

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS SEXUAIS NA FUNÇÃO RENAL DE
RATOS SHR: PAPEL DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA
E ESTRESSE OXIDATIVO**

ANTONIO FERREIRA DE MELO JUNIOR

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VITÓRIA, ABRIL DE 2021

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS SEXUAIS NA FUNÇÃO RENAL DE RATOS SHR:
PAPEL DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA
E ESTRESSE OXIDATIVO**

ANTONIO FERREIRA DE MELO JUNIOR

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

Aprovada em ___ de _____ 2021

Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli – Orientadora, UFES

Profa. Dra. Silvana Meyrelles– UFES

Profa. Dra. Carmem Sartório-UFES

Profa. Dra. Karla Nívea Sampaio- PPG Ciências Farmacêuticas, UFES

Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona- UNIFESP

Prof. Dra. Sônia Alves Gouvea
Coordenadora do PPGCF – UFES

Melo Junior, Antonio Ferreira 1989

Efeitos Dos Hormônios Sexuais Na Função Renal De Ratos SHR:
Papel Do Sistema Renina Angiotensina E Estresse Oxidativo
[Vitória] 2021.

101p., 29,7 cm (UFES, Dr. Ciências Fisiológicas, 2021).

Orientador: Profa. Dra. Nazaré Souza Bissoli

Co-orientadora: Profa. Dra. Polyana Lima Meireles Dalpiaz

*São Jorge, guerreiro vencedor do dragão, rogai por nós.
Ó São Jorge, meu guerreiro, invencível na Fé em Deus, que trazeis em vosso
rosto a esperança e confiança abra os meus caminhos.*

*Eu andarei vestido e armado com as armas de São Jorge para que meus
inimigos,
tendo pés não me alcancem,
tendo mãos não me peguem,
tendo olhos não me vejam,
e nem em pensamentos eles possam me fazer mal.
Armas de fogo o meu corpo não alcançarão,
facas e lanças se quebrem sem o meu corpo tocar,
cordas e correntes se arrebentem sem o meu corpo amarrar.*

*Jesus Cristo, me proteja e me defenda
com o poder de sua santa e divina graça,
Virgem de Nazaré, me cubra com o seu manto sagrado e divino,
protegendo-me em todas as minhas dores e aflições,
e Deus, com sua divina misericórdia e grande poder,
seja meu defensor contra as maldades e perseguições dos meus inimigos.*

*Glorioso São Jorge, em nome de Deus,
estenda-me o seu escudo e as suas poderosas armas,
defendendo-me com a sua força e com a sua grandeza,
e que debaixo das patas de seu fiel ginete
meus inimigos fiquem humildes e submissos a vós.
Ajudai-me a superar todo o desanimo e alcançar a graça que tanto preciso:
Dai-me coragem e esperança fortalecei minha FÉ e auxiliai-me nesta
necessidade.
Assim seja com o poder de Deus, de Jesus e da falange do Divino Espírito
Santo.*

Amém!

Dedico este trabalho aos meus pais ANTONIO FERREIRA DE MELO e LUCIMAR FERREIRA DA SILVA, que sempre foram heróis dentro de suas possibilidades.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sabedoria e por ser mão forte me sustentando quando fraco, me levantando quando caído e por nunca deixar de ser meu guia. Aos meus pais Lucia e Antonio por serem meus principais torcedores e vibrarem a cada pequeno passo. Por estarem comigo nos melhores e piores momentos, mostrando sempre que existe uma saída e uma solução. Por estarem sempre perto transpondo a barreira da distância com suas orações. Muito obrigado pelo exemplo que tornou o próprio reflexo do que vocês são. Amo vocês incondicionalmente! Aos meus irmãos Viviane e Rogério que desde minha graduação foram esteios fortes para minha estadia em Vitória, no aspecto financeiro, emocional e pelo simples fato de serem parte de mim. Aos meus tios Marcos, Ronaldo, Vera, Marluce e Nenzinha, meu avô Aristides por tudo que representam em minha vida, pela torcida e pelas vibrações positivas.

A minha família do coração, tia Nádia, Raul, Tainah, Sophia e Matheus, por me acolherem, incentivar, vibrar comigo, me aconselhar, dar suporte, pelo amor dado a mim de forma gratuita e incondicional.

Agradeço imensamente a Professora Nazaré, minha orientadora e amiga por sempre agir de forma humana, por se preocupar e cuidar não só de mim, mas de todos os seus orientandos. Muito obrigado por me incentivar, por ter me recebido no LHE e por me ajudar a acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Obrigado por cada conselho, cada puxão de orelha e por ter enxergado que eu seria capaz de chegar até aqui.

Agradeço de forma muito especial a minha amiga e co-orientadora Polyana Dalpiaz por me ajudar em todos os momentos de dificuldade, por dividir comigo os bons momentos dessa trajetória. Por estar presente nos momentos difíceis e com sua experiência me ajudar a amadurecer e superar. Muito Obrigado por acreditar sempre que era possível e que eu era capaz.

Agradeço grandemente a Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, por abrir as portas de seu laboratório e nos proporcionar a realização das atividades das enzimas ECA e ECA2. Por ser colaboradora e por vibrar com cada paper publicado. Muito obrigado Profa. Dra. Silvana Meyrelles, pela parceria, por

confiar em mim como aluno, como profissional, por confiar a mim seu laboratório, onde puder realizar a função renal dos animais. Muito obrigado pelas excelentes aulas, pelos momentos felizes de risadas no laboratório e na PPGCF. Sou seu fã!!!! A Profa. Dra. Ivanita Stefanon pela simpatia, pela elegância e contribuição em minha qualificação. Pela confiança e disponibilidade em todos os momentos que precisei, pelas aulas durante o mestrado e também no doutorado. Tenho extrema admiração pela pessoa e profissional que a sra. é. A professora Dra. Karla Nivea pela contribuição em minha qualificação e por ter aceito participar de minha banca. Professora Dra. Carmem Sartório, pela parceria, por me acompanhar desde o mestrado e contribuir com meu trabalho na qualificação, por sempre ser solícita e me ajudar todas as vezes que necessitei. Agradeço ao professor Dr. Roger, um grande pesquisador e posso dizer que amigo, por sempre estar a disposição, pela bondade e contribuição em minha formação desde a iniciação científica.

Agradeço a Profa. Dra. Sônia Alves Gouvea, pelo incentivo, pelas caronas diárias hehehe. Por todos os momentos de conversa, por se preocupar comigo e me aconselhar sempre. Pela parceria em projetos diversos e que venham muitos mais!!! As professoras Dra. Emília Monteiro e Dra. Sofia Pereira por me receberem na Universidade Nova de Lisboa e me proporcionarem momentos de muito conhecimento, vivência com técnicas novas e por me proporcionarem a convivência com pessoas maravilhosas, Maria João, Nuno e Catarina. Foi incrível a experiência vivida com vocês! Quero agradecer imensamente a Maria João que me direcionou nas tarefas e nos ambientes da Universidade. Por ter se tornado uma grande amiga e por dedicar um tempo para me apresentar Lisboa!

Aos profissionais de todos os setores do CCS! Sem vocês nada disso seria possível. Ao biotério em especial, por nos atender, cuidar dos animais e confiá-los a nós. Agradeço especialmente ao Marildo, Mario e Enildo.

Aos meus companheiros fiéis Gabriel e Eliana, por dividirem comigo todos os momentos e estarem comigo doando amor, luz e muita paz. Por me proporcionarem momentos inesquecíveis. Agradeço aos queridos Aline e Gustavo que foram presentes do universo em minha vida. A Dani e Renné, pelos momentos de diversão, descontração e em especial a Dani, por ser minha chefe

e por te me ensinado e ajudado a crescer pessoalmente e profissionalmente. Muito obrigado Helber, pela amizade, pela oportunidade de conseguir meu primeiro emprego na docência superior e por fazer tanto por mim. Aos meus amigos da Multivix, Karine, Elaine, Juliana, Vania, Leandro, profa. Alcione, Ana Gabriela, Robertinha, Nelio, Patrícia, Sheila e Gabriela.

Um super agradecimento aos meus instrutores Izabela e Aline por estarem desde o primeiro dia que cheguei ao LHE e dedicarem tempo para me instruir, por me ensinarem e contribuírem efetivamente no profissional que me tornei.

A minha amiga de todas as horas, colega de trabalho e irmã Glauciene, que sempre dividiu comigo todos os momentos desde o princípio. Sou muito grato por me escutar e por sempre ter um sorriso pra dividir. Gratidão eterna por me salvar muitas vezes com aulas, exercícios, planos de ensino hehehehe...Enfim, você é muito especial.

A minha amiga Pollyana Peixoto, por ser companheira, confidente, por dividir as mesmas ideologias políticas, por trazer sempre comida pra mim durante os experimentos hehehe. Muito obrigado por ter despertado em sua mãe um grande sentimento de filho por mim. Ao meu amigo Marcos pelos diversos momentos de risadas no LHE, pelos conselhos e por se tornar um grande amigo. Muito obrigado ao meu amigo Edgar, pela ajuda desde o mestrado, pela amizade e pelo cuidado e por todos os momentos de muita alegria que vivemos juntos. Um agradecimento super especial ao meu ex-aluno de IC, agora colega de profissão e amigo Leonardo Escouto, por participar de todas as etapas desse trabalho e por contribuir pra o mesmo pudesse ser concluído. Muito obrigado pela amizade que foi desenvolvida. Aos amigos do LHE, Mary, Nara, Silas, Felipe, Thatiany, Girlandia, Andrews, Ewelyne, Karine, pelos bons momentos.

Aos meus amigos Barbára, Amaral, Sheyna, Rúbia, Ana Paula, Vinícius, Brunela, Diego Perovano e a todos que estão presentes marcando minha vida de algum forma.

Meus amigos da pós Thiago, Gersica, Filipe Filleti, Paula, Renata, Bruno, Simone, Fabrício, Wenna, Vinícius, Igor, Emilly, Marito, Laís, Camila, Divo, Elis, Edgar, Duda, Tagana, Nathalie, Wender e a todos mesmo que não citados, por

trazerem alegria aos nossos dias e por terem contribuído nas aulas, em dias de experimento. Enfim agradeço de coração. Aos meus amigos Martielo, Matheus, Thiago, Hebert, Cláudio, cada um de vocês contribuiu de forma diferente para o meu crescimento como pessoa. Aos meus antigos companheiros de graduação, mas sempre atuais amigos Mary, Jeff, Izabel, Edilma, Paulo, por estarem sempre juntos comigo e torcerem sempre. A todos vocês meu muito obrigado!!!!

As agências de fomento Capes, Fapes e CNPQ por financiarem este projeto e tornar possível a sua realização.

Sumário

RESUMO	19
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 FISILOGIA RENAL: Breve Histórico	21
1.2 A ULTRAESTRUTURA DO GLOMÉRULO E FLUXO SANGUÍNEO RENAL	23
1.3 CLEARANCE RENAL.....	27
1.4 FLUXO PLASMÁTICO RENAL.....	27
1.5 TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR	28
1.6 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FUNÇÃO RENAL.....	29
1.7 VISÃO GERAL SOBRE O SRA.....	31
1.8 INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS NOS COMPONENTES DO SRA	34
1.9 ESTRESSE OXIDATIVO (EO), ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E SISTEMA ANTIOXIDANTE	36
1.10 SRA E FUNÇÃO RENAL.....	40
1.11 HIPÓTESE	42
2- OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 ANIMAIS.....	44
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	45
3.4 MEDIDAS DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)	45
3.5 OVARIECTOMIA.....	46
3.6 ORQUIECTOMIA.....	48
3.7 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL	48
3.8 PROTOCOLO DE FUNÇÃO RENAL.....	50
3.9 COLETA E HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS.....	52
3.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ECA TECIDUAL.....	53
3.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ECA2 TECIDUAL.....	53

3.12 DETECÇÃO DE ROS INTRACELULAR.....	54
3.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	55
3.14 WESTERN BLOT.....	55
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 PESO CORPORAL, RAZÃO PESO DOS RINS DIREITO E ESQUERDO /COMPRIMENTO TÍBIA.....	58
4.2 PAS INICIAL E FINAL.....	59
4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL.....	59
4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE EROs NO TECIDO RENAL.....	61
4.5 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO GLOMERULAR.....	62
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....	64
4.7 ATIVIDADE RENAL DAS ENZIMAS ECA E ECA2.....	66
5 DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	82
FINANCIAMENTO.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos dados ponderais, razão rim(mg)/tíbia(cm) e PAS.....	56
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustrações de algumas estruturas do rim, descritas pelo pesquisador William Bowman. **Fonte (Adaptada):** Eknoyan: Sir William Bowman, 1996.....22

