

Perfil de citocinas urinárias de acordo com o local de bloqueio do sistema renina angiotensina em ratos nefrectomizados

Urinary cytokine profiles according to the site of blockade of the renin-angiotensin system in nephrectomized rats

Autores

Nilo César do Vale Baracho ¹
 Kátia Daniela da Silveira ²
 Natália Pessoa Rocha ²
 Thiago Macedo Cordeiro ²
 Victor Feracin ²
 Regina Maria Pereira ³
 Marconi Augusto Aguiar dos Reis ²
 Mauro Martins Teixeira ²
 Ana Cristina Simões e Silva ³

¹ Faculdade de Medicina de Itajubá.

² Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

Data de submissão: 5/10/2016.

Data de aprovação: 8/2/2017.

Correspondência para:

Ana Cristina Simões e Silva.
 Universidade Federal de Minas Gerais.
 Av. Alfredo Balena, nº 190,
 2º Andar, Sala 281, Belo Horizonte, MG, Brasil.
 CEP: 30130-100
 E-mail: acssilva@hotmail.com
 Este estudo recebeu apoio parcial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil - grants number 470472/2014-6 and 460334/2014-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil - grant number CDS - PPM-00555-15), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DOI: 10.5935/0101-2800.20170028

RESUMO

Introdução: Ainda não se sabe como a inibição farmacológica do Sistema Renina Angiotensina (SRA) afeta os níveis de biomarcadores de inflamação e fibrose. **Objetivo:** Este estudo pretendeu avaliar o efeito de enalapril, candesartan e alisquireno sobre os níveis urinários de citocinas em um modelo de doença renal crônica (DRC). **Métodos:** Ratos Wistar machos foram submetidos à remoção cirúrgica de $\frac{3}{4}$ do parênquima renal para induzir DRC (nefrectomia), ou submetidos à cirurgia fictícia (controle). Animais foram então randomizados em cinco grupos: Cirurgia fictícia recebendo veículo; Nefrectomia recebendo veículo; Nefrectomia recebendo enalapril (10 mg/kg); Nefrectomia recebendo candesartan (10 mg/kg) e Nefrectomia recebendo alisquireno (10 mg/kg). Débito urinário, ingesta hídrica, pressão arterial média (PAM) e concentrações urinárias de creatinina, ureia, albumina, Na⁺, K⁺, interleucina (IL) -1 β , IL-6, IL-10 e fator de transformação e crescimento beta (TGF- β) foram medidas. **Resultados:** A nefrectomia comprometeu significativamente a função renal, aumentou a PAM e alterou os níveis de todas as citocinas avaliadas na urina. Enalapril, candesartan e alisquireno melhoraram a função renal e diminuíram a PAM e a IL-6 quando comparado aos grupo de animais nefrectomizados tratados com veículo. Candesartan e alisquireno reduziram IL-1 β , enquanto somente candesartan diminuiu o TGF- β e somente alisquireno aumentou a IL-10. **Conclusão:** Enalapril, candesartan e alisquireno apresentaram efeitos similares em relação à melhora da função renal e redução da PAM e dos níveis urinários de IL-6 em ratos com DRC. Por outro lado, o perfil de citocinas diferiu de acordo com o tratamento, sugerindo que diferentes mecanismos sejam desencadeados em resposta ao local de bloqueio do SRA.

Palavras-chave: angiotensinas; antagonistas de receptores de angiotensina; falência renal crônica; inibidores da enzima conversora de angiotensina; nefrectomia.

ABSTRACT

Introduction: It is still unknown how the pharmacological inhibition of the Renin Angiotensin System (RAS) impacts the levels of inflammation and fibrosis biomarkers. **Objective:** This study sought to evaluate the effect of enalapril, candesartan and aliskiren on urinary levels of cytokines in a model of chronic kidney disease (CKD). **Methods:** Male Wistar rats were submitted to surgical removal of $\frac{3}{4}$ of renal parenchyma to induce CKD ($\frac{3}{4}$ nephrectomy), or subjected to sham surgery (control). Animals were then randomized into five groups: Sham surgery receiving vehicle; $\frac{3}{4}$ Nephrectomy receiving vehicle; $\frac{3}{4}$ Nephrectomy receiving enalapril (10 mg/kg); $\frac{3}{4}$ Nephrectomy receiving candesartan (10 mg/kg) and $\frac{3}{4}$ Nephrectomy receiving aliskiren (10 mg/kg). Urine output, water intake, mean arterial pressure (MAP) and urinary concentrations of creatinine, urea, albuminuria, Na⁺, K⁺, interleukin (IL) -1 β , IL-6, IL-10 and transforming growth factor beta (TGF- β) were measured. **Results:** Nephrectomy significantly impaired renal function, increased MAP and altered the levels of all evaluated cytokines in urine. Enalapril, candesartan and aliskiren improved renal function and decreased MAP and IL-6 when compared to vehicle-treated nephrectomized group. Candesartan and aliskiren decreased IL-1 β , while only candesartan reduced TGF- β and only aliskiren increased IL-10. **Conclusion:** Enalapril, candesartan and aliskiren presented similar effects on improving renal function and reducing MAP and urinary levels of IL-6 in rats with CKD. On the other hand, cytokine profile differed according to the treatment, suggesting that differential mechanisms were triggered in response to the site of RAS blockade.

Keywords: angiotensins; angiotensin-converting enzyme inhibitors; angiotensin receptor antagonists; kidney failure, chronic; nephrectomy.

INTRODUÇÃO

Os efeitos renoprotetores da inibição do Sistema Renina Angiotensina (SRA) na doença renal crônica (DRC) parece se estender para muito além do controle da hipertensão arterial.¹⁻³ Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e os bloqueadores dos receptores da angiotensina tipo 1 (AT1) retardam a progressão da DRC não apenas por meio da redução da pressão arterial, mas também por conta de seus efeitos antioxidantes, antiproliferativos, anti-inflamatórios e antifibrogênicos.¹⁻³ Mais recentemente, os inibidores da renina começaram a ser utilizados como uma nova modalidade de bloqueio do SRA.⁴ Aliskiren, um protótipo dos inibidores da renina, também apresentou efeitos renoprotetores na DRC não-diabética.⁵

Sabe-se que inflamação desempenha um importante papel na patogenia da DRC. Os níveis de moléculas relacionadas a inflamação, tais como proteína C-reativa, quimiocinas e citocinas, encontram-se elevados em pacientes com DRC.⁶⁻⁸ Os pacientes com DRC exibem um perfil pró-inflamatório desde os estágios iniciais da doença, o que, por sua vez, pode contribuir para a progressão da doença.⁹⁻¹¹ Além de atuar na inflamação, o SRA desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da DRC.^{3,12,13}

A estimulação exacerbada do SRA promove a produção intrarrenal de Angiotensina (Ang) II que se liga ao receptor AT₁, produzindo hipertensão glomerular e sistêmica, lesão endotelial e proteinúria.^{12,14,15} Estudos clínicos e experimentais também chamaram atenção para as interações entre Ang II e citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, contribuindo para a progressão da DRC.^{3,12,16,17} Ang II recruta células inflamatórias, induz a liberação de citocinas e estimula diretamente os mecanismos de sinalização intracelular relacionados a inflamação renal e fibrose.^{3,12,18,19}

