

## Efeito antioxidante de antagonista dos receptores de endotelina-1 protege ratos contra lesão renal crônica induzida por hipertensão e hiperglicemia

Antioxidant effect of endothelin-1 receptor antagonist protects the rat kidney against chronic injury induced by hypertension and hyperglycemia

### Autores

Agnaldo Caires<sup>1</sup>  
 Marcia Bastos Convento<sup>1</sup>   
 Bianca Castino<sup>2</sup>   
 Ala Moana Leme<sup>1</sup>   
 Edson de Andrade Pessoa<sup>1</sup>  
 Alef Aragão<sup>2</sup>  
 Nestor Schor<sup>1\*</sup>  
 Fernanda Teixeira Borges<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Cruzeiro do Sul, Programa Interdisciplinar em Ciências da Saúde, São Paulo, SP, Brasil.

Data de submissão: 31/07/2018.

Data de aprovação: 27/05/2019

### Correspondência para:

Fernanda Teixeira Borges.  
 E-mail: ft.borges@unifesp.br

\* *In memoriam.*

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0162

### RESUMO

Hipertensão e Diabetes Mellitus figuram como as duas principais causas de doença renal crônica que culmina em doença renal terminal. Uma vez que os dois fatores de risco são comuns e podem se sobrepor, novas abordagens preventivas e terapêuticas se fazem necessárias. O macitentan (MAC) é um novo antagonista não-seletivo dos receptores da endotelina-1 (ET-1). O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do bloqueio crônico dos receptores da ET-1 com MAC sobre a alteração da função renal em animais hipertensos e hiperglicêmicos. Ratos geneticamente hipertensos foram divididos em grupos com animais hipertensos de controle (HT-CTL), hipertensos e hiperglicêmicos (HT+DIAB) e hipertensos e hiperglicêmicos tratados com 25 mg/kg de macitentan (HT-DIAB+MAC25) via gavagem por 60 dias. Foram avaliados função renal e parâmetros associados ao estresse oxidativo e nitrosativo. Exames de imunohistoquímica foram realizados para lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), ET-1 e catalase no córtex renal. O grupo HT+DIAB exibiu diminuição da função renal e aumento na expressão de NGAL no córtex renal, bem como estresse oxidativo aumentado. O tratamento com MAC foi associado a atenuação da produção de ET-1 e NGAL e maior ativação das defesas antioxidantes (expressão de catalase) e elevação da produção de óxido nítrico. Além disso, o MAC evitou exacerbação da lesão oxidante (medida por hidroperóxidos urinários e peroxidação lipídica), melhorando assim a função renal. Nossos resultados sugerem que o efeito antioxidante do antagonista dos receptores da ET-1 MAC esteja imbricado no aprimoramento da função renal observada em ratos hipertensos e hiperglicêmicos.

**Palavras-chave:** Ratos; Insuficiência Renal Crônica; Endotelina-1; Antioxidantes.

### ABSTRACT

Hypertension and Diabetes mellitus are the two main causes of chronic kidney disease that culminate in the final stage of kidney disease. Since these two risk factors are common and can overlap, new approaches to prevent or treat them are needed. Macitentan (MAC) is a new non-selective antagonist of the endothelin-1 (ET-1) receptor. This study aimed to evaluate the effect of chronic blockade of ET-1 receptor with MAC on the alteration of renal function observed in hypertensive and hyperglycemic animals. Genetically hypertensive rats were divided into control hypertensive (HT-CTL) group, hypertensive and hyperglycemic (HT+DIAB) group, and hypertensive and hyperglycemic group that received 25 mg/kg macitentan (HT-DIAB+MAC25) via gavage for 60 days. Kidney function and parameters associated with oxidative and nitrosative stress were evaluated. Immunohistochemistry for neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), ET-1, and catalase in the renal cortex was performed. The HT+DIAB group showed a decrease in kidney function and an increase in NGAL expression in the renal cortex, as well as an increase in oxidative stress. MAC treatment was associated with attenuated ET-1 and NGAL production and increases in antioxidant defense (catalase expression) and nitric oxide production. In addition, MAC prevented an increase in oxidant injury (as measured by urinary hydroperoxide and lipid peroxidation), thus improving renal function. Our results suggest that the antioxidant effect of the ET-1 receptor antagonist MAC is involved in the improvement of kidney function observed in hypertensive and hyperglycemic rats.

**Keywords:** Rats; Renal Insufficiency, Chronic; Endothelin-1; Antioxidants.



## INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) e hipertensão são as principais causas de doença renal crônica (DRC) e progressão para doença renal terminal<sup>1</sup>. A incidência de DRC se eleva com a idade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento<sup>2,3</sup>. Portanto, novas estratégias para prevenir o desenvolvimento da DRC se fazem necessárias.

Ratos submetidos a injeção única de estreptozotocina em baixa dose são um modelo de DM tipo 2 comumente utilizado em pesquisas<sup>4</sup>. Ratos espontaneamente hipertensos (REH) são um modelo animal frequentemente adotado nos estudos sobre hipertensão essencial (ou primária) geneticamente transmitida<sup>5</sup>. A indução do diabetes em REH<sup>6</sup> acelera o desenvolvimento da nefropatia diabética e da doença renal crônica (DRC).

Nefropatia diabética (ND) é um forte fator de risco para doenças vasculares comumente presente em pacientes com DM tipo 2. A ND é caracterizada por lesão podocitária, proteinúria, fibrose glomerular e diminuição da filtração glomerular<sup>7</sup>. As manifestações da ND incluem hiperglicemia, inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativação da endotelina-1 (ET-1) e do sistema renina-angiotensina (SRA)<sup>8</sup>.

Quando não tratada, a nefropatia diabética é a principal causa de doença renal terminal<sup>9</sup>. A DRC é caracterizada por elevações dos marcadores de lesão renal (albumina urinária > 30 mg/24h ou relação albumina/creatinina superior a 30 mg/g), dano tubular, disfunção da excreção iônica, achados histológicos anormais em amostras de biópsia renal e queda da taxa de filtração glomerular (< 60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>), entre outros<sup>10</sup>.

As ERO estão envolvidas na fisiopatologia da DRC, enquanto as NADPH-oxidases são as principais fontes de ERO em muitos tecidos<sup>11-13</sup>.

A ET-1 modula o fluxo sanguíneo renal por meio da regulação do tônus vascular<sup>14</sup>. A ET-1 é produzida pelas células endoteliais, mas em condições fisiopatológicas pode ser produzida por podócitos e células epiteliais mesangiais e parietais<sup>15</sup>. A ET-1 exerce sua função nas células alvo por meio de dois receptores, o ETA e o ETB<sup>15</sup>.