Figura 2 (A-B): (A) Seção longitudinal da papila renal. Os dutos coletores (a) e os túbulos em forma de alça (b) são visualizados por tratamento do tecido com solução diluída de hidróxido de potássio seguido de enxágue em água. (B) Representação do néfron renal e sua nomenclatura de acordo com Henle. (1) Glomérulo; (2) túbulo cortical convoluto; (3) túbulo em forma de alça ou túbulo de Henle; (4) Túbulo escuro; (5) Segmento de comutação; (6) Túbulo de conexão; (7) túbulo coletor. **Fonte (Adaptada):** Kinne-Saffran; Kinne, 1994.....23

Figura 3: Estrutura do corpúsculo renal. A cápsula de Bowman é revestida com epitélio parietal, que dá lugar às células do túbulo proximal (à direita). À esquerda, o polo vascular do glomérulo inclui as arteríolas aferentes e eferentes. Além disso, a relação entre essas arteríolas e a porção especializada do néfron distal chamada mácula densa é ilustrada. As camadas que compõem a barreira de filtração são exibidas. A camada mais externa é composta pelas células epiteliais viscerais, os podócitos, a seguir a membrana basal glomerular (MBG) e finalmente as células endoteliais fenestradas.....25

Figura 4: Visão clássica (azul) e visão não clássica (verde) da cascata do sistema renina-angiotensina. Receptores (vermelho). AP: Aminopeptidase; APA: Aminopeptidase A; APN: aminopeptidase N; CP: Carboxipeptidase; EP: Endopeptidase; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora da angiotensina 2; NEP: neprilisina; Mas: AT7 receptor da Ang-(1-7). PRR: receptor de pró-renina.....32

Figura 5: Desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Para manter a homeostase celular, é necessário um equilíbrio entre a produção e a degradação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a formação excessiva de oxidantes e a degradação desses radicais por antioxidantes. A desregulação metabólica resultando em dano celular grave, morte celular, envelhecimento e doença pode ser uma consequência do estresse oxidativo. Por outro lado, uma produção excessiva de antioxidantes (como a glutatona (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, ácido ascórbico, α -tocoferol, ...) também é prejudicial à célula. "Estresse redutor" causa uma defesa do hospedeiro defeituosa e sinalização fisiológica prejudicada.....37

Figura 6: Funções da ECA e ECA 2 no sistema renina-angiotensina: Relação com o rim. O angiotensinogênio é clivado pela renina para formar angiotensina I (Ang I), que é convertida em Ang II pela ECA. A principal função do ECA 2 é sintetizar Ang 1-9 a partir da Ang I e produzir a molécula vasodilatadora e antiproliferativa Ang-(1-7) a partir da Ang II. Ang I atua como um substrato para neprilisina, que a cliva para formar Ang-(1-7). Ang II liga-se ao receptor tipo 1 (AT1-R) e AT2. O receptor, Mas é específico para Ang-(1-7). O eixo ECA2-Ang-

(1-7) -MAS modula os efeitos do ECA-Ang Eixoll-AT1-R. ECA: Enzima de conversão da angiotensina; ON: óxido nítrico; NEP: Neprilisina; EROs: espécies reativas de oxigênio.....41

Figura 7: Desenho experimental.....45

Figura 8: Plestismógrafo de cauda utilizado para medidas de PAS inicial e final.....46

Figura 9: Procedimento de Ovariectomia bilateral. Arquivo do Laboratório de Hipertensão experimental, UFES.....47

Figura 10. Fases do ciclo estral detectados por meio de esfregaço vaginal em microscópio ótico com aumento de 40x. Arquivo do Laboratório de Hipertensão experimental, UFES.....49

Figura 11: Procedimento de traqueostomia (A), Cateterização das veia e artéria femurais (B) e Cateterização da bexiga (C). Arquivo do Laboratório de Hipertensão experimental, UFES.....50

Figura 12. Influência do sexo e HS na FR de Machos e Fêmeas SHR. (A) Clearance de inulina, (B) Clearance de PAH, (C) Fluxo sanguíneo renal e (D) resistência vascular renal. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6 *p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.....60

Figura 13. Avaliação de EROs no tecido renal. (A) dihidroetidina e (B) diclorofluoresceína. A análise de EROs foi realizada por citometria de fluxo. O O₂⁻ intracelular e o H₂O₂ foram monitorados separadamente por meio de alterações na intensidade mediana de fluorescência. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6 *p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.....62

Figura 14. Análise histológica da deposição de colágeno renal. Porcentagem de conteúdo de colágeno renal e imagens representativas (A) SHAM Macho, (B) SHAM Fêmea, (C) CAST Macho, (D) CAST Fêmea. As amostras de rim foram coradas com picosirius red para quantificar o conteúdo de colágeno e visualizadas em microscopia óptica com aumento de 400x. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6 *p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.....63

Figura 15. Expressão das proteínas Podocina (A) e Nefrina (B) no tecido renal. A expressão de cada proteína foi normalizado pelo GAPDH. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6 *p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.....64

Figura 16. Expressão das proteínas COX2, CAT, SOD-Mn, SOD-CuZn e NOX2 no tecido renal. (A) expressão da proteína COX2, (B) expressão da proteína CAT, (C) expressão da proteína SOD-Mn, (D) expressão da proteína SOD-CuZn e (E) expressão da proteína NOX2. A expressão de cada proteína foi

normalizado pelo GAPDH. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6
*p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.....65

Figura 17. Avaliação da atividade das enzimas ECA e ECA2 no tecido renal. (A) atividade renal da ECA e (B) atividade renal da ECA2. A atividade enzimática foi expressa em AFU (unidades arbitrárias de fluorescência). Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6 *p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FR	Função Renal
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EO	Estresse Oxidativo
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
PA	Pressão Arterial
MBG	Membrana Basal Glomerular
FSR	Fluxo Sanguíneo Renal
FPR	Fluxo Sanguíneo Renal
PAH	Ácido para-aminohipúrico
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
NUS	Nitrogênio Ureico Sanguíneo
SRA	Sistema Renina Angiotensina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina (1-7)
AT1-R	Receptor de Angiotensina II
Mas	Receptor de Angiotensina (1-7)
HS	Hormônios Sexuais
PAS	Pressão Arterial Sistólica
ON	Óxido Nítrico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ATP	Adenosina-5-Trifosfato
GPX	Glutationa Peroxidase
SOD	Superóxido Dismutase
OH·	O ₂ -Ânio Superóxido
NO·	Radicais de Óxido Nítrico
NO ₂ ·	Radicais de Dióxido de Nitrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
O ₃	Ozônio
HClO	Ácido Hipocloroso
HNO ₂	Ácido Nitroso
N ₂ O ₃	Trióxido de Dinitrogênio
ONOO-	Peroxinitrito
NADH	Adenina Dinucleotídeo
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
SOD1	SOD Cobre-Zinco
SOD2	SOD Manganês
SOD3	SOD Extracelular
CAT	Catalase
O ₂	Oxigênio
H ₂ O	Água
COX2	Ciclooxigenase 2

NADPH	NADPH Oxidase
NOX2	Subunidade da NADPH
FC	Frequência Cardíaca
PAN	Pressão Arterial Média
RVR	Resistência Vascular Renal
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência
DHE	Diidroetidina
DCF	Diclorofluoresceína
APS	Persulfato Amônico
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Deidrogenase
EPM	Erro Padrão da Média
DCR	Doença Renal Crônica
TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação Beta
NF-KB	Fator de Transcrição
IL-1	Interleucina 1
IRA	Insuficiência Renal Aguda

RESUMO

A hipertensão é um fator de risco dependente do sexo e dos hormônios sexuais, no que diz respeito à saúde cardiovascular e renal da população. Os homens experimentam maiores perdas da função renal (FR) que as mulheres, entretanto os mecanismos permanecem pouco esclarecidos. Nosso objetivo foi avaliar a relação entre sexo, Hormônios sexuais, atividade das enzimas conversora de angiotensina (ECA), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), estresse oxidativo (EO), e FR em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) Machos e Fêmeas. SHR com 12 semanas de idade foram submetidos à castração ou cirurgia de SHAM e divididos em 4 grupos, Machos e Fêmeas SHAM ou Castrados (CAST). Após 51 dias avaliamos FR (inulina e para-aminohipurato de sódio), atividades de ECA e ECA2 (fluorimetria), EO (citometria de fluxo), deposição de colágeno (picosirius red) e expressão de proteínas (western blot). Os machos apresentaram FR inferior ao das fêmeas e a castração prejudicou esse parâmetro em ambos os grupos. Dimorfismo sexual não foi observado em relação a EO e inflamação; entretanto, a castração aumentou este parâmetro mais severamente em machos do que em fêmeas. Os machos SHAM exibiram maior deposição de colágeno do que as fêmeas, embora a castração tenha aumentado em ambos os sexos, eliminando a diferença. Encontramos dimorfismo sexual em relação às atividades renais da ECA e da ECA2, que foram menores nos Machos do que em Fêmeas SHAM. Embora a castração não tenha alterado a atividade da ECA, foi capaz de reduzir a atividade da ECA2 nas Fêmeas e aumentou em severamente nos Machos. Nossos resultados demonstraram que os HS, modulam SRA que por sua vez promove desequilíbrio entre os sistemas oxidante/antioxidante em ratos SHR machos e fêmeas na presença e ausência de hormônios sexuais. Foram observados severos danos à função renal desses animais, sendo os machos os mais afetados pela castração, tendendo a insuficiência renal. Sendo assim, sugerimos que os resultados encontrados são influenciados no grupo CAST Macho pela elevada atividade de ECA2 e CAST Fêmeas pelo desequilíbrio entre a atividade ECA / ECA2 encontrada após a castração.

ABSTRACT

Hypertension is a relevant sex and sex hormones-dependent risk factor where the cardiovascular and renal health of the population are concerned. Men experience greater losses of renal function (RF) than women, but the mechanisms remain somewhat unclear. Our goal was to evaluate the relationship between oxidative stress (OS), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activities and RF in male and female SHR. Twelve-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were submitted to either castration or SHAM surgery and divided into 4 groups, SHAM or Castrated (CAST) males or females. After 51 days we evaluated RF (inulin and sodium para-aminohippurate), ACE and ACE2 activities (fluorimetry), OS (flow cytometry), collagen deposition (picrosirius red) and protein expression (western blot). Males presented lower RF than females and castration impaired this parameter in both groups. Sexual dimorphism was not observed regarding OS and inflammation; however, castration increased this parameter more severely in males than in females. SHAM males exhibited higher collagen deposition than females, though castration increased it in both sexes, eliminating the difference. We found sexual dimorphism regarding renal ACE and ACE2 activities, which were lower in males than in females. Although castration did not alter ACE activity, it reduced ACE2 activity in females and increased it in males. Our results demonstrated that SH modulate RAS, which in turn promotes an imbalance between the oxidant/antioxidant systems in male and female SHR rats in the presence and absence of sex hormones. Severe damage to the renal function of these animals was observed, with males being the most affected by castration, tending to renal failure. Therefore, we suggest that the results found are influenced in the CAST Male group by the high activity of ACE2 and CAST Females by the imbalance between the ACE/ACE2 activity found after castration.

1. INTRODUÇÃO

1.1 FISILOGIA RENAL: Breve Histórico

Por volta de 1800, baseado na Teoria da Evolução de Darwin e associado ao reconhecimento de que os processos químicos corporais de diferentes espécies eram extraordinariamente semelhantes, levou Claude Bernard a desenvolver sua teoria do Milieu Intérieur, que seria “A constância do ambiente interno é a condição de um ambiente livre e existência independente”. Com isso, ele quis dizer que a capacidade de nossos organismos ancestrais de deixar os oceanos exigia que eles desenvolvessem a capacidade de "carregar o oceano com eles" na forma de um oceano interno, banhando suas células constantemente em fluidos que se assemelham aos próprios mares de que eles evoluíram.

Esse conceito, muito embora faz menção a noção de humores corporais, marcou um enorme avanço, uma vez que Bernard descreveu tanto as características dos fluidos corporais quanto a necessidade de manutenção desse meio interno. A manutenção do meio interno foi inicialmente chamada de “wisdom of the body” “Ciência/Sabedoria do corpo” por Starling, que reconheceu que os organismos devem manter a constância desse oceano interno, apesar das grandes flutuações na dieta, ingestão de líquidos e outras condições ambientais. O termo homeostase foi posteriormente estabelecido pelo comportamentalista Walter Cannon para descrever os processos fisiológicos que, em conjunto, mantêm a constância das químicas internas, bem

como a pressão arterial (PA), a temperatura corporal e o balanço energético (Zeide et al., 2014).

