



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Bioquímica

Departamento de Fisiología

EVALUACIÓN DEL EFECTO RENOPROTECTOR DE
ANGIOTENSINA(1-7) EN INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los
requisitos para optar al Grado de Magíster en Bioquímica

Por

JUAN CARLOS F. RIVERA CAMAÑO

Tutores

Dra. Victoria Velarde Aliaga

Dr. Carlos P. Vio Lagos

Diciembre, 2014



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Bioquímica

EVALUACIÓN DEL EFECTO RENOPROTECTOR DE
ANGIOTENSINA(1-7) EN INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

Tesis presentada a la Pontificia Universidad Católica de Chile como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en Bioquímica

Por

JUAN CARLOS F. RIVERA CAMAÑO

Director de Tesis:

Dra. Victoria Velarde Aliaga
Dr. Carlos P. Vio Lagos

Comisión de Tesis:

Dr. Mauricio Lima A.
Dr. Mauricio Boric P.
Dra. Sandra Villanueva M.

Diciembre, 2014

AGRADECIMIENTOS

Al final de este ciclo, quisiera agradecer a quienes me han apoyado durante este proceso. En primera instancia a mi tutora de tesis, la Dra. Victoria Velarde Aliaga por el constante apoyo, enseñarme y su envidiable paciencia durante todo este tiempo, donde nunca me dejó abandonar esta etapa. Además, al Dr. Carlos Vio Lagos por aceptarme en su laboratorio, su paciencia y el apoyo económico que me permitió mantenerme mientras estudiaba.

Además, quiero agradecer a mis amigos y compañeros de laboratorio, Carlos y José Miguel ("Los Gorditos"), con los que pasé grandes momentos de diversión y risas, los innumerables desayunos para comenzar el día, la constante ayuda tanto teórica como práctica en el desarrollo de mi tesis, y por supuesto todas las canas que me hicieron salir cuando me hacían rabear. Paralelamente, quisiera agradecer a la Sra. María y Cathy por su ayudarme cada vez que lo necesité.

Por último, quisiera agradecer y dedicar esta tesis a mi familia; a mis padres, tíos y hermana (mi núcleo familiar), que a pesar de que no estar conmigo en el día a día, siempre han sido un pilar fundamental y han creído incondicionalmente en mí.

Gracias.

INDICE DE MATERIAS

	AGRADECIMIENTOS	3
	INDICE DE MATERIAS	4
	INDICE DE FIGURAS	6
	INDICE DE TABLAS	7
	ABREVIATURAS	8
	RESUMEN	10
	ABSTRACT	11
1	INTRODUCCION	12
1.1	Renoprotección de Angiotensina(1-7)-receptor Mas en daño renal crónico	16
2	HIPOTESIS	20
2.1	Objetivo General	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIALES Y METODOS	21
3.1	Animales	21
3.2	Diseño Experimental	21
3.3	Infusión Subcutánea	22
3.4	Nefrectomía 5/6	22
3.5	Determinaciones sistémicas y función renal	23
3.6	Análisis morfológico e Inmunohistoquímica	24

3.7	Anticuerpos	25
3.8	Análisis morfométrico	26
3.9	<i>Western Blot</i>	27
3.10	Estadística	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Cambios sistémicos en CKD	29
4.2	Cambios renales generales en CKD	32
4.3	Análisis de función renal	32
4.4	Daño morfológico túbulo-intersticial	39
4.5	Inflamación y daño tubular	42
4.6	Cuantificación de fibrosis	46
4.7	Cuantificación de los receptores AT1 y Mas	52
5	DISCUSION	54
	CONCLUSIONES	61
6	BIBLIOGRAFIA	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Análisis función renal: Creatininemia y depuración de creatinina	34
Figura 2	Análisis función renal: FE K y FE Na	36
Figura 3	Análisis función renal: Proteinuria y relación proteinuria/creatininuria	38
Figura 4	Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de hematoxilina eosina	40
Figura 5	Infiltración por macrófagos ED-1	43
Figura 6	Tinción para el factor quimioatrayente OPN	45
Figura 7	Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de inmunohistoquímica para α -SMA	47
Figura 8	Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de picro sirius	48
Figura 9	Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de inmunohistoquímica para colágeno III	50
Figura 10	Niveles proteicos de FN	51
Figura 11	Niveles proteicos de AT1 y Mas	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Hemodiálisis crónica en Chile	12
Tabla 2	Datos sistémicos y renales generales	31
Tabla 3	Análisis morfológico	41

ABREVIATURAS

α -SMA:	Alfa actina de músculo liso
Ang(1-7):	Angiotensina(1-7)
Ang I:	Angiotensina I
Ang II:	Angiotensina II
ARB:	Bloqueador del receptor tipo 1 de angiotensina II
AT1:	Receptor de Angiotensina tipo 1
CCr:	Clearance de creatinina
CKD:	Insuficiencia renal crónica, del inglés <i>Chronic Kidney Disease</i>
DOCA:	Acetato de desoxi corticosterona
ECA:	Enzima convertidora de angiotensina
ECAi:	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
FN:	Fibronectina
HE:	Hematoxilina Eosina
HT:	Hipertensión
IHQ:	Inmunohistoquímica
KO:	<i>Knock out</i>
MEC:	Matriz extracelular
NF κ B:	Factor de transcripción nuclear κ B
Nx 5/6:	Nefrectomía 5/6
OPN:	Osteopontina
PAP:	Peroxidasa anti-peroxidasa

PAS:	Presión arterial sistólica
PRI:	Peso riñón izquierdo
PS:	Picrosirio
RPA:	Ensayo de protección de RNAsa
RPC:	Razón proteinuria/creatininuria
SBP:	presión sistólica, del inglés <i>systolic blood pressure</i>
SD:	Sprague Dawley
SRA:	Sistema renina angiotensina
TBS:	Solución salina, amortiguada de tris
TTBS:	Solución salina, amortiguada de tris con Tween-20
Tg:	Transgénica
TI:	Túbulo-intersticio
VFG:	Velocidad de filtración glomerular
WT:	<i>Wild type</i>

RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (CKD) es un problema de salud pública a nivel mundial, que conduce a enfermedades cardiovasculares en estados avanzados y a la muerte de los pacientes. Angiotensina(1-7) (Ang(1-7)) un péptido del sistema renina angiotensina que actúa a través del receptor Mas, tiene efectos opuestos a angiotensina II, tales como disminución de la presión arterial, efectos anti-inflamatorios y anti-proliferativos. Debido a que angiotensina II está incrementada en la CKD, nosotros proponemos que la activación del receptor Mas por Ang(1-7) reduce la progresión de la CKD.

La CKD fue inducida en ratas macho Sprague Dawley. Tres semanas después, los animales recibieron los siguientes tratamientos: CKD+Ang(1-7) (6 µg/kg/h), CKD+A779 (antagonista del receptor Mas) (2 µg/kg/h), CKD+Ang(1-7)+A779, más un grupo CKD y otro *sham*; las drogas se administraron a través de bombas osmóticas. Se analizó la presión arterial sistólica (PAS), en tanto, la función renal fue evaluada a través de la creatinina plasmática, clearance de creatinina (CCr), proteinuria y la razón proteinuria/creatininuria (RPC). El daño morfológico se analizó por el Score túbulo-intersticial con tinción hematoxilina-eosina para la dilatación tubular, depósito de proteína tubular e infiltrado túbulo-intersticial. Colágeno III, miofibroblastos, macrófagos ED-1 (+) y osteopontina por inmunohistoquímica. La expresión de la proteína de fibronectina, el receptor AT1 y Mas se midió mediante *western blot*.

La PAS, FE de K⁺ y Na⁺ mostraron una tendencia a reducirse con Ang(1-7) en relación a las ratas con CKD, otros parámetros como CCr, proteinuria y la RPC se normalizaron en CKD+Ang(1-7) comparado con CKD. El daño morfológico fue menor en CKD+Ang(1-7), en contraste con CKD donde se observó el mayor daño. La expresión de fibronectina aumentó en CKD+A779, y se mantuvo en niveles bajos en CKD+Ang(1-7) comparado con el *sham*. La expresión de los receptores AT1 y Mas no se modificó en ninguno de los grupos.

Estos resultados sugieren que Ang(1-7) posee un efecto protector en el riñón, siendo gran parte de estos efectos no mediados por el receptor Mas.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a public health problem worldwide, that produces cardiovascular abnormalities in advanced stages leading to patient's death. Angiotensin(1-7) (Ang(1-7)), a peptide of the renin angiotensin system that acts through its Mas receptor, presents opposite effects to Angiotensin II, such as decreasing blood pressure, anti-inflammatory and antiproliferative. Considering that Angiotensin II is increased in CKD, we propose that activation of the Mas receptor by Ang(1-7) reduces the progression of CKD.

CKD was induced in male Sprague Dawley rats. Three weeks later, animals received different treatments: CKD+Ang(1-7) (6 µg/kg/h), CKD+A779 (Mas receptor antagonist) (2 µg/kg/h), CKD+Ang(1-7)+A779, plus CKD and sham; drugs were administered through osmotic pumps. It was evaluated systolic blood pressure (SBP); renal function was measured by plasma creatinine, creatinine clearance (CCr), urinary protein and the urinary protein/creatinine ratio (ACR). The morphological damage was analyzed by tubulointerstitial score with hematoxylin-eosin staining tubular dilatation, protein cast and tubulointerstitial infiltrate. Collagen III, myofibroblast, macrophages ED-1 (+) and osteopontin were analyzed by immunohistochemistry. Extracellular matrix protein fibronectin, AT1 and Mas receptor expression were measured by Western blot.

PAS, FE K⁺ and Na⁺ tended to be lower by Ang(1-7) relative to rats with CKD, other parameters such as CCr, proteinuria, and the PRC were normalized in CKD+Ang(1-7) compared to CKD. The morphological damage were reduced in CKD+Ang(1-7), in contrast to CKD where the most damage was observed. Fibronectin expression increased in CKD+A779, and maintained low in CKD+Ang(1-7) compared with sham. Expression of AT1 and Mas did not change in either group.

These results suggest that Ang (1-7) has a protective effect on the kidney, and some of these effects are not mediated by the Mas receptor.

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal crónica (CKD, del inglés Chronic Kidney Disease) se define como *“cualquier daño renal o decaimiento de la función renal (tasa de filtración glomerular (GFR)) por 3 o más meses, con implicaciones en la salud”* (Levey y cols. 2003). Internacionalmente, se considera un problema de salud pública con tasas crecientes cada año, siendo afectada el 11% de la población, en países desarrollados como Estados Unidos (Levey y cols. 2010b). Cuando la detección es en estados avanzados de la enfermedad y los pacientes no son tratados a tiempo, el desenlace es la diálisis, con una baja probabilidad de revertir el estado renal. En Chile, según los datos aportados por la Sociedad Chilena de Nefrología, el número de pacientes que se somete a hemodiálisis se ha incrementado sustancialmente desde el año 1994 (tabla 1).

Años	Región Metropolitana	Región Valparaíso	Resto Regiones	País
1994	356	250	166	(250)
1995	396	302	200	(288)
1996	432	342	249	(327)
1997	456	381	282	(355)
1998	478	420	298	(383)
1999	524	477	328	(423)
2000	568	563	377	(473)
2001	596	566	419	(506)
2002	661	674	467	(561)
2003	700	713	488	(592)
2004	722	773	564	(648)
2005	745	799	634	(685)
2006	777	801	660	(712)
2007	821	846	701	(754)
2008	883	835	751	(811)
2009	927	882	798	(857)
2010	961	939	851	(904)
2011	997	956	900	(944)

Tabla 1. Hemodiálisis crónica en Chile. Pacientes por millón según regiones y año, adaptado de XXXI Cuenta de hemodiálisis crónica (HDC) en Chile (Poblete 2011).

Durante el periodo 2011, 16.231 pacientes se sometieron a este proceso, con una tasa de mortalidad del 11,1% (1.766 pacientes). Del total de pacientes que se somete a diálisis, el 99,5% concurre 3 veces por semana (Poblete 2011). Además, los cuidados que deben recibir, demandan un alto costo no solo económico para el sistema de salud y el propio paciente, sino que también físico y psicológico, que impacta directamente sobre la calidad de vida del paciente y de su familia. Las principales características clínicas y de laboratorio que acompañan el daño renal, y que ayudan a establecer el diagnóstico son la hipertensión arterial, disminución de la función renal medida a través del *clearance* de creatinina y el aumento de la excreción de proteínas por la orina (Griffin y Bidani 2006), la que está directamente relacionada con el nivel de daño alcanzado, siendo de gran importancia en el pronóstico de la enfermedad (Levey y cols. 2010a; Levey y cols. 2003; Levey y cols. 2005).

El daño renal se manifiesta con una evidente alteración funcional como se ha mencionado previamente, la que clínicamente ayuda a categorizar la enfermedad, y también se acompaña de un daño estructural progresivo e irreversible denominado fibrosis túbulo-intersticial (FTI). Los procesos fibróticos, acompañan gran parte de las enfermedades crónicas, siendo su estudio de alta importancia, debido a que alrededor del 45% de las muertes que ocurren en países desarrollados se producen por este tipo de procesos (Wynn 2008). La fibrosis tanto en el riñón, como en otros órganos, se desarrolla de forma constante a lo largo de la enfermedad. Esto se debe a que se produce un daño reiterativo, que determina un proceso que es acompañado de eventos complejos en el que participan distintos mediadores, vías de señalización y estirpes celulares. En un principio se produce inflamación del túbulo-intersticio (TI) que posteriormente evoluciona con un proceso cicatrizante que desplaza el tejido normal provocando el daño funcional y reiterando la progresión. Los principales eventos de este proceso fibrótico son: 1) infiltración de células

inflamatorias, 2) activación de fibroblastos y expansión de la matriz extracelular (MEC) con producción y depósito en el TI, 3) atrofia tubular y rarefacción vascular (Liu 2011).

Un modelo de CKD utilizado para esta enfermedad es la nefrectomía 5/6 (Nx 5/6), que consiste en una reducción de la masa renal, llevada a cabo en 2 pasos (infarto renal y extirpación renal contralateral), dejando funcional finalmente sólo 1/6 de ambos riñones. En este modelo es posible observar los rasgos funcionales y estructurales característicos del daño del TI, además de hipertensión (HT). El nexo entre HT y CKD es Angiotensina II (Ang II), que es reconocida como un elemento fundamental en la progresión del daño renal en la CKD (Brewster y cols. 2004; Remuzzi y cols. 2005) y en particular, el sistema renina angiotensina (SRA) intrarrenal es fundamental en el desarrollo de HT sistémica (González-Villalobos y cols. 2011). Ang II, uno de los principales componentes del SRA es el encargado de regular la presión sanguínea a nivel renal (Kobori y cols. 2007). La acción del SRA se sobre-activa en la Nx 5/6, posterior a ligadura de 2 de las 3 ramas de la arteria renal que ingresan por el hilio al riñón. Simultáneamente se produce una sobrecarga mecánica del riñón remanente (Kobori y cols. 2007), y aumenta la expresión de Ang II, la cual actúa como un potente vasoconstrictor cuando interactúa con el receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) (Santos y cols. 2008). Esta interacción, en especial en el riñón, es la encargada de promover el desarrollo de HT (González-Villalobos y cols. 2011). Fisiológicamente, la Ang II actúa en las arteriolas eferentes provocando su contracción esto desencadena el aumento de la presión hidrostática intra-glomerular, incrementando la velocidad de filtración glomerular (VFG), perdiendo el grado de selectividad de la barrera de filtración y promoviendo la proteinuria (Remuzzi y cols. 2005). Ang II, también promueve los efectos pro-fibróticos, proliferativos e inflamatorios (Franco y cols. 2007; Ruperez y cols. 2003). El daño fibrótico estaría mediado por el factor nuclear kappa B (NF-κB) que por distintas vías, estimula la

fibrosis tisular del riñón (Bascands y Schanstra 2005; Klahr y Morrissey 2002). A su vez el proceso inflamatorio comienza con la infiltración del TI que se compone principalmente de células mononucleadas dentro de las que destacan los macrófagos ED-1. Se ha reportado que esta infiltración se intensifica fuertemente a los 14 días, y se acompaña de la presencia en el TI de miofibroblastos aislados o en grupos (Abbate y cols. 2002), y de un aumento significativo de la expresión del factor quimioatrayente osteopontina (OPN) (Thomas y cols. 1998). En otros modelos de daño renal e HT, la concentración intrarrenal de Ang II, se relaciona directamente con la infiltración de macrófagos ED-1 en el TI (Franco y cols. 2007).