A ativação do receptor ETA media a vasoconstrição, proliferação de células vasculares e proteinúria<sup>16</sup>. Por outro lado, a ativação do receptor ETB libera substâncias vasodilatadoras tais como o óxido nítrico e a prostaciclina, produzindo primeiramente vasodilatação e, a seguir, vasoconstrição, estimulando a reabsorção de sódio nos dutos coletores e o estabelecimento da

proteinúria<sup>17</sup>. Os níveis circulantes de ET-1 encontram-se aumentados em pacientes hipertensos<sup>18</sup>.

A ET-1 e o SRA interagem nos tecidos renais. A angiotensina II eleva a produção de ET-1 e regula para cima a expressão do receptor ETA nos rins<sup>19,20</sup>. Juntos, os dois peptídeos podem produzir vasoconstrição pré e pós-glomerular, contração de células mesangiais, queda da taxa de filtração glomerular, estimulação da produção de matriz extracelular e aumento da reabsorção tubular de sódio<sup>21</sup>. É razoável propor que o bloqueio dos receptores da ET-1 possa ser benéfico na nefropatia diabética.

Ensaio clínicos estudaram os efeitos do antagonista da ET-1 atrasentan sobre a ND<sup>22</sup>. Atualmente, contudo, o principal uso terapêutico dos antagonistas dos receptores da ET-1 reside no tratamento da fibrose pulmonar idiopática e da hipertensão arterial pulmonar<sup>23,24</sup>. O presente estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do macitentan, um novo antagonista não-seletivo dos receptores da ET-1 receitado no tratamento da hipertensão pulmonar, sobre a progressão da lesão renal observada em ratos hipertensos e hiperglicêmicos.

## MÉTODOS

### TRATAMENTO DOS ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 798483) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e foi realizado de acordo com as diretrizes brasileiras para o cuidado e uso científico de animais<sup>25,26</sup>. Os animais foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP.

Trinta ratos machos geneticamente hipertensos (REH) com seis semanas de idade e peso entre 170-200 g foram mantidos em gaiolas metabólicas. As gaiolas foram mantidas em ambiente com temperatura (21 ± 2°C) e umidade (60 ± 10%) controladas em ciclos de 12 horas de luz/escuridão (iluminação artificial, das 7 às 19 horas) e exaustor de ar ligado de hora em hora (15 min/h).

Após um período de adaptação de duas semanas, os animais foram divididos em três grupos. Durante os 60 dias do estudo todos os animais foram alimentados *ad libitum* com ração padrão para rato e tiveram livre acesso à água.

Os dez ratos geneticamente hipertensos (HT) que foram mantidos em regime de controle (CTL) receberam injeção intravenosa de água destilada (apenas veículo) e foram designados ao grupo HT-CTL.

Vinte ratos receberam injeção intravenosa de estreptozotocina 60 mg/kg (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) em solução tampão citrato (0,1 M, pH

4,4). Apenas animais com glicemia acima de 400 mg/dL foram selecionados. Metade foi mantida no grupo com HT e hiperglicemia (Grupo HT-DIAB). A outra metade foi tratada com macitentan (MAC) diário 25 mg/kg por gavagem durante 60 dias (Grupo HT-DIAB+MAC25).

Todos os animais foram pesados, tiveram amostras de sangue coletadas na veia lateral da cauda e volumes de urina quantificados no início e com 30 e 60 dias de estudo. Os animais foram submetidos à eutanásia 60 dias após o início do protocolo experimental por meio de uma dose dose intraperitoneal de quetamina (90 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg) (Agribands de Brasil Ltda., SP, Brasil). Os rins direito e esquerdo foram removidos para análise imunoistoquímica. Os parâmetros bioquímicos foram medidos em amostras de plasma e urina.

#### MEDIÇÃO DO PESO CORPORAL

Os ratos foram pesados mensalmente em uma balança 2610 (Labortex, SP, Brasil) e os resultados foram registrados em gramas.

#### AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

A pressão arterial sistólica foi aferida indiretamente por pletismografia da cauda. Os ratos foram colocados em uma câmara aquecida por 10 min e a medição foi feita pelo método do manguito de cauda. A pressão arterial foi registrada por meio de um esfigmomanômetro elétrico acoplado a um polígrafo Gould de dois canais modelo 2200 S (Record 2200S, Gould Inc., Cleveland, Ohio, EUA). As medidas foram realizadas com zero, 24 e 48 h, e os resultados foram registrados como médias  $\pm$  DP.

#### ANÁLISE BIOQUÍMICA

Os níveis plasmáticos de creatinina e ureia foram avaliados por espectrofotometria segundo procedimentos padronizados, utilizando kits diagnósticos comercialmente disponíveis (Labtest Diagnostic, Brasil). Os níveis de creatinina foram determinados por método colorimétrico baseado na reação de Jaffé<sup>27</sup>. A ureia foi determinada por ensaio colorimétrico baseado na atividade da urease<sup>28</sup>. A concentração plasmática de glicose foi determinada a partir de amostras de sangue da cauda (Accucheck, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind., EUA). Os níveis de creatinina, ureia e glicose foram descritos em mg/dL.

As concentrações urinárias de sódio foram determinadas com o auxílio de um fotômetro de chama Micronal B462 (Micronal, São Paulo, Brasil). A excreção de sódio foi relatada como percentual de mEq/24h. Proteína urinária foi quantificada por método colorimétrico baseado em vermelho de pirogalol-molibdato<sup>29</sup>. Os resultados foram relatados em mg de proteinúria de 24h.

#### ESTUDOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Na avaliação de peroxidação lipídica, os níveis de malondialdeído no produto da peroxidação foram medidos em função das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)<sup>30</sup>. Para fins de quantificação, 0,4 mL de urina diluída em 0,6 mL de água foram adicionados a uma mistura de reação consistindo de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17,5% e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6% para formar um composto vermelho. A mistura foi aquecida em banho-maria a 95°C por 20 min. A solução foi então removida do banho-maria e resfriada em gelo, momento em que foi somado 1,0 mL de TCA 70%. A solução foi homogeneizada e incubada por 20 min, seguida de avaliação espectrofotométrica a 534 nm ( $A = 1,56 \times 10^5$  M/cm). Os achados foram descritos em nM/mg de creatinina urinária.