Os primeiros “insights” sobre a fisiologia renal vieram do estudo assíduo da anatomia porque, em grande parte, a função renal segue a estrutura. Desenhos meticulosos (figura 1) e estudo histológico do rim animal e humano de William Bowman (Eknoyan, 1996), Jacob Henle (Kinne-Saffran; Kinne, 1994) (figura 2A-B) e outros, completos com cápsulas, capilares e túbulos convolutos estavam disponíveis na época de Bernard, mas os mecanismos para a formação da urina e do papel dos rins na homeostase não foram desvendados até o século XXIV.

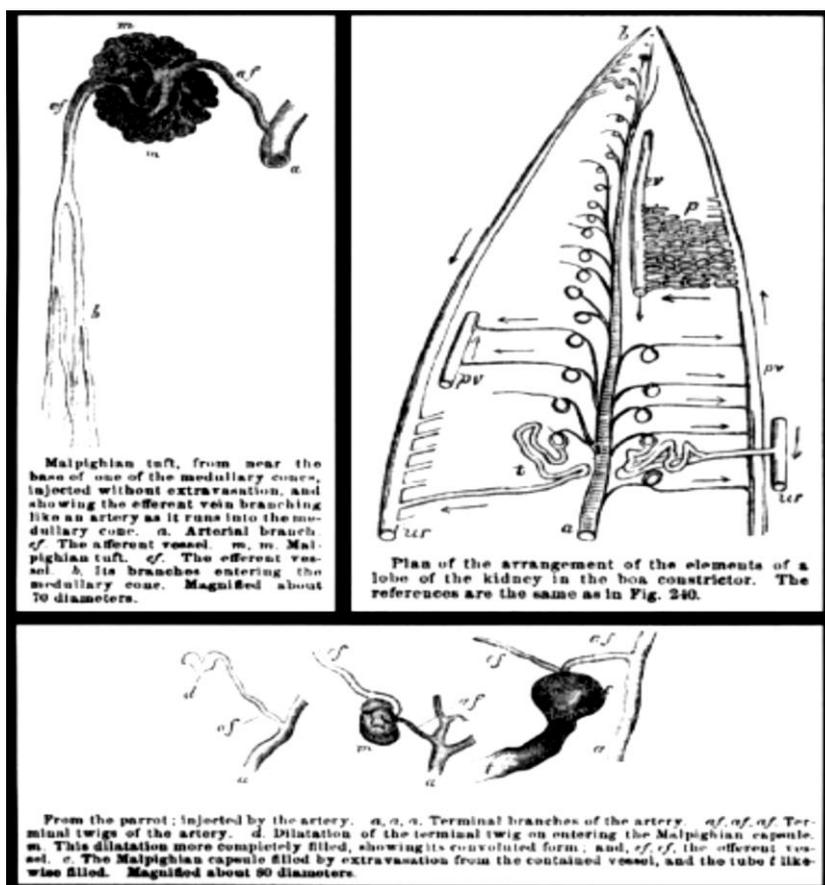


Figura 1: Ilustrações de algumas estruturas do rim, descritas pelo pesquisador William Bowman. **Fonte (Adaptada):** Eknoyan: Sir William Bowman, 1996.

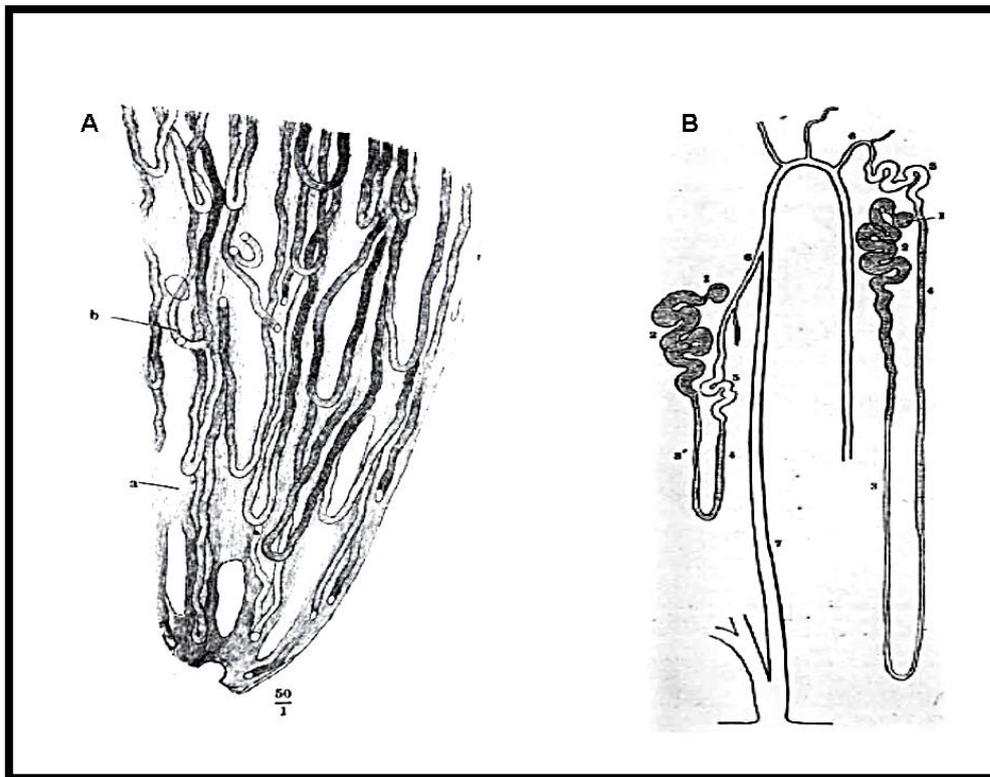


Figura 2 (A-B): (A) Seção longitudinal da papila renal. Os dutos coletores (a) e os túbulos em forma de alça (b) são visualizados por tratamento do tecido com solução diluída de hidróxido de potássio seguido de enxágue em água. (B) Representação do néfron renal e sua nomenclatura de acordo com Henle. (1) Glomérulo; (2) túbulo cortical convoluto; (3) túbulo em forma de alça ou túbulo de Henle; (4) Túbulo escuro; (5) Segmento de comutação; (6) Túbulo de conexão; (7) túbulo coletor. **Fonte (Adaptada):** Kinne-Saffran; Kinne, 1994.

1.2 A ULTRAESTRUTURA DO GLOMÉRULO E FLUXO SANGUÍNEO RENAL

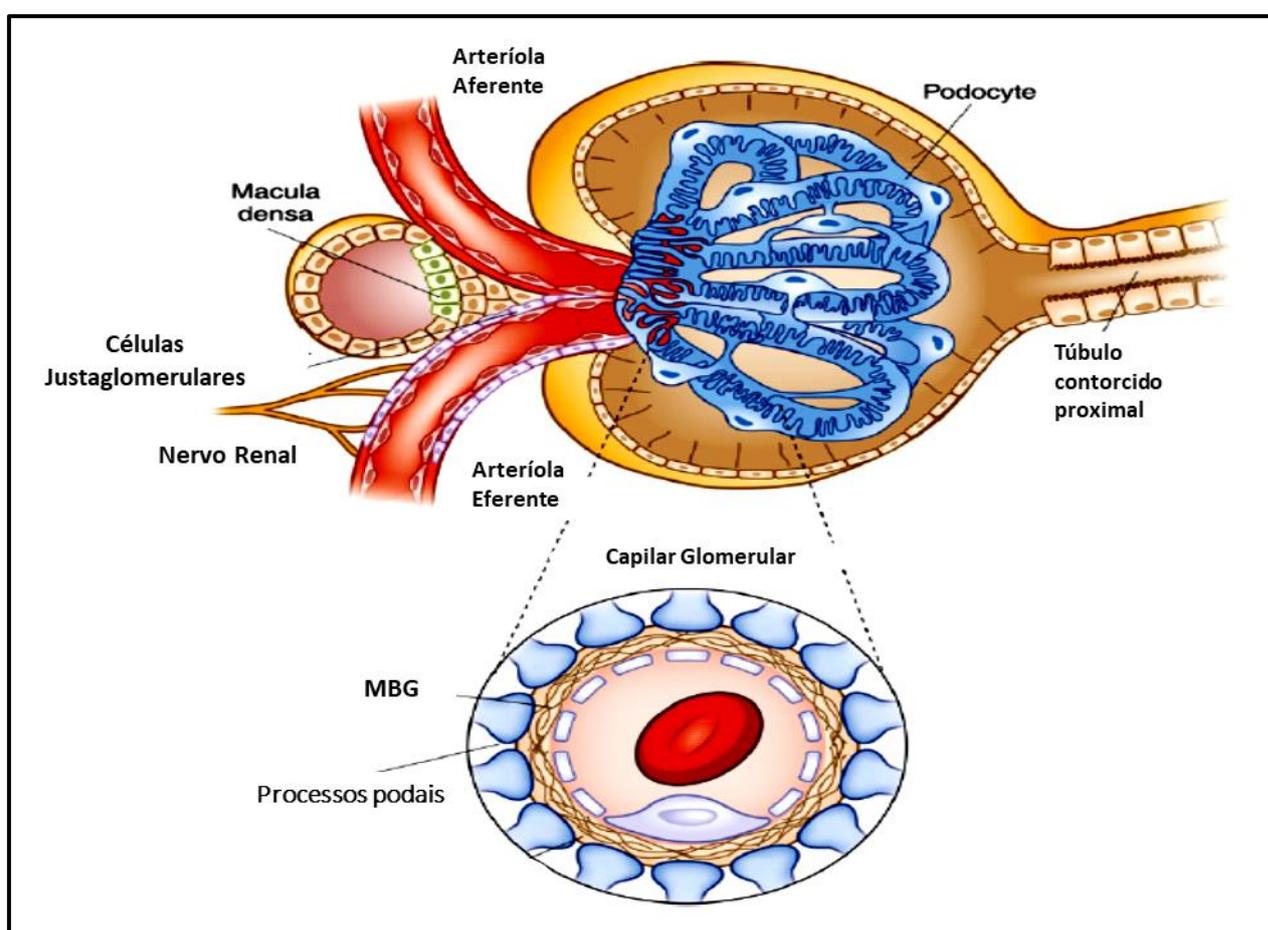
Finalizado o debate sobre a formação da urina, ficou claro que esse processo era composto por filtração, reabsorção e secreção. Os mistérios do design elegante da filtração foram explorados e o conceito de depuração foi construído. O uso da microscopia eletrônica de varredura permitiu aos pesquisadores apreciar a estrutura tridimensional das células e o design

engenhoso do glomérulo. Adicionalmente, o avanço das técnicas de microscopia na década de 70, permitiu ainda visualizar estrutura dos podócitos, fendas de filtração e o endotélio fenestrado dentro do leito capilar envolvendo a membrana basal, além de ter ajudado a definir os fatores que criam a força motriz líquida para a filtração e forneceram a estrutura matemática para nosso entendimento atual dessas forças (Zeide et al., 2014).

Mais recentemente, novas técnicas ajudaram a caracterizar ainda mais essas observações. Por exemplo, modelos de desenvolvimento de néfrons, como o peixe-zebra, que são transparentes e de crescimento rápido com um único par de néfrons, têm sido indispensáveis para determinar o desfecho de defeitos únicos na função e no desenvolvimento dos rins. Embora simples na forma, o glomérulo pronéfrico é composto de tipos de células que são típicos de rins de vertebrados superiores, incluindo células endoteliais capilares fenestradas, podócitos e células epiteliais tubulares polarizadas (Drummond, 2005; Outtandy et al., 2018).

O rim é o órgão com perfusão mais robusta por grama de tecido do corpo humano, recebendo de 20% a 25% do débito cardíaco. Esse órgão apresenta funções amplas e fundamentais para manutenção da homeostasia, como filtrar o sangue, reabsorver componentes fundamentais e excretar os resíduos metabólicos como hormônios e componentes exógenos. No processo de reabsorção os rins devolvem ao sangue algumas substâncias que foram filtradas, como a água, proteínas de baixo peso molecular e eletrólitos (Lunn, 2011).

O glomérulo, a unidade de filtração renal, é composto por um feixe especializado de capilares que estão exclusivamente situados entre dois vasos de resistência (Figura 3). Cada um desses capilares está contido na cápsula de Bowman e são os únicos leitos capilares no corpo que não são circundados por tecido intersticial. Portanto, uma estrutura de suporte única é necessária para manter o fluxo nessas unidades capilares essenciais (Puelles et al., 2011; White, 2012).



Fonte (ADAPTADO): Pollak et al., 2014.

