também foi similar entre os grupos, mostrando, portanto, que os mecanismos reguladores de permuta de sódio e potássio não foram afetados.

Diversos trabalhos na literatura consolidam o conceito de que o excessivo consumo de sal se associa à lesão renal, e o controle no consumo deste nutriente tem sido

recomendado não somente para pacientes com doenças cardiovasculares, mas também para a população geral, tendo em vista o elevado consumo na atualidade (PAHO, 2013). No presente estudo, a restrição crônica do consumo de sal nos animais hipertensos promoveu uma atenuação da hipertensão e, claramente, apresentou um efeito renoprotetor, levando à redução da proteinúria e albuminúria. Por outro lado, observamos que o alto consumo de sal cronicamente agravou a hipertensão nos animais, bem como acelerou a lesão renal caracterizada por aumento da albuminúria e aparecimento de proteinúria de provável origem glomerular.

Muitos estudos experimentais, ao testarem modelos de sobrecarga de sódio, utilizam dietas com teor extremamente altos de sódio ou adicionam cloreto de sódio à água de beber. Entretanto, dietas com teores muito elevados de sódio (8% na dieta ou 1,8% na água de beber, por exemplo) só podem ser usadas por períodos curtos de tempo. Estas intervenções promovem drástico dano aos aparelhos cardiovascular e renal tanto em animais hipertensos como em normotensos. Blase et al. (2003), ao administrarem a animais normotensos 1% de cloreto de sódio na água de beber, juntamente com infusão de aldosterona, durante 28 dias, observaram severa esclerose glomerular e vascular, inflamação e albuminúria. Yu et. al (1998), em modelo experimental com sobrecarga de 8% de cloreto de sódio na dieta, mostraram que a sobrecarga de sódio levava à fibrose generalizada e aumento de TGF- β nos rins e coração de ratos hipertensos e normotensos. Em nosso estudo, elevamos o teor de sódio de forma mais modesta na dieta, compatíveis com situações mais próximas às encontradas em humanos. Apesar de encontrarmos hipertrofia glomerular, não detectamos piora nos parâmetros de glomeruloesclerose e fibrose intersticial nos animais SHR submetidos à alta ingestão de sal. Estes resultados possivelmente se devem ao fato de utilizarmos menores teores de cloreto de sódio nas dietas HS, o que permitiu, possivelmente, a uma adaptação à moderada sobrecarga crônica de sal, durante muitos meses. Diferentemente de outros estudos em que o dano renal foi avaliado após exposição relativamente curta, mas com um consumo muito elevado de sal.

A detecção e quantificação de proteinúria, especialmente de albumina, possui grande importância no diagnóstico inicial e progressão de doença renal. Mesmo a detecção de pequenos aumentos na excreção de albumina (microalbuminúria), pode indicar

disfunção renal (Brasil, 2014). A proteinúria de origem renal pode resultar de um aumento na filtração glomerular, indicando alteração na barreira de filtração glomerular e/ou de uma redução da reabsorção destas macromoléculas no túbulo proximal indicando alteração no mecanismo de endocitose mediada por receptor.

Estudos mostram que a microalbuminúria encontrada nos animais SHR é predominantemente tubular, com perda urinária de proteínas de baixo peso molecular (Russo et al. 2003). Inoue et al (2013), ao investigarem o padrão temporal de excreção urinária de proteínas em animais SHR, observaram que as proteínas excretadas são de peso molecular igual ou menor que albumina e que a excreção urinária de albumina aumenta progressivamente com o aumento da pressão arterial a partir da 6 a 21^o semanas de idade em relação aos normotensos. Em nosso estudo, nós observamos que o alto consumo de sal foi associado com perda urinária de proteínas de alto peso molecular, sugerindo, portanto, dano à BFG, e por sua vez, levando à proteinúria glomerular. A BFG consiste em um endotélio fenestrado, uma membrana basal e os processos podais juntamente com a *slit membrane* que constitui a última e eficiente barreira de filtração às macromoléculas. De fato, tal sugestão foi confirmada pelas imagens da ultraestrutura do capilar glomerular, em que o grupo HS apresentou perda na integridade morfológica dos processos podais e lesão da *slit membrane*. De forma intrigante, a redução da expressão renal de nefrina, principal componente da *slit membrane*, neste mesmo grupo de animais, corrobora estes achados. O *down-regulation* da expressão de nefrina poderia estar contribuindo para o dano glomerular, especialmente à *slit membrane*, resultando em hiperfiltração de proteínas plasmáticas. Por outro lado, nos animais SHR que ingeriram cronicamente baixas concentrações de sal, foi observada uma redução da proteinúria a níveis ainda menores que nos animais que receberam dieta padrão, juntamente ao aumento da expressão renal de cubilina.

Os benefícios da restrição do consumo de sódio para a função renal já foram relatados em outros modelos experimentais. Oudot et al. (2013), testaram se a restrição crônica de sal poderia prevenir o desenvolvimento de alterações renais associadas à dieta com alto teor de frutose. Neste estudo, a dieta de baixo sal melhorou a sensibilidade à insulina, preveniu o aumento da proteinúria e da lesão renal juntamente com redução da inflamação e estresse oxidativo. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro

trabalho que demonstra que a restrição no consumo de sal somente, pode prevenir a proteinúria associada à maior expressão renal de cubilina em animais SHR. Este achado de nosso estudo indica claro efeito benéfico da redução crônica do consumo de sal na doença renal secundária à hipertensão. A cubilina é um receptor endocítico multiligante encontrado no túbulo proximal renal que, juntamente com outra proteína, a megalina, constituem um importante complexo responsável pela reabsorção tubular da maioria das proteínas filtradas nos glomérulos, especialmente albumina. O trabalho de Inoue (2013) demonstrou que, juntamente com a progressiva microalbuminúria a partir da 6^o até a 21^o semana de idade nos animais SHR, ocorre redução da expressão de megalina e cubilina. No presente estudo, acompanhamos ratos SHR a partir do desmame até 28 semanas de idade e observamos que os ratos que consumiram a dieta restritiva de sal exibiram melhora na expressão de cubilina em relação aos grupos de SHR que ingeriram dieta padrão e com alto teor de sal. Tendo em vista tais achados, podemos sugerir que a redução da proteinúria observada pela baixa ingestão de sal poderia estar relacionada a um aumento da capacidade de reabsorção de proteínas no túbulo proximal.

Infelizmente, neste estudo, não conseguimos separar claramente se os efeitos benéficos da restrição de sal na dieta sobre a função renal dos animais hipertensos, foram devido à redução da ingestão de sódio por si só, ou pela atenuação do desenvolvimento da hipertensão ou ainda, a uma interação destes dois fatores. Entretanto, vale destacar que a dieta de baixo sal somente atenuou a hipertensão, sem haver normalização pressórica. Vários relatos na literatura favorecem a hipótese de uma influência da restrição de sal na dieta sobre a função renal. O próprio estudo de Oudot et al. (2013) citado anteriormente, verificou os efeitos benéficos da baixa ingestão de sal sobre a função renal dos animais em seu modelo experimental, sem ocorrer modificações expressivas na PA, sugerindo, portanto, que tais efeitos não estariam relacionados a um efeito hemodinâmico sistêmico. Em outro estudo, o mesmo grupo de investigadores relatou uma influência benéfica da restrição dietética de sal sobre a albuminúria em modelo experimental de hipertensão provocado por infusão de Ang II, que foi independente de redução da PA, mas relacionado com redução dos efeitos pró-oxidantes do peptídeo (Rugale et al. 2003). Resultados similares de prevenção de proteinúria por restrição dietética de sal foram anteriormente descritos em estudo utilizando ratos nefrectomizados (Dworkin et al.