En base a estos mecanismos, los tratamientos empleados actualmente para combatir la CKD corresponden a inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECAi) o bloqueadores de los receptores de Ang II (ARB), con lo que se obtiene un control de la presión arterial, pero no se puede detener la progresión del daño renal (Griffin y cols. 2006, Remuzzi y cols. 2005). Es por ello, que surge la necesidad de seguir buscando nuevas terapias que puedan mejorar el daño renal establecido, o permitan complementar las aproximaciones existentes.

1.1 Renoprotección de Angiotensina(1-7)-receptor Mas en daño renal crónico

Hace algunos años atrás, se descubrió un péptido derivado principalmente de Ang II constituido por sus 7 primeros aminoácidos por lo que se le denominó Angiotensina(1-7) (Ang(1-7)). Este péptido ha demostrado tener funciones opuestas a las que tiene Ang II (Santos y cols. 2008; Stegbauer y cols. 2004). Varias enzimas (prolil-endoropeptidasa, endopeptidasa neutra, prolil-caboxipeptidasa) pueden generar Ang(1-7), a partir de Ang I ó II (Santos y cols. 2008; Ferreira y Santos 2005). En los glomérulos renales Ang I se metaboliza mayormente a Ang(1-7) (Velez y cols. 2009) alcanzando concentraciones en plasma sanguíneo de 17 pg/ml aproximadamente, similar a la concentración de Ang II (Santiago y cols. 2010). Esta molécula se ve particularmente incrementada en individuos tratados con los ECAi, por dos vías, por un lado los ECAi incrementan los niveles de Ang I (precursor) que luego es transformada a Ang(1-7); por otra parte, disminuye la degradación de este heptapéptido por ECA (Campbell y cols. 1994; Santos y cols. 2001). De forma análoga, los ARB provocan una mayor disponibilidad de Ang II que también es un precursor de Ang(1-7) (Zong y cols. 2011).

Ang(1-7) ejerce su efecto mediante la unión y activación de un receptor diferente a los receptores AT₁ y AT₂ de Ang II esto se determinó al demostrar que antagonistas específicos para cada tipo de receptor de angiotensina no bloqueaban los efectos inducidos por Ang(1-7) (Tallant y cols. 1997). Además, en el año 1994 se utilizó el compuesto A779 con el que se logró bloquear los efectos producidos por Ang(1-7), en la diuresis y en presión arterial sin saber aún cuál era el receptor (Santos y cols. 1994). Posteriormente, utilizando A779 en

células CHO, se demostró que Ang(1-7) ejerce sus efectos a través del receptor Mas, resultando ser un antagonista específico para este receptor (Santos y cols. 2003).

El año 1986, Young y colaboradores observaron que los extremos amino y carboxilo terminal del receptor Mas presentaban propiedades hidrofílicas, caracterizándolo como un receptor con 7 dominios transmembrana. Además, lo catalogaron como un protooncogen en un ensayo de tumorigenicidad (Young y cols. 1986). Posteriormente, la caracterización del gen del receptor Mas en rata sugirió que podría tratarse de un receptor acoplado a proteína G (Young y cols. 1988). Este receptor se ha identificado por ensayo de protección de RNAasa (RPA) en diferentes tejidos de ratón (Metzger y cols. 1995) dentro de los cuales cerebro y testículos presentan la mayor expresión, mientras que, riñón y corazón tienen una menor cantidad. La alta expresión del receptor Mas en testículos fue analizada por hibridación *in situ* y entre los diferentes tipos celulares que constituyen el parénquima testicular, las células de Leydig fueron quienes exhibieron la mayor expresión, seguidas por las células de Sertoli (Alenina y cols. 2002). Mediante inmunofluorescencia, se identificó en neuronas del cerebro en ratas (Becker y cols. 2007), en células endoteliales de la aorta de bovinos (Tallant y cols. 1997), y en el aparato yuxtaglomerular, túbulo proximal cortical y túbulo colector del riñón de rata (Pinheiro y cols. 2009). Las vías de señalización a través de las cuales, el receptor Mas desencadena sus efectos, son demostrado en diferentes tipos celulares. En un modelo de aterosclerosis en endotelio, su activación produce un aumento de GMP cíclico (Stegbauer y cols. 2011); en células del corazón, es a través de la activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa/Akt (Shah y cols. 2010), en tanto que los niveles de calcio intracelular no se han vistos alterados (Dias-Peixoto y cols. 2008). Por otra parte, en células del túbulo proximal de riñón su activación estimula a *Src-homology 2 protein-tyrosine phosphatase 1 (SHP-1)*, que actúa inhibiendo la fosforilación de la proteína activada por mitógeno p38, en un modelo de

carga con glucosa (Gava y cols. 2009). En estos trabajos, las vías de señalización se ven bloqueadas con el uso del antagonista A779 sobre el receptor.

Los efectos que Ang(1-7) ejerce al unirse y activar al receptor Mas se han demostrado en diferentes órganos como en el pulmón, donde tiene efectos antifibróticos cuando este órgano es sometido a hipertensión; estos efectos son suprimidos al utilizar A779 (Shenoy y cols. 2010). En túbulos seminíferos, Ang(1-7) participa de la espermatogénesis, y el bloqueo del receptor Mas causa un aumento en la apoptosis de los espermatoцитos (Leal y cols. 2009). En el sistema cardiovascular varios estudios *in vitro* demuestran nuevamente efectos benéficos de Ang(1-7). Se ha visto que previene el aumento en el tamaño inducido por Ang II de los cardiomiocitos (Gomes y cols. 2010), y reduce la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (Giani y cols. 2010). En modelos *in vivo* con sobrecarga de fructosa, la administración de Ang(1-7) por bombas osmóticas durante 2 semanas reduce la fibrosis cardiaca (Giani y cols. 2010), además, induce la liberación del péptido natriurético auricular, con la consecuente prevención de hipertrofia cardiaca en ratas (Shah y cols. 2010), presentando una mayor resistencia a la hipertrofia cardiaca inducida por isoprotenerol. Por otra parte, se ha observado que ratas transgénicas (Tg) que sobreproducen Ang(1-7) y que presentan niveles plasmáticos del péptido incrementados, cuando son sometidas a un modelo de hipertensión que consiste en administrar sal y acetato de desoxicorticosterona (DOCA), presentan una presión arterial sistólica (PAS) y un desarrollo de fibrosis del ventrículo izquierdo menor que el observado en las ratas control tratadas solo con DOCA, (Santiago y cols. 2010). Pese a que la concentración plasmática de Ang(1-7) es aproximadamente dos veces mayor a la normal (Santos y cols. 2004), el análisis morfológico de estas ratas TG demuestra que este incremento no produce alteraciones en el riñón (Santiago y cols. 2010).

Ang(1-7) activando su receptor Mas, participa en la regulación de la homeostasis funcional y estructural renal. Así, produce un aumento de la eliminación de sodio, y un efecto antidiurético en ratas sometidas a una sobrecarga de agua e inyectadas con Ang(1-7) (Baracho y cols. 1998). Por otra parte, se ha observado mayor excreción de urea, pero no de potasio en respuesta a Ang(1-7) (Heller y cols. 2000). En un experimento utilizando ratones KO para Mas se comparó el flujo urinario y la osmolaridad con los obtenidos en ratones *wild type* (WT). En los ratones KO se observó una osmolaridad urinaria incrementada, alteraciones en el diámetro de los glomérulos y un aumento en el depósito de colágeno a nivel intersticial en comparación con los ratones WT (Pinheiro y cols. 2009).

En resumen, gran parte de las enfermedades renales como la CKD, se encuentran entrelazadas con el SRA, en especial con la participación de Ang II, y las principales terapias que abordan estas patologías están destinadas a disminuir o bloquear los efectos de Ang II, lo que indirectamente favorece la producción de Ang(1-7), por lo que aparece como primordial estudiar el rol de este heptapéptido y el de su receptor Mas, en los procesos patológicos que afectan al riñón, de modo de establecer su real efecto.

2. HIPÓTESIS

La activación del receptor Mas por Angiotensina(1-7) protege al riñón del daño observado en la CKD inducida por nefrectomía 5/6.

2.1. Objetivo general

Analizar el rol funcional y morfológico del eje Angiotensina(1-7)-receptor Mas en la CKD producida por nefrectomía 5/6.

2.2. Objetivos específicos

En animales con CKD inducida por Nx 5/6

1. Evaluar el efecto de la administración de Ang(1-7) en el peso corporal, diuresis y la presión arterial sistólica.
2. Analizar los principales parámetros de función renal (creatininemia, depuración de creatinina, fracción excretada de sodio y potasio, proteinuria, relación proteinuria-creatininuria).
3. Estudiar los cambios morfológicos generados por la infusión de Ang(1-7) y A779.
4. Evaluar el efecto de Ang(1-7)-receptor Mas en el grado de inflamación en el TI (infiltración por macrófagos ED-1 y expresión del factor quimio-atrayente OPN).
5. Evaluar la FTI mediante la expresión de Col III, α -SMA y FN, en ratas tratadas con Ang(1-7) y A779.
6. Cuantificar los niveles de los receptores Mas y AT1 en las diferentes condiciones experimentales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales

El manejo de los animales en este estudio se realizó en conformidad con los "*Guiding Principles in the Care and Use of the Laboratory Animals*" adoptados por la American Physiological Society. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Cuidado de Animales de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se utilizaron ratas machos adultos de la cepa Sprague Dawley (SD), provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia general con una mezcla de ketamina (25 mg/kg ip) y xilazina (2,5 mg/kg ip) y los sacrificios con una sobredosis del mismo anestésico. Durante todo el tiempo que duraron los tratamientos, las ratas se mantuvieron a 21-24°C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con alimento normal y agua *ad libitum*.

3.2. Diseño experimental

Los animales se dividieron en 5 grupos experimentales de 5 ratas cada uno, de la siguiente forma:

- Grupo 1: ratas control (sham).
- Grupo 2: ratas con Nx 5/6 (CKD).
- Grupo 3: ratas con Nx 5/6 más infusión subcutánea de Ang(1-7) (CKD+Ang(1-7)).

- Grupo 4: ratas con Nx 5/6 más infusión subcutánea de Ang(1-7) y A779 (CKD+Ang(1-7)+A779).
- Grupo 5: ratas con Nx 5/6 más infusión subcutánea de A779 (CKD+A779).

Las drogas se infundieron a las ratas de los grupos indicados por vía subcutánea, mediante bombas osmóticas individuales para Ang(1-7) y A779.

3.3. Infusión subcutánea

Bajo anestesia general, se implantaron minibombas osmóticas ALZET® modelo 1002, con una velocidad de liberación 0,25 $\mu\text{L/hr}$ (Alza Corp., Palo Alto, CA, USA) bajo la piel del dorso de la rata, a una concentración de 6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de Ang(1-7) y 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para el antagonista A779, ambos compuestos disueltos en suero fisiológico estéril. El procedimiento control consistió en hacer una incisión en el dorso y suturar. Tras la recuperación vigilada de los efectos anestésicos, las ratas se mantuvieron en sus jaulas, para los procedimientos pertinentes. La Ang(1-7) fue adquirida de Sigma (St. Louis, MO, USA), y el antagonista A779 fue donado por el Dr. Robson A. Santos, Universidad de Minas Gerais, Brasil.

3.4. Nefrectomía 5/6

Se operaron ratas SD de 180 a 200 grs, para producir la CKD. Este procedimiento se realizó de forma similar a lo descrito por Salas y cols. (2003). Brevemente, las ratas se anestesiaron y se les realizó una incisión lateral para exponer el riñón izquierdo, al que se le ligaron, con una sutura de poliéster, Ethibond 4-0 (Ethicon Inc., NJ, USA), 2 de las 3 ramas que se bifurcan de la arterial renal al ingresar por el hilio renal, provocando un infarto en dos tercios

del riñón. Tras una semana de adaptación, las ratas nuevamente se anestesiaron y por una incisión lateral se expuso el riñón derecho, se ligó la arteria renal con una sutura de poliéster, Ethibond 4-0 (Ethicon Inc., NJ, USA), y se extirpó, dejando sólo un sexto funcional del total de la masa renal. Tres semanas después, los animales se dividieron en los correspondientes grupos, se implantaron las bombas y se comenzó con la infusión subcutánea de las drogas durante 14 días. Un día antes del sacrificio, las ratas se alojaron en jaulas metabólicas individuales para recolección de orina durante 16 horas con agua *ad libitum* y sin comida. Una vez finalizada la recolección de orina, los animales se sacrificaron y se tomaron las muestras de sangre, tejido para histología y *western blot* necesarias para los análisis posteriores.

3.5. Determinaciones sistémicas y función renal

La presión arterial se midió en la cola (“tail cuff method”) de las ratas que estaban en la fase de recuperación de anestesia superficial con éter. Este procedimiento se realizó a cada rata, 14 días posterior a la Nx 5/6 y previo a la implantación de las bombas osmóticas. Para ello se colocó en el extremo proximal de la cola un transductor conectado a un polígrafo Grass modelo 7B (Grass Instrument Co; Quincy, MA, USA), junto a un “manguito” utilizado para ocluir el flujo de sangre. La presión arterial se midió nuevamente 24 horas antes del sacrificio, de igual forma que la primera vez. El peso corporal se evaluó utilizando una balanza digital Sartorius PT 1200 con las ratas anestesiadas. En las muestras de sangre recolectadas se evaluaron la creatinina (Cr) y, los electrolitos sodio y potasio. La Cr plasmática se midió usando el analizador Creatinine Analyzer 2 (Beckman Instruments, Inc., Brea, CA, USA). Los electrolitos plasmáticos se midieron con el equipo Electrolyte Analyzer

AVL 9180 (Roche Diagnostic, Mumbai, India). Se cuantificó la diuresis en 16 horas, y en la orina se cuantificó Cr y, los electrolitos potasio y sodio utilizando la misma metodología que la utilizada con el plasma. Además, se midió la concentración de proteínas en orina con el método de Bradford (Bio-Rad protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc. United States), utilizando un espectrofotómetro Genesys 5 (Spectronic Instrument Inc., Rochester, United States). Con estos datos se analizaron parámetros de función, daño y pronóstico renal según las fórmulas para el *clearance* de creatinina (CCr), fracción excretada de potasio (FE K⁺) y sodio (FE Na⁺), proteinuria y la razón proteinuria-creatinuria (RPC) (Gallardo y cols. 2007 y Levey y cols. 2003).