Figura 3: Estrutura do corpúsculo renal. A cápsula de Bowman é revestida com epitélio parietal, que dá lugar às células do túbulo proximal (à direita). À esquerda, o polo vascular do glomérulo inclui as arteríolas aferentes e eferentes. Além disso, a relação entre essas arteríolas e a porção especializada do néfron distal chamada mácula densa é ilustrada. As camadas

que compõem a barreira de filtração são exibidas. A camada mais externa é composta pelas células epiteliais viscerais, os podócitos, a seguir a membrana basal glomerular (MBG) e finalmente as células endoteliais fenestradas.

Na verdade, todos os principais componentes do próprio filtro são únicos em comparação com estruturas relacionadas em outros leitos capilares. A camada proximal do componente do próprio filtro glomerular é um endotélio fenestrado, caracterizado pela presença de fenestras individuais da ordem de 70–100 nm de diâmetro. Essas células revestem o aspecto luminal do capilar e permitem a filtração. A segunda camada do filtro, a MBG, é uma malha complexa de proteínas extracelulares, incluindo colágeno tipo IV, lamininas, fibronectinas e proteoglicanos (Pollak et al., 2014; Roumenina et al., 2016).

A camada distal do filtro glomerular é composta pelas células epiteliais viscerais ou podócitos. Essas células notáveis ajudam a criar o diafragma de fenda de filtração e servem como suporte para ajudar a manter a integridade das alças capilares independentes. Um terceiro tipo de célula, as células mesangiais, também contribui para a integridade glomerular e a natureza dinâmica da filtração. Juntas, essa estrutura elegante permite a formação do filtrado glomerular primário que entra em um espaço delimitado pelas células epiteliais viscerais e parietais antes da modificação durante o trânsito pelo túbulo (Pollak et al., 2014; Roumenina et al., 2016).

O fluxo sanguíneo renal (FSR) é diretamente proporcional ao gradiente transrenal, a diferença de pressão entre a artéria renal e a veia renal, é inversamente proporcional à resistência da vasculatura renal. A autorregulação do FSR é realizada alterando a resistência vascular renal conforme a pressão arterial muda, mantendo assim o fluxo sanguíneo constante em uma faixa de

pressão arterial média de 50 a 150 mmHg em pessoas normotensas (Loutzenhiser et al., 2006).

Embora o FSR global seja relativamente constante, sua distribuição dentro do rim é bastante heterogênea. O córtex renal e os néfrons corticais renais recebem 90% do FSR, enquanto a medula renal e seus néfrons justamedulares recebem apenas cerca de 10%. Essa grande disparidade no fluxo sanguíneo regional torna a medula renal sensível à lesão isquêmica. O FSR é calculado pela determinação da depuração de uma determinada substância do plasma e do fluxo plasmático renal (FPR) (Meltzer, 2013; Bellomo et al., 2004)

1.3 CLEARANCE RENAL

A depuração ou clearance renal de uma substância é o volume de plasma completamente eliminado da substância por unidade de tempo (Meltzer, 2013; Bellomo et al., 2004), calculado utilizando a fórmula abaixo:

$$C = U \times V / P$$

Onde C= depuração em mL/min, U= concentração de urina em mg/mL, V= volume/tempo de urina em mL/min e P = concentração plasmática em mg/mL.

1.4 FLUXO PLASMÁTICO RENAL

O FPR é calculado pela depuração do ácido para-aminohipúrico (PAH), visto que em baixas concentrações, este composto é completamente eliminado do

plasma por filtração tubular renal e secreção em uma única passagem (Meltzer, 2013).

$$RPF = C_{PAH} = U_{PAH} \times V / P_{PAH}$$

Onde FPR = fluxo plasmático renal em mL/min, C_{PAH} = depuração de PAH em mL/min, U_{PAH} = concentração urinária de PAH em mg/mL, V = taxa de fluxo urinário em mL/min, e P_{PAH} = concentração plasmática de PAH em mg/mL.

FSR (em mL/min) é determinado por meio da seguinte equação:

$$FSR = FPR / 1 - \text{hematócrito}$$

1.5 TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

A taxa de filtração glomerular (TFG) é determinada pela depuração da inulina, um polissacarídeo de frutose que é facilmente filtrado, mas não reabsorvido ou secretado pelo túbulo renal, sendo, portanto, diretamente proporcional à TFG (Meltzer, 2013).

$$TFG = U_{inulina} \times V / P_{inulina} = C_{inulina}$$

Onde TFG = taxa de filtração glomerular em mL/min, $U_{inulina}$ = concentração de inulina na urina em mg/mL, V = taxa de fluxo de urina em mL/min, $P_{inulina}$ = concentração plasmática de inulina em mg/mL e $C_{inulina}$ = depuração de inulina em mL/min.

A TFG normal é de cerca de 120 mL/min em homens e 100 mL/min em mulheres. Adicionalmente pode ser estimada com o nitrogênio ureico sanguíneo (NUS) e a creatinina plasmática. O NUS e a creatinina plasmática aumentam à medida que a TFG diminui. Notavelmente, a TFG diminui com a

idade, embora a creatinina plasmática permaneça relativamente constante devido a uma diminuição na massa muscular. A depuração da creatinina é menos precisa do que a depuração da inulina, entretanto mais prática de se medir (Bellomo et al., 2004).

O fluxo sanguíneo para o glomérulo é regulado pelo tônus vascular arteriolar aferente e eferente, que ajusta a pressão de filtração glomerular. A dilatação arteriolar aferente ou constrição arteriolar eferente aumenta a TFG. Este mecanismo autoregulatório é capaz de manter a TFG em uma ampla gama de pressões sanguíneas e é obtido, em parte, pelo aparelho justaglomerular (Bellomo et al., 2004; McIlroy; Sladen, 2015).

Em condições de queda de pressão, ocorre redução concomitante na pressão arteriolar aferente com queda no FSR e no soluto filtrado. Isso desencadeia a liberação de renina no aparelho justaglomerular, ativando a via do Sistema Renina Angiotensina (SRA). Além disso, o rim responde a baixos níveis de catecolaminas circulantes quando a pressão arterial cai por vasoconstrição arteriolar eferente preferencial, que atua para manter a TFG (McIlroy; Sladen, 2015).

1.6 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FUNÇÃO RENAL

Hipertensão é conhecida como um importante fator de risco para a saúde cardiovascular da população, afetando mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo (World Health Organization, 2013) e está fortemente relacionanda com o desenvolvimento e progressão da disfunção renal em ambos os sexos (Perry;

Miller; Fornoff. et al., 1995). Sabe-se que os homens após a quarta década de vida apresentam redução gradual da taxa de filtração glomerular, mulheres por outro lado tem essa diminuição atrasada e atenuada (Lindeman; Tobin; Shock, 1985; Hemmelgarn; Zhang; Manns, 2006). Essas diferenças podem ser observadas tanto em humanos quanto em ratos (Baylis, 2005).

A função renal está diretamente relacionada ao sistema cardiovascular. Doenças cardíacas que culminam em disfunção sistólica e redução do débito cardíaco levam a reduções no FSR. Isso, por sua vez, ativa o SRA em um esforço para manter a pressão arterial. A ativação crônica do SRA pode causar pressão sangüínea anormalmente elevada, vasoconstrição excessiva, hipertrofia vascular e fibrose (Papinska; Rodgers, 2018). Outro aspecto que regula o fluxo sanguíneo renal são os nervos renais aferentes e eferentes. Quando a atividade simpática é aumentada, contribui para a hipertensão renal e para a doença renal em estágio terminal. Estudos demonstraram que a denervação simpática melhorou a pressão arterial (Sata et al., 2018).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que o sexo e os hormônios sexuais exercem um papel determinante na injúria do tecido renal, onde a testosterona tem sido negativamente associada e o estrogênio por outro lado como protetor (Sullivan et al., 2007). Outros fatores que contribuem para o surgimento e progressão da injúria renal são a inflamação (Kneedler et al., 2017) e o EO (Lazaro et al., 2005). Esses fatores serão detalhados abaixo, pois foram de interesse do nosso estudo.

1.7 VISÃO GERAL SOBRE O SRA

O SRA é reconhecido como importante sistema hormonal para manutenção e controle da pressão arterial e da homeostase eletrolítica renal (Mark, 2012; Ferrão;Lara; Lowe, 2014). Mesmo após mais de 100 anos da sua descoberta, ainda é alvo de diversas pesquisas, que por meio do desenvolvimento de drogas que atuam de forma eficaz em diferentes componentes do SRA, que trouxeram vantagens terapêuticas e se tornaram importantes ferramentas clínicas para o controle da hipertensão, insuficiência cardíaca, diabetes e outros estados fisiopatológicos (Hall, 2003).

Esse sistema é considerado complexo, de atuação sistêmica e local (parácrina e autócrina) (Ferrario, 2010), constituído por hormônios e peptídeos regulados por diversas enzimas, que estão presentes em inúmeros tecidos como os vasos sanguíneos, cérebro, coração, rins, adrenais, tecido adiposo, trato gastrointestinal e órgãos reprodutores, capazes de exercer amplo espectro de funções em todo o organismo (Ferrario, 2010; Dzau; Burt; Pratt, 1988). Numa visão geral o SRA pode ser dividido em duas vias principais com ações opostas na maioria das vezes, a via clássica e a via não clássica (Figura 4).

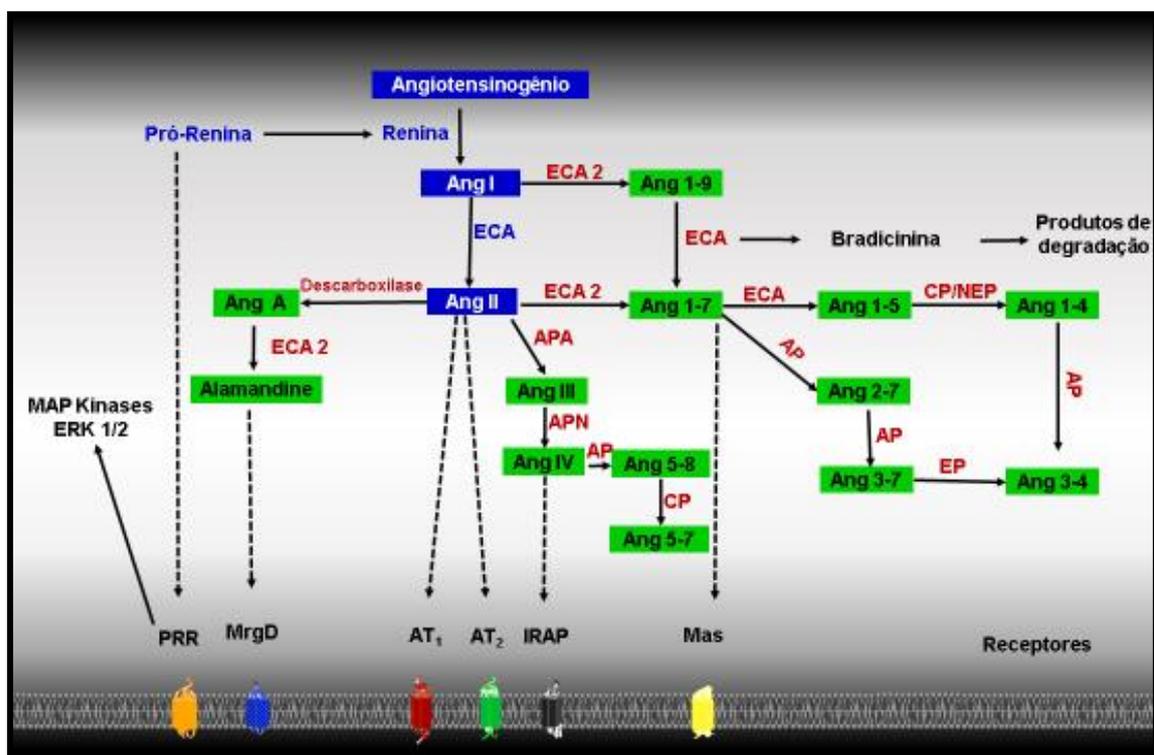


Figura 4: Visão clássica (azul) e visão não clássica (verde) da cascata do sistema renina-angiotensina. Receptores (vermelho). AP: Aminopeptidase; APA: Aminopeptidase A; APN: aminopeptidase N; CP: Carboxipeptidase; EP: Endopeptidase; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora da angiotensina 2; NEP: neprililina; Mas: AT7 receptor da Ang-(1-7). PRR: receptor de pró-renina.

Fonte: baseada nos estudos de:

Ferrão e Cols, 2014.

Santos e Cols, 2013.

Zhuo e Cols, 2013.