1996) e em ratos SHR (Benstein et al. 1990). Em ambos os estudos, nem a pressão arterial, tampouco a hemodinâmica glomerular (avaliada por micropunção) tiveram participação nos efeitos benéficos da restrição dietética de sal. Os benefícios do baixo sal na dieta são possivelmente multifatoriais com interações complexas entre vários sistemas hormonais, nervosos e metabólicos.

5.3 A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Ainda não está claro como a alta ingestão de sódio modula os receptores envolvidos na filtração e reabsorção de proteína nos rins, provocando proteinúria e lesão renal. Por meio de dados da literatura, é plausível sugerir que o SRA esteja relacionado a tais mecanismos. Estudos demonstraram que Ang II é capaz de induzir apoptose de células epiteliais do túbulo proximal e de podócitos em cultura (Bhaskaran et al. 2003), além de diminuir a expressão glomerular de nefrina (Jia et. al 2008). De fato, atualmente, diversos trabalhos têm relatado a participação do SRA intra-renal nos efeitos prejudiciais renais independentes da PA provocados pelo alto consumo de sal. Susic et al (2011) detectaram em ratos SHR, que a atividade do SRA intra-renal não está suprimida; ao contrário, encontra-se até mesmo aumentada após 4 semanas de sobrecarga de sal na dieta. No mesmo estudo em SHR, a dieta de alto sal aumentou a proteinúria, acelerou a lesão glomerular, a fibrose intersticial e o tratamento com losartan, um antagonista do receptor AT1 de Ang II, foi capaz de reduzir tais alterações, independente de redução da PA. Resultados similares foram encontrados com a utilização do candesartan que foi capaz de prevenir o aumento da proteinúria e do índice de massa renal nos animais SHR submetidos à dieta de alto sal (Varagic et al. 2008). Além disso, estudos clínicos já demonstraram que a redução no consumo de sal contribui para os efeitos anti-hipertensivos e renoprotetores dos inibidores da ECA (Cutler et al. 1997; Heeg, 1989).

É amplamente descrito na literatura os efeitos renoprotetores independentes da redução da PA de fármacos antagonistas do SRA (Brenner et al. 2001; Sasso et al. 2002; Viberti et al. 2002), principalmente em relação à perda renal de albumina. Recentemente, Arruda-Junior et al. (2014) demonstraram que a redução da proteinúria tubular em ratos SHR tratados com losartan foi associada ao aumento da

expressão renal de megalina e tais efeitos foram adicionais à redução da PA. Em outro estudo utilizando modelo experimental de hipertensão e diabetes, o tratamento com irbesartan impediu o desenvolvimento de albuminúria e redução na expressão renal de nefrina, ambos os efeitos sem participação importante sobre os níveis da PA (Bonnet et al. 2001). Coletivamente, os dados de nosso estudo, juntamente com os relatos da literatura, sugerem que o alto sal poderia ativar vias do SRA intra-renal relacionadas a alteração da expressão de proteínas da *slit membrana* e componentes críticos do aparato endocítico no túbulo proximal, que resultariam em proteinúria. E, por outro lado, podemos especular que a dieta de baixo sal poderia mitigar a ativação de vias do SRA intra-renal em condições patológicas, como a hipertensão arterial, que preservariam o manejo renal de albumina e outras proteínas.

No presente estudo, o consumo crônico de dieta com alto teor de sal aumentou a relação proteica de ECA/ECA2 renal, o que possivelmente poderia ser um dos mecanismos pelos quais a sobrecarga de sal leva à lesão renal, provavelmente aumentando a relação Ang II / Ang-(1-7). Resultados similares foram relatados por Bernardi et al (2012). Neste trabalho, o alto consumo de sal durante 4 semanas levou ao aumento da razão proteica ECA/ECA2 glomerular juntamente com aumento de estresse oxidativo sem alterar a expressão gênica dos receptores AT1 e Mas. Curiosamente, em nosso estudo, a relação de atividade ECA/ECA2 não acompanhou o aumento da relação proteica de ECA/ECA2 renal observado no grupo HS. Existem algumas explicações para esses achados. As técnicas atualmente disponíveis para avaliação da atividade as enzimas ECA e ECA2 geralmente utilizam concentrações não fisiológicas de um substrato sintético, o que pode não refletir a real atividade enzimática. Além disso, existem relatos na literatura da presença de inibidores endógenos destas enzimas que poderiam suprimir a atividade das mesmas *in vivo* (Fagyas et al 2014; Lew et al. 2008). Recente estudo (Veragic et. al 2013) relatou achados similares aos nossos em relação à expressão e atividade da ECA2. Vale destacar ainda, que existem estudos que evidenciam o desacoplamento entre a expressão gênica, a densidade proteica e a atividade da ECA2 (Ferrario et al. 2005; Burchill et al. 2008; Takahashi et al. 2010)

Diferente do que observamos no grupo HS, em nosso estudo, demonstramos que os ratos SHR submetidos à restrição no consumo de sal desde o desmame até a idade

adulta, tiveram um aumento da expressão e da atividade renal de ECA2, além da redução tanto da expressão quanto na atividade renal da ECA, o que resultou em diminuição na razão ECA/ECA2 renal em relação aos outros grupos de SHR que ingeriram dieta padrão e dieta com alto teor de sal, sem alterações na expressão proteica renal dos receptores AT1, AT2 e Mas. No que diz respeito à modulação da expressão destes receptores pelo consumo de sal, especialmente AT1, Sechi et al. (1996) detectaram aumento da expressão gênica renal de AT1 em dieta de alto sal (7.5%) por 14 dias. Já Schmid et al. (1997) observaram aumento da expressão gênica de AT1 nos rins, fígado e pulmão com uma dieta de baixo sódio (0.02 %) que retornou ao basal após 3 semanas de dieta, enquanto a dieta de 4% de sal não influenciou a expressão deste receptor. Portanto, os estudos ainda são controversos e demonstram uma modulação órgão específica que se apresenta de forma temporária e transiente.