Estudos anteriores demonstraram que a interleucina (IL)-1 β e a IL-6 são importantes mediadores inflamatórios em doenças renais,^{6,8,11} enquanto o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) é um importante mediador de fibrose tecidual renal.¹⁸⁻²⁰ Além disso, a interação entre Ang II e estas moléculas já foi descrita em modelos experimentais e em doenças renais humanas.^{12,13,16,18,19} Alguns estudos também descreveram a ação anti-inflamatória da IL-10²¹⁻²³ em doenças renais. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o perfil das citocinas urinárias em resposta a três diferentes locais de bloqueio farmacológico do SRA em um modelo experimental de DRC estágio III.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

O presente estudo incluiu 60 ratos Wistar machos adultos (idades 60-90 dias), com pesos entre 200-250g. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada em ciclos de 12 horas de luz/escurecimento, alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Os ratos foram criados no biotério da Faculdade de Medicina de Itajubá (MG). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), segundo o protocolo CETEA 03/09.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (25 mg/kg). De forma a induzir DRC moderada, os animais foram submetidos a remoção cirúrgica de $\frac{3}{4}$ do parênquima renal, segundo as diretrizes desenvolvidas por Ormrod e Miller.²⁴ O grupo de controle foi submetido a cirurgia placebo.

CIRURGIA PLACEBO - GRUPO DE CONTROLE

Anestesia, raspagem de pelos, assepsia e incisão no flanco esquerdo foram realizadas para expor o rim esquerdo, seguidas da dissecação de tecido adiposo aderido e da cápsula renal, preservando a glândula suprarrenal. Em seguida, foi retirada uma pequena seção de tecido cortical renal. Passados sete dias, o rim direito foi exposto e manipulado.

DRC MODERADA - NEFRECTOMIA $\frac{3}{4}$

Anestesia, raspagem de pelos, assepsia e incisão no flanco foram realizadas para expor o rim esquerdo, seguidas da dissecação do tecido adiposo aderido e da cápsula renal, preservando a glândula suprarrenal. Assim como no grupo anterior, o rim esquerdo foi exposto para permitir a excisão cirúrgica dos polos superiores e inferiores do tecido cortical a partir do lado externo do rim esquerdo. Passados sete dias, foi feita ligadura do pedículo renal direito e o rim direito foi removido.

Após a recuperação da anestesia, os animais foram alocados em cinco grupos experimentais (n = 10 por grupo), abrigados em gaiolas metabólicas (Tecniplast, EUA), com livre acesso a água e ração padrão. Após 72 horas de adaptação, os animais foram randomizados para receber diariamente os seguintes tratamentos por meio de gavagem por 14 dias:

1. Grupo controle - cirurgia placebo: água destilada (veículo);
2. Nefrectomia $\frac{3}{4}$: água destilada (veículo);
3. Nefrectomia $\frac{3}{4}$: maleato de enalapril 10 mg/kg;
4. Nefrectomia $\frac{3}{4}$: candesartan 10 mg/kg;
5. Nefrectomia $\frac{3}{4}$: aliskiren 10 mg/kg.

Todos os animais foram submetidos a medições de pressão arterial média por pletismografia de cauda uma vez por semana. Débito urinário e ingestão de água e ração foram medidos diariamente. Ao final do período experimental (décimo quarto dia), as amostras de sangue colhidas por punção cardíaca sob anestesia com quetamina e xilazina (50 mg/kg e 25 mg/kg, respectivamente) foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 min a 4°C. As amostras de soro e urina de 24 horas colhidas no último dia do experimento foram armazenadas a -20°C para medição de creatinina, ureia, Na⁺, K⁺, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β . Ao final do protocolo experimental (décimo quarto dia), os animais foram sacrificados, seus rins removidos e cortados em seções de 2 mm e fixados por 24 horas em formalina tamponada 10%.

TRATAMENTOS E POSOLOGIA

A posologia dos bloqueadores do SRA testadas em estudos anteriores varia bastante. Nosso protocolo baseou-se em estudos anteriores em que foi avaliada a administração diária de tratamentos orais em ratos adultos. Assim, o inibidor da ECA utilizado no presente estudo foi o maleato de enalapril em dose de 10 mg/Kg/dia, seguindo o procedimento adotado em estudos experimentais anteriores realizados com ratos.^{25,26}

O ARA utilizado foi o candesartan cilexetil em dose de 10 mg/kg/dia com base no estudo de Lin e colaboradores sobre os efeitos anti-hipertensivos e anti-inflamatórios de doses orais de 10 a 15 mg/Kg/dia em ratos Dahl sensíveis a ingestão de sódio.²⁷ As doses relatadas de Aliskiren em estudos experimentais variou de 5 mg/Kg/dia²⁸ a 100 mg/Kg/dia.²⁹ Por este motivo, executamos um teste preliminar com as doses de 10 (n = 5) e 100 mg/Kg/dia (n = 5), e ambas provocaram os mesmos efeitos sobre pressão arterial, parâmetros de função renal e citocinas urinárias (dados não exibidos). Assim, adotamos a dose de 10 mg/kg/dia de Aliskiren.

MEDIDAS GERAIS E PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL

De modo a avaliar os parâmetros de função renal, a creatinina sérica e urinária foi determinada por meio do método colorimétrico modificado de Jaffé (Labtest, Minas Gerais). A ureia sérica foi determinada pelo método enzimático (Labtest, Minas Gerais). As concentrações

séricas e urinárias de sódio e potássio foram medidas por fotometria de chama (CELM, Minas Gerais) e a quantificação da microalbuminúria foi realizada por turbidimetria (Gold Diagnostic Análises, Minas Gerais).

MEDIÇÃO DAS CITOCINAS URINÁRIAS

Os níveis urinários de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 foram medidos no dia 14 por ensaio imunoenzimático (ELISA) com kits da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), segundo as instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. As concentrações urinárias das citocinas foram expressas em valores relativos à creatinina urinária medida na mesma amostra de urina (pg/mg Cr). Os limites de detecção de cada citocina foram: 0,1 mg/ml para IL-1 β , 0,039 pg/ml para IL-6 e 6 pg/ml para IL-10 e TGF- β 1. As medições de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β 1 foram realizadas em um único ensaio para evitar variações inter-ensaios. A variação intra-ensaio foi inferior a 3%.