Na visão clássica, o SRA age endocrinamente, sendo que a renina (enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal) cliva o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) em angiotensina I (Ang I) (um decapeptídeo) que por sua vez é clivada em angiotensina II (Ang II) pela ECA (Peach, 1977). Com conhecimentos atuais, o SRA é o principal agente regulador da pressão

arterial basal sendo composto por peptídeos vasoativos com ações hipertensivas e anti-hipertensivas que agem de modo endócrino, parácrino e autócrino (Santos; Campagnole; Andrade, 2000; Silva; Pinheiro; Santos, 2008).

Dois importantes peptídeos ativos deste sistema Ang II e angiotensina (1-7) (Ang-(1-7)), exercem ações, na maioria das vezes, antagônicas a função renal (Dilauro et al., 2010; Ru"ster; Wolf, 2011). Aumento nos níveis de Ang II na circulação e tecidual e o desequilíbrio entre os braços vasoconstrictor e vasodilatador (predominando a vasoconstrição) do SRA estão implicados no surgimento de doenças renais e muitas doenças cardiovasculares (Remuzzi et al., 2005; Silva; Pinheiro; Santos, 2008; Dilauro et al., 2010; Ru"ster; Wolf, 2011).

Nas últimas décadas, novas vias de formação de Ang II e novos componentes do sistema, um deles citado anteriormente, Ang-(1-7) foram identificados (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). A Via clássica, composta pela ECA/Ang II-receptor de angiotensina II (AT1-R) que estão envolvidos nas ações desencadeadas pela Ang II como vasoconstrição, proliferação celular, reabsorção de sódio, hipertrofia, inflamação, aumento do estresse oxidativo, trombogênese e fibrose (Touyz; Schiffrin, 2000; Santos, 2014) e a via não clássica, composta primariamente pelo eixo Ang II/Ang III-receptor AT2 e pelo eixo ECA 2/Ang-(1-7)-receptor de Ang-(1-7) (Mas), responsáveis por ações contra-regulatórias, vitais para equilíbrio do SRA, com efeito antiproliferativo, vasodilatador, anti-inflamatório, antitrombogênico e antifibrótico (Ferreira et al., 2011; Sanjuliani et al., 2011; Mark, 2012).

1.8 INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS NOS COMPONENTES DO SRA

Estudos em humanos e modelos de hipertensão têm demonstrado a importância da interação entre hormônios sexuais (HS) e SRA na regulação da função cardiovascular e da PA (Os et al., 2008; Komukai; Mochizuki; Yoshimura, 2010; Miller et al., 2011). Estudos têm mostrado que mulheres apresentam níveis mais baixos de pressão arterial durante grande parte da sua vida útil em comparação com os homens com a mesma idade (Wiinberg et al., 1995; Freshour; Chase; Vikstrom, 2002). Este dimorfismo sexual é evidente tanto em humanos, quanto em animais (Reckelhoff; Zhang; Granger, 1998; Lima; Wofford; Reckelhoff, 2003).

No entanto, após o início da menopausa, os níveis de pressão arterial sistólica em mulheres aumentam e tornam-se semelhante aos dos homens, sugerindo importante papel dos HS na regulação da pressão arterial. Os menores níveis de PAS em mulheres na pré-menopausa estão associados a menor risco de desenvolvimento e progressão da doença cardiovascular e hipertensão, comparado aos homens de mesma idade (Lima; Wofford; Reckelhoff, 2003; Zimmerman; Sullivan, 2013; August; Oparil, 2015). Esta vantagem em relação à menor incidência de doença cardiovascular diminui após a menopausa (Hilliard, 2013).

Miller et al. demonstraram que após a infusão sistêmica de Ang II por 30 minutos, as mulheres apresentaram queda da TFG enquanto nos homens permaneceu inalterada. Adicionalmente, observou-se que mulheres com níveis

mais elevados de estrogênio obtiveram as maiores quedas, sugerindo que o hormônio feminino influencia na função glomerular em resposta a Agio II.

De forma geral o estrogênio parece reduzir a expressão da ECA (Freshour; Chase; Vikstrom, 2002), e dos receptores AT1-R (Silva-antonialli et al., 2004), a atividade da renina (Sainz et al., 2004) e estimular a atividade da ECA2 (Ji et al., 2008), aumentar os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Brosnihan et al., 1997), além de aumentar a densidade dos receptores AT2 (Armando et al., 2002). Que em conjunto favorece a ativação do eixo vasodilatador do SRA, aumentando a formação de Ang-(1-7), estimulando os receptores AT2 resultando no aumento da formação de óxido nítrico (ON) e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sandberg; Ji, 2008; Caliman et al., 2013).

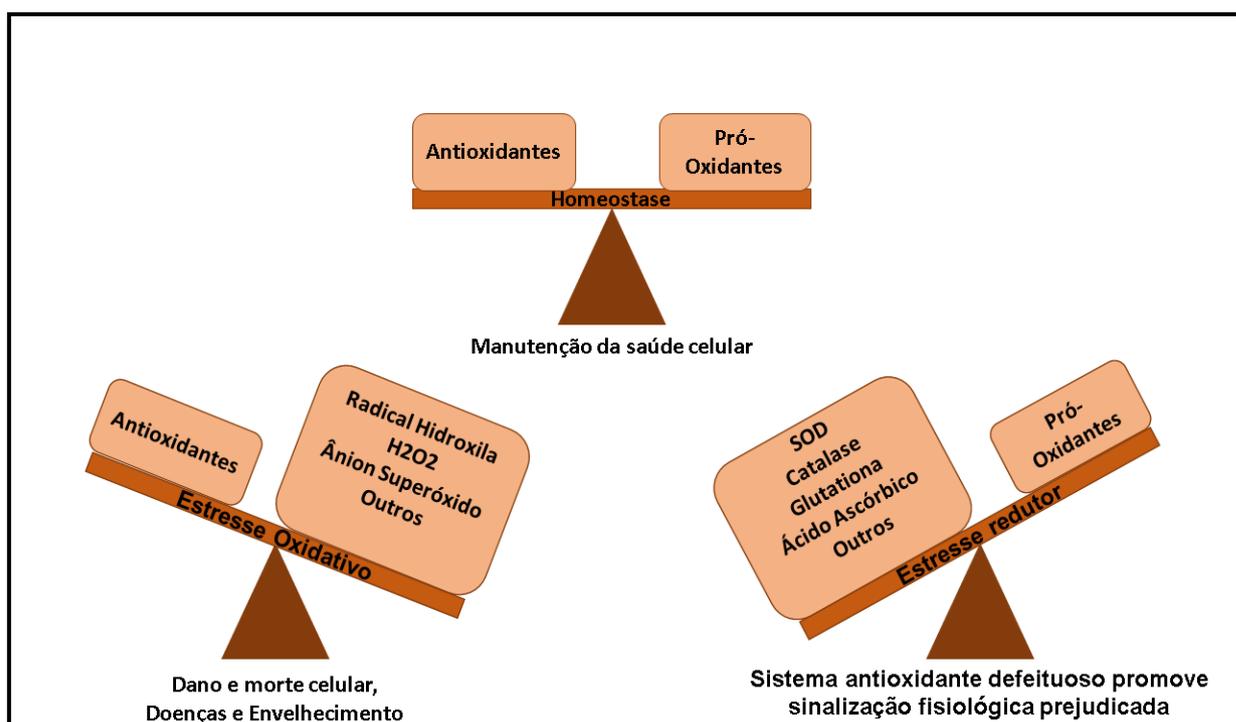
Por outro lado, a testosterona está relacionada as ações pró-hipertensivas do SRA, com aumento da atividade da renina (Sainz et al., 2004; Reckelhoff, 2001), da ECA cardíaca e plasmática (Freshour; Chase; Vikstrom, 2002), dos receptores AT1-R da Ang II e do EO (Reckelhoff, 2001), além de menor expressão de AT2 (Armando et al., 2002; Brown et al., 2012). Apesar da variabilidade de resultados entre os diferentes modelos experimentais e ressaltando que a atividade enzimática do SRA provavelmente não dependa só dos HS, mas também do nível de PA, linhagem, espécie animal (Bhatia; Zimmerman; Sullivan, 2013), cromossoma X e Y (Carrel; Willard, 2005; Ely et al., 2011), idade e tecido analisado, evidências demonstram que os machos têm maior expressão dos componentes da via clássica do SRA, enquanto que

as fêmeas têm maior expressão de componentes da via não clássica (Sullivan et al., 2010; Zimmerman; Sullivan, 2013).

1.9 ESTRESSE OXIDATIVO, ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

Segundo Burton e Jauniaux (2011), o oxigênio é fundamental para o funcionamento dos sistemas biológicos, entretanto apresenta efeitos benéficos e colaterais potencialmente prejudiciais. A reatividade permite que o oxigênio participe das transferências de elétrons de alta energia e, portanto, proporciona a geração de grandes quantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa. Isso é necessário para permitir a evolução de organismos multicelulares complexos, mas também o torna suscetível de atacar qualquer molécula biológica, seja uma proteína, lipídio ou DNA. Conseqüentemente, nosso corpo está sob constante exposição oxidativa das EROS.

Considerando o exposto acima, o corpo humano desenvolveu um sistema complexo de defesas antioxidantes que geralmente mantém esse ataque em equilíbrio. Todavia, esse equilíbrio pode ser perturbado, levando ao EO que pode ser apontado como mecanismo central na fisiopatologia de muitos distúrbios (Halliwell; Gutteridge, 1999). Desta forma, EO é definido como um estado de desequilíbrio entre os radicais oxidantes (livres) excessivos e a degradação insuficiente desses radicais por sistemas antioxidantes como um mecanismo de defesa interno (Figura 5) (Daenen et al., 2018).



Fonte: (ADAPTADA) Daenen et al., 2018.

Figura 5: Desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Para manter a homeostase celular, é necessário um equilíbrio entre a produção e a degradação de EROs. O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a formação excessiva de oxidantes e a degradação desses radicais por antioxidantes. A desregulação metabólica resultando em dano celular grave, morte celular, envelhecimento e doença pode ser uma consequência do estresse oxidativo. Por outro lado, uma produção excessiva de antioxidantes (como a glutathione peroxidase (GPX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ácido ascórbico, α -tocoferol, ...) também é prejudicial à célula. "Estresse redutor" causa defesa do hospedeiro defeituosa e sinalização fisiológica prejudicada.

Os EROs e as espécies reativas de nitrogênio representam uma classe de moléculas reativas que são continuamente formadas por reações de oxidação em células vivas durante os processos metabólicos normais por reações enzimáticas e não enzimáticas. Radicais livres ou primários, definidos como espécies químicas independentes com um ou mais elétrons desemparelhados,

são altamente reativos na busca por outro elétron desemparelhado. Os exemplos são radical hidroxila (OH^\bullet) e o ânion superóxido (O_2^\bullet), radicais de óxido nítrico (NO^\bullet) e radicais de dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) (Stocker; Keaney, 2004; Daenen et al., 2018).

Quando dois elétrons desemparelhados reagem um com o outro para formar uma ligação covalente, uma nova molécula não-radical é formada. Mais frequentemente, no entanto, os radicais livres atacam moléculas não radicais, resultando em uma nova molécula de radical (secundária), iniciando uma reação em cadeia. Essa reação em cadeia de radicais primários e secundários acaba levando ao dano oxidativo de vários tecidos e órgãos. Exemplos de radicais secundários são peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), ácido hipocloroso (HClO), ácido nitroso (HNO_2), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), peroxinitrito (ONOO^-) e peróxidos lipídicos. Como os EROs são instáveis e têm meia-vida curta, é difícil medir a quantidade de radicais livres circulantes. Diversos produtos finais de oxidação são, portanto, usados para avaliar o estado redox: Estes são produtos finais de peroxidação lipídica, dano ao DNA ou oxidação de proteínas e aminoácidos (Stocker; Keaney, 2004; Czerska et al., 2015).

Durante o processo de transporte de elétrons mitocondrial, os elétrons são transferidos a fim de reduzir o oxigênio em água e produzir ATP por fosforilação oxidativa das formas reduzidas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). Nos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons, o O_2^\bullet é gerado pela ação das enzimas, NADH desidrogenase e ubiquinonocitocromo bc1, devido a reduções

incompletas e elétrons que escapam ao longo da cadeia principal. Esses processos reduzem diretamente as moléculas de oxigênio para EROs, como $O_2\cdot$, H_2O_2 e $OH\cdot$ (Pieczenik; Neustadt, 2007; Birbenet al., 2012).