Fundamentando-se nas evidências da literatura supra descritas e nos achados de nosso estudo, propomos um mecanismo que, hipoteticamente, estaria por trás dos efeitos renais provocados pela manipulação do teor dietético de cloreto de sódio (Figura 17). O consumo crônico da dieta com baixo sal parece modular o SRA intra-renal, e, portanto, interferir simultaneamente na atividade da ECA e ECA2 no tecido renal com predomínio da via da ECA2. Tal modulação poderia reduzir a produção renal de Ang II e em paralelo aumentar a produção de Ang-(1-7). Este perfil de balanço intra-renal de ECA/ECA2 poderia contribuir para o efeito renoprotetor encontrado em nosso estudo pela dieta de baixo sal. A ECA2 é a principal enzima que, endogenamente, forma o peptídeo Ang-(1-7) a partir da Ang II, possuindo um relevante papel de contrabalancear o eixo vasoconstritor do SRA dependente da ação da Ang II *via* seus receptores AT1. Diversos relatos na literatura fortalecem esta concepção, como por exemplo, Oudit et al. (2006) que demonstraram que a deleção gênica da ECA2 em camundongos leva a glomeruloesclerose dependente de Ang II. Além disso, a expressão renal de ECA2 é reduzida em animais diabéticos e está associada com lesão tubular (Tikellis et al. 2003). Sua expressão também se encontra diminuída nos animais hipertensos quando comparada à expressão em controles normotensos (Zhong et al. 2004). Portanto, estratégias com intuito de aumentar a expressão ou atividade de ECA2 poderiam ser úteis em presença de doenças cardiovasculares, tais como a hipertensão, aterosclerose, etc., como sugerido por Tikellis et al. (2011).

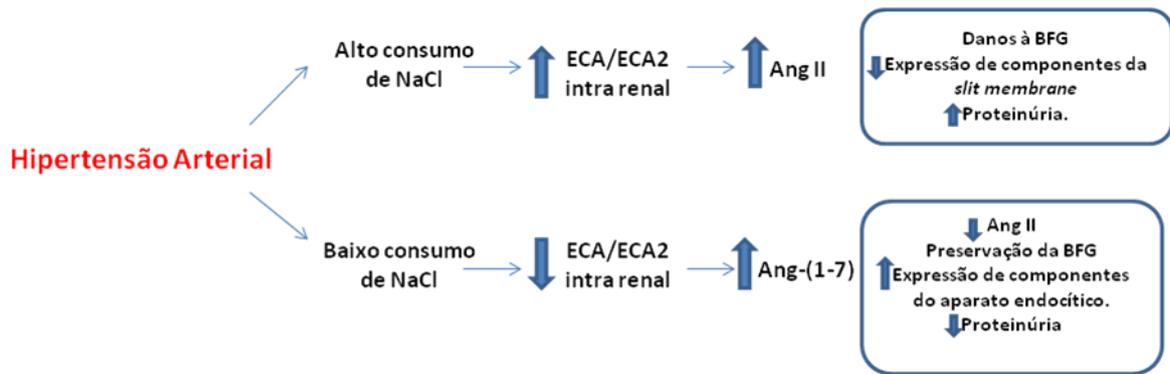


Figura 17: Modelo hipotético de mecanismo envolvido nos efeitos renais provocados pela modulação do teor de cloreto de sódio na dieta. O consumo crônico da dieta com baixo sal nos ratos SHR estaria modulando o SRA intra-renal interferindo simultaneamente na atividade da ECA e ECA2 no tecido renal com predomínio da via da ECA2. Tal modulação poderia reduzir a produção renal de Ang II e em paralelo aumentar a produção de Ang-(1-7) contribuindo para o efeito protetor.

Ye et. al (2006) mostraram que a localização da expressão glomerular de ECA2 nos rins de animais diabéticos estava predominantemente co-localizada nos processos podais e *slít membrane*, juntamente com nefrina e podocina. O mesmo trabalho relatou que a inibição da ECA2 desencadeou aumento na excreção urinária de albumina que foi prevenido com a utilização de um bloqueador do receptor AT1 de Ang II, sugerindo que os efeitos da inibição da ECA2 são mediados por meio da estimulação do receptor AT1 pela Ang II. Este peptídeo, de alguma forma, impede a função da barreira glomerular, levando ao aumento da perda de proteínas. Além disso, fármacos que antagonizam as ações de Ang II em seu receptor AT1 reduzem a filtração de macromoléculas na barreira glomerular. Portanto, a presença de ECA2 no glomérulo poderia desenvolver um importante papel contra regulatório na prevenção do acúmulo de Ang II, enquanto uma redução da ECA2 seria deletéria, pois a degradação da Ang II por esta enzima estaria reduzida, particularmente quando concomitante ao aumento da ECA, o que resultaria no aumento em sua formação.

Podemos sugerir que um aumento na atividade da ECA2 poderia ser protetora contra a redução na expressão de nefrina observada em nosso estudo nos animais que consumiram alto sal, além de preservar a expressão de cubilina. Entretanto, mais investigações são necessárias para elucidar os mecanismos precisamente envolvidos na interação do baixo consumo de sal e o SRA na proteção a progressão de lesão renal e também do alto consumo de sal e o SRA na lesão renal hipertensiva.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Por fim, este estudo demonstrou que a restrição crônica do consumo de sal introduzida após o desmane de ratos SHR é capaz de atenuar a progressão para hipertensão e de prevenir o aparecimento de proteinúria concomitantemente aumentando a expressão renal de cubilina, um receptor endocítico importante na reabsorção de macromoléculas no túbulo proximal. Além disso, a dieta com baixo teor de sódio foi capaz de modular o balanço das enzimas ECA e ECA2 do SRA intra-renal resultando em proteção renal. Em contraste, o consumo crônico do alto sal piora a hipertensão e agrava a lesão renal, caracterizada por aumento na excreção urinária de albumina e proteínas de elevado peso molecular, além de promover danos à BFG, juntamente com redução na expressão de nefrina, componente chave da "slit membrane", em associação a um aumento da razão ECA/ECA2 intra-renal.

É incitante especular que, na dieta de baixo sal, o SRA intra-renal, especificamente o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas poderia ser a via responsável pela modulação dos componentes do aparato endocítico no túbulo proximal, levando à redução da proteinúria, que poderia explicar a relação entre a baixa ingestão de sal e a proteção renal na hipertensão.

Referências

REFERÊNCIAS

- A global brief on Hypertension Silent killer, global public health crisis WHO 2013
- Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004; 11 (6): 304-309.
- Anderson CA, Appel LJ, Okuda N, Brown IJ, Chan Q, Zhao L, et al. Dietary sources of sodium in China, Japan, the United Kingdom, and the United States, women and men aged 40 to 59 years: the INTERMAP study. *J Am Diet Assoc.* 2010; 110(5): 736-45.
- Ardailou, R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*, v.10 Suppl 11, Jan, p.S30-9. 1999.
- Arruda-Junior DF, Virgulino SG, Girardi AC. Reduced tubular proteinuria in hypertensive rats treated with losartan is associated with higher renal cortical megalin expression. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;18: 105-112.
- Ayres JE. Prevalence of arterial hypertension in Piracicaba city. *Arq Bras Cardiol* 1991; 57: 33-6.
- Benstein JA, Feiner HD, Parker M, Dworkin LD. Superiority of salt restriction over diuretics in reducing renal hypertrophy and injury in uninephrectomized SHR. *Am J Physiol.* 1990; 258(6 Pt 2): F1675-81.
- Bernardi S, Toffol B, Zennaro C, Tikellis C, Monticone C, Losurdo P, et al. High-salt diet increases glomerular ACE/ACE2 ratio leading to oxidative stress and kidney damage. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 1793–1800.
- Bhaskaran M¹, Reddy K, Radhakrishanan N, Franki N, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284(5): F955-65.