Os peróxidos urinários foram determinados pelo método da oxidação do ferro pelo laranja de xilenol versão 2 (FOX-2)<sup>31</sup>. O íon ferroso é oxidado em íon férrico por peróxidos contidos nas amostras. O reagente laranja de xilenol exibe elevada seletividade para o íon  $Fe^{3+}$ , produzindo um complexo azul-arroxado cuja absorvância pode ser medida a 560 nm ( $A = 4,3 \times 10^4$  M/cm). O seguinte reagente foi preparado: 90 mL de metanol; 10 mL de água bidestilada; 100  $\mu$ M de laranja de xilenol; 4 mM de butil hidroxitolueno (BHT); 25 mM de ácido sulfúrico; e 250  $\mu$ M de sulfato ferroso amoniacal. Cada amostra de urina (100  $\mu$ L) foi misturada com 900  $\mu$ L de reagente FOX-2, condicionada em agitador tipo vortex e incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente. As soluções foram então centrifugadas a 15.000 g por 10 min a 4°C para a remoção de resíduos de proteína. A absorvância a 560 nm foi lida contra o branco. Os dados foram descritos em nmol/g de creatinina urinária.

#### DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess<sup>32</sup>. Uma mistura de sulfanilamida 1% (em  $H_3PO_4$  5%) e dicloridrato N-(1-Naftil)Etilenodiamida

0,1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foi adicionada às amostras de urina e a absorvância a 546 nm foi medida usando um espectrofotômetro GENESYS 2 (Spectronic Instruments, Rochester, EUA). O nitrato, um dos metabólitos estáveis do NO, foi então estimado a partir de uma curva padrão construída usando  $\text{NaNO}_2$ . A avaliação da creatinina urinária foi realizada e usada para normalizar as concentrações de NO. Os dados foram descritos em nM/mg de creatinina urinária.

#### IMUNOISTOQUÍMICA

Os rins foram dissecados ao longo do eixo não hilar e fixados em tampão fosfato-salino 10% (Erviagas, Brasil). Os cortes renais foram fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponada, incluídos em parafina (Erviagas, Brasil) e preparados em seções de 4  $\mu\text{m}$  de espessura. Os cortes renais foram desparafinados e reidratados. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% em metanol absoluto por 10 minutos à temperatura ambiente. Para expor os antígenos, os cortes renais foram fervidos em solução de recuperação alvo [1 mmol/L de tris (hidroximetil) aminometano (Tris) pH 9,0, com 0,5 mM ácido bis-(2-aminoetil)etilenoglicol-NNN'N'-tetracético (EGTA)] por 10 min. Ligações não específicas foram evitadas incubando os cortes em tampão fosfato-salino (PBS) contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA), 0,05% de saponina e 0,2% de gelatina. Os cortes foram então incubados durante a noite a 4°C com anticorpos primários contra ET-1 (1:200 anticorpos de coelho anti-IgG de rato; ABCAM, MA, EUA), lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) (1:200 anticorpos de coelho anti-IgG de rato; ABCAM, MA, EUA) ou catalase (1:200 anticorpos de coelho anti-IgG de rato; ABCAM, MA, EUA) durante 18 horas a 4°C. Depois eles foram lavados e incubados com anticorpos secundários conjugados com estreptavidina-peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) por 1h em temperatura ambiente. Os sítios das reações antígeno-anticorpo foram visualizados por coloração com 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorato 0,5% (Dako). Fotomicrografias foram tiradas com uma câmera para microscópio Leica DFC 310 FX, LAS 3.8 conectada a um microscópio vertical Leica DM 1000 (Leica, Suíça) e a um computador. Foram tiradas dez fotomicrografias ao longo do córtex renal. Foi quantificada a coloração marrom clara (software LAS, versão 3.8) e calculada a média

de cada rato. Os dados foram descritos em percentual de área corada.

#### WESTERN BLOTTING

A concentração de proteínas foi verificada pelo método de Lowry<sup>33</sup>. As células e tecidos renais foram lisados em tampão de lise RIPA 200  $\mu\text{L}$  por placa (100  $\text{mm}^2$ ). Os lisados foram centrifugados a 12.000 g por 5 min a 4°C e os sobrenadantes foram armazenados a -80°C. As proteínas (30  $\mu\text{g}$ ) foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) 10% e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) utilizando uma célula de transferência eletroforética Mini Trans-Blot (BioRad, CA, EUA). Os sítios de ligações não específicas foram bloqueados com albumina 5% (v/v) em solução TBS. Os immunoblots foram incubados durante a noite a 4°C em renina (1:500, Santa Cruz, TX, EUA), angiotensina I (1:500, Santa Cruz, TX, EUA), angiotensina II (1:500, Santa Cruz, TX, EUA) ou anticorpos primários contra GAPDH (1:500, Abcam, MA, EUA). Após três lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por 1h a 4°C em anticorpos secundários conjugados com HRP (1:100.000; Santa Cruz TX, EUA). As bandas de proteínas imunorreativas foram visualizadas usando o substrato quimioluminescente Pierce ECL Plus (Thermo Fisher, EUA). As imagens foram obtidas e analisadas no sistema de documentação Alliance 7 (UVITEC, Cambridge, Reino Unido). As intensidades das bandas dos immunoblots foram quantificadas com o software Image J e descritas em relações renina/GAPDH, angiotensina I/GAPDH e angiotensina II/GAPDH.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. Os dados foram tratados por análise de variância de dupla classificação, seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

#### RESULTADOS

A Tabela 1 exibe o peso corporal médio (g) dos grupos durante o experimento. O peso médio dos animais nos grupos HT-DIAB e HT-DIAB+MAC25 foi significativamente menor do que o dos ratos no grupo CTL aos 30 dias.

**TABELA 1** PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE RATOS GENETICAMENTE HIPERTENSOS (REH) NO GRUPO CONTROLE (HT-CTL), ANIMAIS HIPERTENSOS E HIPERGLICÊMICOS (HT-DIAB), ANIMAIS HIPERTENSOS E HIPERGLICÊMICOS TRATADOS COM MACITENTAN (HT-DIAB+MAC25) AO INÍCIO E COM 30 E 60 DIAS DE ESTUDO