Na vasculatura, diversos sistemas enzimáticos diferencialmente localizados e expressos contribuem para a formação de EROs, incluindo ON-sintases endoteliais, enzimas da cadeia respiratória, citocromo P450 monoxigenases, xantina oxidase e NADPH oxidases (NADPH). Embora todas essas enzimas contribuam para a carga oxidativa, estudos demonstram que a geração inicial de EROs pelas NADPH desencadeia a liberação de EROs por outras enzimas (Landmesser et al., 2003). Conseqüentemente, foi sugerido que as NADPH vasculares desempenham papel importante no desenvolvimento de hipertensão, disfunção endotelial, aterosclerose, reestenose e hipertrofia (Cai; Griendling; Harrison, 2003).

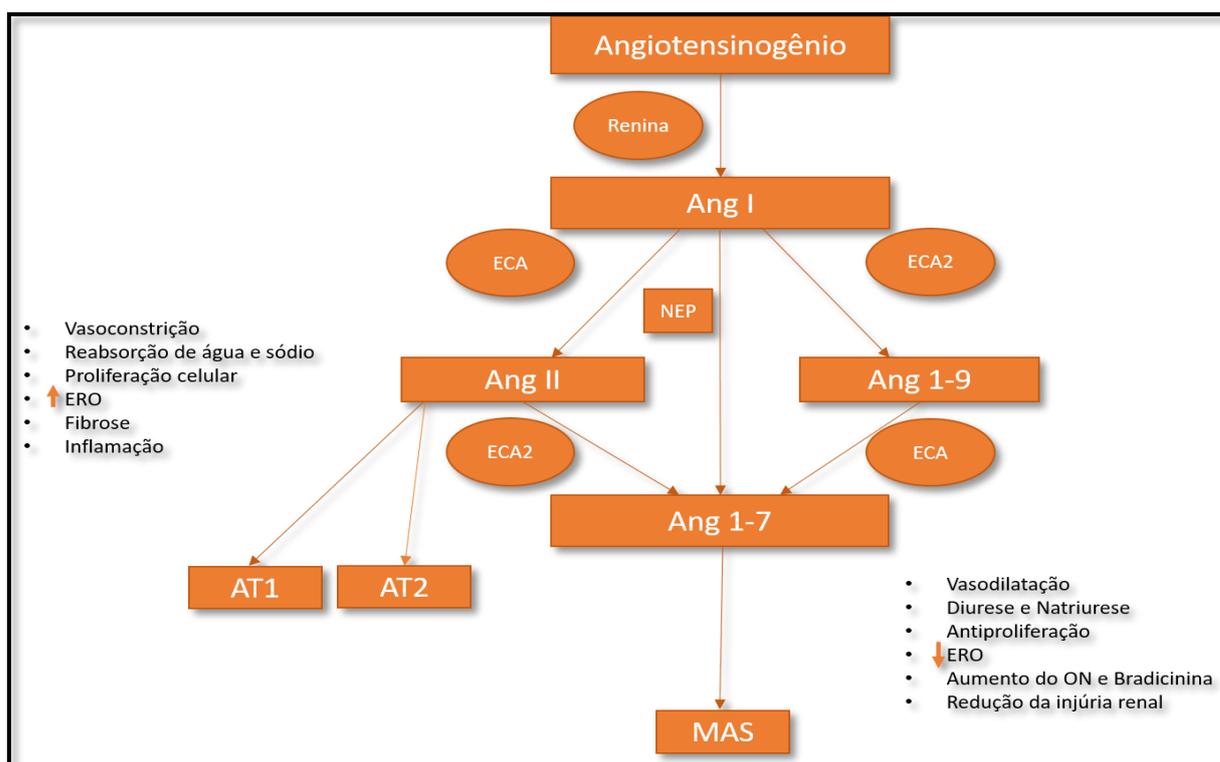
Dentre os fatores enzimáticos que contribuem para manutenção do equilíbrio redox estável, podemos citar as enzimas antioxidantes de ação constitutiva (SOD, CAT, GPX e tioredoxina). A SOD é uma enzima chave na desintoxicação dos radicais livres na célula. Ela é responsável por converter $O_2\cdot$ em H_2O_2 e oxigênio e, por sua vez, a CAT ou o sistema de GPX reduz H_2O_2 em água. A SOD também desempenha um papel na inibição da inativação oxidativa do ON. Essa enzima apresenta três isoformas em mamíferos: SOD contendo cobre-zinco (SOD1), SOD contendo manganês (SOD2) e SOD extracelular (SOD3), que são expressos no citosol, matriz mitocondrial e espaço extracelular, respectivamente.

A CAT decompõe diretamente H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), enquanto as peroxidases usam H_2O_2 para oxidar outro substrato, como a glutathiona. Principalmente, a glutathiona peroxidase coopera com a CAT para a decomposição de H_2O_2 em H_2O e glutathiona oxidada, que é então reduzida pela glutathiona redutase. A glutathiona peroxidase requer glutathiona como um doador de hidrogênio para decompor H_2O_2 em H_2O e O_2 , utilizando selênio como cofator para participar da reação com peróxidos (Birbenet al., 2012; Daenen et al., 2018).

1.10 SRA E FUNÇÃO RENAL

A síntese local de Ang-(1-7) no coração foi primeiramente detectada em cães após isquemia aguda do miocárdio (Santos et al, 1990). Desta forma, surgiam as primeiras evidências de que o dano tecidual cardíaco é um estímulo para formação local de um sistema contrarregulatório mediado pela Ang-(1-7), sendo a ECA2 a principal enzima envolvida na formação deste peptídeo no coração (Crackower et al, 2002).

No rim, a ECA2 é altamente expressa e possui alta atividade no córtex renal. Pode atuar como fator protetor nas doenças renais, regulando negativamente o SRA, por outro lado a redução da expressão da ECA2 contribui para a patogênese e a progressão da doença renal (Figura 6), uma vez que a ECA2 pode contrabalançar a ECA, e regular negativamente os níveis de Ang II locais e assim regular a homeostase renal local (Kuba; Imai; Penninger, 2013; Soler; Wysocki; Battle, 2013).



Fonte: Adaptada de Mizuiri S et al. ACE and ACE2 in renal disease

Figura 6: Funções da ECA e ECA 2 no sistema renina-angiotensina: Relação com o rim. O angiotensinogênio é clivado pela renina para formar angiotensina I (Ang I), que é convertida em Ang II pela ECA. A principal função do ECA 2 é sintetizar Ang 1-9 a partir da Ang I e produzir a molécula vasodilatadora e antiproliferativa Ang-(1-7) a partir da Ang II. Ang I atua como um substrato para neprilissina, que a cliva para formar Ang-(1-7). Ang II liga-se ao receptor tipo 1 (AT1-R) e AT2. O receptor Mas (MAS) é específico para Ang-(1-7). O eixo ECA2-Ang-(1-7) -MAS modula os efeitos do ECA-Ang Eixo II-AT1-R. ECA: Enzima de conversão da angiotensina; ON: óxido nítrico; NEP: Neprilissina; EROs: espécies reativas de oxigênio.

Comumente nas doenças renais, ECA e ECA2 estão com níveis em direções opostas, assim as alterações na ECA e ECA2 podem ser expressas como a razão ECA/ECA2, refletindo alterações nos padrões de doenças renais (Soler; Wysocki; Battle, 2013). A relação ECA/ECA2 está positivamente correlacionada com a pressão arterial média, glicemia de jejum, creatinina sérica, proteinúria e

está inversamente correlacionado com a taxa de filtração glomerular (Wong et al., 2007). O aumento da razão da ECA/ECA2 no rim sugere maior ativação do SRA, que pode contribuir para o agravamento da lesão renal, resultante do aumento Ang II (Soler; Wysocki; Battle, 2013).

De fato, o sexo e hormônios sexuais, SRA e EO exercem papel chave no desenvolvimento e manutenção de diversas doenças, dentre estas, atenção especial tem sido dada a doença renal em condições de hipertensão. Conforme acima apresentado, diversos estudos demonstraram os efeitos da testosterona na função renal em condições normotensas e hipertensão, entretanto, os estudos comparativos entre machos e fêmeas, na presença e ausência dos hormônios sexuais são limitados.

1.11 HIPÓTESE

Considerando os estudos apresentados acima, a hipótese do nosso estudo foi que ratos machos SHR teriam maior atividade da ECA e menor da ECA2, assim como maior EO no rim, associado a menor função renal do que as fêmeas. A castração melhoraria esses parâmetros em machos e os prejudicaria nas fêmeas SHR.

Nossa hipótese foi parcialmente confirmada, pois de fato os animais machos SHAM apresentam elevada atividade da ECA e reduzida atividade da ECA2, menores taxas de filtração e maiores de colágeno renal. Todavia, de maneira interessante, no que diz respeito aos animais castrados obtivemos desfechos diferentes.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi melhor compreender a participação do sexo, hormônios sexuais, via clássica e não clássica do SRA, OS na função renal em ratos SHR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a TGF e o FPR.
- ✓ Realizar a atividade da ECA e ECA2 teciduais;
- ✓ Quantificar os níveis intracelulares de $O_2\cdot$ e H_2O_2 ;
- ✓ Mensurar a deposição de colágeno glomerular;
- ✓ Avaliar a expressão das proteínas: Podocina, Nefrina, Subunidade da NADPH (NOX2), cicloxigenase 2 (COX2), CAT, SOD1 e SOD2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

No presente estudo, foram utilizados ratos machos e fêmeas SHR com 12 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram acondicionados em gaiolas a 25 °C obedecendo o ciclo claro-escuro de 12/12 horas e com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Guia para o cuidado e uso de animais de laboratório - 2011”, o qual foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Animal (19/2018).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais, n=6, sendo:

- ✓ SHAM Macho
- ✓ SHAM Fêmea
- ✓ Castrado Macho (CAST Macho)
- ✓ Castrado Fêmea (CAST Fêmea)

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

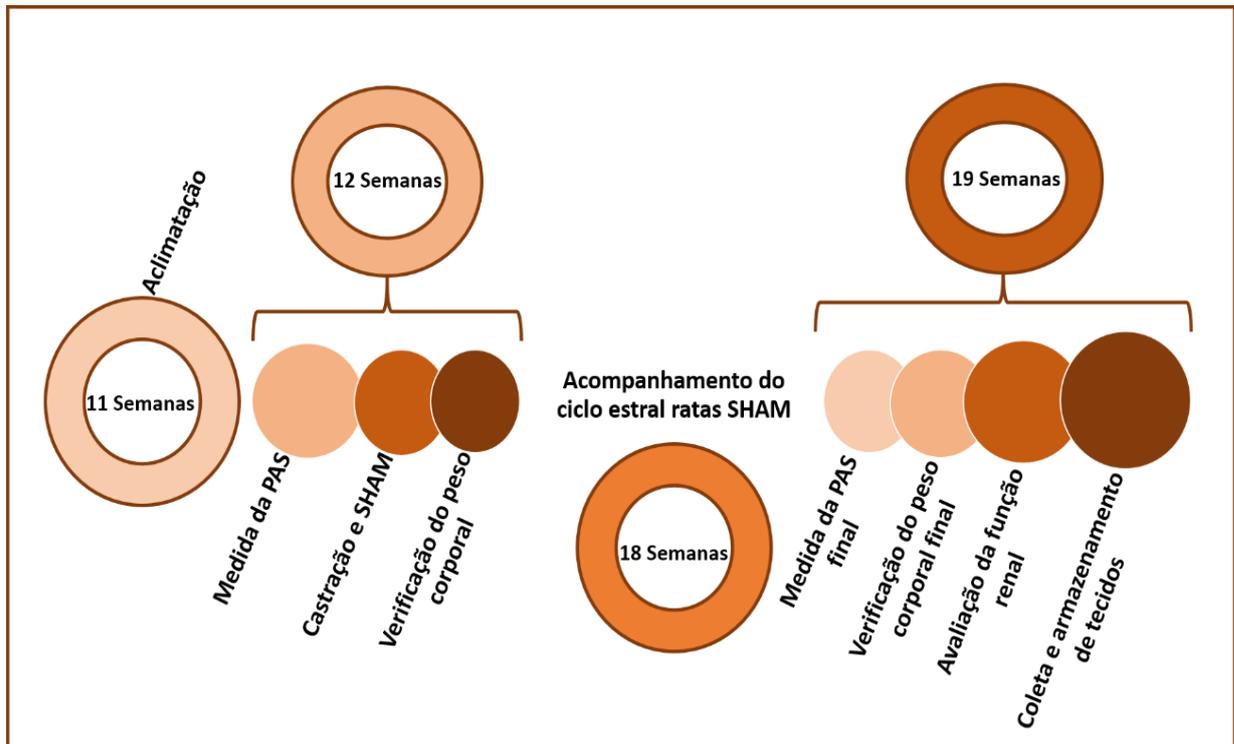


Figura 7: Desenho experimental.