HISTOPATOLOGIA RENAL

Após fixação, os cortes foram embutidos em parafina, cortados em seções de 5 micra e corados com hematoxilina e eosina (HE). A seguir, os cortes histológicos foram examinados de forma cega pelo protocolo experimental sob microscopia óptica (Nikon Eclipse, Japão). Foram obtidas imagens de campos ilustrativos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

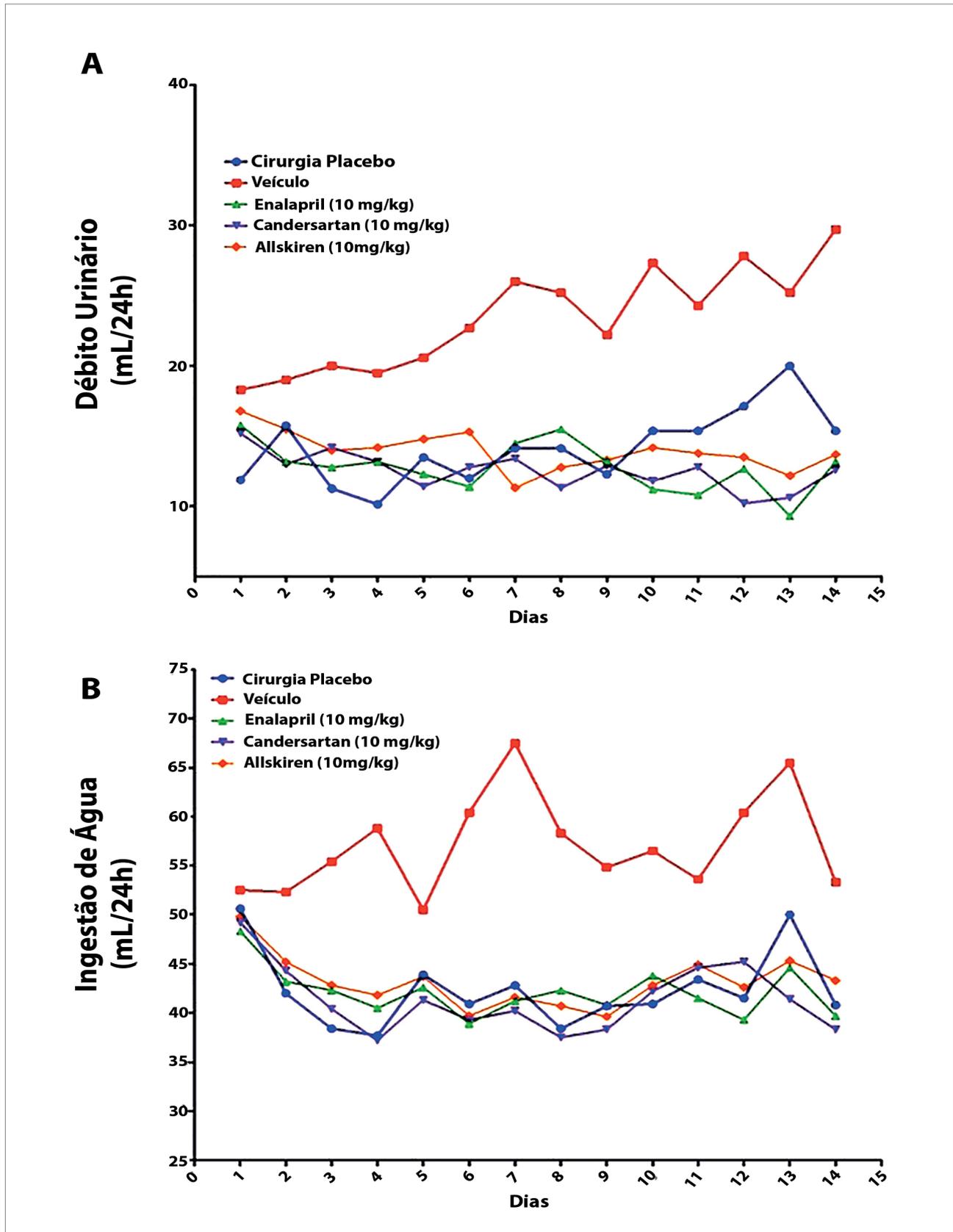
Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar as médias entre os vários grupos, seguida do teste de *Student-Newman-Keuls*. O nível de significância foi configurado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

MEDIDAS GERAIS

O débito urinário dos animais é exibido na Figura 1A. O grupo de nefrectomia que recebeu veículo apresentou elevação significativa do débito urinário do primeiro ao último dia do experimento em comparação ao grupo de controle ($p < 0,05$) e aos animais tratados ($p < 0,05$). Por outro lado, os ratos nefrectomizados tratados com bloqueadores do SRA (enalapril, candesartan ou aliskiren) mantiveram débitos urinários semelhantes aos do grupo de controle. Não houve diferença significativa no débito urinário entre os grupos tratados.

Figura 1. Débito urinário e ingestão de água de ratos submetidos a cirurgia placebo (grupo de controle) ou nefrectomia $\frac{3}{4}$ acompanhada de vários tratamentos: enalapril (10 mg/kg), candesartan (10 mg/kg), aliskiren (10 mg/kg), aliskiren (20 mg/kg) ou água (veículo). Débito urinário (mL/24h) - painel A - e ingestão de água (mL/24h) - painel B - foram avaliados diariamente por 14 dias. As linhas exibem as médias dos resultados de cinco ratos por grupo.



A ingestão de água dos animais é exibida na Figura 1B. Os animais nefrectomizados que receberam veículo sofreram elevação significativa na ingestão de água em comparação ao grupo de controle ($p < 0,05$) e aos animais tratados ($p < 0,05$). Como foi observado no débito urinário, todos os tratamentos (enalapril, candesartan ou aliskiren) resultaram em valores de ingestão de água comparáveis aos do grupo de controle. A mudança na ingestão de água ocorreu a partir do segundo dia do experimento e persistiu até o final.

PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL

Os parâmetros de função renal são apresentados na Tabela 1. Todos os parâmetros bioquímicos da função renal foram gravemente comprometidos no grupo de ratos nefrectomizados que receberam veículo em comparação aos do grupo de controle (cirurgia placebo) ($p < 0,05$ em todas as comparações). Por outro lado, os tratamentos com enalapril (10 mg/kg), candesartan (10 mg/kg) e aliskiren (10 mg/kg) produziram melhoras significativas em todos os parâmetros de função renal em comparação aos animais nefrectomizados que receberam veículo ($p < 0,05$). Além disso, todos os tratamentos resultaram em parâmetros de função renal com valores semelhantes aos do grupo de controle (Tabela 1).

PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

Como era de se esperar, os animais nefrectomizados que receberam veículo apresentaram PAM significativamente mais elevada que os do grupo de controle ($p < 0,05$, Tabela 2). Em contrapartida, todos os tratamentos (enalapril, candesartan e aliskiren) reduziram a PAM ($p < 0,05$, Tabela 2) a níveis comparáveis à dos animais de controle ($p > 0,05$).

NÍVEIS URINÁRIOS DE CITOCINAS (IL-1 β , IL-6, TGF- β E IL-10)

Como ilustra a Figura 2A-D, os níveis urinários de IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-10 foram significativamente alterados após a nefrectomia $\frac{3}{4}$ em relação ao grupo submetido a cirurgia placebo (grupo de controle).