3.6. Análisis morfológico e Inmunohistoquímica

Una vez extraídos los riñones como se describió anteriormente (Vio y cols. 2001), se realizaron cortes transversales (de aproximadamente 5 mm de espesor) que incluyeron corteza, médula y papila. Los cortes se fijaron inmediatamente en solución de Bouin (ácido pícrico saturado 70% v/v, formaldehído al 37% al 25% v/v y ácido acético glacial al 5% v/v) por 16 horas, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol, se aclararon en xilol y se incluyeron en Paraplast plus (Monoject Scientific, St. Louis, MO, USA). Posteriormente se cortaron en secciones de 5 µm de espesor en un micrótomos rotatorio Leica modelo RM2145 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) y se montaron en portaobjetos con albúmina de huevo como medio de adhesión. Para el análisis de rutina, los cortes se desparafinaron, deshidrataron y tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) o la tinción tricrómica de picro sirio (PS), según los protocolos del laboratorio. Brevemente, para la tinción de HE los tejidos se desparafinaron e hidrataron en agua destilada, luego se tiñeron

por 2 minutos en hematoxilina de Bayer, se basificaron por 10 minutos en agua corriente. Posteriormente, se tiñeron con eosina acuosa por 2 minutos se deshidrataron, aclararon y montaron. Para la tinción con PS, los tejidos se desparafinaron e hidrataron en agua destilada, luego se colocaron por 2 minutos en ácido fosfomolibdico al 0,2%, se lavaron en agua destilada y luego se incubaron en *sirius red* al 1% en ácido pícrico saturado por 45 minutos. Por último, los cortes se lavaron en HCl 0,1N por 2 minutos para luego ser deshidratados, aclarados y montados en la resina sintética Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

La inmunotinción se realizó según protocolos establecidos en el laboratorio, de acuerdo al tipo de anticuerpo utilizado (Villanueva y cols. 2008). Brevemente, los tejidos se rehidrataron, se lavaron con tampón Tris fosfato salino (TBS) (40 mM Tris, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,02% azida de sodio, pH 7,6). Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 22°C. La detección del anticuerpo primario se realizó con el kit *Ultravision detection system* (Labvision Corp., CA, USA) que utiliza el complejo biotina-estreptavidina unida a peroxidasa. La reacción de la peroxidasa se visualizó con 0,1% (p/v) 3,3'-diaminobenzidina y 0,03% (v/v) de peróxido de hidrógeno. Las secciones se contrastaron con hematoxilina, luego se deshidrataron, se aclararon con xilol y se montaron con Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

3.7. Anticuerpos

Para inmunohistoquímica en cortes incluidos en Paraplast se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Para detectar macrófagos/monocitos se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón (Bioproducts for Science, Indianápolis, IN, USA), dirigido contra el

antígeno ED-1 de rata (dilución 1:200). Para inmunolocalizar osteopontina se utilizó un anticuerpo de ratón contra OPN de rata: MP11B 10 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA, USA) (dilución 1:50). Para la identificación de miofibroblastos se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la proteína alfa actina de músculo liso (α -SMA) clon 1A4 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Para la FTI se evaluó el depósito de colágeno III (Col III) con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Col III con el método de PAP (Southern, Birmingham, AL). Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de ICN Pharmaceuticals-Cappel (Aurora, OH, USA).

Otros productos químicos, entre los que se incluyen 3,3'-diaminobenzidina, peróxido de hidrógeno, Tris, y otras sales se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO, USA). Los alcoholes usados en las diferentes baterías y el PBS se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Germany).

3.8. Análisis morfométrico

Las secciones inmunoteñidas se observaron en un microscopio Nikon Optiphot-2 (Nikon Corporation, Tokyo, Japón). Las imágenes se captaron y se digitalizaron con una cámara Nikon DXM1200 en resolución de 12 Mega píxeles (Nikon Corporation, Tokyo, Japón). Para el análisis morfométrico de las áreas inmunoteñidas, se utilizó el software Photoshop (versión CS4; Adobe System, San José, CA, USA) y el software SimplePCI (Compix Inc., Imaging System, PA, USA). El daño morfológico se analizó por un análisis semi-cuantitativo con un *score* túbulo-intersticial (*score* TI) (Suga y cols. 2001), los parámetros analizados fueron: dilatación tubular, depósito de proteínas tubulares (*protein cast*) e infiltrado túbulo-intersticial. El *score* también se utilizó para evaluar la tinción por IHQ con DAB de los anticuerpos Col III y α -SMA. El *score* TI consistió en los siguientes valores asignados según

2 evaluadores, como: 0; sin cambios, 1; <10% de cambios, 2; 10-25% alteración, 3; 25-50%; 4; 50-75%, 5; 75-100%. De este análisis se realizó un promedio para cada parámetro evaluado. Para la cuantificación del número de células ED-1 se contaron todas las células positivas en corteza y médula externa renal, de un corte transversal proveniente de cada individuo de los grupos en estudio. Los resultados se normalizaron por mm² del área renal de corteza y médula externa en corte histológico de 5 µM. Para la cuantificación morfológica de OPN, se contaron los túbulos positivos por IHQ en corteza y médula externa renal de cada corte histológico de 5 µM, y se normalizaron por mm². Esta evaluación también fue realizada por dos evaluadores.

3.9. Western Blot

Se homogeneizaron trozos de riñón de aproximadamente 100 mg en *buffer* que contenía 100 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 1% SDS y un cocktail de inhibidores de proteasas Sigma (St. Louis, MO, USA). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA), en un espectrofotómetro Eppendorf *BioPhotometer plus* (North America, Inc. N.Y. USA). El western blot se realizó de acuerdo a protocolos descritos en el laboratorio (Villanueva y cols. 2007). Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida por 10 minutos a 80 V (concentrador) y por 80 minutos a 120 V. El gel concentrador se hizo al 3%, el separador se hizo al 8% para fibronectina (FN), y al 12% para el receptor Mas y AT1. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA) a 300 mA por 2 horas a 4°C. Las membranas se bloquearon para unión inespecífica con una solución de leche descremada al 5% en TTBS (TBS con 0,5 % de *Tween* 20). Luego las membranas se incubaron por 16 horas a 4°C con los anticuerpos anti-FN (Sigma Aldrich, St.

Louis, Mo., USA), receptor MAS (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA) y receptor AT₁ (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Posteriormente, las membranas se lavaron para ser reincubadas con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente (anti-IgG de conejo, Anti-IgG de cabra conjugados con la peroxidasa del rábano picante diluido 1:3000). La reacción se visualizó con el kit de quimioluminiscencia

3.10. Estadística

Se utilizó análisis de varianza ANOVA de 1 vía para comparaciones entre grupos, seguido por el *test* de Tukey's, para el estudio de los grupos con infusión subcutánea comparados con el grupo CKD. Todos los valores se expresaron como promedio $\pm$ error estándar (EE). Se consideraron valores $p < 0,05$ para indicar una diferencia significativa con un *. Los *tests* estadísticos se realizaron con el *software* Prism[®] de GraphPad[®], versión 5.0 (GraphPad[®] Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

La CKD es una enfermedad progresiva con daño renal acentuado, pero que además incluye un cambio sistémico que, en estados avanzados, puede provocar la muerte. Un modelo ampliamente utilizado de CKD corresponde a la Nx 5/6, el cual se realiza por medio de dos cirugías independientes, cuyo resultado final es sólo 1/6 de la masa renal funcional. Este modelo simula las alteraciones fisiológicas, estructurales del riñón, conjuntamente con el daño sistémico que se observan en la CKD, por ello se utilizó en esta tesis como modelo de estudio. Diversos tratamientos han intentado revertir los cambios asociados a los procesos inflamatorios, fibróticos e histológicos, que acompañan a la CKD, pero no han tenido los resultados deseados, es por ello que se planteó estudiar el rol de Ang(1-7) y su receptor Mas en la CKD para proponerlo como un posible tratamiento para revertir los procesos asociados a la CKD, esto basado en los efectos de este péptido reportados en diferentes tejidos. Los reportes sobre los efectos del eje Ang(1-7)/Mas sugieren que Ang(1-7) podría tener efectos beneficiosos en alteraciones renales.

4.1. Cambios sistémicos en CKD

Es sabido que una vez finalizada la intervención de Nx 5/6 las ratas pierden peso corporal, en relación a ratas sham (Sangalli y cols. 2011). Por eso se evaluó la variación en el peso de las ratas de los cinco grupos experimentales como un indicador de cambios generales. Las ratas sometidas a CKD mostraron una reducción del peso corporal en relación a las sham ($p < 0,05$). Las tratadas con Ang(1-7) no mostraron pérdida del peso corporal. Curiosamente, las ratas de los grupos tratados con A779 (CKD+Ang(1-7)+A779 y CKD+A779), un

antagonista específico del receptor Mas también mostraron una pérdida de peso corporal, menor al del grupo Nx 5/6 (CKD), disminución que fue similar a lo observado en el grupo Nx tratado solo con Ang(1-7) (tabla 2). Esto sugiere que el efecto sobre el peso no está mediado por el receptor Mas.

Para verificar si los tratamientos produjeron cambios en la presión arterial, se evaluó en todos los grupos de ratas previo al sacrificio, la presión arterial sistólica (PAS) (tabla 2). Cabe mencionar que previo a la cirugía para realizar el modelo de CKD, todas las ratas presentaban una PAS normal (datos no mostrados), semejante a la de las ratas sham. Como era de esperar, la presión de los animales con CKD (Nx 5/6) sin tratamiento adicional, fue mayor al de los animales sham ($p < 0,05$). La PAS de las ratas con CKD tratada con Ang(1-7), aunque mostró una tendencia a disminuir del 10%, no fue significativamente diferente a la PAS observada en el grupo con CKD. Por otro lado, el bloqueo de la actividad del receptor Mas con A779 no presentó diferencias con respecto al grupo CKD (tabla 2).

Tabla 2. Datos sistémicos y renales generales.

	Peso (g)	PAS (mm Hg)	PRI/100g (g)	Diuresis (ml)
Sham (5)	349,2±9	123±4,3	0,33±0,02	7,4±1,4
CKD (4)	273±8,9**#	190±3,5*	0,52±0,03	11,9±1,3
CKD+Ang(1-7) (3)	336,7±6,8	173±4,4	0,54±0,05	8,7±1,2
CKD+Ang(1-7)+A779 (3)	339±15,6	185±20,2	0,55±0,03	10±1,7
CKD+A779 (5)	335±12,1	185±11,4	0,51±0,02	13,2±1,1

Los valores corresponden a medidas obtenidas al final del tratamiento de los animales y se expresan como promedio $\pm$ error estándar, (n) número de ratas por grupo. PRI: peso riñón izquierdo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. * $p < 0,05$ con respecto a sham, ** $p < 0,01$ vs sham, # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7).

4.2. Cambios renales generales en CKD

Al finalizar el período experimental, el riñón remanente en el grupo CKD tenía un tamaño aumentado de casi el 200% del existente en las ratas sham (tabla 2). El riñón remanente se observaba brillante y con zonas fibróticas. El aspecto del riñón remanente en los animales CKD tratados con Ang(1-7) y/o A779 era similar al de los animales del grupo CKD así como también su tamaño (tabla 2).

Se evaluó el efecto de Ang(1-7) sobre la diuresis en las ratas que recibieron la infusión de las drogas (tabla 2). La orina se recolectó por 16 horas, en jaulas metabólicas previo al sacrificio. Las ratas con CKD tuvieron una diuresis levemente mayor a los animales del grupo sham cuya diferencia no fue significativa, en tanto que, el tratamiento con Ang(1-7) mostró una tendencia a reducir el volumen de orina de un 30%. A diferencia de estos resultados, al usar A779 en animales CKD tratados con Ang(1-7), la disminución de la diuresis fue solo de un 15%, y cuando sólo se utilizó A779 en CKD la diuresis aumentó en un 10% en comparación al grupo CKD sin tratamiento.

4.3. Análisis de función renal

Fisiológicamente, el riñón es el encargado de mantener el balance de electrolitos y moléculas que son eliminadas a través de la orina. Clínicamente, los parámetros a través de los que se evalúan la función renal son la creatininemia, el CCr, FE de K y Na, proteinuria y la RPC. Estos parámetros están alterados en la CKD y son indicadores claves del grado de evolución y pronóstico de la enfermedad, en base a esto, los analizamos en los grupos con los diferentes tratamientos.

La creatininemia (figura 1A), se utiliza para evaluar la filtración glomerular, se encontró 3 veces por sobre el valor de una rata sham en CKD (0,45 vs 1,23 mg/dl, respectivamente), en tanto que en ratas tratadas con Ang(1-7) la creatininemia no fue significativamente mayor a la del grupo sham (0,74 mg/dl), aún en presencia de A779 (0,77 mg/dl). Los animales CKD que recibieron solo A779 tuvieron valores de creatininemia similares a los CKD sin otro tratamiento (1,29 mg/dl; $p < 0,01$). La depuración de creatinina evaluada por cada 100 g de peso corporal se observó notablemente reducida en CKD (45% del valor en sham, $p < 0,05$). Por otra parte, en las ratas CKD con Ang(1-7) la depuración de creatinina se recuperó en relación al grupo CKD y CKD+A779, normalizando este parámetro; y cuando fueron co-infundidas con Ang(1-7) y A779, el valor tuvo una tendencia a normalizar. Por último, en las ratas con CKD+A779 la depuración de creatinina se mantuvo reducida con valores semejantes a los observados en las ratas CKD sin otro tratamiento (figura 1B).

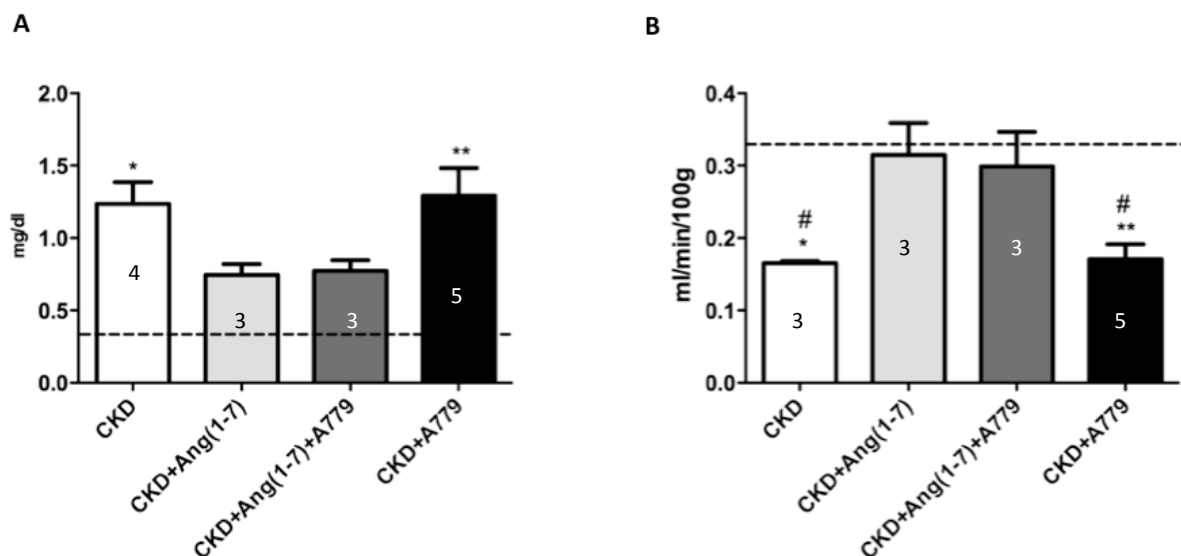


Figura 1. Análisis de la función renal. **A**, Creatininemia (mg/dl). **B**, Clearance de creatinina (ml/min/100g). La línea discontinua muestra el valor promedio de las ratas sham. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. * $p < 0,05$ vs sham, ** $p < 0,01$ vs sham, # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7).