Peso (g)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25mg
BASAL	174,00 ± 10,19	167,38 ± 10,76	189,17 ± 13,38
30 DIAS	279,00 ± 18,46	184,75 ± 12,75 *	182,83 ± 17,74 *
60 DIAS	318,71 ± 19,49	191,25 ± 21,33 **	172,50 ± 19,42 **
PAS (mmHg)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	173,00 ± 5,67	178,00 ± 5,14	176,83 ± 4,28
30 DIAS	178,86 ± 4,61	187,88 ± 7,05	191,00 ± 7,30
60 DIAS	181,43 ± 2,76	190,50 ± 6,70	195,17 ± 5,33
Glicose plasmática (mg/dl)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	100,29 ± 8,29	100,29 ± 8,29	89,00 ± 0,82
30 DIAS	94,43 ± 2,17	418,50 ± 73,66 *	524,83 ± 7,21 *
60 DIAS	127,71 ± 14,11	541,38 ± 18,67 **	516,33 ± 30,79 **
Volume urinário (ml)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	11,11 ± 1,41	9,12 ± 0,84	12,83 ± 0,91
30 DIAS	13,05 ± 1,57	76,83 ± 8,98 *	78,33 ± 7,03 *
60 DIAS	13,91 ± 1,69	85,00 ± 5,80 **	78,33 ± 9,80 **
Creatinina plasmática (mg/dl)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	0,69 ± 0,07	0,61 ± 0,04	0,63 ± 0,05
30 DIAS	0,70 ± 0,06	0,85 ± 0,09	0,69 ± 0,05 †
60 DIAS	0,65 ± 0,03	0,98 ± 0,09 **	0,72 ± 0,01 ††
Ureia plasmática (mg/dl)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	26,59 ± 2,57	26,43 ± 3,22	23,00 ± 1,08
30 DIAS	38,86 ± 7,84	67,84 ± 11,12 *	55,75 ± 9,41 †
60 DIAS	36,53 ± 6,09	72,73 ± 11,04 **	47,25 ± 5,65
Sódio urinário (mEq/24h)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	10,61 ± 3,05	8,38 ± 2,35	14,11 ± 1,81
30 DIAS	12,97 ± 2,68	55,24 ± 3,28 *	56,46 ± 5,34 *
60 DIAS	10,61 ± 1,27	72,33 ± 14,10 **	44,42 ± 6,39 **
Proteinúria (mg/24h)	HT-CTL	HT-DIAB	HT-DIAB+MAC 25 mg
BASAL	8,79 ± 2,20	6,29 ± 1,21	10,04 ± 1,12
30 DIAS	12,85 ± 1,28	36,71 ± 4,89 *	29,81 ± 4,00 *
60 DIAS	10,97 ± 2,17	30,02 ± 3,58 **	21,40 ± 4,79 ** ††

Os dados são relatados como médias ± DP. O nível de significância para a hipótese nula foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). (\*) comparado ao grupo HT-CTL aos 30 dias; (†) comparado ao grupo HT-DIAB aos 30 dias; (\*\*) comparado ao grupo HT-CTL aos 60 dias; e (††) comparado ao grupo HT-DIAB aos 60 dias (ANOVA seguida de Teste post-hoc de Tukey). N = 10 por grupo.

Não houve diferença na PAS dos grupos HT-DIAB e HT-DIAB+MAC25 em relação ao grupo HT-CTL dentro de seus respectivos períodos experimentais. Houve aumento da glicemia em todos os grupos experimentais após 30 e 60 dias de estudo em relação aos níveis observados no grupo HT-CTL.

Todos os grupos experimentais exibiram aumento na diurese com 30 e 60 dias de estudo em relação ao grupo HT-CTL.

O grupo HT-DIAB apresentou aumento significativo da creatinina e ureia plasmáticas em relação ao grupo

HT-CTL aos 60 dias de estudo. Notadamente, a creatinina e a ureia plasmáticas dos ratos do grupo HT-DIAB+MAC25 aos 30 e 60 dias de estudo não foram estatisticamente diferentes dos valores vistos no grupo HT-CTL.

A função tubular renal foi avaliada através da excreção de sódio. Em todos os grupos experimentais observamos aumento na excreção de sódio aos 30 e 60 dias em comparação aos valores observados no grupo HT-CTL. Não houve diferença estatística na excreção de sódio entre os ratos diabéticos tratados ou não com macitentan.

Observamos um aumento significativo na excreção urinária de proteínas no grupo HT-DIAB em comparação ao grupo HT-CTL em todos os períodos experimentais. O grupo HT-DIAB+MAC25 também apresentou elevação na proteinúria aos 30 e 60 dias em relação ao grupo HT-CTL. Contudo, os ratos diabéticos tratados com macitentan exibiram diminuição significativa da proteinúria em comparação ao grupo HT-DIAB aos 60 dias de estudo, sugerindo melhora na função da barreira de filtração renal.

A imunocoloração para ET-1 e NGAL aos 60 dias é exibida na Figura 1. Observamos aumento na marcação de ET-1 e NGAL no grupo HT-DIAB em relação ao grupo HT-CTL e diminuição quando comparamos os grupos HT-DIAB+MAC25 e HT-DIAB. O macitentan atenuou a elevação da ET-1 e da NGAL (marcador de lesão renal), corroborando a hipótese de efeito renal benéfico.

A Figura 1 exibe a marcação para catalase aos 60 dias. Observamos que no grupo HT-DIAB não houve estimulação da expressão dessa enzima antioxidante. Contudo, o grupo HT-DIAB+MAC25 exibiu aumento da catalase em relação aos grupos HT-CTL e HT-DIAB, sugerindo a presença de potencial antioxidante para o macitentan.

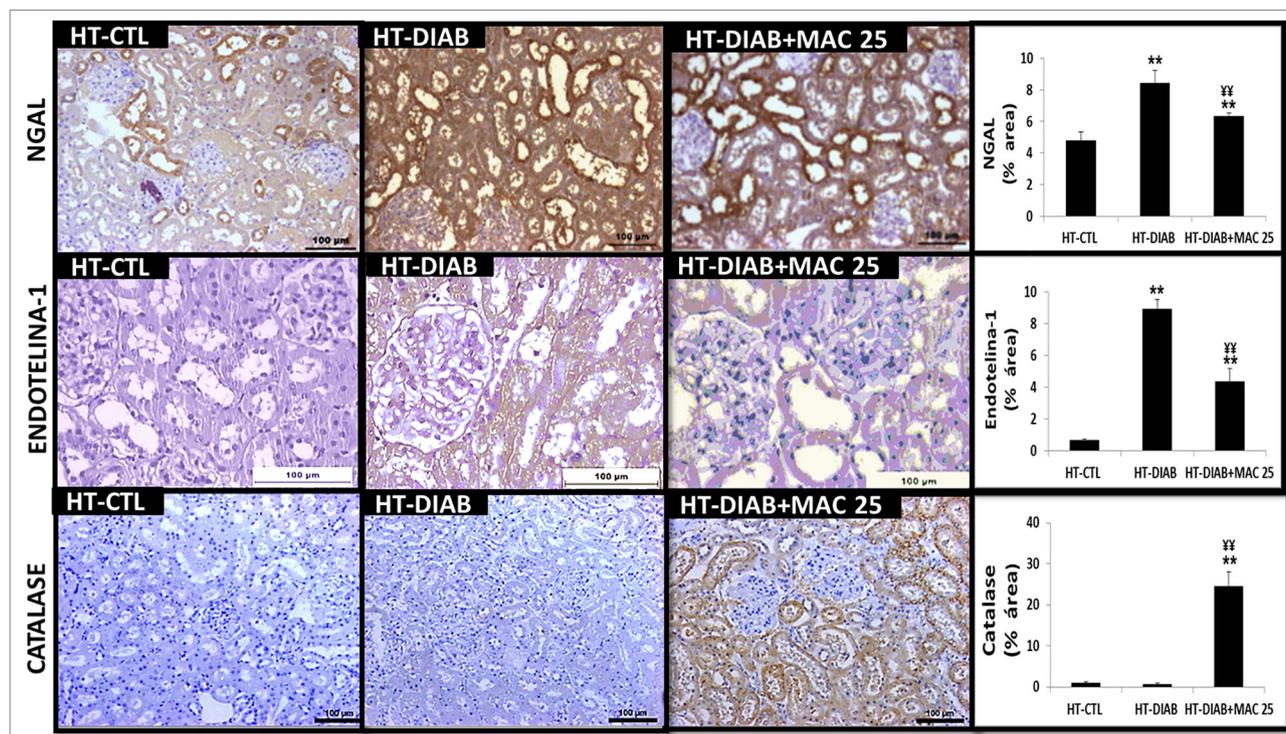
A Figura 2 analisa o SRA por meio da expressão proteica e suas respectivas quantificações gráficas. Foi observado aumento na produção de angiotensina II no grupo HT-DIAB. O grupo HT-DIAB+MAC25, em que foi notada redução da produção de ET-1, demonstrou aumento nas expressões de renina e angiotensina II.