3.4 MEDIDAS DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Para determinação da PAS, o método de Pletismografia de cauda (Figura 8) foi utilizado antes e ao final do protocolo experimental de acordo com as instruções do fabricante, IITC Life Science (23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA, EUA).



Figura 8: Pletismógrafo de cauda utilizado para medidas de PAS inicial e final.

Os animais foram acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico, com encaixe para região proximal da cauda e revestido por um manguito de borracha ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 40 segundos. Próximo ao manguito estava acoplado um transdutor de pulso (sensor) que captava os sinais a serem enviados e registrados no computador. Os registros só foram obtidos, após um período de aclimatação, onde os animais por três vezes, em dias diferentes, por dez minutos, foram submetidos à mesma situação de medida da PAS. Este procedimento teve como objetivo a adaptação dos animais de modo que se movimentassem a menor quantidade de vezes possível durante o procedimento. Para determinação do valor da PAS, utilizamos a média de cinco medidas.

3.5 OVARIECTOMIA

A cirurgia de ovariectomia bilateral foi realizada após anestesia com mistura de quetamina (70 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER,

BRASIL). O animal em decúbito lateral, foi realizada tricotomia e assepsia com álcool iodado na região. Após a palpação, uma incisão de cerca de 1,5 cm entre a última costela e a coxa a 1,0 cm da linha mediana, perpendicular a cauda e paralela a coluna vertebral. Abaixo da incisão da pele, a camada muscular foi divulsionada até que uma abertura foi realizada para alcançar a cavidade peritoneal. O tecido adiposo da cavidade peritoneal foi exposto e junto com ele o ovário envolto neste tecido adiposo. Posteriormente, uma linha de sutura foi passada em volta do ovário e realizada ligadura da tuba uterina. A remoção do ovário foi feita por meio de uma secção distal (figura 9).

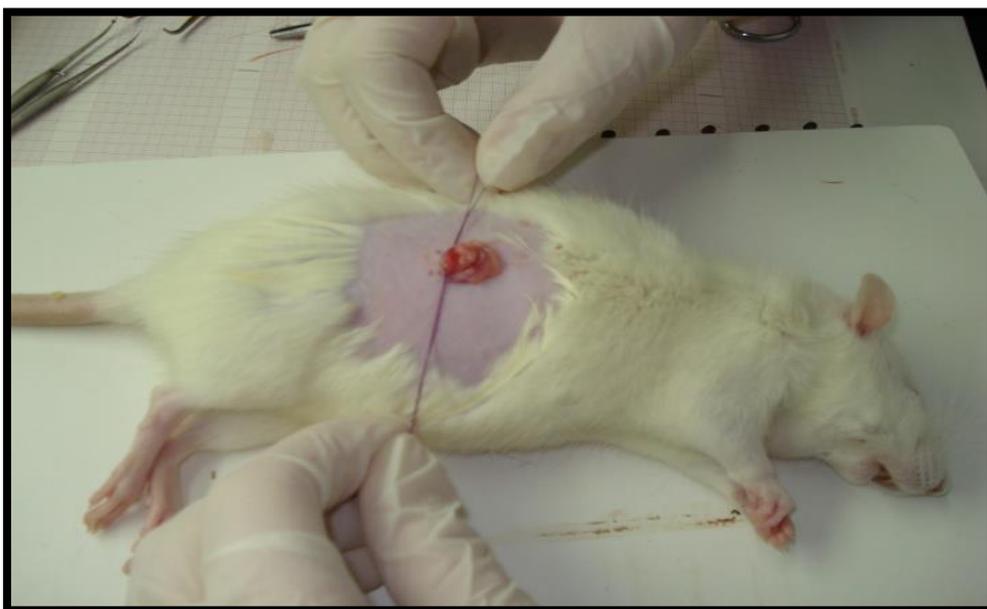


Figura 9: Procedimento de Ovariectomia bilateral. Arquivo do Laboratório de Hipertensão experimental, UFES.

A camada muscular da cavidade peritoneal foi então suturada com fio reabsorvível, em seguida a pele foi suturada com linha de nylon. O mesmo procedimento foi realizado no lado oposto, e ao final, foi feita assepsia dos dois lados e os animais receberam 100mg por 100 g de peso Dipirona por

via gavagem e recolocados em gaiolas individuais. No grupo SHAM foi realizada uma cirurgia fictícia de ovariectomia, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.

3.6 ORQUIECTOMIA

A orquiectomia foi realizada sob anestesia com quetamina (70 mg/kg, AGENER, BRASIL) e xilazina (10 mg/kg, BAYER, BRASIL). A cirurgia consistiu em uma incisão perpendicular de 0,5 a 1,0 cm no tegumento e celular subcutâneo da bolsa escrotal, rompendo a cavidade escrotal, em seguida realizou-se outra incisão na camada muscular até atingir a túnica vaginallis. Os testículos foram expostos por compressão e uma ligadura feita em torno do cordão espermático para posterior remoção das gônadas. Ao final do procedimento os animais receberam 100mg por 100 g de peso de Dipirona via gavagem e em seguida recolocados em gaiolas individuais. No grupo SHAM foi realizada uma cirurgia fictícia de orquiectomia, a fim de estabelecer parâmetros semelhantes em todos os animais deste estudo.

3.7 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Após 18 semanas de estudo, as ratas SHAM foram submetidos à avaliação do ciclo estral a fim de verificar a fase em que as mesmas se encontravam. Naturalmente, ratas apresentam 4 fases em seu ciclo estral (Figura 10):

A- Metaestro ou Diestro I- caracterizada por quantidades semelhantes de 3 tipos celulares (Células Nucleadas, Epiteliais e Leucócitos).

B- Diestro II- caracterizada por infiltrado leucocitário

C- Proestro – caracterizada por presença predominante de células nucleadas

D- Estro – caracterizada por presença predominante de células epiteliais.

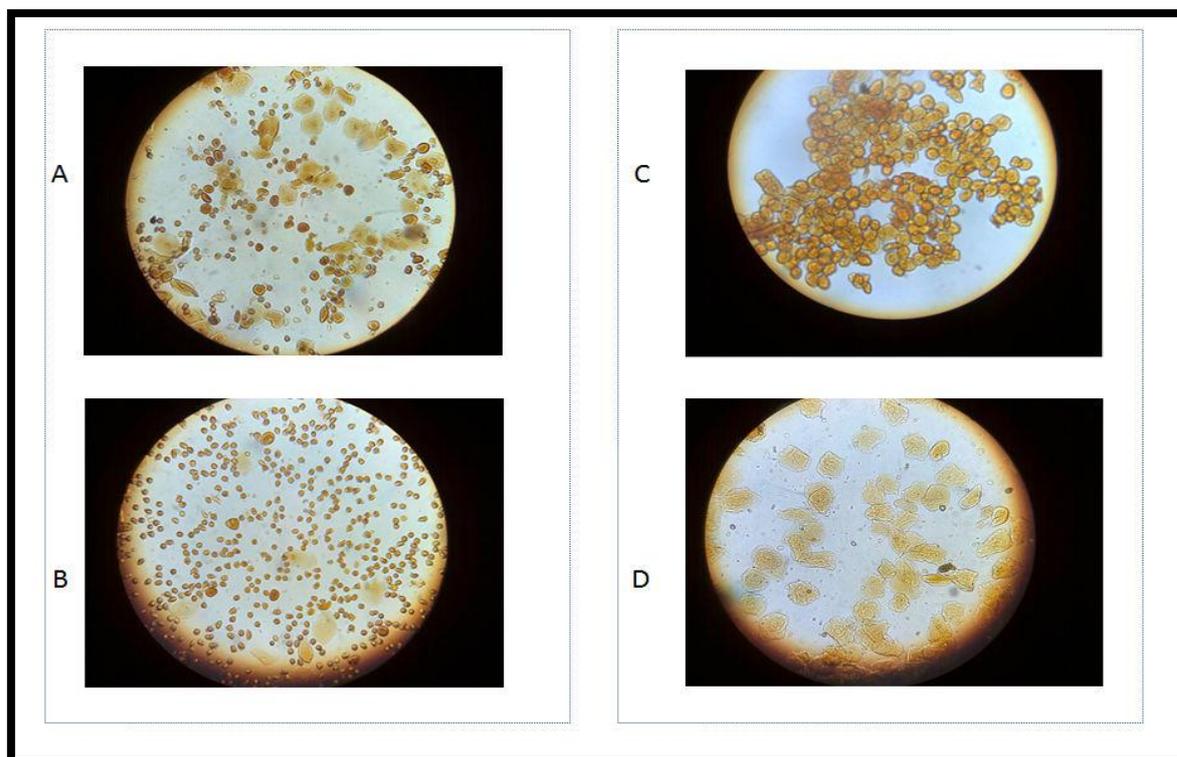


Figura 10. Fases do ciclo estral detectados por meio de esfregaço vaginal em microscópio ótico com aumento de 40x. Arquivo do Laboratório de Hipertensão experimental, UFES.

Para realização deste procedimento, 20 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) foram introduzidos suavemente na cavidade vaginal das ratas com o auxílio de uma micropipeta, e realizados movimentos de impulsão e expulsão do líquido para retirada do conteúdo vaginal. Em seguida este material foi aplicado a uma lâmina de vidro junto a uma gota de solução de lugol para análise em microscópio (Dalpiaz et al., 2013). Os esfregaços foram realizados todos os dias entre as semanas 18 e 19 antes do final do protocolo experimental, e o experimento só foi realizado quando as ratas SHAM se encontravam em proestro. Tal padronização foi realizada a fim de se evitar a influência da variação hormonal nas diferentes fases do ciclo estral sobre os parâmetros estudados (Dalle Lucca; Adeagbo; Alsip, 2000).

3.8 PROTOCOLO DE FUNÇÃO RENAL

Cinquenta e um dias após a cirurgia, a FR foi determinada por meio da depuração de inulina e PAH para estimar a TFG e o FPR, respectivamente. Para tal procedimento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg / kg i.p.) e realizada traqueostomia para facilitar a respiração (Figura 11-A). Cateteres de polietileno foram inseridos na artéria femoral para coleta de amostras de sangue, na veia femoral para infusão de inulina e para-aminohipurato (Figura 11-B) e na bexiga (Figura 11-C) para coleta de urina.

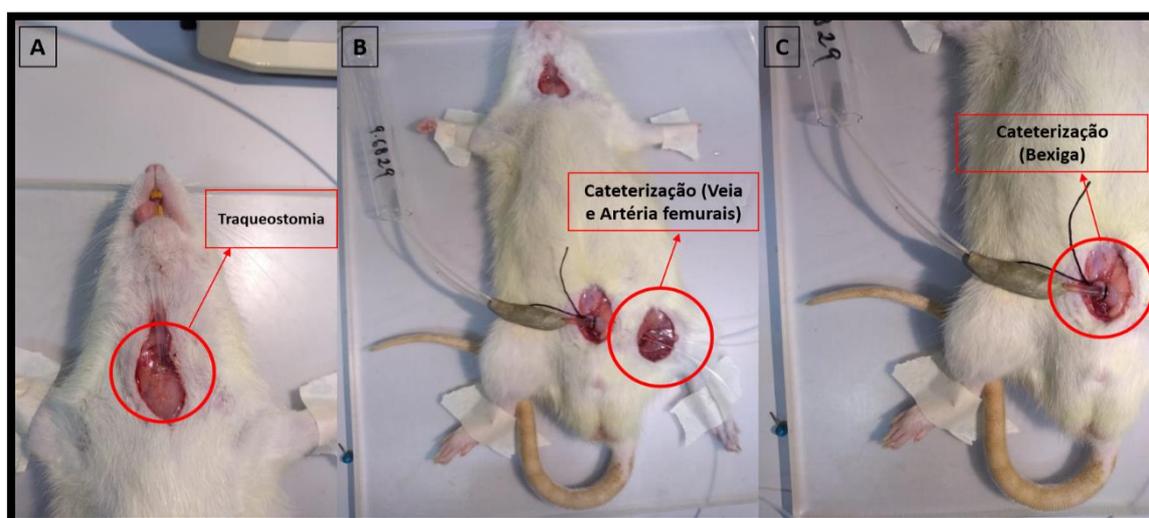


Figura 11: Procedimento de traqueostomia (A), Cateterização das veia e artéria femurais (B) e Cateterização da bexiga (C). Arquivo do Laboratório de Hipertensão experimental, UFES.

O volume urinário foi determinado gravimetricamente. Os animais foram infundidos por 30 minutos durante o experimento com solução isotônica contendo 3% de manitol a 0,06 ml/min por meio de bomba de infusão contínua. Logo em seguida, uma dose prime de inulina e PAH (30mg/100g de peso corporal de inulina e 0,6mg/100g de PAH) foram administradas por via

intravenosa e após esse procedimento a infusão dessas substâncias foi mantida.