La FE K^+ (figura 1A) en ratas sham es de alrededor de un 20% (mostrado en la figura 1A como una línea punteada). A diferencia de esto, en CKD este porcentaje se ve incrementado a un 90% ($p < 0,05$). El tratamiento sólo con Ang(1-7) reduce la FE K^+ a un 55%. Curiosamente, en el grupo co-infundido con Ang(1-7) y A779 el valor de FE K^+ es de 53%, similar al valor observado solo con la infusión de Ang(1-7). El grupo con CKD y sólo tratado con el antagonista del receptor Mas presentó una FE K^+ de 90% ($p < 0,01$) similar a lo observado en el grupo solo con CKD. Por otro lado, la FE Na^+ (figura 1B) en ratas sham se encontró en valores bajos, alrededor del 0,1 a 0,2% (mostrado en la figura 1A como una línea punteada), mientras que el grupo CKD aumentó la FE Na^+ a 0,4%. Al administrar el agonista del receptor Mas a las ratas con CKD, se observó un valor de FE Na^+ de 0,2% similar al valor del grupo sham. Nuevamente, los animales que recibieron la co-infusión con Ang(1-7) y A779 presentaron un valor de FE Na^+ (0,22%) similar al de las ratas CKD con Ang(1-7) y al de las ratas sham. El valor de FE Na en las ratas CKD solo con infusión de A779 fue similar al del grupo solo con CKD. Estos resultados sugieren que el efecto de Ang(1-7) sobre FE K^+ y FE Na^+ , no es mediada por el receptor Mas.

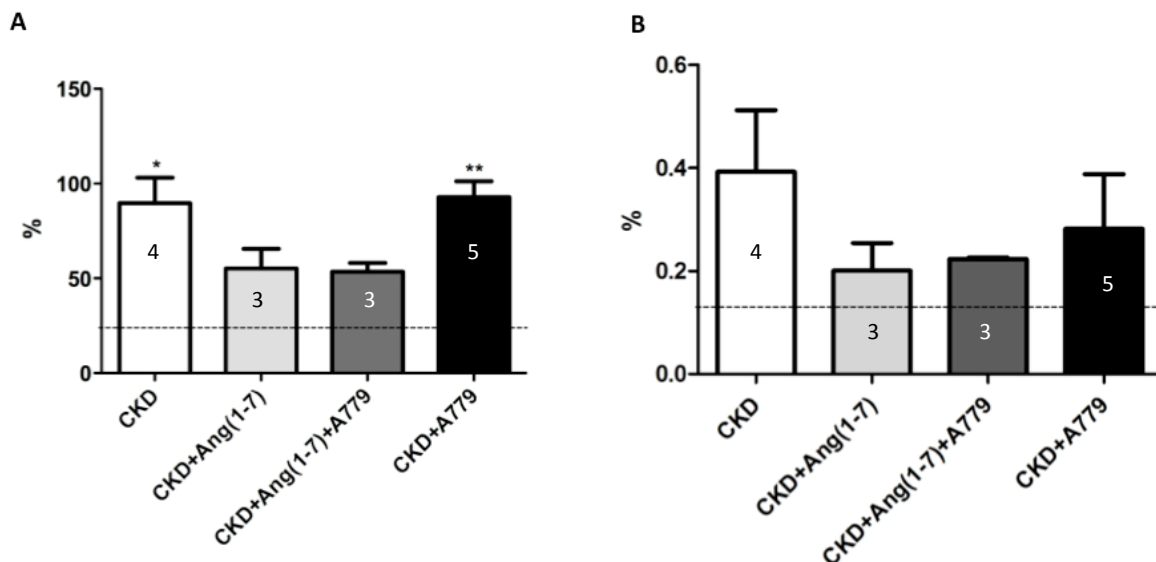


Figura 2. Análisis función renal. **A**, Fracción excretada de potasio (%). **B**, Fracción excretada de sodio (%). La línea discontinua muestra el valor promedio de las ratas control Sham. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ EE; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. * $p < 0,05$ vs sham, ** $p < 0,01$ vs sham.

La proteinuria es un evidente parámetro del daño renal a nivel de la barrera de filtración y tubular. En ratas normales éste parámetro es bajo con $5,94 \pm 0,8$ mg/16 hrs de eliminación de proteínas, siendo la albúmina el principal constituyente. En los animales con CKD se observó un aumento de más de 10 veces en la proteinuria (62,58 mg/16 hrs; $p < 0,001$). Por el contrario en los animales con infusión de Ang(1-7) se observó una reducción de la proteinuria (23,16 mg/16 hrs; $p < 0,05$) en relación a las ratas CKD, que corresponde a una reducción de un 48% de la proteinuria (figura 3A). La reducción de la proteinuria en los animales CKD tratados con Ang(1-7) y A779 fue menor a la observada en los animales CKD+Ang(1-7) (37,56 mg/16 hrs), siendo solo el 40% de la proteinuria de las ratas CKD, mientras que la proteinuria de las ratas CKD+A779 (50,99 mg/16 hrs), no fue diferente a la de las CKD.

La infusión de Ang(1-7) normalizó la razón proteinuria/creatininuria (RPC) en comparación a CKD ($p < 0,05$), siendo un 80% menor al grupo CKD. Cuando se administró A779 en conjunto con Ang(1-7), se observó una tendencia a normalizar la RPC, reduciéndola solo en un 53%. En cuanto al tratamiento de los animales con CKD con el bloqueador del receptor Mas, no se observaron cambios con respecto al grupo CKD (figura 3B) ($p < 0,05$).

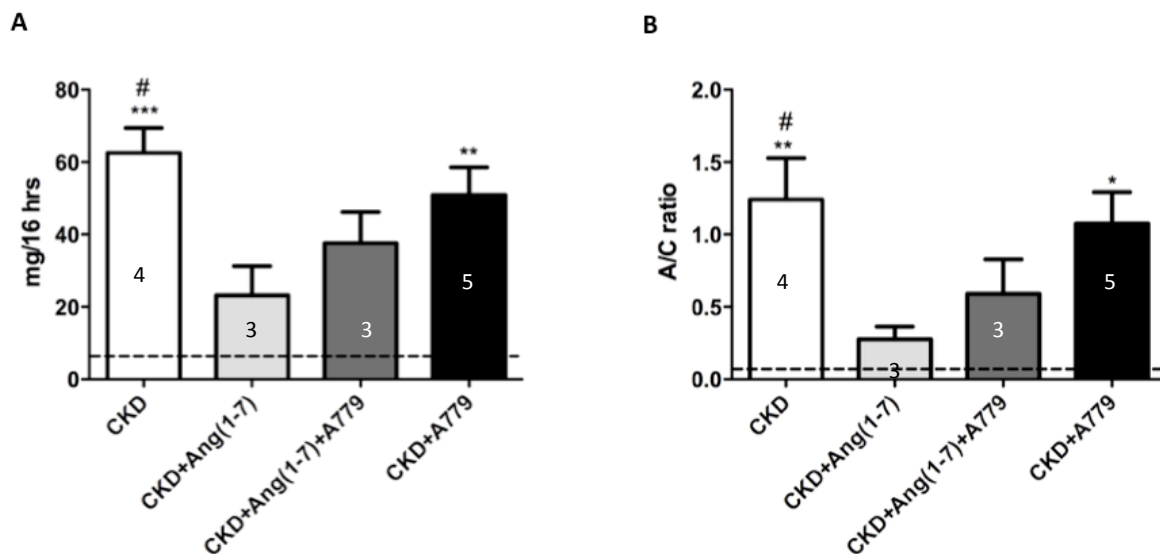


Figura 3. Análisis función renal. **A**, Proteinuria (mg/16 hrs). **B**, Relación proteinuria-creatinuria (RPC). La línea discontinua muestra el valor promedio de las ratas control Sham. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. * $p < 0,05$ vs sham, ** $p < 0,01$ vs sham, *** $p < 0,001$ vs sham y # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7).

4.4. Daño morfológico túbulo-intersticial

Los evidentes cambios funcionales sistémicos del riñón, también se pueden observar a nivel histológico. Al analizar cortes renales de los animales con Nx 5/6, se pudo observar una pérdida de la arquitectura normal del riñón. Estos cambios morfológicos se caracterizan principalmente por dilatación tubular, infiltración histo-linfocitaria, depósitos intra-tubulares de proteínas, expresión de quimiocinas (OPN) por parte de las células tubulares, aumento del tamaño del intersticio renal, fibrosis túbulo-intersticial y mitosis.

En animales sham no se visualizó un espacio TI (figura 4A), a diferencia de esto, en los animales con Nx 5/6, bajo los diferentes tratamientos utilizados, es posible observar que el parénquima renal es desplazado por una expansión del espacio TI (asterisco en figura 4B, C, D, E). La morfología tubular está alterada con cambios como dilatación tubular, siendo este uno de los primeros signos morfológicos visualizados en CKD. Además, este cambio se acompaña de depósitos de proteínas intra-tubulares (*protein cast*) (flecha en figura 4B), cambio que también se observa en los animales tratados con el bloqueador del receptor Mas (flecha en figura 4E).

El tratamiento con Ang(1-7), redujo el nivel de la dilatación de los túbulos renales, así como también el número de túbulos con depósito de proteína intra-tubular (figura 4C y 4D), en relación a los grupos CKD y CKD+A779 ($p < 0,05$). Además, de reducir la dilatación con respecto al grupo CKD+Ang(1-7)+A779 ($p < 0,05$), por lo tanto sugiriendo la participación del receptor Mas.

En el espacio TI se observó aumentado, debido a la invasión con diferentes estirpes celulares que contribuyen a combatir o controlar el daño que se presenta el tejido.

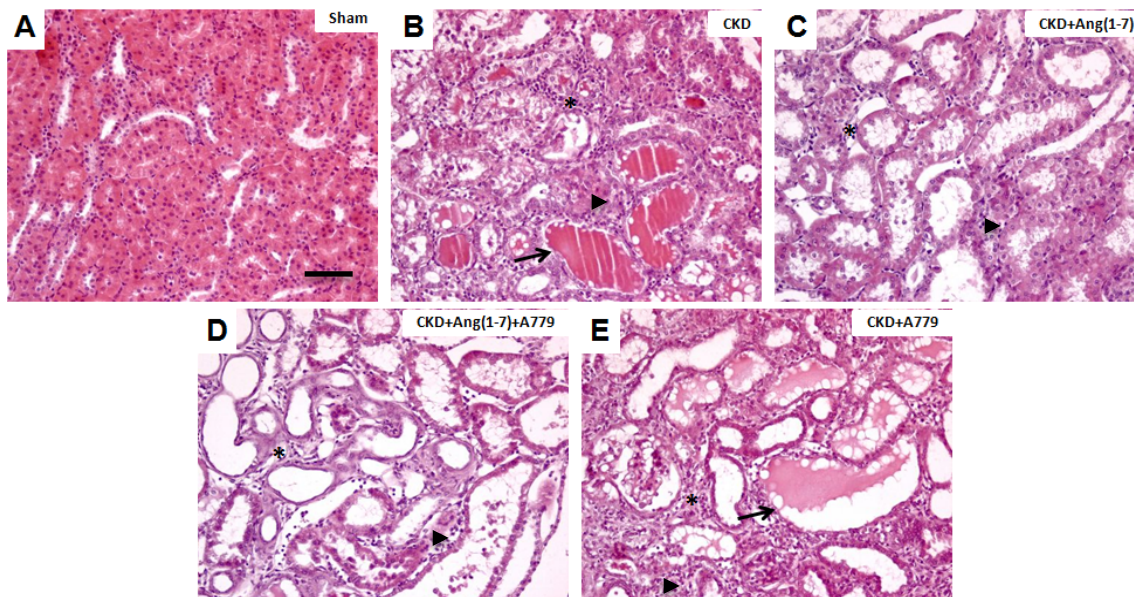


Figura 4. Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de hematoxilina eosina. Las imágenes son representativas de los diferentes tratamientos. **A)** Sham. **B)** CKD. **C)** CKD+Ang(1-7). **D)** CKD+Ang(1-7)+A779. **E)** CKD+A779, respectivamente. Los asteriscos indican aumento del espacio TI. Las cabezas de flecha indican la infiltración por células mononucleadas del sistema inmune. Las flechas muestran la dilatación de los túbulos renales con depósitos de proteína tubular. La barra representa 100 μ M.

Tabla 3. Análisis morfológico.

	Dilatación tubular	Infiltrado TI	Proteína tubular
Sham (5)	0,4±0,2	0±0	0±0
CKD (4)	4,6±0,2***#	4,8±0,1***#	3,5±0,3***#
CKD+ANG(1-7) (3)	2,8±0,1***	2,8±0,3***	1±0,3
CKD+ANG(1-7) +A779 (3)	4,1±0,2***#	3±2,6***	2,1±0,2**
CKD+A779 (5)	4,4±0,2***#	4,6±0,2***#	3,2±0,4***#

Los valores fueron asignados basados sobre un score de 0 a 5 (valores designados desde sin cambios a severos, respectivamente), y expresados como promedio ± error estándar, (n) número de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. ** p<0,01 vs sham, *** p<0,001 vs sham, # p<0,05 vs CKD+Ang(1-7).

Estas células son principalmente células mononucleadas del sistema inmune, que son observadas entre los túbulos como una gran condensación de núcleos en las ratas con CKD y CKD+A779 (cabeza de flecha en figura 4B, C, D y E). Este infiltrado está reducido en el grupo CKD+Ang(1-7) en relación a los grupos CKD y CKD+A779 ($p<0,05$), mientras que este efecto no sería mediado por el receptor debido a que no existen diferencias entre CKD+Ang(1-7) y CKD+Ang(1-7)+A779. Los parámetros de daño morfológico (dilatación tubular, depósito de proteína tubular e infiltrado TI) fueron cuantificados con un *score* TI (Johnson y cols. 2001) (tabla 3), en cortes con tinción con hematoxilina eosina (figura 4).

4.5. Inflamación y daño tubular

La infiltración por macrófagos es uno de los primeros cambios identificados luego en Nx 5/6. La evaluación de macrófagos infiltrando el TI renal tanto a nivel de la corteza como médula externa se realizó por inmunohistoquímica para el marcador ED-1 (flechas en figura 5).

El número de macrófagos infiltrando el TI fue cuantificado, mediante un recuento de las células ED-1 positivas, normalizando los valores por milímetro cuadrado (mm^2) de riñón (figura 5F), las imágenes son representativas de los cambios en el grado de macrófagos infiltrando el intersticio renal. Las ratas del grupo CKD+Ang(1-7) tuvieron una baja presencia de macrófagos (Figura 5C) aproximándose al valor de las ratas sham (figura 5A). Al contrario, las ratas con CKD (figura 5B) tuvieron un gran contenido de infiltración para macrófagos ED-1 en comparación al control ($p<0,001$) y al grupo CKD+Ang(1-7) ($p<0,05$). El grupo CKD+Ang(1-7)+A779 (figura 5D) presentó un menor número de macrófagos ED-1 que el grupo CKD similar al grupo CKD+Ang(1-7). El grupo CKD tratado con el antagonista del receptor Mas, A779 (figura 5E), conservó un número de macrófagos elevados ($p<0,001$) en el intersticio renal en valores similares al grupo CKD.