Bianchi G., Fox U., Di Francesco G.F., Giovanetti A.M., Pagetti D. Blood pressure changes produced by kidney cross-transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med.* 1974; 47, 435-448.

Bibbins-Domingo K, Chertow GM, Coxson PG, Moran A, Lightwood JM, Pletcher MJ, Goldman L. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease *N Engl J Med.* 2010; 362(7): 590-599.

Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Ørskov H, Willnow TE, Moestrup SK, and Christensen EI. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest* 2000; 105: 1353–1361.

Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003; 63: 1791-800.

Bisi Molina Mdel C, Cunha R de S, Herkenhoff LF, Mill JG. Hypertension and Salt Intake in an urban population. *Rev.Saúde Publica.* 2003; 37(6): 743-750.

Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia.* 2001; 44: 874-877.

Bonnet F, Tikellis C, Kawachi H, Burns WC, Wookey PJ, Cao Z. Nephrin expression in the postnatal developing kidney in normotensive and hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2002; 24, 371-381.

Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2000; 24: 349–354.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Plano de reorganização da atenção a hipertensão arterial e ao diabetes mellitus: manual de hipertensão arterial e diabetes mellitus. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol.* 1978; 234: F455-60.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Prevenção clínica de doença cardiovascular, cerebrovascular e renal crônica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 56p. Cadernos de Atenção Básica, n.14. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345: 861-869.

Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol,* 2009, 38(3):791–813.

Bruneval P, Hinglais N, Alhenc-Gelas F, Tricottet V, Corvol P, Menard J, et al. Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry* 1986; 85: 73-80

Burchill L, Velkoska E, Dean RG, Lew RA, Smith AI, Levidiotis V, et al. Acute kidney injury in the rat causes cardiac remodelling and increases angiotensin-converting enzyme 2 expression. *Exp Physiol.* 2008; 93: 622–630.

Burnier M, Zanchi A. Blockade of the renin-angiotensinaldosterone system: a key therapeutic strategy to reduce renal and cardiovascular events in patients with diabetes. *J Hypertens* 2006; 24:11–25.

Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 1992; 263(1 Pt 2): R89–R94.

Carey RM, Siragy HM. Newly components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 24:261-271, 2003.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: Food categories contributing the most to sodium consumption — United States, 2007–2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011; 61: 92–98.

Chansel, D., S. Vandermeersch, et al. Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells. *Eur J Pharmacol*, v.414, n.2-3, Mar 2, p.165-75. 2001.

Christensen EI, Gburek J. Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19(7): 714-721.

CKD Work Group. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) KDIGO. Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012; 3: 1-150.

Cook NR, Cutler JA, Obarzanek E, Buring JE, Rexrode KM, Kumanyika SK, Appel LJ, Whelton PK. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ.* 2007; 334(7599): 885-888.

Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis.* 2003; 41: 1-12.

Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(47): 17985-17990.

Curtis J.J., Luke R.G., Dustan H.P., Kashgarian M., Whelchel J.D., Jones P., Diethelm AG. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med*. 1983; 309, 1009-1015.

Cutler JA, Follmann D, Allender PS. Randomized trials of sodium reduction: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(Suppl 2): 643S– 651S.

Dahl L.K., Heine M. Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res*. 1975; 36, 692-696.

Deddish, P. A., B. Marcic, et al. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* 1998; 31 (4): 912-917.

Deen WM, Bridges CR, Brenner BM, Myers BD. Heteroporous model of glomerular size selectivity: Application to normal and nephrotic humans. *Am J Physiol* 1985; 249: F374–F389.

Dib MW, Riera R, Ferraz MB. Estimated annual cost of arterial hypertension treatment in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* [online]. 2010; 27 (2): 125-131.

Dickinson BD, Havas S. Reducing the population burden of cardiovascular disease by reducing sodium intake. *Arch Int Med*. 2007;167(14):1460-8.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ Res* 2000; 87, E1–E9.

Drenjančević-Perić I., Jelaković B., Lombard J.H., Kunert M.P., Kibel A., Gros M. (2011) High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res.* 2011; 34: 1-11.

Du Cailar G, Ribstein J, Mimran A. Dietary sodium and target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15: 222–229.

Dworkin LD, Benstein JA, Tolbert E, Feiner HD. Salt restriction inhibits renal growth and stabilizes injury in rats with established renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7(3): 437-442.

Eaton DC, Pooler JP. Fisiologia Renal de *Vander*. 6^o edição, Porto Alegre: Artmed; 2006.

Endemann DH, Toyuz RM, Iglarez M, Savoia C, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 43: 1252–1257.

Fagyas M, Úri K, Siket IM, Daragó A, Boczán J, Bányai E. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) I: endogenous angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *Plos One* 2014 9: e87843.

Fei Gao,1,2* Zhi-Qi Han,2* Xin Zhou,2 Rui Shi,2 Yan Dong,2 Tie-Min Jiang,2 Yu-Ming Li2, Early Online: 1–8, (2011)

Ferrão FM, Lara LS, Lowe J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? *World J Nephrol.* 2014; 3(3): 64-76.

Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1–7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int.* 2005; 68: 2189–2196.

Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension.* 1996; 28: 104–108.

Frishberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, Feinstein S, Raas-Rothschild A. Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephritic syndrome among Israeli-Arab children. *Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 400–405.

Fyfe JC, Giger U, Hall CA, Jezyk PF, Klumpp SA, Levine JS, and Patterson DF. Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs. *Pediatr Res* 1991; 29: 24–31.

Fyfe JC, Ramanujam KS, Ramaswamy K, Patterson DF, and Seetharam B. Defective brush-border expression of intrinsic factor-cobalamin receptor in canine inherited intestinal cobalamin malabsorption. *J Biol Chem* 1991; 266: 4489–4494.

Gao F, Han ZQ, Zhou X, Shi R, Dong Y, Jiang TM, Li YM. High Salt Intake Accelerated Cardiac Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats: Time Window of Left Ventricular Functional Transition and Its Relation to Salt-Loading Doses. *Clin Exp Hypertens*. 2011; 33(7):492-499.

Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Everett A, Carey RM, et al. Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney. *Am J Physiol* 1988; 254: F582-F587.

Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, Giani JF, Nguyen MT, Riquier-Brison AD, et al. The absence of intra-renal ACE protects against hypertension. *J Clin Invest*. 2013; 123(5): 2011-23.

Gorin Y, Kim NH, Fellers D, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE. Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J* 2001; 15: 1909–1920.

Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F219–F229.

Gorin Y, Ricono JM, Wagner B, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, et al. Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 2004; 381: 231–239.

Grisk O, Klötting I, Exner J, Spiess S, Schmidt R, Junghans D, Lorenz G, Rettig R. Long-term arterial pressure in spontaneously hypertensive rats is set by the kidney. *J Hypertens*. 2002; 20 (1): 131-138.

Gueth-Hallonet C, Santa Maria A, Verroust P, and Maro B. Gp330 is specifically expressed in outer cells during epithelial differentiation in the preimplantation mouse embryo. *Development* 1994; 120: 3289–3299.