Os tratamentos com aliskiren e candesartan reduziram significativamente os níveis urinários de IL-1 β em comparação ao grupo nefrectomizado que recebeu veículo ($85,5 \pm 67,8$ pg/mg cr \times $1,3$

$\pm 1,1$ pg/mg cr após tratamento com aliskiren e apresentaram níveis indetectáveis após administração de candesartan (Figura 2A). Por outro lado, enalapril não reduziu os níveis urinários de IL-1 β .

A Figura 2B demonstra que todos os tratamentos reduziram significativamente os níveis urinários de IL-6 (candesartan: $0,30 \pm 0,13$ pg/mg cr, aliskiren: $1,37 \pm 0,53$ pg/mg cr e enalapril $2,50 \pm 1,25$ pg/mg cr) em comparação com a administração de veículo ($8,60 \pm 4,99$ pg/mg cr, $p < 0,05$ em todas as comparações), atingindo valores comparáveis aos do grupo de controle ($0,48 \pm 0,18$ pg/mg cr).

Apenas o tratamento com candesartan foi capaz de significativamente reduzir os níveis urinários de TGF- β em comparação com os animais que receberam veículo ($1,17 \pm 0,35$ \times $3,42 \pm 1,09$ pg/mg cr, $p < 0,05$, Figura 2C). Além disso, apesar de candesartan ter reduzido significativamente os níveis urinários de IL-10, aliskiren os elevou cerca de quatro vezes em relação aos animais que receberam veículo ($99,50 \pm 36,14$ pg/mg cr \times $22,50 \pm 21,50$ pg/mg cr, $p < 0,05$, Figura 2D). Enalapril não alterou os níveis urinários de IL-10 ($11,80 \pm 10,52$ pg/mg cr) em relação aos animais nefrectomizados que receberam veículo (Figura 2D).

A Tabela 3 mostra todos os valores das medições de citocinas urinárias.

HISTOPATOLOGIA RENAL

A Figura 3 exibe cortes representativos de tecido renal (ampliação 400 x) corados com HE dos ratos submetidos a cirurgia placebo tratados com veículo (grupo de controle, painel A), ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com veículo (painel B), ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com enalapril (painel C), ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com candesartan (painel D) e ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com aliskiren (painel E). O grupo de controle apresentou histologia renal normal (A).

Em agudo contraste, os ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ que receberam veículo exibiram intenso infiltrado intersticial inflamatório, distúrbio glomerular e hipotrofia ou dilatação tubular anormal com material hialino na luz tubular (painel B). Os ratos nefrectomizados tratados com enalapril (C), candesartan (D) ou aliskiren (E) apresentaram alterações renais teciduais menos graves em relação aos ratos nefrectomizados que receberam veículo.

Todos os tratamentos reduziram os danos glomerulares e tubulares em comparação com a

TABELA 1 PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL DOS RATOS SUBMETIDOS A CIRURGIA PLACEBO (GRUPO DE CONTROLE) OU NEFRECTOMIA ¾ ASSOCIADA A DIFERENTES TRATAMENTOS (VEÍCULO, ENALAPRIL, CANDESARTAN OU ALISKIREN)

Parâmetros	Cirurgia Placebo	Veículo	Enalapril 10 mg/kg	Candesartan 10 mg/kg	Aliskiren 10 mg/kg
Na ⁺ Sérico (mEq/l)	141,3 ± 2,3	157,0 ± 2,1 [#]	141,0 ± 2,3*	143,8 ± 3,0*	145,3 ± 3,8*
K ⁺ Sérico (mEq/l)	4,3 ± 0,2	5,8 ± 0,3 [#]	4,5 ± 0,5*	4,4 ± 0,4*	4,8 ± 0,6*
Na ⁺ Urinário (mEq/l)	286,8 ± 28,2	185,3 ± 20,2 [#]	268,3 ± 21,2*	274,3 ± 18,2*	265,3 ± 22,8*
K ⁺ Urinário (mEq/l)	212,4 ± 32,3	173,5 ± 12,1 [#]	210,0 ± 17,3*	219,2 ± 17,1*	208,2 ± 12,3*
Ureia sérica (mg/dL)	33,4 ± 3,5	162,3 ± 7,5 [#]	40,3 ± 7,8*	38,3 ± 6,5*	40,8 ± 7,7*
Creatinina sérica (mg/dL)	1,1 ± 0,2	5,3 ± 1,0 [#]	1,5 ± 0,5*	1,4 ± 0,6*	1,8 ± 1,0*
Clearance de creatinina (mL/min)	0,42 ± 0,04	0,16 ± 0,02 [#]	0,38 ± 0,03*	0,37 ± 0,06*	0,36 ± 0,08*
Microalbuminúria (mg/day)	0,42 ± 0,4	52,3 ± 4,1 [#]	1,0 ± 0,7*	0,8 ± 0,5*	1,0 ± 0,9*

TABELA 2 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DOS RATOS SUBMETIDOS A CIRURGIA PLACEBO (GRUPO DE CONTROLE) OU NEFRECTOMIA ¾ ACOMPANHADA DE DIFERENTES TRATAMENTOS (VEÍCULO, ENALAPRIL, CANDESARTAN OU ALISKIREN)

Pressão Arterial Média (mmHg)	Dia 14
Grupos	
Controle (cirurgia placebo)	108 ± 6
Veículo (nefrectomia ¾ + água)	161 ± 5 [#]
Enalapril 10 mg/kg (nefrectomia ¾)	102 ± 8*
Candesartan 10 mg/kg (nefrectomia ¾)	105 ± 4*
Aliskiren 10 mg/kg (nefrectomia ¾)	122 ± 6*

A pressão arterial média dos animais em todos os grupos experimentais foi medida por pletismografia da cauda uma vez por semana. Os resultados estão apresentados na forma de média ± EPM dos dez animais por grupo. **p* < 0,05: para comparações com o grupo que recebeu veículo. [#]*p* < 0,05: para comparações entre os grupos veículo e controle (cirurgia placebo).

administração de veículo, demonstrando efeito renoprotetor. Em relação aos ratos submetidos a cirurgia placebo, os animais submetidos a nefrectomia ¾ tratados com bloqueadores do SRA apresentaram elevações de celularidade mesangial e inflamação intersticial, discreta hipertrofia glomerular e leve hipotrofia tubular.

DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram que a inibição da ECA, o bloqueio dos receptores AT₁ e a inibição da renina foram semelhantemente eficazes na reversão das alterações bioquímicas, redução da pressão arterial, proteinúria e danos teciduais renais produzidos pela

nefrectomia ¾. Por outro lado, os tratamentos com enalapril, candesartan e aliskiren alteraram de forma diferente as citocinas urinárias. Em comparação com a administração de veículo, o bloqueio dos receptores AT₁ com candesartan reduziu significativamente os níveis urinários de todas as citocinas (IL-1β, IL-6, TGF-β e IL-10), enquanto a inibição da ECA com enalapril reduziu apenas os níveis de IL-6. Inversamente, a inibição da renina com aliskiren foi o único tratamento que elevou os níveis urinários da citocina anti-inflamatória IL-10.