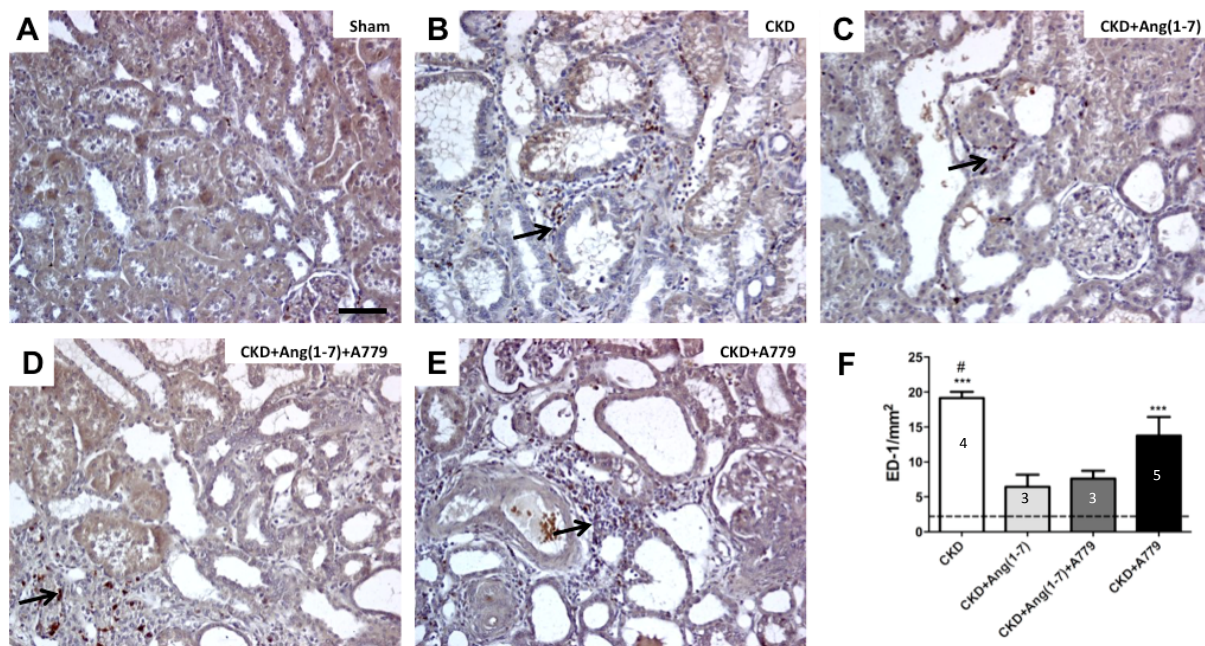


Figura 5. Infiltración por macrófagos ED-1. Imágenes representativas de los diferentes grupos con tinción con inmunohistoquímica para ED-1. **A)** Sham. **B)** CKD. **C)** CKD+Ang(1-7). **D)** CKD+Ang(1-7)+A779. **E)** CKD+A779. **F)** cuantificación de células positivas para ED-1 por milímetro cuadrado de riñón determinado en un corte transversal de 5 μ m de espesor. La barra de la figura representa 100 μ M. La línea discontinua representa el valor promedio de las ratas control Sham. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. *** $p < 0,001$ vs sham, # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7). Las flechas indican células positivas para ED-1.

Además, se analizó el factor quimioatrayente OPN, como un indicador del daño renal. Este factor se expresa en condiciones de daño a nivel de los túbulos renales en la corteza y médula externa renal (indicado con flechas en figura 6). En el riñón de las ratas sham se observó (figura 6A) una bajo número de túbulos positivos para OPN, que contrasta con el significativo aumento de su expresión en ratas CKD (figura 6B) ($p < 0,001$), confirmando el daño provocado por la Nx 5/6. En el grupo CKD+Ang(1-7), se observó una disminución de la expresión de OPN en los túbulos renales en comparación a las ratas CKD ($p < 0,05$); en tanto el grupo CKD+Ang(1-7)+A779 mostró un nivel de OPN similar al grupo CKD+Ang(1-7). Contrariamente, el grupo CKD+A779 mantiene los niveles de OPN elevados ($p < 0,001$) similar al grupo CKD.

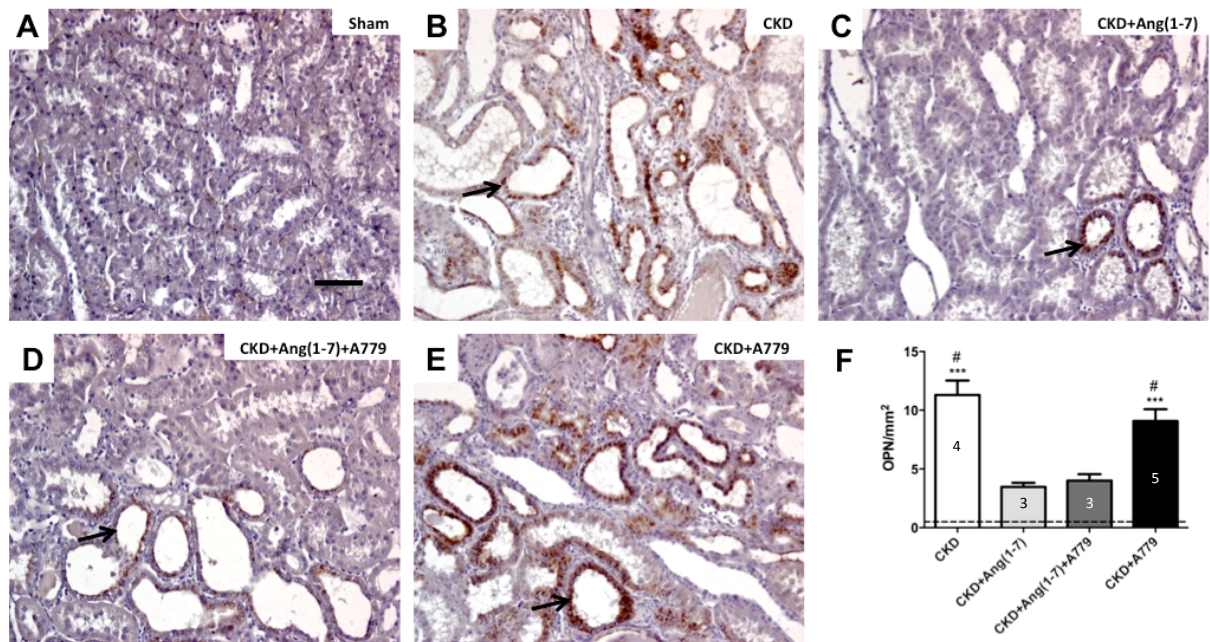


Figura 6. Tinción para el factor quimioatrayente OPN. Imágenes representativas de los diferentes grupos con tinción con inmunohistoquímica para OPN. **A)** Sham. **B)** CKD. **C)** CKD+Ang(1-7). **D)** CKD+Ang(1-7)+A779. **E)** CKD+A779. **F)** cuantificación de túbulos renales positivos para OPN por milímetro cuadrado de riñón determinado en un corte transversal de 5 μ m de espesor. La barra de la figura representa 100 μ M. La línea discontinua muestra el valor promedio de las ratas control Sham. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. *** $p < 0,001$ vs sham, # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7). Las flechas indican túbulos positivos para OPN.

4.6. Cuantificación de fibrosis

Además de los cambios descritos, el tejido renal experimenta un proceso fibrótico en el espacio TI, a través del depósito de proteínas de matriz extracelular.

Los miofibroblastos son células especializadas que en condiciones fisiológicas no son detectables por IHQ, pero que en CKD aumentan en número y se encargan de sintetizar las proteínas de matriz extracelular produciendo fibrosis. Por esta razón, se analizaron por IHQ utilizando α -SMA como marcador de su presencia (figura 7). En el grupo CKD la marca para α -SMA aumentó significativamente (figura 7B y 7F) ($p < 0,01$). En cambio, en el grupo CKD tratado con Ang(1-7) se visualizó un menor aumento de la tinción para α -SMA, efecto que fue similar en el grupo CKD+Ang(1-7)+A779 (flechas en figura 7) ($p < 0,05$). El análisis de inmunohistoquímica de α -SMA, fue cuantificado por el *score* TI (Johnson y cols. 2001) (figura 7F).

Colágeno es una proteína de matriz que se expresa en diferentes isoformas. La deposición de todos los tipos de colágeno es posible analizarla con tinción de picro sirio. En este trabajo, en condiciones normales (figura 8A), no fue posible distinguir depósito de proteínas, al contrario de lo que sucedió en el grupo de ratas con CKD y CKD+A779 (asterisco en figura 8B y 8E), que incluso provocó un evidente engrosamiento de la membrana basal de los túbulos renales (flecha en 8B y 8E). En los grupos que recibieron el tratamiento con Ang(1-7) se observó un depósito de proteínas y engrosamiento de la membrana basal leve como es indicado en las imágenes (asterisco y flecha en figuras 8C y 8D).

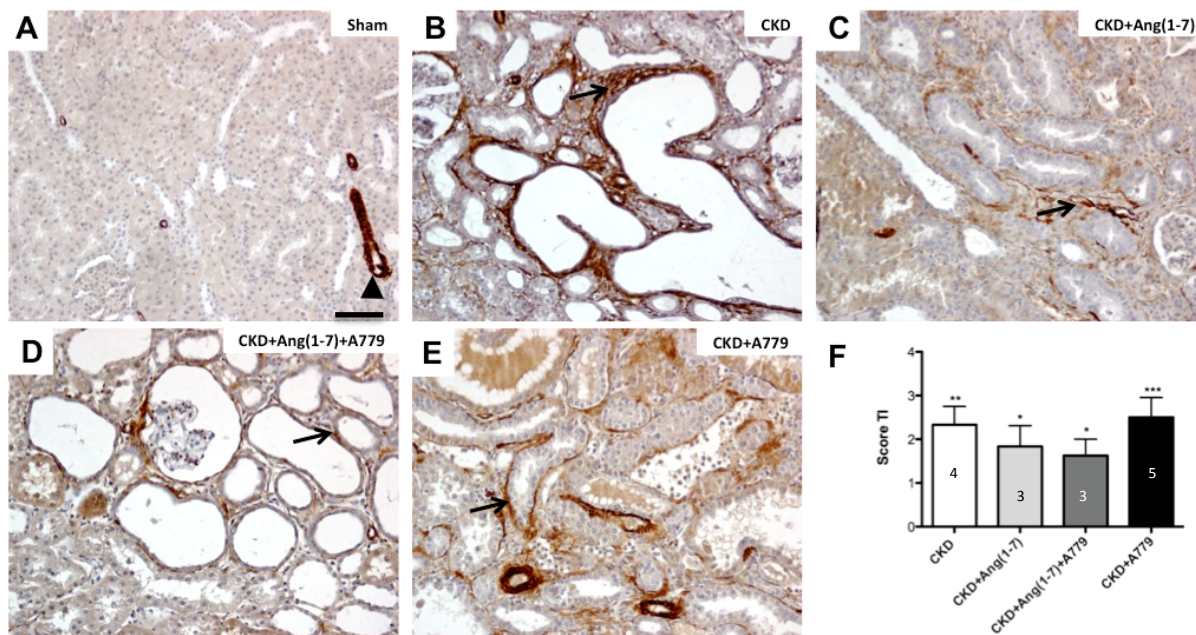


Figura 7. Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de inmunohistoquímica para α -SMA. La imagen representa en **A)** Sham. **B)** CKD. **C)** CKD+Ang(1-7). **D)** CKD+Ang(1-7)+A779. **E)** CKD+A779. **F)** cuantificación mediante Score TI. Las flechas indican zonas positivas para α -SMA, la cabeza de flecha corresponde al control positivo interno. La barra de la figura representa 100 μ M. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. * $p < 0,05$ vs sham, ** $p < 0,01$ vs sham, *** $p < 0,001$ vs sham.

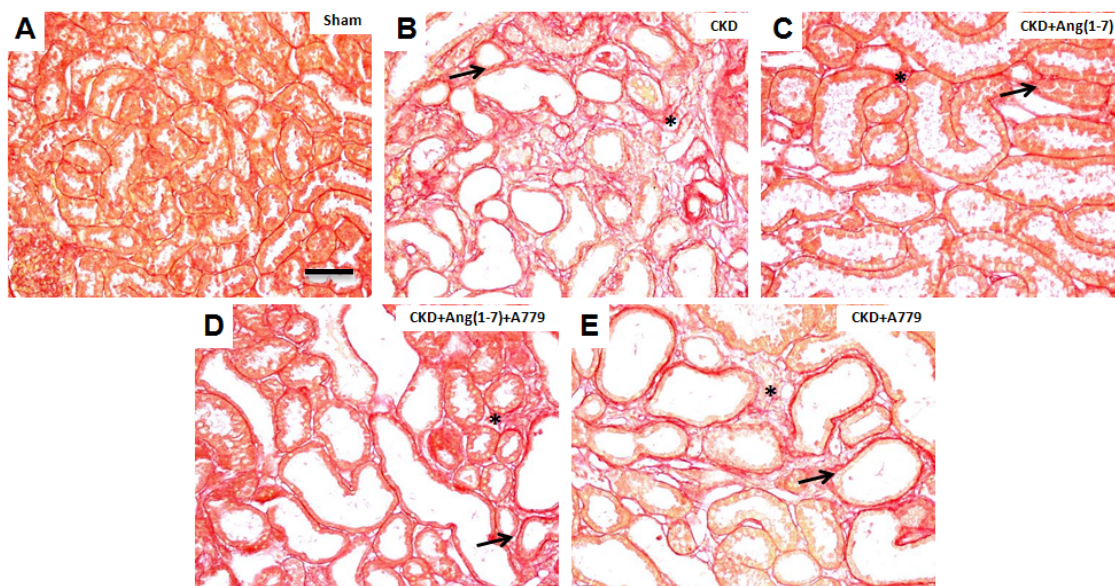


Figura 8. Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de PS. La imagen representa en **A)** Sham. **B)** CKD. **C)** CKD+Ang(1-7). **D)** CKD+Ang(1-7)+A779. **E)** CKD+A779, respectivamente. Los asteriscos indican zonas de fibrosis TI, en tanto, las flechas indican engrosamientos de la membrana basal. La barra de la figura representa 100 μ M.

Entre las principales proteínas de matriz extracelular que son aumentadas en procesos fibróticos, se encuentran el Col III, cuantificado por tinción con IHQ (figura 9). En esta figura, se puede apreciar que los riñones de ratas tratadas con Ang(1-7) muestran pequeños focos de depósito de Col III en el tejido renal (flecha en figura 9C), en comparación a los grupos CKD y CKD+A779 (flecha en figuras 9B y 9E) ($p < 0,05$), que muestran zonas extensas de depósito de Col III. Por otra parte, en los animales CKD con infusión de Ang(1-7) y A779 el efecto sobre el Col III fue semejante al observado en el grupo CKD+Ang(1-7) (flecha en figura 9D y figura 9F).

Finalmente, se evaluó la expresión proteica por *western blot* de fibronectina (FN), una de las principales proteínas de matriz extracelular que se ve involucrada en los procesos fibróticos (figura 10). La cuantificación muestra que los niveles de FN presentan una tendencia a aumentar en CKD, en tanto que el tratamiento con Ang(1-7) tiende a reducir la expresión de FN a niveles similares al de ratas sham. Contrariamente, riñones de ratas con CKD y tratadas con A779 muestran una incrementada expresión de FN con respecto al sham y a CKD+Ang(1-7) ($p < 0,05$), sugiriendo que la activación del receptor Mas participa de la regulación de los niveles proteicos de FN.