Guyton AC. Circulatory Physiology III. Arterial Pressure and Hypertension. *Saunders Company*, Philadelphia. 1980.

Guyton AC. Long-term arterial blood pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 1990; 259: R865-R877.

Hallman N, Hjelt L, Ahvenainen EK: Nephrotic syndrome in newborn and young infants. *Ann Paediatr Fenn* 1956; 2: 227–241.

Hattori S, Kanda S, Harita Y. Tyrosine kinase signaling in kidney glomerular podocytes. *J Signal Transduct* 2011; 317852.

He FJ, MacGregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens* 2009; 23(6): 363–384.

Heeg, J.E. Efficacy and variability of the antiproteinuric effect of ACE inhibition by lisinopril. *Kidney Int.* 1989; 35: 272-279.

Held PJ, Port FK, Webb RL, Wolfe RA, Garcia JR, Blagg CR, et al. The United States Renal Data Systems 1991 annual data report: an introduction. *Am J Kidney Dis.* 1991; 18: 1-16.

Heringer-Walther S, Batista EN, Walther T, Khosla MC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex improvement in shr after ace inhibition involves angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2001; 37(5): 1309-14.

Holbrook JT, Patterson KY, Bodner JE et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1984, 40(4):786–793.

Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem.* 2001; 276: 41543–41546.

Huentelman MJ, Zubcevic J, Hernandez Prada JA, Xiao X, Dimitrov DS, Raizada MK, et al. Structure-based discovery of a novel angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor. *Hypertension.* 2004; 44: 903-906.

Inagami T. Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol* 10: S2-S7, 1999.

Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest* 1990; 85: 417-423

Inoue BH, Arruda-Junior DF, Campos LC, Barreto AL, Rodrigues MV, Krieger JE, et al. Progression of microalbuminuria in SHR is associated with lower expression of critical components of the apical endocytic machinery in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305: F216–26.

Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 h urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* 1988; 297 (6644): 319–328.

Jalanko H. Pathogenesis of proteinuria: lessons from nephrin and podocin. *Pediatr Nephrol.* 2003; 18: 487–491.

Jia J, Ding G, Zhu J, Chen C, Liang W, Franki N, et al. Angiotensin II infusion induces nephrin expression changes and podocyte apoptosis. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 500-507.

Junqueira ICU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen

Kerjaschki D, Farquhar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5557–5581.

Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 108 (11) 1583–1587.

Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575–582.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol rev.* 2007; 59 (3): 251-287.

Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res.* 2013; 112 (8): 1104-1111.

Lenkkeri U, Mannikko M, McCready P, Lamerdin J, Gribouval O, Niaudet P, et al. Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 51–61.

Lew RA, Warner FJ, Hanchapola I, Yarski MA, Manohar J, Burrell LM, et. al. Angiotensin-converting enzyme 2 catalytic activity in human plasma is masked by an endogenous inhibitor. *Exp Physiol* 2008; 93: 685–693.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002; 360 (9349): 1903–1913.

Luft FC, Haller H. Hypertension-induced renal injury: is mechanically mediated interstitial inflammation involved? *Nephrol Dial Transplant*. 1995; 10: 9-11.

Mahon, J. M., R. D. Carr, et al. Angiotensin (1-7) is an antagonist at the type 1 angiotensin II receptor. *J Hypertens*. 1994; 12 (12); 1377-81.

Matavelli LC, Zhou X, Varagic J, Susic D, Frohlich ED. Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(2): H814-H819.

Mazzuchi N, Schwedt E, Fernandez JM, Cusumano AM, Ancao MS, Poblete H, et al. Latin American Registry of dialysis and renal transplantation: 1993 annual dialysis data report. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 2521-2527.

McClellan WM. Epidemiology and risk factors for chronic kidney disease. *Med Clin North Am*. 2005; 89: 419–445.

McMahon EJ, Campbell KL, Bauer JD, Mudge DW. Altered dietary salt intake for people with chronic kidney disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 2. Art. No.: CD010070.

Mercier N, Labat C, Louis H, Cattan V, Benetos A, Safar ME, Lacolley P. Sodium, arterial stiffness, and cardiovascular mortality in hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2007; 20: 319–325.

Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D, Pontillon F, Goda FO, Christensen EI, Hammond TG, Verroust PJ. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem.* 1998; 273(9):5235-42.

Mountokalakis TD. The renal consequences of arterial hypertension. *Kidney Int.* 1997; 51:1639-1653.

Mullins LJ, Bailey MA, Mullins JJ. Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiol Rev.* 2006; 86 (2): 709-746.

Navar LG, Lewis L, Hymel A, Braam B, Mitchell KD. Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1153-1158.

Ni Mhurchu C, Capelin C, Dunford EK, Webster JL, Neal BC, Jebb SA. Sodium content of processed foods in the United Kingdom: analysis of 44,000 foods purchased by 21,000 households. *Am J Clin Nutr* 2011; 93(3): 594-600

Norio R. Heredity in the congenital nephrotic syndrome: A genetic study of 57 families with a review of reported cases. *Ann Paediatr Fenn* 1966; 12[Suppl]: 1–94.

Obermuller N, Kranzlin B, Blum WF, Gretz N, Witzgall R. An endocytosis defect as a possible cause of proteinuria in polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F244–F253.

Ohlson M, Sorensson J, Haraldsson B. Glomerular size and charge selectivity in the rats as revealed by FITC-ficoll and albumin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279:F84-91.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ* 1968; 27: 282:-293.

Orikasa M, Matsui K, Oite T, Shimizu F. Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1988; 141(3): 807-14.

Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 2006; 168: 1808–1820,

Oudot C, Lajoix AD, Jover B, Rugale C. Dietary sodium restriction prevents kidney damage in high fructose-fed rats. *Kidney Int.* 2013; 83: 674-83.

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J Exp Med* 1940; 71: 29-42.

Pan American Health Organization. Salt-Smart Americas: A Guide for Country-Level Action. Washington, DC: PAHO, 2013.

Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes, a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol.* 1951; 167:13-46.

Picon RV, Fuchs FD, Moreira LB, Riegel G, Fuchs SC Trends in Prevalence of Hypertension in Brazil: A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2012; 7 (10): e48255.

Piwon N, Gunther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. CIC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 2000; 408: 369–373.

Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The Glomerulus: The Sphere of Influence *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014; 9(8): 1461–1469.

Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int.* 1990; 38: 384-94.

Resende MM, Mill JG (2007). Effect of high salt intake on local renin-angiotensin system and ventricular dysfunction following myocardial infarction in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34:274-9.

Rodicio JL, Campo C, Ruilope LM. Microalbuminuria in essential hypertension. *Kidney IntSuppl* 1998; 68: S51-S54.

Rosón MI, Cao G, Della Penna S, Gorzalczany S, Pandolfo M, Toblli JE, et al. Angiotensin II increases intrarenal transforming growth factor-beta1 in rats submitted to sodium overload independently of blood pressure. *Hypertens Res*. 2008; 31(4): 707-715.

Rowe, B. P., D. L. Saylor, et al. Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regul Pept* 1995; 56 (2-3):139-146.