A nefrectomia ¾ produziu alterações significativas nos parâmetros de função renal, incluindo débito urinário, concentração plasmática e urinária de eletrólitos, níveis plasmáticos de produtos das escórias nitrogenadas, clearance de creatinina e excreção urinária de proteínas. Poliúria e polidipsia podem ser atribuídas a alterações nos mecanismos de concentração da urina, relacionados à incapacidade da vasopressina de estimular a reabsorção de água nos dutos coletores destes animais.^{30,31} A detecção de concentrações urinárias mais baixas de sódio e potássio também foi relacionada à redução da capacidade de concentração urinária.

Por outro lado, Chamberlain e Shirley³² obtiveram diferentes resultados em relação a sódio e potássio em ratos submetidos a nefrectomia unilateral e subtotal. Os autores identificaram que a excreção geral de sódio e potássio pouco foi alterada no grupo submetido a nefrectomia unilateral, ao passo que nos animais submetidos a nefrectomia 5/6 pequenas reduções na excreção de sódio e potássio foram observadas apenas durante a primeira semana após a cirurgia.³²

Figura 2. Efeitos da administração de Aliskiren, Candesartan, Enalapril ou Veículo sobre níveis urinários de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β) em ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$. Os Painéis de A a D exibem IL-1 β (A), IL-6 (B), TGF- β (C) e IL-1 (D).

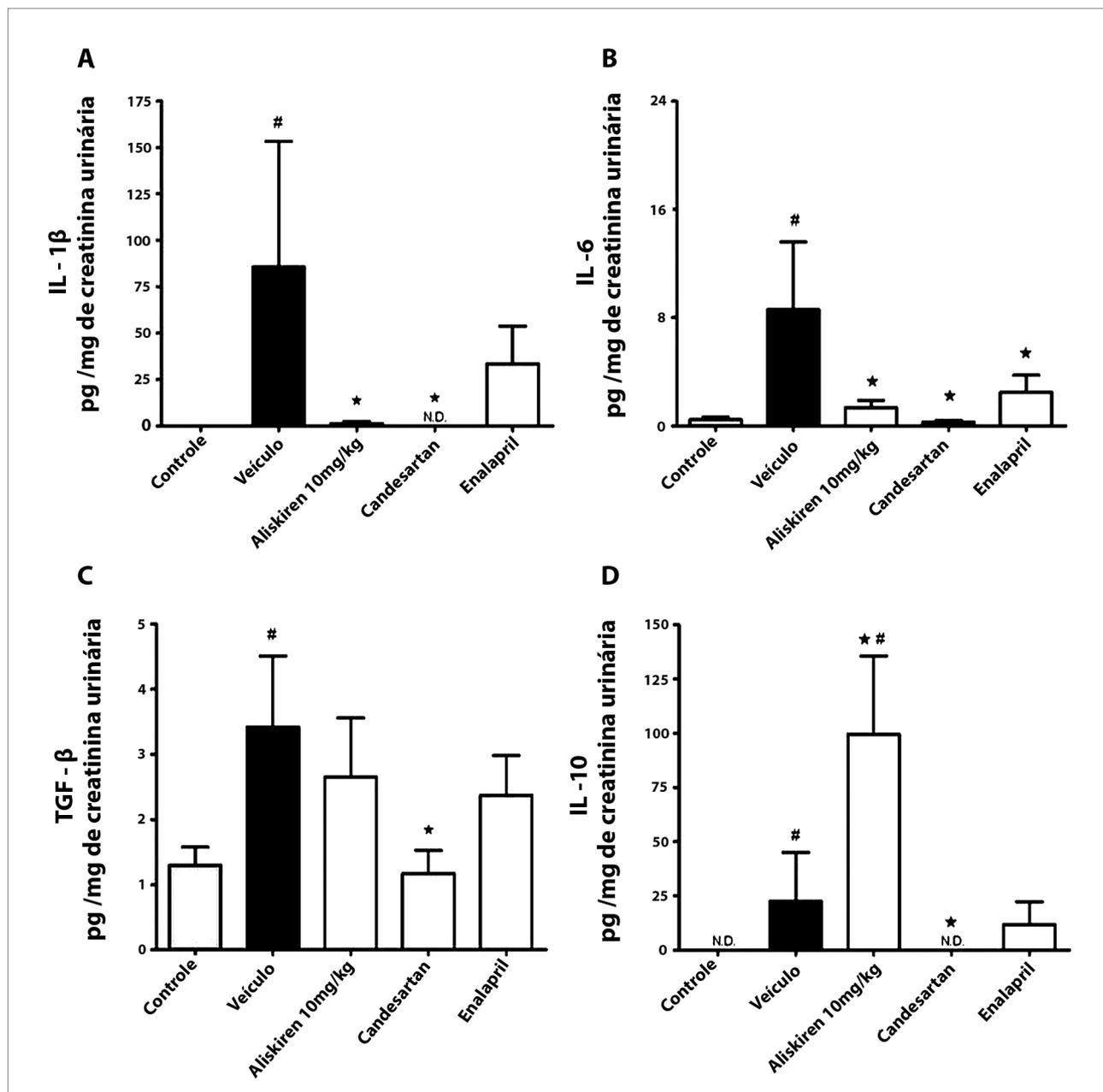
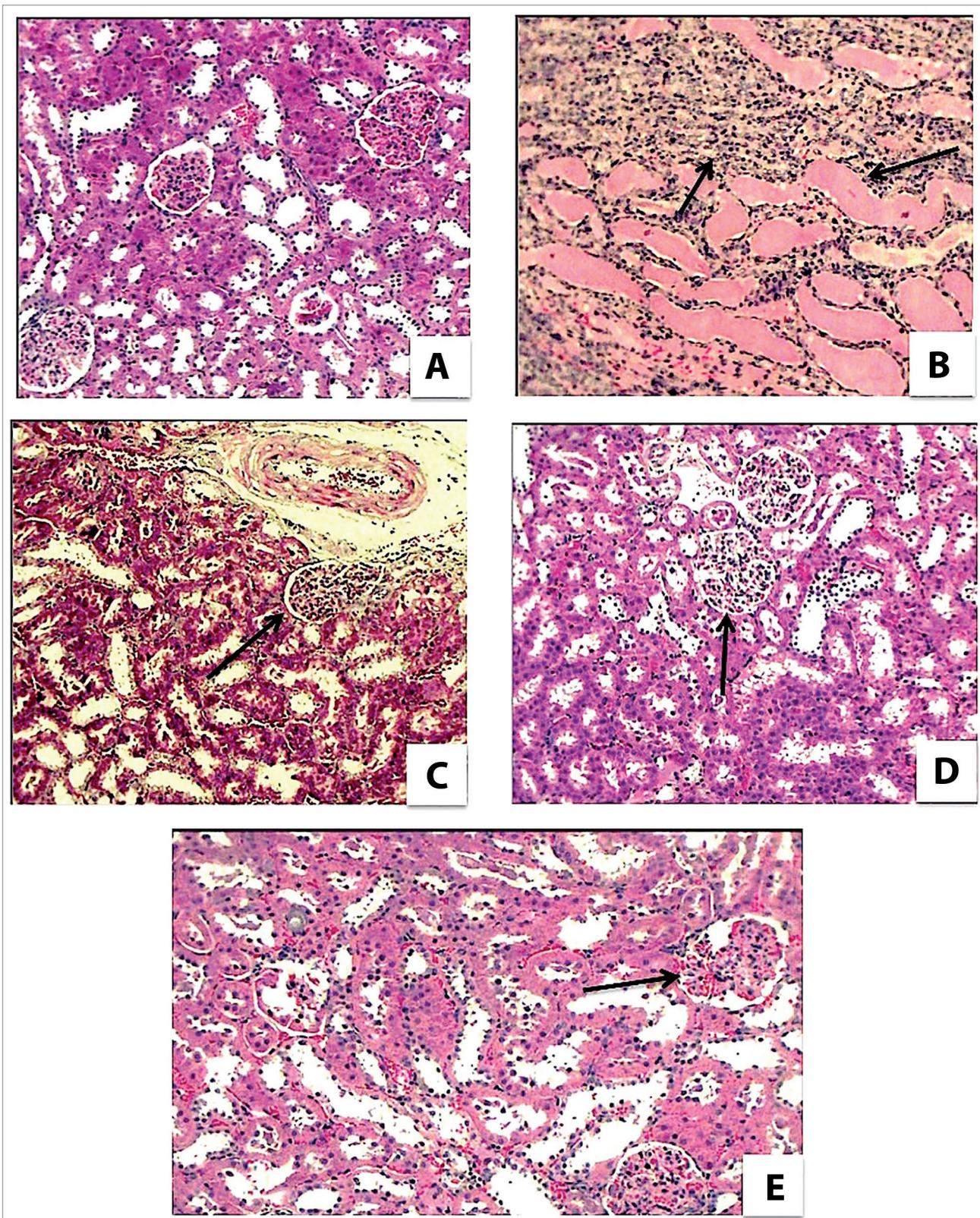