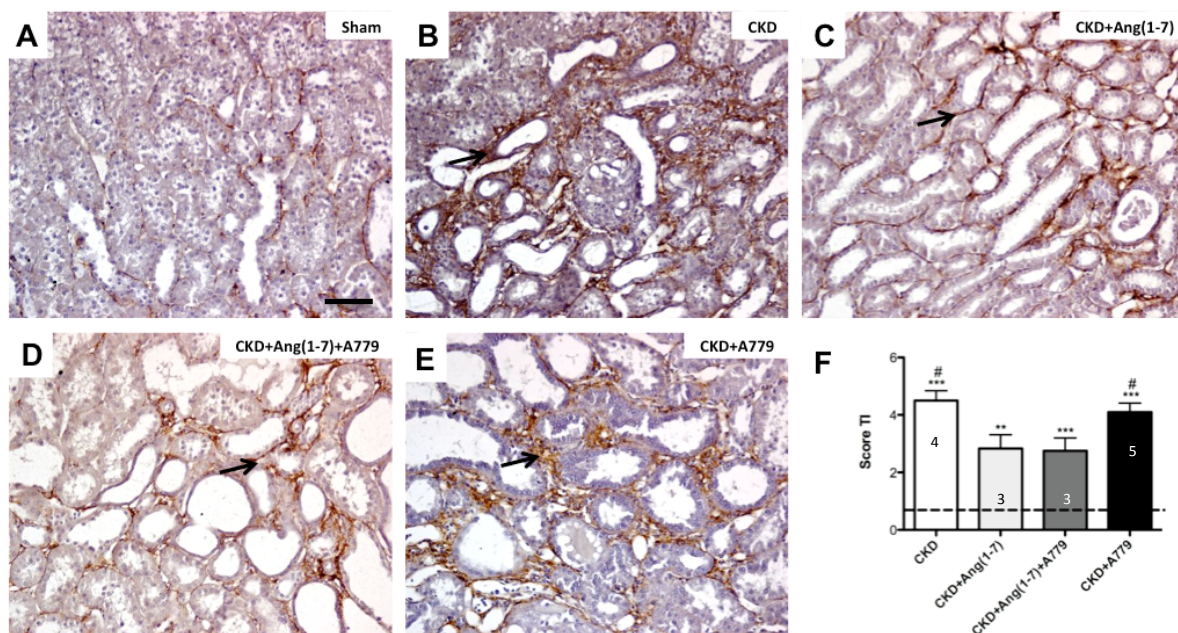


Figura 9. Cortes histológicos de riñón de los grupos tratados, con tinción de inmunohistoquímica para colágeno III. La imagen representa en **A)** Sham. **B)** CKD. **C)** CKD+Ang(1-7). **D)** CKD+Ang(1-7)+A779. **E)** CKD+A779. **F)** cuantificación mediante Score TI. Las flechas indican zonas positivas para Col III. La barra de la figura representa 100 μ m. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. ** $p < 0,01$ vs sham, *** $p < 0,001$ vs sham, # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7).

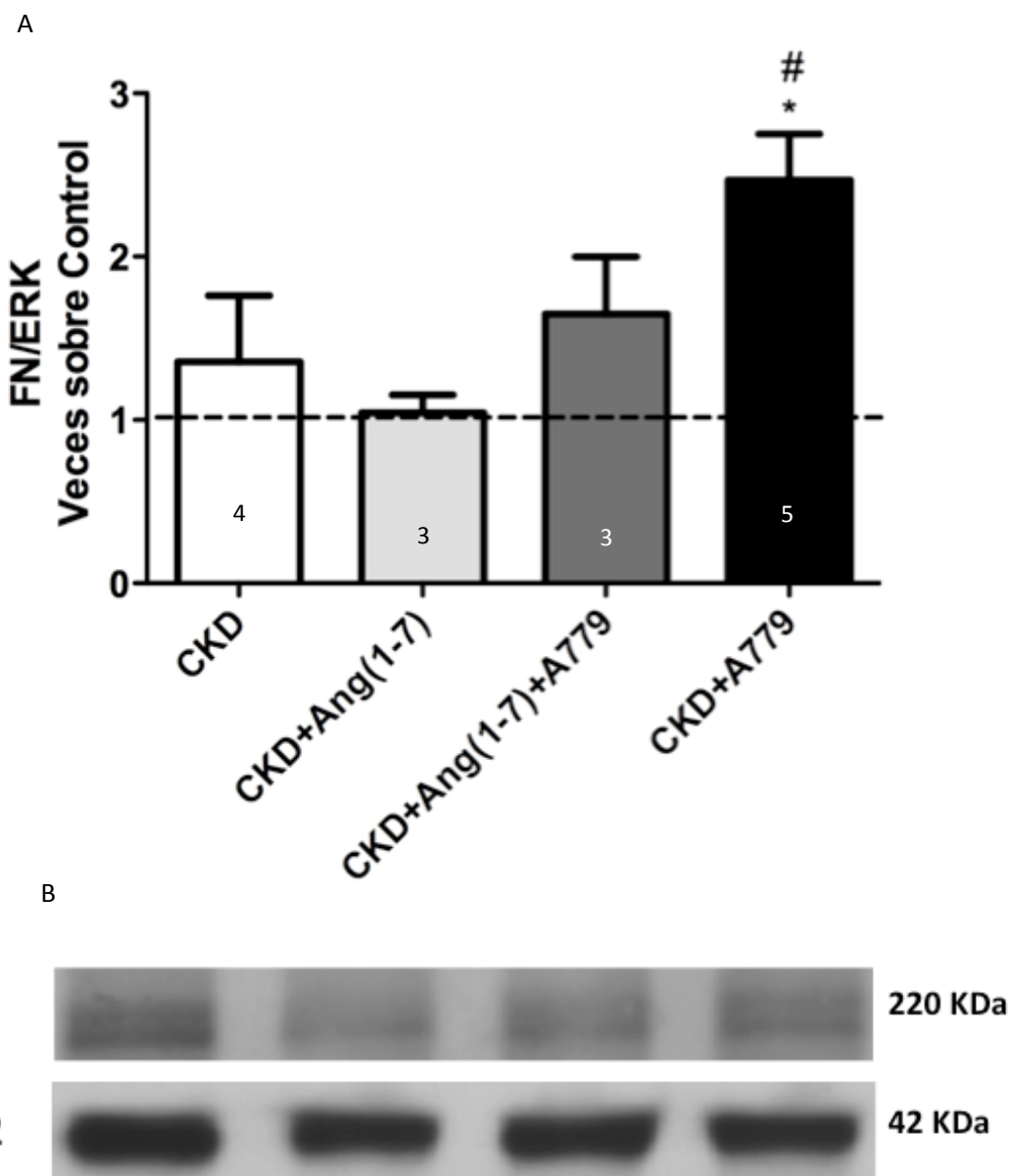


Figura 10. Niveles proteicos de FN. En **A** se muestra en el gráfico las unidades relativas de expresión de FN sobre ERK-2 usada como control de carga, graficado como veces sobre el control. La línea punteada indica el valor del grupo control. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. * $p < 0,05$ vs sham, # $p < 0,05$ vs CKD+Ang(1-7). En **B** se muestran imágenes representativas de los *western blot* de FN y ERK-2.

4.7. Cuantificación de los receptores AT1 y Mas

Se cuantificaron los principales receptores del SRA que estarían participando de este proceso de daño y protección renal en CKD, los receptores AT1 y Mas, respectivamente (figura 11), para analizar cambios que pudieran estar presentando en su expresión proteica y que dieran cuenta de las alteraciones que se observaron en la función y arquitectura renal. Los niveles proteicos de ambos receptores se mantuvieron sin variaciones significativas, bajo las diferentes condiciones de tratamiento, por lo que efectos observados pueden asociarse a la interacción directa con los respectivos agonistas sobre el receptor.

Conjuntamente, los receptores AT1 y Mas, mantienen su expresión proteica constante no siendo alterados por las condiciones de daño y tratamientos.

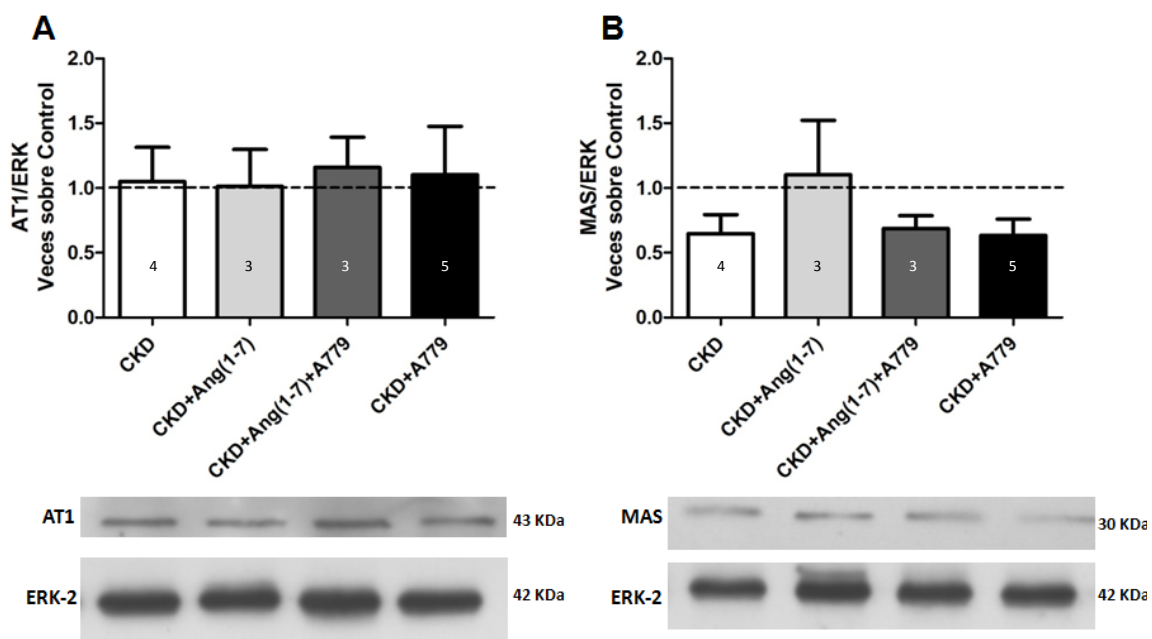


Figura 11. Niveles proteicos de AT1 y Mas. A y B muestran los niveles proteicos de los receptores como unidades relativas de expresión de AT1 y Mas sobre ERK, graficado como veces sobre el control. La línea punteada indica el valor del grupo control. Las barras del gráfico representan el promedio $\pm$ error estándar; número dentro de las barras representa n de ratas por grupo. Análisis estadístico: ANOVA de 1 vía, con *test a posteriori* de Tukey's. En la parte inferior de A y B, se muestran imágenes representativas de los *western blot* de AT1, MAS y ERK.

5. DISCUSIÓN

La CKD es una enfermedad destacada por un proceso progresivo de reducción de la función renal que es habitualmente detectado en los pacientes cuando ya se encuentra en estados avanzados, por lo que los tratamientos existentes son muy poco eficaces (Griffin y Bidani, 2006, Peters y col. 2014). Esta enfermedad abarca una serie de procesos degenerativos del parénquima renal que finalmente, terminan con la pérdida de la función renal en donde los pacientes deben ser sometidos a procesos de diálisis o trasplante, con todas las consecuencias en la calidad de vida que implica en ambos casos (Kimmel 2002, Hui y cols. 2014). Es por ello que esta tesis planteó estudiar el rol de Ang(1-7) en la CKD. Este péptido es producto de la degradación principalmente de Ang II, y ha demostrado contrarrestar la señalización y los efectos de Ang II (Sampaio y cols. 2007, Iwai y Horiuchi 2009). En los resultados observados, se demuestra que Ang(1-7) revierte los efectos producidos por la CKD.

Una de las principales alteraciones sistémicas observadas en CKD es el aumento de la presión arterial (Kolesnyk y cols. 2010). En relación a Ang(1-7), diversos estudios indican que la acción de Ang(1-7) sobre el receptor Mas, tiene un rol crucial en la regulación de la presión arterial, teniendo un efecto hipotensor (Iyer y cols, 2000). Esto también es demostrado en esta tesis con un menor aumento de la PAS del 10% en animales con CKD tratados con Ang(1-7) comparados con el grupo CKD (tabla 2). Además, el bloqueo del receptor Mas produce un aumento en la PAS comparado con el grupo CKD+Ang(1-7), insinuando el activo rol que desempeña Ang(1-7) en el control de este parámetro. En otros estudios, utilizando ratones KO para el receptor Mas (Matos y cols. 2010), se han logrado resultados similares. Igualmente la administración de Ang(1-7) en el cerebro regula la

presión arterial sistémica (Guimaraes y cols. 2012) y el uso de un agonista del receptor Mas (AVE0991) en ratas con diabetes mellitus tipo I, que desarrollan hipertensión, reduce la PA (Singh y cols. 2012). Adicionalmente, se han descrito efectos benéficos de Ang(1-7), independientes de la regulación de la presión sistólica (Ji y cols. 2008).

En la CKD, la función renal está fuertemente alterada, siendo la proteinuria uno de los principales indicadores del daño, en esta tesis se apreció que los animales con CKD tratados con Ang(1-7), presentaron proteinurias menores a las de los animales con CKD sin tratamiento adicional, normalizando estos valores sugiriendo el rol benéfico. La razón proteinuria/creatininuria (RPC) al igual que la proteinuria demuestra el daño en la barrera de filtración y en el proceso de reabsorción de aminoácidos en los túbulos renales. Constituye un marcador más del daño independiente de la recolección de orina y es catalogada como uno de los parámetros más concluyentes en el estado de progresión de CKD en pacientes (Levey y cols. 2010). Este parámetro mostró una clara reducción con el tratamiento con Ang(1-7) en CKD. Igualmente, los análisis de filtración glomerular, indican resultados benéficos de Ang(1-7). Los datos obtenidos de Ang(1-7) concuerdan con resultados de otros autores, donde se observó la disminución de proteinuria en ratas espontáneamente hipertensas (Giani y cols. 2011) o con nefropatía diabética (Benter y cols. 2007; Giani y cols. 2012). Además, una sobrecarga de proteínas tubulares induce un aumento del infiltrado intersticial y del estrés oxidativo que promueven el desarrollo de hipertensión en ratas (Alvárez y cols. 2002). Estos últimos efectos, podrían ser mediados por la producción de quimiocinas por las células tubulares, que promueven el infiltrado TI (Abbate y cols. 2006). Como demuestran estos resultados la función renal se ve altamente alterada en CKD, mientras que, la administración de Ang(1-7) restaura la función renal, por un mecanismo que no involucraría al receptor Mas bajo las condiciones utilizadas en esta tesis.

En un estudio realizado por Baracho y cols. (1998), se demostró que Ang(1-7) actúa como un agente antidiurético y natriurético. Basado en este y otros trabajos que han demostrado efectos de Ang(1-7) en diuresis y natriuresis, se evaluaron estos parámetros. En esta tesis, Ang(1-7) mostró una tendencia a normalizar los valores de la fracción excretada de potasio y sodio en relación a las ratas control. Esto es concordante con lo descrito por otros autores en otros modelos experimentales donde se demostró que en condiciones de una dieta elevada en sal, Ang(1-7) produce una atenuación del control de la diuresis y de la excreción de sodio, sugiriendo un efecto benéfico mediado por el receptor Mas. Sin embargo, en condiciones de una dieta baja en sodio, Ang(1-7) aumenta considerablemente la excreción de este ion (O'Neill y cols. 2013).

Las alteraciones morfológicas que se presentan en la CKD son daño TI, aumento del infiltrado inflamatorio, aumento de la expresión de OPN, entre otras. Particularmente, el sistema inmune contribuye en gran medida al desarrollo del daño renal, esto ha sido corroborado con el uso de inmunosupresores los que revierten parámetros como hipertensión y proteinuria (Mattson y cols. 2006). Los macrófagos son participantes activos en los procesos de fibrosis tanto en su inicio como en su resolución (Wynn y Barron 2010), lo que permite catalogarlos como “reguladores maestros” de este proceso, por lo tanto es importante estudiarlos en CKD.