A Figura 3A exibe os níveis urinários de peroxidação lipídica (TBARS). Houve aumento na peroxidação lipídica no grupo HT-DIAB aos 30 dias em relação ao grupo HT-CTL. Por outro lado, no grupo HT-DIAB+MAC25 a peroxidação lipídica não foi estatisticamente diferente quando comparada ao grupo HT-CTL em todos os períodos experimentais.

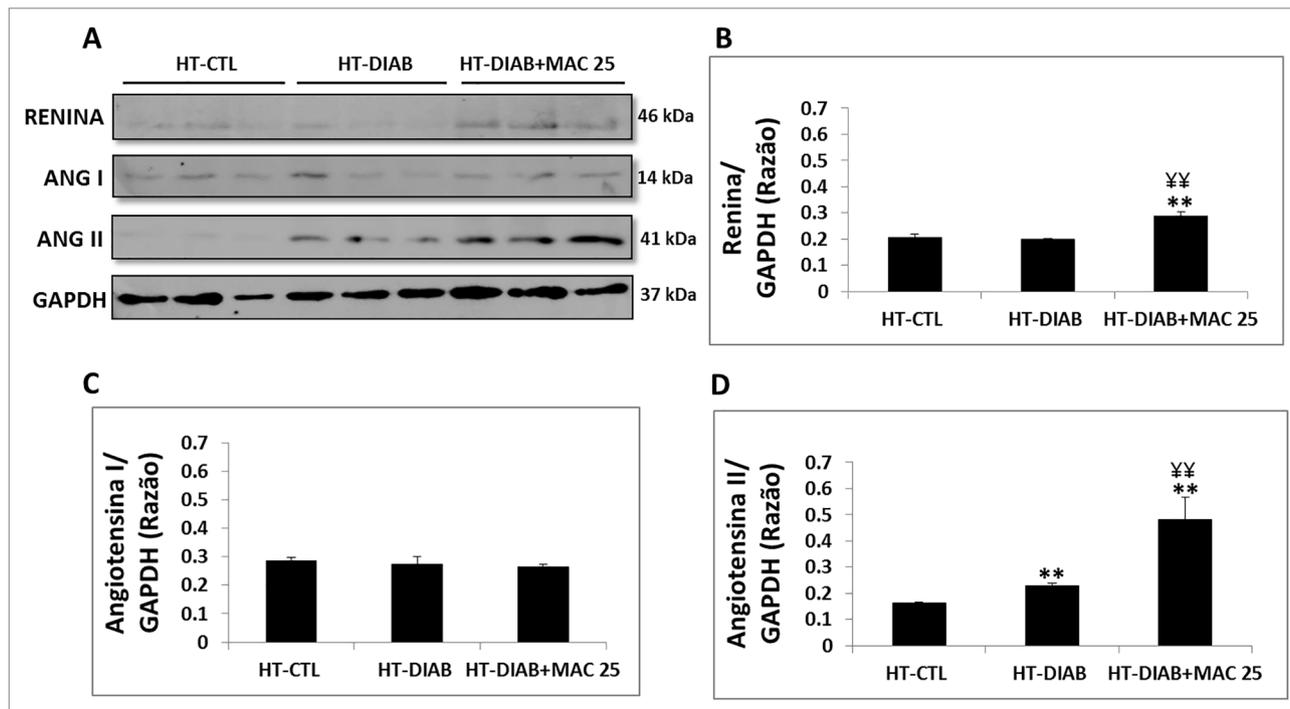
Houve aumento nos hidroperóxidos urinários (Figura 3B) avaliados por FOX-2 no grupo HT-DIAB aos 30 e 60 dias, mas no grupo HT-DIAB+MAC25 tal elevação foi observada apenas aos 30 dias. Além disso, aos 60 dias o grupo HT-DIAB+MAC25 exibiu níveis menores do que o grupo controle. Tal resultado sugere, novamente, o potencial efeito antioxidante do macitentan.

A Figura 3C analisa os níveis urinários de NO. Apesar da tendência indicativa de aumento, os níveis urinários de NO identificados no grupo HT-DIAB não foram estatisticamente diferentes dos níveis encontrados no grupo HT-CTL aos 30 e 60 dias. Contudo, o