Rugale C, Delbosc S, Cristol JP, Mimran A, Jover B. Sodium restriction prevents cardiac hypertrophy and oxidative stress in angiotensin II Hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H1744-H1750.

Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, et al. Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *New Engl J Med* 2004; 351: 1941–51.

Russo LM, Osicka TM, Brammar GC, Candido R, Jerums G, Comper WD. Renal processing of albumin in diabetes and hypertension in rats: possible role of TGF-beta1. *Am J Nephrol*. 2003; 23: 61-70.

Sacks F, Svetkey L, Vollmer W, Appel L, Bray G, Harsha D, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med* 2001; 344: 3–10.

Sahali D, Mulliez N, Chatelet F, Laurent Winter C, Citadelle D, Sabourin JC, et al. Comparative immunochemistry and ontogeny of two closely related coated pit proteins.

The 280-kDa target of teratogenic antibodies and the 330-kDa target of nephritogenic antibodies. *Am J Pathol* 1993; 142: 1654–1667.

Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H1985–H1994.

Sanders PW Effect of salt intake on progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(1): 54-60.

Santos RA, Ferreira AJ, Nadu AP, Braga AN, de Almeida AP, Campagnole- Santos MJ, et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*. 2004;17:292–299.

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8258-8263.

Santos RAS, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension*. 1985; 7: 244-252.

Sarno F, Claro RM, Levy RB, Bandoni DH, Monteiro CA. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. *Rev Saúde Pública* 2013;47(3):571-8.

Sasso FC, Carbonara O, Persico M, Iafusco D, Salvatore T, D'Ambrosio R, et al. Irbesartan reduces the albumin excretion rate in microalbuminuric type 2 diabetic patients independently of hypertension: a randomized double-blind placebo-controlled crossover study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1 909-1913.

Schmid C, Castrop H, Reitbauer J, Della Bruna R, Kurtz A. Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression. *Hypertension*. 1997; 29(4):923-929.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)*. 2001; 100(5): 481-492.

Sechi LA, Griffin CA, Giacchetti G, Valentin JP, Llorens-Cortes C, Corvol P, et al. Tissue-specific regulation of type 1 angiotensin II receptor mRNA levels in the rat. *Hypertension*. 1996; 28(3): 403-408.

Seetharam B, Christensen EI, Moestrup SK et al. Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor–cobalamin receptor. *J Clin Invest* 1997; 99: 2317–2322.

Seikaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 1990; 86: 1352-1357.

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

Soler MJ, Wysocki J, Batlle D. Angiotensin-converting enzyme 2 and the kidney. *Exp Physiol* 2008; 93 (5): 549–556.

Stewen P, Mervaala E, Karppanen H, Nyman T, Saijonmaa O, Tikkanen I, et al. Sodium load increases renal angiotensin type 1 receptors and decreases bradykinin type 2 receptors. *Hypertens Res* 2003; 26: 583–589.

Stolarz-Skrzypek K, Kuznetsova T, Thijs L, Tikhonoff V, Seidlerová J, Richart T, et al. Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure 590 changes in relation to urinary sodium excretion. *JAMA* 2011; 305: 1777-1785.

Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2009; 339: b4567.

Su Z, Zimpelmann J & Burns KD. Angiotensin-(1–7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int* 2006; 69: 2212–2218.

Susic D, Varagic J, Frohlich ED. Cardiovascular effects of inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system components in hypertensive rats given salt excess *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1177–H1181, 2010.

Susic D, Frohlich ED, Kobori H, Shao W, Seth D, Navar LG. Salt-induced renal injury in SHR is mediated by AT1 receptor activation. *J Hypertens* 2011; 29: 716-723.

Swift PA, Markandu ND, Sagnella GA, He FJ, MacGregor GA. Modest salt reduction reduces blood pressure and urine protein excretion in black hypertensives: a randomized control trial. *Hypertension* 2005; 46: 308–312.

Takahashi Y, Haga S, Ishizaka Y, Mimori A. Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R85.

Taylor RS, Ashton KE, Moxham T, Hooper L, Ebrahim S. Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized controlled trials (Cochrane review). *Am J Hypertens.* 2011; 24: 843-853.

Tikellis C, Bernardia BS, Burns WC. Angiotensin-converting enzyme 2 is a key modulator of the renin–angiotensin system in cardiovascular and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20: 62-68.

Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper M.E. Characterization of renal of angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003;41: 392-397.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G & Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captoprilinsensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275, 33238–33243.

Tojo A, Onozato ML, Ha H, Kurihara H, Sakai T, Goto A, et al. Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 269–276.

Tojo A, Onozato ML, Kurihara H, Sakai T, Goto A, Fujita T. Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. *Hypertension Res* 2003; 26: 413–419.

Tom, B., R. De Vries, et al. Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade. *Hypertension* 2001;38 (1): 95-99.

Tossidou I, Teng B, Drobot L, Meyer-Schwesinger C, Worthmann K, Haller H, et al. CIN85/RukL Is a Novel Binding Partner of Nephrin and Podocin and Mediates Slit Diaphragm Turnover in Podocytes. *J Biol Chem*. 2010; 285(33): 25285–25295.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. *Circ Res* 1981; 48: 309-319.

Tuomilehto J, Jousilahti P, Rastenyte D, Moltchanov V, Tanskanen A, Pietinen P, Nissinen A. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. *Lancet*. 2001; 357(9259): 848-851.

Unger, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2002; 89 (2A): 3A-9A.

Varagic J, Frohlich ED, Susic D, et al. AT1 receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHRs without affecting pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294(2): H853–H858.

Varagic J, Ahmad S, VonCannon JL, Moniwa N, Brosnihan KB, Wysocki J. et al. Predominance of AT(1) blockade over mas-mediated angiotensin-(1-7) mechanisms in the regulation of blood pressure and renin-angiotensin system in mRen2.Lewis rats. *Am J Hypertens*. 2013; 26: 583-590.

Varagic J, Frohlich ED, Díez J, Susic D, Ahn J, González A, López B. Myocardial fibrosis, impaired coronary hemodynamics, and biventricular dysfunction in salt-loaded SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290(4): H1503-H1509.

Verhave JC, Hillege HL, Burgerhof JGM, Janssen WMT, Gansevoort RT, Navis GJ, de Zeeuw D, Jong PE. Sodium intake affects urinary albumin excretion especially in overweight subjects. *J Intern Med* 2004; 256: 324–330.

Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. Effects of treatment on morbidity in hypertension: results in patients with diastolic blood pressure averagings 115 through 129 mmHg. *JAMA* 1997; 202: 1028-1034.

Viberti G, Mogensen CE, Groop LC, Pauls JF. Effect of captopril on progression to clinical proteinuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. European Microalbuminuria Captopril Study Group. *JAMA* 1994; 271:275–279.

Viberti G, Wheeldon NM; MicroAlbuminuria Reduction With VALsartan (MARVAL) Study Investigators. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation*. 2002; 106(6):672-678.

Viberti GC, Hill RD, Jarrett RJ, Argyropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1982; 1(8287): 1430-1232.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002; 277:14838-14843.

Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J of Clin Invest* 2004; 114 (10):1475–1483.

Webster JL, Dunford EK, Neal BC. A systematic survey of the sodium contents of processed foods. *Am J Clin Nutr* 2010; 91(2): 413-420.

WHO (World Health Organization). *Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of cardiovascular risk*. Geneva: World Health Organization; 2007.

WHO (World Health Organization). *Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Report of a Joint WHO/ FAO Expert Consultation*. Geneva: World Health Organization (WHO); 2003

WHO (World Health Organization). *Guideline: Sodium intake for adults and children*. Geneva: World Health Organization; 2012.

Wilczynski EA, Leenen FH. Dietary sodium intake and age in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and sympathetic activity. *Life Sci*. 1987; 10;41(6): 707-715.

Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, et. al. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes* 2006; 55: 2132–2139.

Xu P, Costa-Goncalves AC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, Santos SS, Luft FC, Bader M, Gross V, Alenina N, Santos RA. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*. 2008; 51: 574–580.

Ye M, Wysocki J, Naaz P, Salabat MR, LaPointe MS & Battle D. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension* 2004; 43: 1120–1125.

Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I & Battle D. Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17, 3067–3075.

Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper M.E, et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998; 98: 2621-2628.

Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998; 98(23): 2621-2628.

Zats R. Fisiopatologia Renal. 2^o edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2000

Zhong JC, Huang DY, Yang YM, Li YF, Liu GF, Song XH, Du K. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 by all-trans retinoic acid in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004; 44: 907-912.

**APÊNDICE A –
Avaliação dos Componentes do SRA no ventrículo esquerdo e no plasma dos
grupos experimentais**

Neste documento estão contidos os resultados preliminares da avaliação dos efeitos das dietas com diferentes teores de sal no coração dos animais SHR.

**1. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES AT1, AT2 E MAS EM
VENTRÍCULO ESQUERDO**

1.1 METODOLOGIA

A expressão dos receptores AT1, AT2 e Mas no ventrículo esquerdo dos animais SHR submetidos às diferentes dietas de sal seguiu exatamente a mesma metodologia (western blot) já descrita nesta tese (resultados, seção 3.9).

1.2 RESULTADOS

A expressão proteica dos receptores do SRA: AT1, AT2 e Mas, avaliada em ventrículo esquerdo dos ratos SHR submetidos a diferentes dietas de sal, está representada na figura abaixo. Observamos um aumento da expressão ventricular do receptor AT1 nos animais submetidos à dieta restritiva de sal. A expressão dos receptores AT2 e Mas foi similar entre os grupos experimentais.

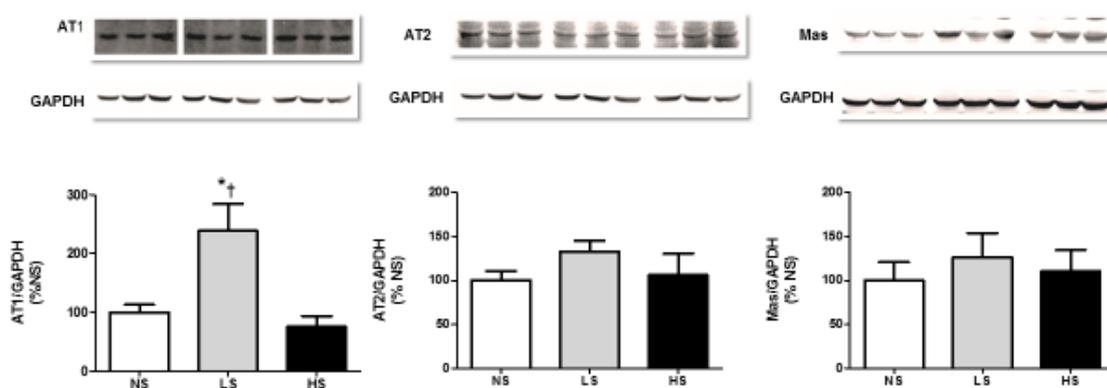


Figura A1: Expressão proteica ventricular dos receptores AT1, AT2 e Mas nos animais SHR submetidos diferentes teores de sal na dieta. NS: grupo dieta padrão, LS: grupo dieta de baixo sal, HS: grupo dieta de alto sal. N = 6/grupo. Valores apresentados como média \pm EPM.

2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ANGIOTENSINA II, 1-7 e ALAMANDINA NO VENTRÍCULO ESQUERDO.

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Homogeneização do tecido

O plasma foi colhido em tubos contendo uma solução com coquetel de inibidores (420 μ L de coquetel para 3 mL de sangue) conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela: Coquetel de Inibidores de Proteases

Inibidor Enzimático	Volume utilizado por ml/mg de sangue ou tecido
Para-hidroximercúrio-benzoato (pOHHgHz) 1 mM	10 μ L
Orto-fenantrolina 30 mM	50 μ L
Fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF) 1 mM	10 μ L
Ácido etilenodinitrilotetra-acético (EDTA) 7,5 %	50 μ L
Pepstatin A 1 mM	20 μ L

Cada solução de inibidor de protease foi preparada previamente e estocadas adequadamente: Pepstatina A e orto-fenantrolina conservados em freezer - 20° C e EDTA 7,5% mantido em geladeira. Com exceção das soluções de pOHHgBz e PMSF que foram preparadas no dia da coleta. O coquetel de inibidores de proteases foi

preparado imediatamente antes à coleta do sangue. O plasma contendo coquetel de inibidores e os seguimentos do ventrículo esquerdo foram mantidos à temperatura de -80 °C até o momento da homogeneização.

O tecido foi homogenizado com auxílio de um homogeneizador (Turax) e ultrassom (Vibra Cell, Sonics e Materias Inc) em 2 mL do mesmo coquetel de inibidores de proteases como descrito acima para coleta de plasma, e, 10µl de solução de BSA 5% em água destilada. Amostras dos homogenatos foram utilizadas para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Para a extração, foi adicionado 200 µl de clorofórmio aos homogenatos e procedeu-se à centrifugação em 6000 rpm a 4 °C por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido para um tubo de polietireno lavado com solução de BSA 0.1 % em água destilada.

Todo processo de extração dos peptídeos das amostras de tecido e plasma foi realizado no Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. A dosagem destes, por Espectrometria de Massa, foi realizada na empresa LabFar do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, em Nanobiofarmacêutica, INCT-NANOBIOFAR, por técnico treinado.

2.1.1 Extração das angiotensinas em coluna c18 - bond elut

Para a extração das angiotensinas das amostras de plasma e homogenatos utilizou-se colunas C18 - BOND ELUT pré-ativadas com 20 mL de ACN 99% / HFBA 0.1%, 20 mL de HFBA 0.1%, 3 mL de solução de BSA 0,2% / HFBA 0.1%, 10 mL de ACN 10% / HFBA 0.1% e por fim, 3 mL de HFBA 0.1%. Tais soluções foram vertidas, individual e sequencialmente, por cada coluna com auxílio de uma seringa. As amostras de plasma (1000 µL) e homogenatos foram aplicadas nas colunas previamente ativadas e posteriormente lavadas sequencialmente com 20 ml de HFBA 0,1% e 3 ml de ACN 20% / HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluidos em 3 ml de ACN 99,9% / HFBA 0,1% em tubos de polietileno lavados com BSA 0,1%. Imediatamente após a extração, as amostras foram liofilizadas em centrífuga evaporadora por aproximadamente 12 horas até a formação de resíduo sólido. Em seguida, as amostras foram estocadas em freezer - 20 °C até o momento da dosagem em espectrometria de massa.