TABELA 3 NÍVEIS URINÁRIOS DE CITOCINAS (PG/MG CREATININA) DOS RATOS SUBMETIDOS A CIRURGIA PLACEBO (GRUPO DE CONTROLE) OU A NEFRECTOMIA $\frac{3}{4}$ SEGUIDA DE DIFERENTES TRATAMENTOS (VEÍCULO, ENALAPRIL, CANDESARTAN OU ALISKIREN)

Citocinas (pg/mg cr)	Cirurgia Placebo	Veículo	Enalapril 10 mg/kg	Candesartan 10 mg/kg	Aliskiren 10 mg/kg
IL-1 β	N.D.	85,50 \pm 67,80 [#]	27,33 \pm 23,45	N.D.*	1,30 \pm 1,10*
IL-6	0,48 \pm 0,18	8,60 \pm 4,99 [#]	2,50 \pm 1,25*	0,30 \pm 0,13*	1,37 \pm 0,53*
TGF- β	1,34 \pm 0,47	3,42 \pm 1,09 [#]	2,48 \pm 0,96	1,17 \pm 0,35*	2,75 \pm 0,83
IL-10	N.D.	22,50 \pm 21,50 [#]	11,80 \pm 10,52	N.D.	99,50 \pm 36,14*

N. D. = níveis não-detectáveis * p < 0,05: para comparações com o grupo que recebeu veículo. # p < 0,05: para comparações entre os grupos veículo e controle (cirurgia placebo).

Figura 3. Cortes representativos de tecido renal (ampliação 400 x) corados com HE de ratos submetidos a cirurgia placebo tratados com veículo (grupo de controle, painel A), ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com veículo (painel B), ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com enalapril (painel C), ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com candesartan (painel D) e ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$ tratados com aliskiren (painel E). Painel A representa histologia renal normal. Painel B exibe intenso infiltrado inflamatório e dilatação tubular com material hialino na luz (setas pretas). Painel C exibe estrutura glomerular mais preservada (seta preta) e dano tubular menos intenso. Painéis D e E mostram estruturas tubulares e glomerulares mais preservadas com leve hipertrofia glomerular e hiperplasia mesangial (setas pretas).



Tais diferenças podem ser atribuídas, pelo menos em parte, ao uso de diferentes linhagens de animais, uma vez que em nosso estudo foram utilizados ratos Wistar e no estudo de Chamberlain e Shirley³² foram avaliados animais Sprague-Dawley. Além disso, Chamberlain e Shirley³² não analisaram parâmetros de função renal após nefrectomia $\frac{3}{4}$, como no caso de nosso estudo. Devemos ainda lembrar que os ratos submetidos a nefrectomia subtotal apresentaram elevados níveis plasmáticos de vasopressina³⁰ e expressão gênica reduzida de aquaporinas 1, 2 e 3.³¹

Em nosso estudo, observamos que todos os tratamentos testados reverteram poliúria, polidipsia e as alterações das concentrações de sódio e potássio produzidas pela nefrectomia $\frac{3}{4}$. Não foi possível determinar os mecanismos por meio dos quais os bloqueadores do SRA normalizaram estes parâmetros. Contudo, sabe-se que Ang II eleva a secreção de vasopressina e acentua os efeitos dipsogênicos.³³ Assim, a redução da síntese de Ang II em resposta ao tratamento com enalapril ou aliskiren e o bloqueio dos receptores AT₁ pelo candesartan podem reduzir a liberação de vasopressina e a ingestão de água, com consequente normalização do volume e concentração da urina.

Todos os tratamentos também reduziram os níveis séricos de creatinina, a pressão arterial e a excreção urinária de proteína nos animais submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$. A melhora da função renal, o controle da pressão arterial e a redução da proteinúria em resposta aos inibidores da ECA e aos bloqueadores AT₁ foram amplamente relatados em estudos clínicos e experimentais.^{1-3,12-14} Entretanto, nosso estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos do aliskiren em ratos submetidos a nefrectomia $\frac{3}{4}$.

Estudos clínicos demonstraram que aliskiren exacerba os efeitos anti-hipertensivos de bloqueadores do canal de cálcio, diuréticos, inibidores da ECA ou bloqueadores dos receptores AT₁.^{34,35} Além disso, aliskiren reduziu a proteinúria e retardou a progressão da disfunção renal em comparação com placebo.⁴ Mais recentemente, o tratamento com aliskiren isolado ou em combinação com bloqueadores dos receptores AT₁ reduziu significativamente a proteinúria de pacientes com DRC não-diabética.³⁶

Estudos experimentais demonstraram que a remoção cirúrgica de grandes porções do parênquima renal eleva a expressão de vários genes pró-inflamatórios e estimula a infiltração do tecido renal remanescente por macrófagos.^{37,38} De acordo com estes achados, o presente estudo identificou uma elevação significativa das concentrações urinárias de

IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β após nefrectomia $\frac{3}{4}$ em ratos.