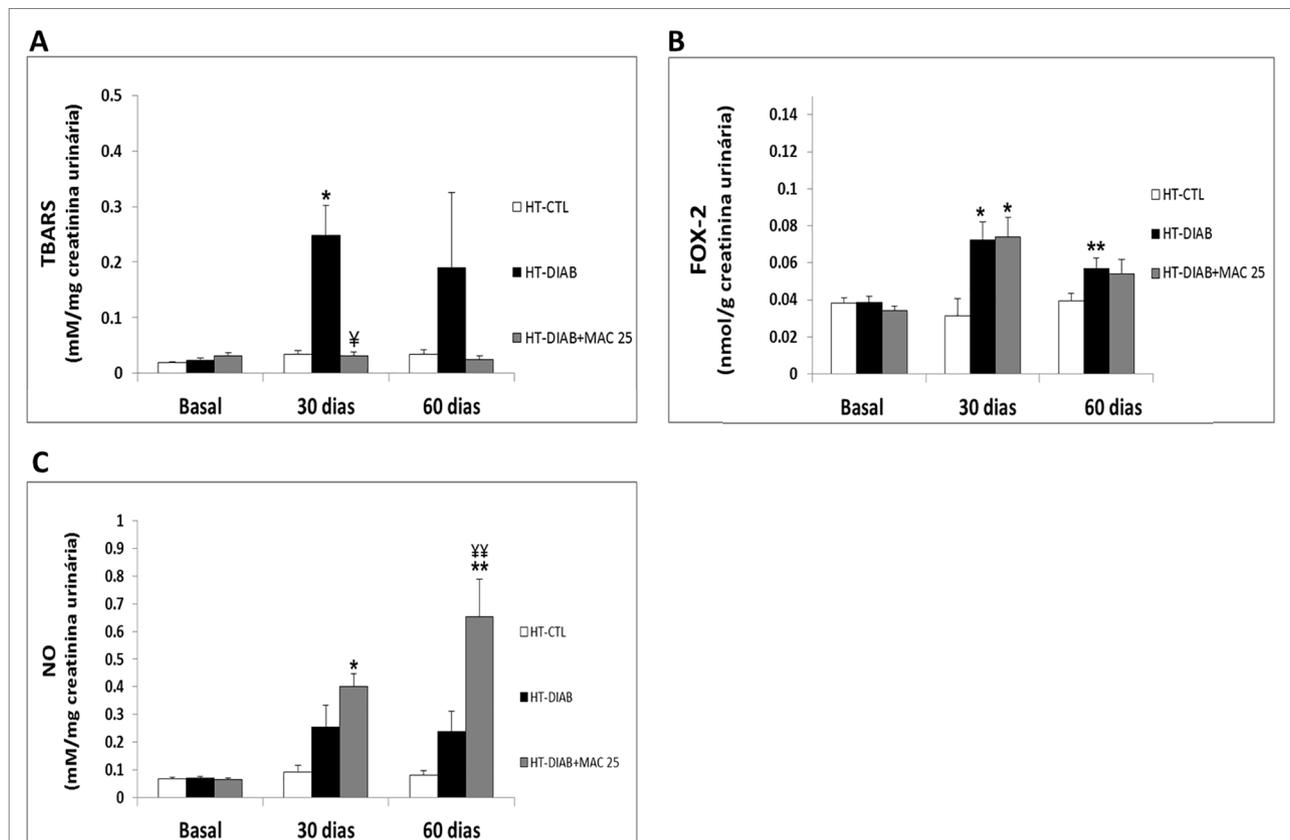
**Figura 1.** Microscopia óptica de cortes renais imunocorados. A: Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL 200x), endotelina-1 (ET-1, 200x) e catalase (200x) em ratos geneticamente hipertensos nos grupos controle (HT-CTL), hipertensos e hiperglicêmicos (HT-DIAB) e hipertensos e hiperglicêmicos tratados com macitentan (HT-DIAB+MAC25) após 60 dias de estudo (último dia do experimento). B: Análises quantitativas de cortes renais corados para NGAL, ET-1 e catalase. Os dados são reportados em valores percentuais. O nível de significância para a hipótese nula foi estabelecido em 5%. \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-CTL aos 60 dias e \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-DIAB aos 60 dias (ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey). N = 10 por grupo.



**Figura 2.** Análise de renina, angiotensina I (ANG I) e angiotensina II (ANG II). A: Imagem de Western blot do córtex renal de ratos geneticamente hipertensos (REH) nos grupos controle (HT-CTL), hipertensos e hiperglicêmicos (HT-DIAB) e hipertensos e hiperglicêmicos tratados com macitentan (HT-DIAB+MAC25) aos 60 dias (último dia do experimento). B, C e D: análises quantitativas de imagens do imunoblot obtidas pelo software ImageJ. Os dados são relatados como médias  $\pm$  DP. O nível de significância para a hipótese nula foi estabelecido em 5%. \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-CTL aos 60 dias e \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-DIAB aos 60 dias (ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey). N = 10 por grupo.



**Figura 3.** Análise da formação de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio. A: Análises quantitativas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). B: O hidropéroxido urinário foi determinado pelo método da oxidação do ferro pelo laranja de xilenol versão 2 (FOX-2). C: Óxido nítrico (NO) em ratos geneticamente hipertensos nos grupos controle (HT-CTL), hipertensos e hiperglicêmicos (HT-DIAB) e hipertensos tratados com macitentan (HT-DIAB+MAC25) no início e aos 30 e 60 dias de estudo. Os dados são relatados como médias  $\pm$  DP. O nível de significância para a hipótese nula foi estabelecido em 5%. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-CTL aos 30 dias; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-DIAB aos 30 dias, \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-CTL aos 60 dias e \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo HT-DIAB aos 60 dias (ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey). N = 10 por grupo.



grupo tratado com macitentan apresentou aumento significativo da concentração urinária de NO em relação ao grupo HT-CTL aos 30 e 60 dias. Uma vez que a lesão renal determinada pela NGAL (Figura 1) diminuiu no grupo tratado com 25 mg/kg de macitentan, o NO produzido pelo rim pode contribuir para a melhoria da insuficiência renal.

## DISCUSSÃO

Nosso modelo experimental utilizou ratos espontaneamente hipertensos com hiperglicemia induzida por estreptozotocina. Esse modelo foi escolhido porque a coexistência de DM e hipertensão arterial sistêmica (HAS) eleva o risco para insuficiência renal crônica. Nosso modelo experimental possui características muito semelhantes à nefropatia diabética em humanos.

Observamos sinais de diabetes, incluindo glicemia elevada, poliúria (devido à diurese osmótica induzida pela hiperglicemia) e diminuição do peso corporal. Juntamente com a elevação da pressão arterial sistólica, esses parâmetros levam a perda progressiva da função renal. Identificamos proteinúria, aumento da excreção de sódio e aumento de creatinina e ureia nos ratos hipertensos e hiperglicêmicos.

A NGAL é um biomarcador diagnóstico e prognóstico confiável para insuficiência renal aguda (IRA), pois seus níveis se elevam 2h após a lesão renal. Além disso, estudos demonstraram que os níveis de NGAL nos grupos com IRA e DRC estável são superiores aos dos grupos controle<sup>34-36</sup>, o que corrobora nossos resultados, uma vez que houve aumento da NGAL nos ratos hipertensos e hiperglicêmicos aos 60 dias.

Estudos recentes demonstraram o papel da ET-1 na fase inicial da ND. Mais especificamente, a expressão dos receptores da ET-1 pode ser estimulada pela hiperglicemia<sup>37</sup>. Os rins são um local essencial em sua produção. A ET-1 causa aumento da resistência vascular renal, redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, além de inibição da reabsorção de sais e água<sup>37</sup>.

Ao mesmo tempo, o SRA também tem papel ativo na gênese e progressão da ND. Evidências indicam a existência de uma interação entre a ET-1 e outras substâncias vasoativas, como a angiotensina II<sup>38</sup>.