Teniendo como antecedentes la inducción de los macrófagos tras la infusión de Ang II (Ozawa y cols. 2007), los efectos anti-inflamatorios que Ang(1-7) a través del receptor Mas se han demostrado en diferentes condiciones de inflamación (Da Silveira y cols. 2010, Giani y cols. 2012). Incluso se ha sugerido que el ARB olmesartán, ejerce su efecto protector a través de Ang(1-7) y el receptor Mas (Sukumaran y cols. 2012). En base a esta evidencia era

esperable encontrar una reducción del número de los macrófagos ED-1 (+) en presencia de Ang(1-7), lo que sugiere que en este modelo también existe una reducción de la inflamación asociada a la CKD, reduciendo los parámetros a los del control, sin embargo, estos cambios no parecen estar mediados por el receptor Mas pues su antagonista no revirtió los cambios inducidos por Ang(1-7).

En un modelo de glomerulonefritis, Ang II indujo el incremento de macrófagos M1 (pro-inflamatorios), el cual se vio contrarrestado con el uso del ARB olmesartán, y paralelamente se observó un aumento de macrófagos M2, que participan de procesos reparativos (Aki y cols. 2010). En esta tesis se evaluó exclusivamente los macrófagos ED-1 (+), que no distingue entre M1 y M2, por lo que, para poder precisar la acción de Ang(1-7) es necesario profundizar en este aspecto e identificar el tipo de macrófagos que participa en la CKD, y así evaluar si Ang(1-7) a través del receptor Mas tiene algún efecto en la modulación de las distintas poblaciones de macrófagos.

Otra de las interrogantes que surge, es que en conjunto con las células ED-1, es posible observar en los cortes histológicos de riñón un gran número de células inflamatorias mononucleadas participando de la infiltración en el tejido renal, pero que no fue posible identificarlas con los marcadores utilizados, por lo que deben ser caracterizadas, para evaluar el rol que puedan desempeñar en la fisiopatología de CKD.

El espacio TI corresponde a un espacio virtual, que en condiciones normales sólo está constituido por un número menor de fibras de colágeno que otorgan el sostén del parénquima renal y células como fibroblastos y macrófagos tisulares, pero en CKD este espacio se ve considerablemente expandido. En este proceso de FTI los miofibroblastos son activos participantes, contribuyendo al desarrollo de la matriz extracelular (Hewitson 2008).

Sin embargo, Ang(1-7) no reduce la presencia de miofibroblastos en el intersticio renal. Por otro lado, el daño TI es un indicador clave de la reducción de la función renal (Zhao y cols. 2011). En este contexto, la infusión de Ang II produce un aumento de la fibrosis renal (Fujimura y cols. 2014). Por otra parte, en tejidos como el corazón, Ang(1-7) revierte los efectos pro-fibróticos de Ang II (Gomes y cols. 2010, Gava y cols. 2012). Como se demuestra en este trabajo, existe una reducción del *score* TI, fibrosis TI y de la expresión de Col III, estos efectos no parecen ser mediados por la activación del receptor Mas ya que al co-administrar el inhibidor de Mas, el efecto de Ang(1-7) no se ve reducido. Por último, los niveles proteicos de FN tienden a reducirse cuando está presente Ang(1-7), provocando una menor fibrosis renal, en donde además se demuestra que el bloqueo específico del receptor Mas provoca un incremento significativo de fibronectina, sugiriendo un activo rol en los procesos fibróticos renales.

Igualmente, el aumento en la expresión del factor quimioatrayente OPN fue prevenido manteniendo valores similares a los encontrados en las ratas control, correlacionándose con la disminución del infiltrado TI. Un efecto similar fue reportado previamente (Mezzano y cols. 2000), y se ha sugerido que OPN juega un papel crucial en la fibrosis TI (Nagao y cols. 2012). Por lo tanto, estos resultados permiten establecer el posible rol de Ang(1-7) como regulador del daño TI en el riñón en CKD, contribuyendo a reducir el daño.

Estudios en animales KO para el receptor Mas, han mostrado un aumento de la fibrosis del corazón en ratones sometidos a ejercicio (Guimaraes y cols. 2012), alteraciones en el flujo sanguíneo de órganos como riñón entre otros (Botelho-Santos y cols. 2012), daño TI en nefropatía inducida por adriamicina (Silveira y cols. 2013), y empeoramiento de parámetros renales en un modelo de HT Goldblatt (Rakusan y cols. 2010). Es interesante

destacar que la función normal del riñón se ve alterada en el ratón KO para Mas, así como también el túbulo-intersticio (Pinheiro y cols. 2009), demostrando la importancia de este eje tanto a nivel renal como sistémico y los efectos benéficos de su activación como es demostrado en este trabajo.

La literatura apoya los resultados de esta tesis en cuanto describe que Ang II es uno de los efectores clave del proceso de daño TI, pero gran parte de los hallazgos descritos en otros trabajos establecen que Ang(1-7) logra estos efectos a través del receptor Mas, por lo que su delección produce daño similar al ejercido por Ang II (Gava y cols. 2012).

En esta tesis se plantea que gran parte de los efectos de Ang(1-7) evaluados en los experimentos realizados no serían mediados por el receptor Mas, ya que tras el uso del antagonista específico A779, no se pierden los efectos logrados por Ang(1-7).

Existen dos posibles explicaciones para la ausencia de efecto del A779 en primer lugar la concentración de antagonista utilizado podría ser insuficiente, en segundo lugar Ang(1-7) podría estar interactuando con otro receptor como el AT2. Esto último podría explicar por qué los efectos logrados por Ang(1-7) no son revertidos por A779 (Lara y cols. 2006).

A779 ha sido ampliamente reportado como un antagonista específico del receptor Mas, bloqueando los efectos de Ang(1-7) (Santos y cols. 2003, Sullivan y cols. 2010). A pesar de esto las dosis son un punto fundamental para lograr bloquear el receptor Mas con A779, en esta tesis se utilizó una dosis de A779 3 veces menor que Ang(1-7), similar a la utilizada por otros autores en un trabajo donde se estudió el efecto vasodepresor de Ang(1-7) (Bosnyak y cols, 2012). En otros trabajos reportan el uso de A779 en igual concentración que Ang(1-7) logrando bloquear la activación del receptor Mas, demostrando que los efectos

de Ang(1-7) son a través de este receptor (Moon y cols. 2011). Estos antecedentes podrían sugerir que la razón por la que no se logró efecto con la utilización del antagonista fue porque su dosis fue muy baja. Sin embargo, al evaluar los niveles de FN mediante western blot, es posible observar que en CKD+A779 aumenta FN confirmando la actividad de A779, además esto concuerda con datos previamente publicados que demostraban que la ausencia de Mas estimula el aumento de FN (Pinheiro y cols. 2009), por ende los niveles endógenos de Ang(1-7) serían importantes para regular FN. Considerando lo anteriormente mencionado, los resultados de esta tesis sugieren que los efectos de Ang(1-7) serían mediados por un receptor diferente a Mas, donde el receptor AT2 surge como uno de los posibles candidatos (Walters y cols. 2005, Bosnyak y cols. 2011).

Se han utilizado otros agonistas del receptor Mas, para inducir su activación, dentro de los que se encuentran péptidos específicos como CGen-865S, con efectos antihipertensivos y cardio-protectores (Quintao y cols. 2010), otros compuestos no peptídicos como AVE0991, con efectos benéficos tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden ser administrados por vía oral, expandiendo las posibilidades de utilizar esta vía de señalización en pacientes (Pinheiro y cols. 2004, Santos y cols. 2006). A nivel farmacéutico, también se han generado formulaciones que permiten la administración de Ang(1-7) por vía oral, en particular una ciclodextrina que corresponde a un oligosacárido que protege a Ang(1-7) de la degradación tras ser ingerida (Marques y cols. 2011).

A pesar de los resultados obtenidos en esta tesis, otras publicaciones se contraponen a estos hallazgos proponiendo un rol pro-inflamatorio para Ang(1-7) (Esteban y cols. 2009) e hipertensivo (Velkoska y cols. 2011), pudiendo Ang(1-7) además, interaccionar bajo ciertas condiciones con los receptores AT1 y AT2 (Zimmerman 2013). Por lo tanto, es necesario

profundizar aún más en el rol de Ang(1-7) y el receptor Mas en el tejido renal para establecer adecuadamente, bajo qué condiciones se podría estar ejerciendo un efecto dual en la acción de Ang(1-7).

No obstante lo anterior, existen efectos benéficos de Ang(1-7) adicionales, como son la disminución de la albúmina glicada (Wang y cols. 2012), una mejora en las funciones reparativas del endotelio disfuncional en pacientes con diabetes (Jarajapu y cols. 2012). Además en endotelio se ha visto que Ang(1-7) revierte los efectos de Ang II sobre moléculas implicadas en aterogénesis (Zhang y cols. 2012), y en tejido adiposo se ha demostrado que Ang(1-7) reduce el estrés metabólico asociado a la obesidad junto a marcadores inflamatorios (Santos y cols. 2012). Por último, se ha sugerido que los agonistas del receptor Mas tendrían una activa participación en la función eréctil masculina (Costa-Goncalves y cols. 2012).

Finalmente, hoy en día los ARB y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina son los tratamientos de elección para combatir los efectos de Ang II en hipertensión y CKD, estas drogas provocan un aumento de Ang(1-7) en el plasma (Zong y cols. 2011, Castro y cols. 2012, Takai y cols. 2012), dejando abierta la posibilidad que los efectos de estos fármacos estén además asociados a la acción que pueda ejercer Ang(1-7) en el receptor Mas en conjunto con el bloqueo del receptor AT1 y la inhibición de la ECA.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren:

1. Un potencial rol protector de Ang(1-7) en CKD en parámetros sistémicos, función renal y morfología de tejido renal utilizando un modelo de Nx 5/6.

2. Algunos de los efectos protectores como Ccr, infiltrado TI, proteína tubular, macrófagos TI, daño tubular, deposición de Col III no serían mediados por el receptor Mas.
3. Algunos de los efectos protectores de Ang(1-7) como la mantención de los niveles de FN, la regulación de la proteinuria y la dilatación tubular serían mediados por el receptor MAS.

6. **BIBLIOGRAFÍA**

Abbate M, Zoja C, Rottoli D, Corna D, Tomasoni S, Remuzzi G (2002) Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF- β 1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney int* 61: 2066-2077.

Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2006) How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 2006 17(11): 2974-84.

Aki K, Shimizu A, Masuda Y, Kuwahara N, Arai T, Ishikawa A, Fujita E, Mii A, Natori Y, Fukunaga Y and Fukuda Y (2010) ANG II receptor blockade enhances anti-inflammatory macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F870–F882.

Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E y Walther T (2002) Cell Type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem* 50: 691-696.

Alvarez V, Quiroz Y, Nava M, Pons H and Rodríguez-Iturbe B (2002) Overload proteinuria is followed by salt-sensitive hypertension caused by renal infiltration of immune cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F1132–F1141.

Baracho N, Simões-e-Silva A, Khosla M, Santos R (1998) Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin-(1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res* 31: 1221-1227.

Bascands J, Schanstra J (2005) Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int* 68: 925-937.

Becker L, Etelvino G, Walther T, Santos R, Campagnole-Santos M (2007) Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: 1416-1424.

Benter I, Yousif M, Cojocel C, Al-Maghrebi M, Diz D (2007) Angiotensin-(1–7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H666–H672.

Botelho-Santos G, Bader M, Alenina N and Santos R (2012) Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 6: 201-211.

Bosnyak S, Jones E, Christopoulos A, Aguilar M, Thomas W, Widdop R (2011) Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)*. 121: 297-303.

Bosnyak S, Widdop RE, Denton KM, Jones ES. (2012) Differential mechanisms of ang (1-7)-mediated vasodepressor effect in adult and aged candesartan-treated rats. *Int J Hypertens*. 2012:192567.

Brewster U, Perazella M (2004) The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney Disease. *Am J Med* 116: 263–272.

Campbell D, Kladis A, Duncan A (1994) Effects of converting enzyme inhibitors on angiotensin and bradykinin peptides. *Hypertension* 23: 439-449.

Castro P, Pardo J, Hernández R, López J, Del Valle L, Pastelín G, Ibarra M, Villalobos R (2012) Captopril avoids hypertension, the increase in plasma angiotensin II but increases angiotensin 1-7 and angiotensin II-induced perfusion pressure in isolated kidney in SHR. *Auton Autacoid Pharmacol* 32(3): 61-9.

Costa-Goncalves A, Fraga-Silva R, Leite R, Santos R (2012) AVE 0991, a Non-peptide Mas-Receptor Agonist, Facilitates Penile Erection. *Exp Physiol* 98(3): 850-5.

Da Silveira K, Matos F, Thomáz A, Sachs D, Corrêa L, Vasconcelos V, Bicalho T, Bader M, Pires L, Silva T, Santos R, Simões A and Martins M (2010) Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis. *The Journal of Immunology* 185: 5569–5576.

Dias-Peixoto M, Santos R, Gomes E, Alves M, Almeida P, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S (2008) Molecular Mechanisms Involved in the Angiotensin-(1-7)/Mas Signaling Pathway in Cardiomyocytes. *Hypertension* 52: 542-548.

Esteban V, Heringer-Walther S, Sterner-Kock A, de Bruin R, van den Engel S, et al. (2009) Angiotensin-(1–7) and the G Protein-Coupled Receptor Mas Are Key Players in Renal Inflammation. *PLoS One* 4(4): e5406.

Ferreira A y Santos R (2005) Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 38: 499-507.

Flores M, Godinho B, Almalik A, Nicklin S (2012) Adenoviral Delivery of Angiotensin-(1-7) or Angiotensin-(1-9) Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy via the Mas or Angiotensin Type 2 Receptor. *PLoS One* 7(9): e45564.

Franco M, Martínez F, Quiroz Y, Galicia O, Bautista R, Johnson R, and Rodríguez-Iturbe B (2007) Renal angiotensin II concentration and interstitial infiltration of immune cells are correlated with blood pressure levels in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R251–R256.

Fujimura K, Wakino S, Minakuchi H, Hasegawa K, Hosoya K, et al. (2014) Ghrelin Protects against Renal Damages Induced by Angiotensin-II via an Antioxidative Stress Mechanism in Mice. *PLoS One* 9(4): e94373.

Gallardo P, Velarde V, Vio CP, Alvo M, Pacheco A, Rodrigo R, 2007. Fisiología Renal y Metabolismo Hidrosalino. Santiago, Ediciones Universidad Católica de Chile.

Gava E, Samad-Zadeh A, Zimpelmann J, Bahramifarid N, Kitten G, Santos R, Touyz R, Burns K (2009) Angiotensin-(1–7) activates a tyrosine phosphatase and inhibits glucose-induced signalling in proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 24: 1766–1773.

Gava E, Castro C, Ferreira A, Colleta H, Melo M, Alenina N, Bader M, Oliveira L, Santos R, Kitten G (2012) Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regulatory Peptides* 175: 30–42.

Giani J, Muñoz M, Mayer M, Veiras L, Arranz C, Taira C, Turyn D, Toblli J, and Dominici F (2010) Angiotensin-(1–7) improves cardiac remodeling and inhibits growth promoting pathways in the heart of fructose-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1003–H1013.

Giani J, Muñoz M, Pons R, Cao G, Toblli J, Turyn D and Dominici F (2011) Angiotensin-(1–7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F272–F282.