Porém, o perfil de citocinas variou dependendo do tratamento. Por exemplo, o bloqueador AT₁ candesartan reduziu todas as moléculas avaliadas (IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-10). Em modelos experimentais de DRC, o tratamento com candesartan significativamente reduziu o RNAm de TGF- β em tecido renal e, ao fazê-lo, retardou a progressão da insuficiência renal.³⁹⁻⁴² A administração de candesartan também reduziu os níveis renais de IL-1 β e IL-6 e melhorou a função renal em ratos Zucker obesos.⁴² Em pacientes diabéticos, o tratamento com candesartan reduziu os níveis séricos de IL-6.⁴¹

Alterações menos acentuadas no perfil de citocinas foram provocadas pela administração de enalapril, uma vez que apenas as concentrações urinárias de IL-6 foram significativamente reduzidas. Semelhantemente, Ding *et al.*⁴³ relataram redução na expressão renal de IL-6 em ratos Wistar submetidos a nefrectomia unilateral direita.

Por outro lado, ratos submetidos a nefrectomia subtotal estudados por Ghosh *et al.*⁴⁴ apresentaram reduções nos níveis de IL-1 β e TGF- β após tratamento com enalapril. Os resultados obtidos com aliskiren foram um pouco diferentes em relação aos dos demais tratamentos. O inibidor da renina reduziu as concentrações urinárias das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6, sem alterar os níveis de TGF- β .

Além disso, aliskiren foi o único tratamento a elevar os níveis urinários de IL-10. Em consonância com nossos achados, estudos anteriores também relataram efeitos do aliskiren sobre citocinas pró-inflamatórias.^{4,5,45-48} Matavelli *et al.*⁴⁵ demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com aliskiren reduziu os níveis de IL-6 e TNF- α no interstício renal por meio da redução das concentrações renais de Ang II. Da mesma forma, Wang *et al.*⁴⁶ relataram que aliskiren impediu a elevação dos níveis de RNAm tecidual renal pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β) e atenuou albuminúria e glomeruloesclerose em modelo murino de nefropatia diabética.

Diferentemente de nossos dados, outros pesquisadores relataram que aliskiren reduziu os níveis renais de TGF- β em modelo murino de fibrose renal progressiva⁴⁸ e reduziu a concentração urinária desta citocina em pacientes com doenças renais não-diabéticas.⁴⁷ Tal divergência entre achados relativa a TGF- β pode se dever a diferenças entre os modelos experimentais e/ou ao grau de fibrose.

Contudo, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar elevação da IL-10 urinária após uso de aliskiren. Foi relatado anteriormente que a IL-10 exerce efeitos anti-inflamatórios em diferentes modelos experimentais de DRC.²¹⁻²³ Nestes estudos, fármacos anti-inflamatórios e/ou produtos fitoterápicos elevaram os níveis de IL-10 por meio de seus mecanismos de ação.²¹⁻²³ Podemos especular que a elevação dos níveis de IL-10 pode contribuir, pelo menos parcialmente, com os efeitos benéficos dos inibidores da renina também no tecido renal. Maiores estudos são necessários para corroborar nossa hipótese.

Estamos cientes das limitações de nosso estudo. O principal ponto é que não avaliamos os mecanismos além das interações entre bloqueadores do SRA e citocinas urinárias. Além disso, nosso estudo não nos permitiu determinar com precisão o papel das citocinas urinárias na patogenia da DRC. Por outro lado, alguns aspectos podem fortalecer nossos achados, incluindo os rigorosos protocolos experimentais e a baixa variabilidade intra-ensaio das medições de citocinas.

Em conclusão, o presente estudo mostrou que a nefrectomia $\frac{3}{4}$ resultou em alterações dos parâmetros de função renal, elevação da pressão arterial, produção de lesão tecidual renal e elevação das concentrações urinárias de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6), de um mediador de fibrose (TGF- β) e de uma citocina anti-inflamatória (IL-10). O bloqueio farmacológico do SRA em diferentes níveis melhorou a função renal, reduziu a pressão arterial e alterou o perfil das citocinas urinárias.

Todos os tratamentos reduziram os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6. Entretanto, apenas a inibição da renina conseguiu aumentar os níveis do mediador anti-inflamatório IL-10. Nossos resultados não permitiram a identificação dos mecanismos de ação específicos de cada tratamento, mas sugeriram que a liberação local de moléculas relacionadas a inflamação e fibrose pode variar dependendo do local do bloqueio do SRA, e tais diferenças podem contribuir com os efeitos destes medicamentos sobre a DRC.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processos no. 470472/2014-6 e 460334/2014-0), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, processo CDS - PPM-00555-15) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Tylicki L, Lizakowski S, Rutkowski B. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for nephroprotection: current evidence and future directions. *J Nephrol* 2012;25:900-10.
2. Verdecchia P, Gentile G, Angeli F, Reboldi G. Beyond blood pressure: evidence for cardiovascular, cerebrovascular, and renal protective effects of renin-angiotensin system blockers. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2012;6:81-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1753944712444866>
3. Simões E, Silva AC, Flynn JT. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2012;10:1835-45.
4. Friedrich S, Schmieder RE. Review of direct renin inhibition by aliskiren. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2013;14:193-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320313497328>
5. Bhatti AB, Gazali ZA. Can Aliskiren be Considered as a New Novel Drug for Hypertension? *Cureus* 2015;7:e375. DOI: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.375>
6. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Bianchi AM, Giovannini L, et al. C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. *Nephron* 2002;91:594-600. PMID: 12138260 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000065018>
7. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004;65:1009-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x>
8. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia-the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005;67:1216-33. PMID: 15780075 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x>
9. Vianna HR, Soares CM, Silveira KD, Elmiro GS, Mendes PM, de Sousa Tavares M, et al. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. *Pediatr Nephrol* 2013;28:463-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-012-2363-x>
10. Pereira AB, Teixeira AL, Rezende NA, Pereira RM, Miranda DM, Oliveira EA, et al. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study. *Int Urol Nephrol* 2012;44:1539-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11255-012-0176-2>
11. Stangou M, Alexopoulos E, Papagianni A, Pantzaki A, Bantis C, Dovas S, et al. Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2009;14:613-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2008.01051.x>
12. Macconi D, Remuzzi G, Benigni A. Key fibrogenic mediators: old players. *Renin-angiotensin system. Kidney Int Suppl* (2011) 2014;4:58-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/kisup.2014.11>
13. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med* 2004;116:263-72. PMID: 14969655 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.09.034>
14. Chen D, Coffman TM. AT1 Angiotensin receptors-vascular and renal epithelial pathways for blood pressure regulation. *Curr Opin Pharmacol* 2015;21:122-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2015.01.006>
15. Navar LG. Intrarenal renin-angiotensin system in regulation of glomerular function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014;23:38-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.mnh.0000436544.86508.f1>
16. Thethi T, Kamiyama M, Kobori H. The link between the renin-angiotensin-aldosterone system and renal injury in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2012;14:160-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-012-0245-z>