Nossos resultados demonstram que os rins de ratos hipertensos e hiperglicêmicos apresentaram estimulação por angiotensina II e ET-1, confirmando

a participação dos respectivos mediadores de inflamação e disfunção endotelial.

O estresse oxidativo e nitrosativo desempenha um papel importante na progressão do diabetes<sup>39,40</sup>. Os ratos hipertensos e hiperglicêmicos de nosso estudo exibiram aumento nos níveis de peroxidação lipídica renal, peróxidos urinários e NO.

Uma vez que a ET-1 desempenha um importante papel na progressão do diabetes, o presente estudo teve como objetivo testar as possíveis contribuições do macitentan, um antagonista não-seletivo dos receptores ETA e ETB aprovado pelo FDA em 2014. Contudo, outros antagonistas seletivos da ET-1 têm sido utilizados na prevenção da nefropatia diabética, mesmo em ensaios clínicos<sup>22</sup>. O macitentan foi estudado na lesão renal induzida por hiperglicemia em modelos de ratos com diabetes tipo 2<sup>41</sup>, mas dado que hipertensão e diabetes são fatores de risco de peso para doença renal crônica, nosso estudo avaliou o efeito do antagonista da ET-1 sobre a função renal de ratos concomitantemente hipertensos e diabéticos.

A dose de macitentan utilizada em nosso estudo é compatível com os regimes adotados em outros estudos<sup>41,42</sup>. Inicialmente, observamos que os ratos hipertensos e hiperglicêmicos tratados com 25 mg/kg de macitentan não exibiram elevação significativa da concentração de creatinina e ureia plasmáticas e tampouco aumento na excreção de proteínas. Tais resultados, juntamente com a diminuição da expressão de NGAL, sugerem melhora da função renal.

A ET-1 promove a natriurese agindo nas células dos dutos coletores via receptores ETB<sup>43</sup>. No entanto, não observamos diminuição significativa da excreção de sódio nos ratos hipertensos e hiperglicêmicos tratados com macitentan. Uma possível explicação é a seletividade aproximadamente 50 vezes maior do macitentan para o receptor ETA<sup>42</sup>, o que faria com que os efeitos da ET-1 mediados pelo receptor ETB, como a natriurese, fossem pelo menos em parte preservados.

Para confirmar o efeito do macitentan sobre os rins, analisamos a marcação para ET-1 e confirmamos que houve diminuição da marcação no tecido renal dos ratos hipertensos e hiperglicêmicos tratados com macitentan. Este resultado demonstrou que o bloqueio dos receptores da ET-1 reduziu a produção do agente vasoconstritor.

A ET-1 reduz a taxa de filtração glomerular ao promover a contração das arteríolas aferentes

e eferentes. Portanto, o bloqueio da ET-1 pode parcialmente explicar a melhora da função renal. Contudo, em nossas condições experimentais observamos que o bloqueio dos receptores da ET-1 elevou a produção de angiotensina II no tecido renal, o que poderia neutralizar o bloqueio dos receptores da ET-1 por meio da ação sobre seu receptor AT1, promovendo vasoconstrição arteriolar.

Outra hipótese é que o NO pode atuar como um antagonista funcional da angiotensina II, inibindo a vasoconstrição nas arteríolas glomerulares<sup>44,45</sup>. A administração de macitentan em ratos hipertensos e hiperglicêmicos aumentou ainda mais a excreção urinária de NO (165%). Esse aumento na produção de NO pode explicar, pelo menos parcialmente, o aprimoramento da função renal indicado pela melhora do fluxo sanguíneo renal por meio do efeito vasodilatador do NO. Estudos em rins de coelhos demonstraram que a ET-1 estimula a produção de NO através da ativação dos receptores ETB<sup>46</sup>. Dado que o macitentan é mais seletivo para o receptor ETA, o aumento na diurese e na excreção pode se dever à ação do receptor ETB<sup>42,43</sup>.

Curiosamente, o macitentan estimulou a expressão da catalase, uma importante enzima antioxidante. O aumento da peroxidação lipídica e dos hidroperóxidos urinários foi evitado pelo tratamento com MAC, sugerindo que o hidroperóxido foi degradado pela enzima catalase em água e oxigênio<sup>47</sup>.

## CONCLUSÃO

Observamos que o macitentan (25 mg/kg) inibiu a progressão da lesão renal induzida por hiperglicemia e hipertensão em ratos, possivelmente por potencializar as defesas antioxidantes e evitar o aumento do estresse oxidativo. Uma limitação do nosso trabalho é a falta de marcadores mais específicos de função renal. Contudo, os marcadores utilizados no presente estudo são os mesmos atualmente utilizados na prática clínica. Em conclusão, o bloqueio dos receptores da ET-1 com macitentan pode ser uma alternativa viável na prevenção da ND em ratos hiperglicêmicos e hipertensos. A intervenção com o macitentan deve ser confirmada em ensaios clínicos com humanos.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho recebeu apoio financeiro das seguintes instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq);

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP); Fundação Oswaldo Ramos (FOR); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/0945-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

AC, EAP e AA conduziram os experimentos. AC e FTB delinearão o protocolo experimental. AC, MBC e FTB redigiram o manuscrito. NS realizou a avaliação crítica dos resultados e revisou o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

## CONFLITO DE INTERESSES

Não auferimos incentivo financeiro comercial direto ou indireto associado à publicação deste artigo. Os autores não têm conflitos de interesse a declarar. As fontes de financiamento extra-institucionais estão indicadas no manuscrito.

## REFERÊNCIAS

1. Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005 Apr;67(Suppl 94):S14-S18. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.09403.x
2. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet.* 2013 Jul;382(9888):260-272. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X
3. Hernandez GT, Nasri H. World Kidney Day 2014: increasing awareness of chronic kidney disease and aging. *J Renal Inj Prev.* 2014;3(1):3-4. DOI: 10.12861/jrip.2014.02
4. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* 2011 Jul;45(3):131-40. DOI: 10.1258/la.2010.010090
5. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal.* 1963;27(3):282-293. DOI: 10.1253/jcj.27.282
6. Cooper ME, Allen TJ, Macmillan P, Bach L, Jerums G, Doyle AE. Genetic hypertension accelerates nephropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Am J Hypertens.* 1988 Jan;1(1):5-10.
7. Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, Meyer P, Moreau P, Luscher TF. ETA receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 1998 Jan;31:499-504. DOI: 10.1161/01.HYP.31.1.499
8. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 2011 Jun;300(6):R1288-R1295. DOI: 10.1152/ajpregu.00397.2010
9. Kos I, Prkacin I. Diabetic nephropathy as a cause of chronic kidney disease. *Acta Med Croatica.* 2014 Dec;68(4-5):375-381.
10. CKD Work Group. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int (Suppl).* 2013 Jan;3:1-150.