2.1.1 Dosagem das angiotensinas por espectrometria de massa

A determinação quantitativa dos peptídeos foi realizada por espectrometria de LC-MS/MS em um Espectrômetro de Massa (MS) Waters Xevo TQ-S ESI+ triplo quadrupolo acoplado a um sistema Waters UPLC Acquity I-Class System, equipado com uma fonte de ionização Z-spray e controlado por software MassLynx 4.0 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Todos os reagentes e aditivos utilizados foram de grau MS. Inicialmente, as amostras solubilizadas na fase móvel (Acetonitrila 3%) foram purificadas com auxílio de sistema UPLC ((Waters®) em uma coluna de fase reversa C18 (BEH C₁₈ 2,1 x 5,0 mm, Waters) utilizando acetonitrila e ácido fórmico 0,1% na fase móvel em um fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente da fase móvel foi composto de concentração crescente de de acetonitrila (10% até 60 % em 10 minutos). A ionização por ESI no modo positivo foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar: 3,5 KV; voltagem do cone: 15 V; temperatura de dessolvatação: 300 °C; fluxo do gás de dessolvatação: 1000L/h; temperatura da fonte: 120 °C.

As amostras foram injetadas em duplicata. Ao obter os cromatogramas, calculou-se a área dos picos e as concentrações correspondentes conforme curva padrão previamente realizada. Os valores foram expressos em pg/mg proteínas totais e pg/mL para tecido e plasma, respectivamente.

2.2 RESULTADOS

Conforme figura abaixo, observamos que os animais que SHR que ingeriram dieta de baixo sal tiveram maiores níveis de Ang II no tecido cardíaco e, por outro lado, uma redução nos níveis de Ang-(1-7). Observamos ainda, um aumento de Ang-(1-7) plasmática no grupo que ingeriu dieta com alto teor de sal. Os níveis do peptídeo alamandina foram similares entre os grupos experimentais. Infelizmente, por problemas técnicos não foi possível a obtenção da dosagem de Ang II no plasma, tampouco dos outros peptídeos nos tecidos renais.

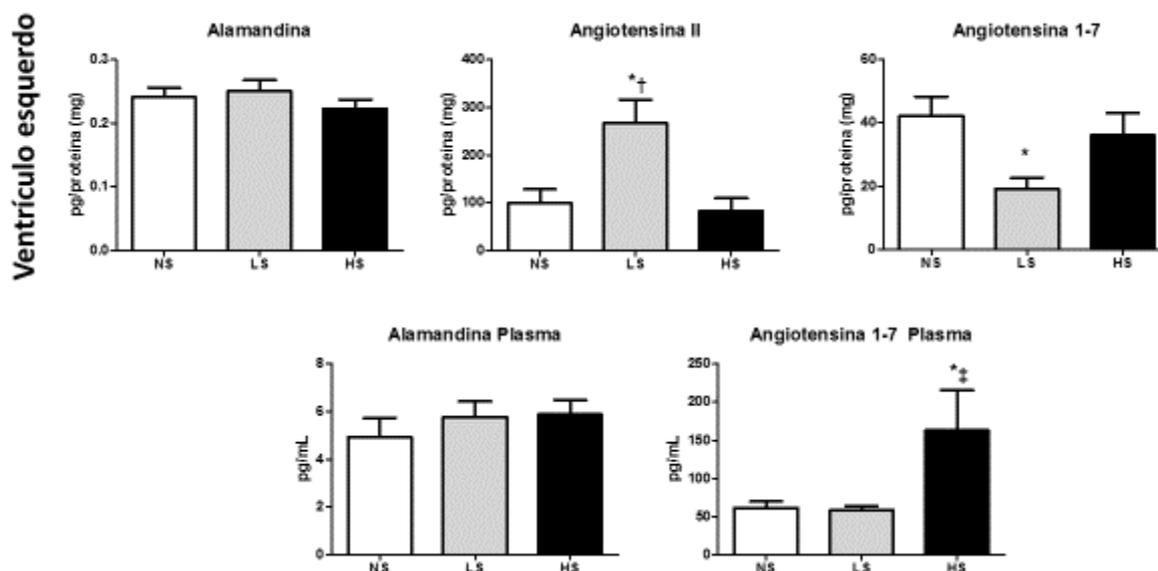


Figura A2: Concentração dos peptídeos alamandina, Ang II e Ang 1-7 no ventrículo esquerdo e plasma dos animais SHR submetidos diferentes teores de sal na dieta. NS: grupo dieta padrão de sódio, LS: grupo dieta de baixo sal, HS: grupo dieta de alto sal. Valores apresentados como média \pm EPM. * $P < 0.05$ vs. NS; † $P < 0.05$ vs. HS; ‡ $P < 0.05$ vs. LS. $N = 8$ / grupo (Ang 1-7 e alamandina). $N = 6$ (Ang II)

3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ECA E ECA2 NO VENTRÍCULO ESQUERDO

3.1 METODOLOGIA

A avaliação da atividade das enzimas ECA e ECA2 no ventrículo esquerdo dos animais SHR submetidos à diferentes dietas de teor de sal seguiu exatamente a mesma metodologia já descrita nesta tese (resultados, seção 3.7 e 3.8).

3.2 RESULTADOS

Como observado na figura abaixo, a atividade tanto da ECA quanto da ECA2 tecidual no ventrículo esquerdo foi similar entre os grupos experimentais.

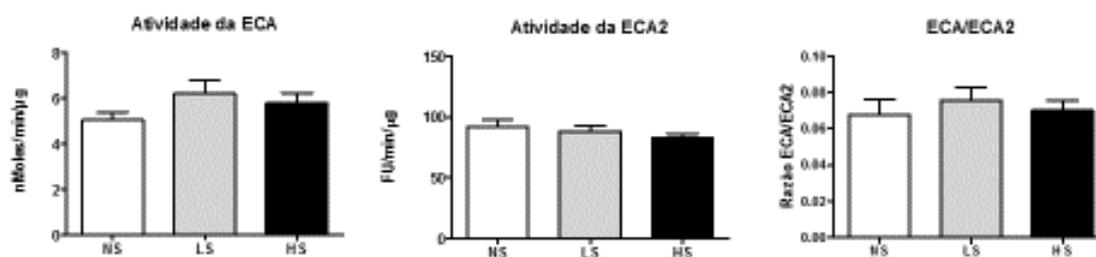


Figura A3: Atividade das enzimas ECA e ECA no ventrículo esquerdo dos animais SHR. NS: grupo dieta padrão de sódio (n = 12), LS: grupo dieta baixo sal (n = 8), HS: grupo dieta de alto sal (n = 9). Valores apresentados como média \pm EPM.