17. Wong C, Kanetsky P, Raj D. Genetic polymorphisms of the RAS-cytokine pathway and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2008;23:1037-51. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-008-0816-z>
18. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Pro-inflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:321-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00041552-200105000-00005>
19. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol* 2013;169:477-92. PMID: 23488800 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12159>
20. Tsakas S, Goumenos DS. Accurate measurement and clinical significance of urinary transforming growth factor-beta1. *Am J Nephrol* 2006;26:186-93. PMID: 16679757 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000093178>
21. Schulze-Topphoff U, Shetty A, Varrin-Doyer M, Molnarfi N, Sagan SA, Sobel RA, et al. Laquinimod, a quinoline-3-carboxamide, induces type II myeloid cells that modulate central nervous system autoimmunity. *PLoS One* 2012;7:e33797. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033797>
22. Azevedo MS, Zhang W, Wen K, Gonzalez AM, Saif LJ, Yousef AE, et al. *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* modulate cytokine responses in gnotobiotic pigs infected with human rotavirus. *Benef Microbes* 2012;3:33-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/BM2011.0041>
23. Zarogiannis SG, Noah JW, Jurkuvenaite A, Steele C, Matalon S, Noah DL. Comparison of ribavirin and oseltamivir in reducing mortality and lung injury in mice infected with mouse adapted A/California/04/2009 (H1N1). *Life Sci* 2012;90:440-5. PMID: 22269828 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.014>
24. Ormrod D, Miller T. Experimental uremia. Description of a model producing varying degrees of stable uremia. *Nephron* 1980;26:249-54. PMID: 7422053 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000181994>
25. Samad MA, Kim UK, Kang JJ, Ke Q, Kang PM. Endothelin A receptor antagonist, atrasentan, attenuated renal and cardiac dysfunction in Dahl salt-hypertensive rats in a blood pressure independent manner. *PLoS One* 2015;10:e0121664. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121664>
26. Kumar KV, Satyanarayana S, Kumar KE. Evaluation of enalapril affecting the renin-angiotensin system in normal and streptozotocin-induced rats based on urinary metabolites of amines and cortisol. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2013;14:34-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320312460069>
27. Lin L, Philips WE, Manning RD. Intrarenal Angiotensin II is associated with inflammation, renal damage and dysfunction in Dahl-sensitive hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2009;3:306-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2009.08.002>
28. De Melo W, Rivera M, Rabell A, Gerena Y. Aliskiren, at low doses, reduces the electrical remodeling in the heart of the TGR(mRen2)27 rat independently of blood pressure. *J Renin Aldosterone Syst* 2013;14:23-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320312463832>
29. Ziypak T, Halici Z, Alkan E, Akpınar E, Polat B, Adanur S, et al. Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. *Ren Fail* 2015;37:343-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/0886022X.2014.991327>
30. Boubay N, Bachmann S, Bichet D, Bankir L. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol* 1990;258:F973-9. PMID: 2184677
31. Kwon TH, Frøkiaer J, Knepper MA, Nielsen S. Reduced AQP1, -2, and -3 level in kidneys of rats with CRF induced by surgical reduction in renal mass. *Am J Physiol* 1998;275:724-41.
32. Chamberlain RM, Shirley DG. Time course of the renal functional response to partial nephrectomy: measurements in conscious rats. *Exp Physiol* 2007;92:251-62. PMID: 17085677 DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2006.034751>
33. Matsukawa T, Miyamoto T. Angiotensin II-stimulated secretion of arginine vasopressin is inhibited by atrial natriuretic peptide in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R624-9. PMID: 21123762 DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00324.2010>
34. Townsend RR, Forker AD, Bhosekar V, Yadao A, Keefe DL. Comparison of aliskiren/hydrochlorothiazide combination therapy and amlodipine monotherapy in patients with stage 2 systolic hypertension and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2011;13:889-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7176.2011.00552.x>
35. Axthelm C, Sieder C, Meister F, Kaiser E. Efficacy and tolerability of the single-pill combination of aliskiren 300 mg/amlodipine 10 mg in hypertensive patients not controlled by olmesartan 40 mg/amlodipine 10 mg. *Curr Med Res Opin* 2012;28:69-78. PMID: 22117838 DOI: <http://dx.doi.org/10.1185/03007995.2011.637914>
36. Woo KT, Choong HL, Wong KS, Tan HK, Foo M, Fook-Chong S, et al. Aliskiren and losartan trial in non-diabetic chronic kidney disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014;15:515-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320313510584>
37. Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, Shahsafaei A, Kato S, Lee KW, et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 2000;58:1664-76. PMID: 11012900 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00327.x>
38. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 1999;103:627-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI2454>
39. Noda M, Matsuo T, Fukuda R, Ohta M, Nagano H, Shibouta Y, et al. Effect of candesartan cilexetil (TCV-116) in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;56:898-909. PMID: 10469358 DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00614.x>
40. Higashi K, Oda T, Kushiyama T, Hyodo T, Yamada M, Suzuki S, et al. Additive antifibrotic effects of pioglitazone and candesartan on experimental renal fibrosis in mice. *Nephrology (Carlton)* 2010;15:327-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2009.01253.x>
41. Pavlatou MG, Mastorakos G, Margeli A, Kouskouni E, Tentolouris N, Katsilambros N, et al. Angiotensin blockade in diabetic patients decreases insulin resistance-associated low-grade inflammation. *Eur J Clin Invest* 2011;41:652-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02453.x>
42. Ecelbarger CM, Rash A, Sinha RK, Tiwari S. The effect of chronic candesartan therapy on the metabolic profile and renal tissue cytokine levels in the obese Zucker rat. *Mediators Inflammation* 2010;2010:841343. PMID: 20490358 DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/841343>
43. Ding LH, Liu D, Xu M, Liu H, Wu M, Tang RN, et al. Enalapril inhibits tubulointerstitial inflammation and NLRP3 inflammasome expression in BSA-overload nephropathy of rats. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35:1293-301. PMID: 25152022 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2014.66>
44. Ghosh SS, Krieg R, Massey HD, Sica DA, Fakhry I, Ghosh S, et al. Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302:439-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00356.2010>
45. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Combined aliskiren and amlodipine reduce albuminuria via reduction in renal inflammation in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;59:281-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0b013e31823fc3f5>
46. Wang W, Qiu L, Howard A, Solis N, Li C, Wang X, et al. Protective effects of aliskiren and valsartan in mice with diabetic nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014;15:384-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320313507123>
47. Lizakowski S, Tylicki L, Renke M, Rutkowski P, Heleniak Z, Sławińska-Morawska M, et al. Aliskiren and perindopril reduce the levels of transforming growth factor-β in patients with non-diabetic kidney disease. *Am J Hypertens* 2012;25:636-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2012.14>
48. Gross O, Girgert R, Rubel D, Temme J, Theissen S, Müller GA. Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. *Am J Hypertens* 2011;24:355-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ajh.2010.231>