11. Forte M, Nocella C, De Falco E, Palmerio S, Schirone L, Valenti V, et al. The Pathophysiological Role of NOX2 in Hypertension and Organ Damage. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2016 Dec;23(4):355-364. DOI: 10.1007/s40292-016-0175-y
12. Garrido AB, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Apr 29;302(2):148-158. DOI: 10.1016/j.mce.2008.11.003
13. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2014 May 19;20(17):2794-2814. DOI: 10.1089/ars.2013.5607
14. Boesen EI. Endothelin ETB receptor heterodimerization: beyond the ETA receptor. *Kidney Int.* 2008 Sep 2;74(6):693-694. DOI: 10.1038/ki.2008.324
15. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ETA and ETB receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007 Feb 10;47:731-759. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105134
16. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016 Apr;68(2):357-418. DOI: 10.1124/pr.115.011833
17. Ruggenenti P, Porrini EL, Gaspari F, Motterlini N, Cannata A, Carrara F, et al. Glomerular hyperfiltration and renal disease progression in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012 Oct;35(10):2061-2068. DOI: 10.2337/dc11-2189
18. Kohan DE, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014 Nov;86(5):896-904. DOI: 10.1038/ki.2014.143
19. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Sep 29;238(3):861-865. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7394
20. Lin YJ, Kwok CF, Juan CC, Hsu YP, Shih KC, Chen CC, et al. Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 22;451(2):263-269. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.07.119
21. Rossi GP, Ganzaroli C, Cesari M, Maresca A, Plebani M, Nussdorfer GG, et al. Endothelin receptor blockade lowers plasma aldosterone levels via different mechanisms in primary aldosteronism and high-to-normal renin hypertension. *Cardiovasc Res.* 2003 Jan;57(1):277-283. DOI: 10.1016/S0008-6363(02)00658-2
22. Andress DL, Coll B, Pritchett Y, Brennan J, Molitch M, Kohan DE. Clinical efficacy of the selective endothelin A receptor antagonist, atrasentan, in patients with diabetes and chronic kidney disease (CKD). *Life Sci.* 2012 Oct;91(13-14):739-742. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.01.011
23. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29;369:809-818. DOI: 10.1056/NEJMoa1213917
24. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2002 Mar 21;346:896-903. DOI: 10.1056/NEJMoa012212
25. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA [Internet]. Brasília (DF): MCTIC; 2013 [access in 2017 mar 5]. Available from: <http://pages.cnpem.br/ceua/wp-content/uploads/sites/56/2015/06/DBCA.pdf>
26. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (BR). Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução normativa n. 30 de 2 de fevereiro de 2016. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. Diário oficial da União [Internet], Brasília (DF), 03 fev 2016; Seção 1: 3; [access in 2017 mar 5]. Available from: [https://ww2.icb.usp.br/icb/wp-content/uploads/bioterio\\_etica/RESOLUCAO\\_NOR\\_30.pdf](https://ww2.icb.usp.br/icb/wp-content/uploads/bioterio_etica/RESOLUCAO_NOR_30.pdf)
27. Taussky HH. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. *J Biol Chem.* 1954 Jun;208(2):853-61.
28. Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis.* Florida Publishers. 1985;9:435-449.
29. Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, Lustenberger P, Bernard S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. *Clin Chem.* 1989 Nov;35(11):2233-6.
30. Beuge JA, Aust S. The thiobarbituric acid assay. *Method Enzym.* 1978 Jan;52:306-307.
31. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for mensurament of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 1994;233:182-189. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33021-2
32. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.* 2005;39(8):797-815. DOI: 10.1080/10715760500053651
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
34. Avci Çiçek E, Rota S, Dursun B, Kavalci E. Evaluation of serum NGAL and hepcidin levels in chronic kidney disease patients. *Ren Fail.* 2016;38(1):35-39. DOI: 10.3109/0886022X.2015.1107823
35. Bolognani D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb;4(2):337-44.
36. Ozkan S, Durukan P, Kavalci C, Duman A, Sayhan MB, Salt O, et al. Importance of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in differential diagnosis of acute and chronic renal failure. *Iran Red Crescent Med J.* 2014 Aug;16(8):e14133. DOI: 10.5812/ircmj.14133
37. Zanatta CM, Canani LH, Silveiro SP, Burtet L, Nabinger G, Gross JL. Endothelin system function in diabetic nephropathy. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008 Jun;52(4):581-588. DOI: 10.1590/S0004-27302008000400003
38. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J clin invest.* 1993 Jul 1;92(1):398-403. DOI: 10.1172/JCI116579
39. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J.* 2015 Mar 21;24(5):547-553. DOI: 10.1016/j.jsps.2015.03.013
40. Chan GC, Tang SC. Diabetic nephropathy: landmark clinical trials and tribulations. *Nephrol Dial Transplant.* 2016 Mar;31(3):359-368. DOI: 10.1093/ndt/gfu411
41. Sen S, Chen S, Feng B, Iglarz M, Chakrabarti S. Renal, retinal and cardiac changes in type 2 diabetes are attenuated by macitentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Life Sci.* 2012 Oct;91(13-14):658-668. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.03.032
42. Iglarz M, Binkert C, Morrison K, Fischli W, Gatfield J, Treiber A, et al. Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2008 Dec;327(3):736-745. DOI: 10.1124/jpet.108.142976
43. Bugaj V, Mironova E, Kohan DE, Stockand JD. Collecting duct-specific endothelin B receptor knockout increases ENaC activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Jan 1;302(1):188-194. DOI: 10.1152/ajpcell.00301.2011
44. Rabelink TJ, Bakris GL. The rennin-angiotensin system in diabetic nephropathy: the endothelial connection. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24:381-388. DOI: 10.1159/000057399
45. Salgado PPCA, Santos Júnior ACS, Oliveira MM, Penido MG, Santana NF, Silva ACS. Fisiopatologia da nefropatia diabética. *Revista Med Minas Gerais.* 2004;14(3):180-5.

46. D'Orléans-Juste P, Claing A, Télémaque S, Maurice MC, Yano M, Gratton JP. Block of endothelin-1-induced release of thromboxane A2 from the guinea pig lung and nitric oxide from the rabbit kidney by a selective ETB receptor antagonist, BQ-788. *Br J Pharmacol.* 1994 Dec;113(4):1257-62. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb17133.x/full
47. Chen H, Li X, Epstein PN. MnSOD and Catalase Transgenes Demonstrate That Protection of Islets From Oxidative Stress Does Not Alter Cytokine Toxicity. *Diabetes.* 2005 May;54(5):1437-1446.