Giani J, Burghi V, Veiras L, Tomat A, Muñoz M, Cao G, Turyn D, Toblli J, Dominici F (2012) Angiotensin-(1-7) Attenuates Diabetic Nephropathy in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 302(12): F1606-15.

Gomes E, Lara A, Almeida P, Guimaraes D, Resende R, Campagnole-Santos M, Bader M, Santos R (2010) Angiotensin-(1-7) Prevents Cardiomyocyte Pathological Remodeling Through a Nitric Oxide/Guanosine 3,5-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway. *Hypertension* 55: 153-160.

Gonzalez-Villalobos R, Billet S, Kim C, Satou R, Fuchs S, Bernstein K, and Navar G (2011) Intrarenal Angiotensin-Converting Enzyme Induces Hypertension in Response to Angiotensin I Infusion. *J Am Soc Nephrol* 22: 449–459.

Griffin K. & Bidani, A (2006) Progression of Renal Disease: Renoprotective Specificity of Renin-Angiotensin System Blockade. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 1054–1065.

Guimarães G, Santos S, Oliveira M, Pimenta E, Motta D, Martins A, Alenina N, Bader M, Santos R, Campagnole-Santos M (2012) Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides* 38(1): 54-61.

Guimaraes P, Santiago N, Xavier C, Fontes M, Santos R, Campagnole M (2012) Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(3): H393-400.

Heller J, Kramer H, Mal J, Cervenka L, Horáček V (2000) Effect of Intrarenal Infusion of Angiotensin-(1–7) in the Dog. *Kidney Blood Press Res* 23: 89–94.

Hewitson T (2009) Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F1239–F1244.

Iyer S, Averill D, Chappell M, Yamada K, Allred A and Ferrario C (2000) Contribution of Angiotensin-(1–7) to Blood Pressure Regulation in Salt-Depleted Hypertensive Rats. *Hypertension* 36: 417-422.

Iwai M and Horiuchi M (2009) Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT1 receptor axis vs ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. *Hypertension Research* 32: 533–536.

Jarajapu Y, Bhatwadekar A, Caballero S, Hazra S, Shenoy V, Medina R, Kent D, Stitt A, Thut C, Finney E, Raizada M, Grant M (2012) Activation of the ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis Enhances the Reparative Function of Dysfunctional Diabetic Endothelial Progenitors. *Diabetes* 62(4): 1258-69.

Liu J, Ji H, Zheng W, Wu X, Zhu J, Arnold A and Sandberg K (2010) Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17 β -oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biol Sex Differ* 1: 6.

Kimmel P (2002) Psychosocial factors in dialysis patients. *Kidney Int* 59: 1599–1613.

Klahr S, Morrissey J (2002) Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: 861-875.

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

Kolesnyk I, Struijk D, Dekker F, Krediet R (2010) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers in patients with chronic kidney disease. *Neth J Med* 68(1): 15-23.

Lara Lda, Cavalcante F, Axelband F, De Souza A, Lopes A, Caruso-Neves C (2006) Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT2-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na⁺-ATPase by Ang-(1-7). *Biochem J* 395(1): 183-90.

Leal M, Pinheiro S, Ferreira A, Santos RA, Bordoni L, Alenina N, Bader M and França L (2009) The role of angiotensin-(1–7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. *J Anat* 214: 736–743.

Levey A, Coresh J, Balk E, Kausz A, Levin A, Steffes M, Hogg R, Perrone R, Lau J, Eknoyan G (2003) National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med* 139: 137-147.

Levey A, Eckardt K, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, Zeeuw D, Hostetter T, Lameire N, Eknoyan G (2005) Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 67: 2089-2100.

Levey A, Jong P, Coresh J, Nahas M, Astor B, Matsushita K, Gansevoort R, Kasiske B and Eckardt K (2010a) The definition, classification and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 80(1): 17-28.

Levey A, Astor B, Stevens L and Coresh J (2010b) Chronic kidney disease, diabetes, and hypertension: what's in a name? *Kidney Int* 78: 19–22.

Liu Y (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 7: 684-696.

Marques F, Ferreira A, Sinisterra R, Jacoby B, Sousa F, Caliari M, Silva G, Melo M, Nadu A, Souza L, Irigoyen M, Almeida A, Santos R (2011) An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats. *Hypertension* 57: 477-483.

Matos M, Santos R, Campagnole-Santos M, Todiras M, Bader M, Alenina N, Siqueira A (2010) Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides* 31: 1934-1939.

Mattson D, James L, Berdan E, Meister C (2006) Immune suppression attenuates hypertension and renal disease in the Dahl salt-sensitive rat. *Hypertension* 48(1): 149-56.

Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D (1995) Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett* 357: 27-32.

Mezzano S, Droguett M, Burgos M, Ardiles L, Aros C, Caorsi I and Egido J (2000) Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney International* 57: 147–158.

Moon J, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Yamazaki T, Ohara I, Murakoshi M, Aoki T, Ishikawa Y, Lee S, Jeong K, Lee T, Ihm C, Lim S, Tomino Y (2011) Attenuating effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II-mediated NAD(P)H oxidase activation in type 2 diabetic nephropathy of KK-A(y)/Ta mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 300(6): F1271-82.

Nagao T, Okura T, Irita J, Jotoku M, Enomoto D, Desilva V, Miyoshi K, Kurata M, Matsui Y, Uede T and Higaki J (2012) Osteopontin Plays a Critical Role in Interstitial Fibrosis but Not Glomerular Sclerosis in Diabetic Nephropathy. *Nephron Extra* 2: 87–103.

Neves L, Santos R, Khosla M, Milsted A (2000) Angiotensin-(1-7) regulates the levels of angiotensin II receptor subtype AT1 mRNA differentially in a strain-specific fashion. *Regul Pept* 24;95(1-3): 99-107.

Ng H, Tan W, Mooppil N, Stanton N, Griva K (2014) Prevalence and patterns of depression and anxiety in hemodialysis patients: A 12-month prospective study on incident and prevalent populations. *Br J Health Psychol*.

O'Neill J, Corbett A, Johns E (2012) Dietary sodium intake modulates the renal excretory responses to intra-renal angiotensin (1-7) administration in the anaesthetised rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304(3): R260-6.

Ozawa Y, Kobori H, Suzaki Y, and Navar L (2007) Sustained renal interstitial macrophage infiltration following chronic angiotensin II infusions. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1): F330–F339.

Peters C, Kjaergaard K, Jensen J, Christensen K, Strandhave C, Tietze I, Novosel M, Bibby B, Jensen L, Sloth E and Jespersen B (2014) No significant effect of angiotensin II receptor blockade on intermediate cardiovascular end points in hemodialysis patients. *Kidney Int*

Pinheiro S, Silva A, Sampaio W, Paula R, Mendes E, Dias E, Bosco J, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, Santos R (2004) Nonpeptide AVE 0991 Is an Angiotensin-(1–7) Receptor Mas Agonist in the Mouse Kidney. *Hypertension* 44: 490-496.

Pinheiro S, Ferreira A, Kitten G, Da Silveira K, Silva D, Santos S, Gava E, Castro C, Magalhaes J, Mota R, Botelho-Santos G, Bader M, Alenina N, Santos R, Simoes A (2009) Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int* 75: 1184-1193.

Poblete H. (2011) XXXI Cuenta de hemodiálisis crónica (HDC) en Chile. Sociedad chilena de nefrología, registro de diálisis.

Quintão S, Beiman M, Queiroga R, de Paula V, Allahdadi K, Caires D, Pereira F, Fraga-Silva R, Cojocarú G, Cohen Y, Bader M, Pinto A, Rotman G and Santos R (2010) Vascular Relaxation, Antihypertensive Effect, and Cardioprotection of a Novel Peptide Agonist of the Mas Receptor. *Hypertension* 56: 112-120.

Rakušan D, Bürgelová M, Vaněčková I, Vaňourková Z, Husková Z, Škaroupková P, Mrázová I, Opočenský M, Kramer H, Netuka I, Malý J, Alenina N, Bader M, Santos R, Červenka L (2010) Knockout of Angiotensin 1–7 Receptor Mas Worsens the Course of Two-Kidney, One-Clip Goldblatt Hypertension: Roles of Nitric Oxide Deficiency and Enhanced Vascular Responsiveness to Angiotensin II. *Kidney Blood Press Res* 33: 476–488.

Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P (2005) The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 68: S57–S65.

Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza J, and Egido J (2003) Angiotensin II Increases Connective Tissue Growth Factor in the Kidney. *Am J Pathol* 163: 1937-1947.

Salas S, Giacaman A, Vio CP (2003) Pregnant Rats With 5/6 Nephrectomy Have Normal Volume Expansion Despite Lower Renin and Kallikrein. *Hypertension* 43: 744-748.

Sampaio W, Castro C, Santos R, Schiffrin E and Touyz R (2007) Angiotensin-(1-7) Counterregulates Angiotensin II Signaling in Human Endothelial Cells. *Hypertension* 50: 1093-1098.

Sangalli F, Carrara F, Gaspari F, Corna D, Zoja C, Botti L, Remuzzi G and Remuzzi A (2011) Effect of ACE inhibition on glomerular permselectivity and tubular albumin concentration in the renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1291–F1300.

Santiago N, Guimarães P, Sirvente R, Oliveira L, Irigoyen M, Santos R, Campagnole-Santos M (2010) Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension* 55: 889-896.

Santos R, Campagnole-Santos M, Baracho N, Fontes M, Silva L, Neves L, Oliveira D, Caligorne S, Rodrigues A, Gropen C, Carvalho W, Simoes A, Khosla M (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 35: 293-298.

Santos R, Passaglio K, Pesquero J, Bader M, Silva A (2001) Interaction between angiotensin-(1-7), kinins, and angiotensin II in kidney and blood vessels. *Hypertension* 38: 660-664.

Santos R, Silva A, Maric C, Silva D, Machado R, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro S, Lopes M, Bader M, Mendes E, Lemos V, Campagnole-Santos M, Schultheiss H, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8258-8263.

Santos R, Ferreira A, Nadu A, Braga A, de Almeida A, Campagnole-Santos M, Baltatu O, Iliescu R, Reudelhuber T, Bader M (2004) Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 19: 292-299.

Santos R and Ferreira A (2006) Pharmacological Effects of AVE 0991, a Nonpeptide Angiotensin-(1–7) Receptor Agonist. *Cardiovascular Drug Reviews* 24: 239–246.

Santos R, Ferreira A, Silva A (2008) Recent advances in the angiotensin-converting enzyme2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93: 519-527.

Santos S, Fernandes L, Pereira C, Guimarães A, de Paula A, Campagnole-Santos M, Alvarez J, Bader M, Santos R (2012) Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept* 178(1-3): 64-70.

Shah A, Gul R, Yuan K, Gao S, Oh Y, Kim U and Kim S (2010) Angiotensin-(1–7) stimulates high atrial pacing-induced ANP secretion via Mas/PI3-kinase/Akt axis and Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1365–H1374.

Shenoy S, Ferreira A, Qi Y, Fraga-Silva R, Díez-Freire, Dooies A, Jun J, Sriramula S, Mariappan N, Pourang D, Venugopal C, Francis J, Reudelhuber T, Santos RA, Patel J, Raizada M, and Katovich M (2010) The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiogenesis-(1–7)/Mas Axis Confers Cardiopulmonary Protection against Lung Fibrosis and Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1065-1072.

Silveira K, Barroso L, Vieira A, Cisalpino D, Lima C, et al. (2013) Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLoS One* 8(6): e66082.

Singh Y, Singh K, Sharma P (2012) Effect of combination of renin inhibitor and Mas-receptor agonist in DOCA-salt-induced hypertension in rats. *Mol Cell Biochem* 373(1-2): 189-94.

Stegbauer J, Oberhauser V, Vonend O, Rump L (2004) Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 61: 352-359.

Stegbauer J, Potthoff S, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, Vonend O, Woznowski M, Königshausen E, Sellin L, Rump L (2011) Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE deficient mice. *Br J Pharmacol* 163: 974-983.

Suga S, Phillips M, Ray P, Raleigh J, Vio CP, Kim Y, Mazzali M, Gordon K, Hughes J, Johnson R (2001) Hypokalemia induces renal injury and alterations in vasoactive mediators that favor salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F620-629.

Sukumaran V, Veeraveedu P, Gurusamy N, Lakshmanan A, Yamaguchi K, Ma M, Suzuki K, Nagata M, Takagi R, Kodama M, Watanabe K (2012) Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor. *Mol Cell Endocrinol* 351(2): 208-19.

Takai S, Jin D, Aritomi S, Niinuma K, Miyazaki M (2012) Powerful vascular protection by combining cilnidipine with valsartan in stroke-prone, spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 36(4): 342-8.

Tallant EA, Lu X, Weiss R, Chappell M, Ferrario C (1997) Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor. *Hypertension* 29: 388-392.

Thomas S, Anderson S, Gordon K, Oyama T, Shankland S, Johnson R (1998) Tubulointerstitial Disease in Aging: Evidence for Underlying Peritubular Capillary Damage, a Potential Role for Renal Ischemia. *J Am Soc Nephrol* 9: 231-242.

Velez J, Ryan K, Harbeson C, Bland A, Budisavljevic M, Arthur J, Fitzgibbon W, Raymond J, Janech M (2009) Angiotensin I Is Largely Converted to Angiotensin (1-7) and Angiotensin (2-10) by Isolated Rat Glomeruli. *Hypertension* 53: 790-797.

Velkoska E, Dean R, Griggs K, Burchill L and Burrell L (2011) Angiotensin-(1–7) infusion is associated with increased blood pressure and adverse cardiac remodelling in rats with subtotal nephrectomy. *Clinical Science* 120: 335–345.

- Villanueva S, Céspedes C, González A, Vio C, Velarde V (2007) Effect of ischemic acute renal damage on the expression of COX-2 and oxidative stress-related elements in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1364–F1371.
- Villanueva S, Céspedes C, González A, Roessler E, Vio CP (2008) Inhibition of bFGF-receptor type 2 increases kidney damage and suppresses nephrogenic protein expression after ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R819-R828.
- Vio CP, An S, Céspedes C, McGiff J, Ferreri N (2001) Induction of Cyclooxygenase-2 in Thick Ascending Limb Cells by Adrenalectomy. *J Am Soc Nephrol* 12: 649-658.
- Walters P, Gaspari T, and Widdop R (2005) Angiotensin-(1–7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* 45: 960-966.
- Wang H, Lo W, Lin L (2012) Angiotensin-(1-7) decreases glycated albumin-induced endothelial interleukin-6 expression via modulation of miR-146a. *Biochem Biophys Res Commun* 430(3): 1157-63.
- Wynn T (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210.
- Wynn T and Barron L (2010) Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 30(3): 245–257.
- Young D, Waltches G, Birchmeier, Fassano O, Wigler M (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45: 711-719.
- Young D, O'Neill K, Jessell T, Wigler M (1988) Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5339-5342.
- Zhang F, Ren J, Chan K, Chen H (2012) Angiotensin-(1-7) regulates Angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430(2): 642-6.
- Zhao G, Zhao H, Tu L, Xu X, Zheng C, Jiang M, Wang P, Wang P (2011) Effects and Mechanism of Irbesartan on Tubulointerstitial fibrosis in 5/6 Nephrectomized Rats. *J Huazhong Univ Sci Technol* 30(1): 48-54.
- Zong W, Yang X, Chen X, Huang H, Zheng H, Qin X, Yong Y, Cao K, Huang J, Lu X. (2011) Regulation of angiotensin-(1-7) and angiotensin II type 1 receptor by telmisartan and losartan in adriamycin-induced rat heart failure. *Acta Pharmacol Sin* 32(11): 1345-1350.
- Zimmerman D, Burns K (2012) Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin Sci (Lond)* 123(6):333-46.