Durante a infusão contínua, foram realizadas quatro coletas de urina e sangue, com intervalo de 30 minutos entre cada coleta. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (TRI 21, Leticia Scientific Instruments, Espanha) e a um sistema digital (Powerlab / 4SP ML750, ADInstruments, Austrália) para monitoramento contínuo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). As concentrações plasmáticas e urinárias de inulina e PAH foram quantificadas por ensaio colorimétrico (Rocco et al., 2008; Freitas et al., 2015).

A partir do fluxo urinário e da quantificação dos valores plasmáticos e urinários de inulina e PAH, foi possível calcular as suas taxas de depuração, que refletem a TFG e o FPR, respectivamente segundo a seguinte fórmula:

$$Cl = \frac{([X_u] \times [F_u])}{X_p \times P}$$

Sigla	Significado
Cl	Clearance da substância (inulina ou PAH) normalizado pelo peso corpóreo do animal
X _u	Concentração da substância na urina
X _p	Concentração da substância no plasma
F _u	Fluxo urinário
P	Massa corporal do animal (kg)

A cada coleta, um tubo capilar heparinizado foi preenchido de sangue para determinação do hematócrito, permitindo assim o cálculo do FSR utilizando a

seguinte fórmula: **FSR = FPR/(1-hematócrito)**. Como citado acima, durante todo protocolo experimental a PAM e FC foram monitoradas, o que possibilitou o cálculo matemático da resistência vascular renal (RVR) por meio da lei de Ohm, onde a **RVR = PAM/FSR**.

3.9 COLETA E HOMOGENEIZAÇÃO DOS TECIDOS

Ao final do protocolo de FR, os animais foram perfundidos com solução tampão e o rim esquerdo foi imediatamente excisado, lavado em solução tampão Tris.HCl, pH 7,0, com 50 mM NaCl gelada, em seguida armazenado em -80°. O rim direito foi separado para avaliação histológica.

Para estudo da atividade da ECA e ECA2, a homogeneização do tecido renal foi realizada em tampão Tris.HCl, pH 7,0, com 50 mM NaCl (Carmona et al., 2006) com auxílio de sonificador Misonix XL-2000, sendo em seguida centrifugado a 1000 rpm, 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em alíquotas a -80 °C.

Para avaliação de proteínas por western blot, porções centrais do rim esquerdo foram homogeneizados (A estrutura apresenta quantidades corticais e medulares semelhantes), utilizando tampão de homogeneização constituído de: Tris- HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO₃ (1 mM); SDS, 1 %; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM, pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM) e inibidor de protease. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 4°C a 12.000 rpm durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados em alíquotas a

-80 °C. A determinação da concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, sendo as amostras analisadas em duplicata.

3.10 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ECA TECIDUAL

Protocolo para a determinação da atividade da ECA

O ensaio, para a medida da atividade proteolítica da ECA, empregou o substrato Abz_FRK (Dnp) P-OH, ideal para os estudos em cinéticas enzimáticas e para a análise da atividade somática dos domínios C e N da ECA. Os ensaios foram realizados diretamente em Espectrofluorímetro (TECAN GENios) de microplaca automático equipado com controlador de temperatura e shaker, placa de 96 poços de poliestireno preta. O homogenato dos rins foi descongelado em gelo. Em cada poço da microplaca, foi colocado 5ul de amostra homogeneizada e em seguida adicionou-se a mistura do tampão de ensaio (12,1 g de Tris.Base, 2,92 g de NaCl em 1 litro de água deionizada, o pH 7,0 ajustado com HCl) e 10 Mm de Abz-FRK (dnp) P-OH. Gravou-se o aumento da fluorescência com excitação - λ_{ex} : 320nm e emissão λ_{em} : 420 nm, com a temperatura de 37°C e agitação constante. A atividade da Eca foi expressa em UAF (unidades arbitrárias de fluorescência) (Carmona et al., 2006).

3.11 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ECA2 TECIDUAL

Protocolo para a determinação da atividade da ECA2

A atividade renal da ECA2 foi determinada utilizando 10 μ M do substrato fluorogênico Mca-APK (DNP) -OH (Aminotech, Pesquisa e Desenvolvimento, SP, Brasil), substrato específico para ECA2, em tampão 0.2M Tris-HCl, 200 mM NaCl, e 10mM ZnCl₂, pH 7,5. O aumento na fluorescência foi acompanhado e mensurado por Espectrofotometria de fluorescência (Hitachi F-7000 - placa de 96 poços - λ excitação= 320 nm; λ emissão = 420 nm). Os ensaios foram realizados em duplicata, e os valores da atividade de ECA2 foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). Ensaio especificidade foi demonstrado pela inibição hidrólise com 10 μ M DX600 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA), um inibidor específico ECA2 (Pedersen et al., 2011).

3.12 DETECÇÃO DE ROS INTRACELULAR

A análise de EROs foi realizada por citometria de fluxo conforme descrito anteriormente (Campagnaro et al., 2013). Os níveis de O₂. intracelular e H₂O₂ foram monitorados separadamente medindo as mudanças na intensidade mediana de fluorescência (MFI) emitida pela diidroetidina (DHE) e diclorofluoresceína (DCF), respectivamente. Resumidamente, 1x10⁶ células foram incubadas com 160 mmol / L de DHE e 20 mmol / L de DCF a 37 ° C por 30 minutos no escuro. As células foram então lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos; FACS Canto II, BD). Os dados foram adquiridos usando o software FACS Diva (BD) e os histogramas de sobreposição foram analisados usando o software Flow-Jo. Os dados são expressos como IMF em unidades arbitrárias (a.u.).

3.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os rins direitos foram pesados e normalizados pelo comprimento da tíbia. Em seguida foram fixados em solução de formaldeído 10% por 24 horas e posteriormente embebidos em parafina. Afim de avaliar a deposição de colágeno glomerular, cortes com espessura de 5- μ m foram realizados, fixados em lâminas e coradas com picrosirius red. As lâminas coradas foram fotografadas por meio de uma câmera acoplada ao microscópio ótico (BEL, Engineering, Top Light B2, Itália) sob aumento de 400 vezes.

3.14 WESTERN BLOT

Alíquotas do homogenato foram diluídas em solução de Laemmli (Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 100 μ L, SDS 0,002mg; DTT 0.3 mg; glicerol 100 μ L; e Azul de bromofenol 10 % 25 μ L; água 50 μ L) e em seguida foram mantidas à temperatura de 95 °C durante 5 minutos.

A fim de avaliar a expressão proteica da podocina, nefrina, COX2, CAT, SOD1, SOD2, NOX2 e GAPDH, 60 μ g das amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 29:1), sendo o gel de separação entre 7,5% e 10% (acrilamida 40%, Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,8), SDS 1%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed) e o gel de empacotamento (carregamento) a 4% (acrilamida 40%, Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS 10%, APS 10% e Temed). A eletroforese ocorreu em meio a tampão (25 mM tris-HCl (pH 8,3), 192 mM

glicina e 0,1% SDS) com corrente constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura).

Ao fim da corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose previamente ativada conforme instruções do fabricante. Para tal, o gel, a membrana e papel Whatman (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia) foram colocados em um sistema “sanduíche”. Foi realizado o método de transferência líquida onde o sanduíche foi montado em suporte Holder Cassete e acoplado à cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,05% e Metanol 20%) à 8° C com uma corrente constante de 0,25 Mv por 18 horas a 4°C.

Após transferência, as membranas foram incubadas em uma solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em pó, dissolvido em solução de TBS-T: 20 mM (Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) em temperatura ambiente e agitação contínua por 6:00 horas a fim de evitar ligações inespecíficas do anticorpo. Após lavagem, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Podocina ([1:1000], Santa Cruz, Inc., USA); anti-Nefrina ([1:1000], Santa Cruz, Inc., USA); anti-COX2 ([1:200], Cayman Chemical, USA), anti-NOX2 ([1:1000] Sigma, United States); anti-CAT ([1:2000] Sigma, United States); anti-SOD E 2 ([1:500] Sigma, United States), and anti-Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase (GAPDH) ([1:1000], Merck Millipore, Germany) durante toda a noite (cerca de 18 horas). Na manhã seguinte, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a peroxidase ([1:5000], Abcam, Inc., USA). As bandas

imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimiluminescência utilizando substrato de peroxidase (*Luminata HRP Substrate-Millipore*) e a reação foi captada e quantificada pelo software Bio-rad Image Lab 5.2.1. As proteínas foram normalizadas por meio da expressão do GAPDH.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) sendo $n=6$ para todos os experimentos. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido pelo teste pós hoc de Fisher's LSD. Foi considerado significativo $p<0.05$. Todas as análises foram realizadas utilizando software GraphPad Prism (versão 7.02, USA).

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL, RAZÃO PESO DOS RINS DIREITO E ESQUERDO /COMPRIMENTO TÍBIA

Foram observadas diferenças entre Machos e Fêmeas no início dos experimentos e ao final apenas as Fêmeas CAST apresentaram diferenças relacionadas ao seu respectivo grupo SHAM (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação dos dados ponderais, razão rim(mg)/tíbia(cm) e PAS.

n=6	SHAM		CASTRADOS	
	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA
Peso inicial(g)	237,66±3,63	163,66±3,91*	238,66±8,54	153,33±3,37•
Peso final(g)	296,00±6,38	196,40±2,12*	292,66±7,27	231,83±3,95•
PAS inicial (mmH)	198,00±4,11	179,86±3,64*	193,61±3,81	181,80±1,69•
PAS final (mmHg)	192,66±0,80	182,16±1,75*	190,69±0,28	182,27±2,23•
Razão peso rim direito/Tibia (g/cm)	1,30±0,04	0,82±0,01*	1,10±0,02*	0,84±0,03•
Razão peso rim esquerdo/Tibia (g/cm)	1,38±0,08	0,82±0,01*	1,16±0,02*	0,88±0,04•

Os dados foram expressos como média ± SEM. n= 6 *p<0,05 vs Machos SHAM; +p<0,05 vs Fêmeas SHAM; •p<0,05 vs Machos castrados.

Conforme apresentado na tabela 1, a maior razão peso do rim/comprimento da tíbia foi encontrada no SHAM. Diferenças significativas também foram observadas entre machos castrados e ambos os grupos de fêmeas, não sendo encontradas diferenças entre as fêmeas.

4.2 PAS INICIAL E FINAL

Os valores de PAS inicial e final dos animais machos e fêmeas obtidos ao longo do estudo estão demonstrados na tabela 1. Os ratos machos de ambos os grupos apresentaram os mesmos valores de PAS no início e no final do protocolo, o que também ocorreu para as fêmeas. No entanto, foi verificado a presença de dimorfismo sexual nas medidas iniciais e finais da PAS.

4.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Para verificação da função renal, avaliamos TFG, FPR, FSR e RVR (Figura 10). Os animais SHAM Machos apresentaram menor TFG ($3,79 \pm 0,21$ mL/min/Kg) que as SHAM Fêmeas ($6,04 \pm 0,32$ mL/min/Kg). A castração piorou esse parâmetro em ambos os grupos quando comparadas aos seus respectivos grupos SHAM (CAST Macho $2,12 \pm 0,16$ mL/min/Kg; CAST Fêmea $3,47 \pm 0,31$ mL/min/Kg) (Figura 12-A).

Não foram encontradas diferenças no FPR entre os grupos SHAM (Machos $9,83 \pm 1,10$ mL/min/Kg; Fêmeas $9,26 \pm 0,94$ mL/min/Kg) (Figura 12-B). A castração em ambos os sexos reduziu o FPR (Machos $5,35 \pm 0,83$ mL/min/Kg;

Fêmeas $5,37 \pm 0,42$ mL/min/Kg). O FSR (Figura 12-C) seguiu o mesmo padrão de alteração do FPR (SHAM Macho $17,26 \pm 1,89$ mL/min/Kg; SHAM Fêmea $15,2 \pm 1,51$ mL/min/Kg; CAST Macho $9,04 \pm 1,41$ mL/min/Kg; CAST Fêmea $8,61 \pm 0,65$ mL/min/Kg). Em relação à RVR (Figura 12-D), não foram encontradas diferenças entre SHAM machos e fêmeas ($9,25 \pm 0,55$ u.a.; $8,84 \pm 0,53$ u.a.), com ambos os grupos apresentando valores inferiores aos seus respectivos grupos castrados. O grupo CAST Macho ($24,99 \pm 3,38$ u.a.) apresentou valores maiores quando comparado ao grupo CAST Fêmea ($14,69 \pm 0,95$ u.a.).

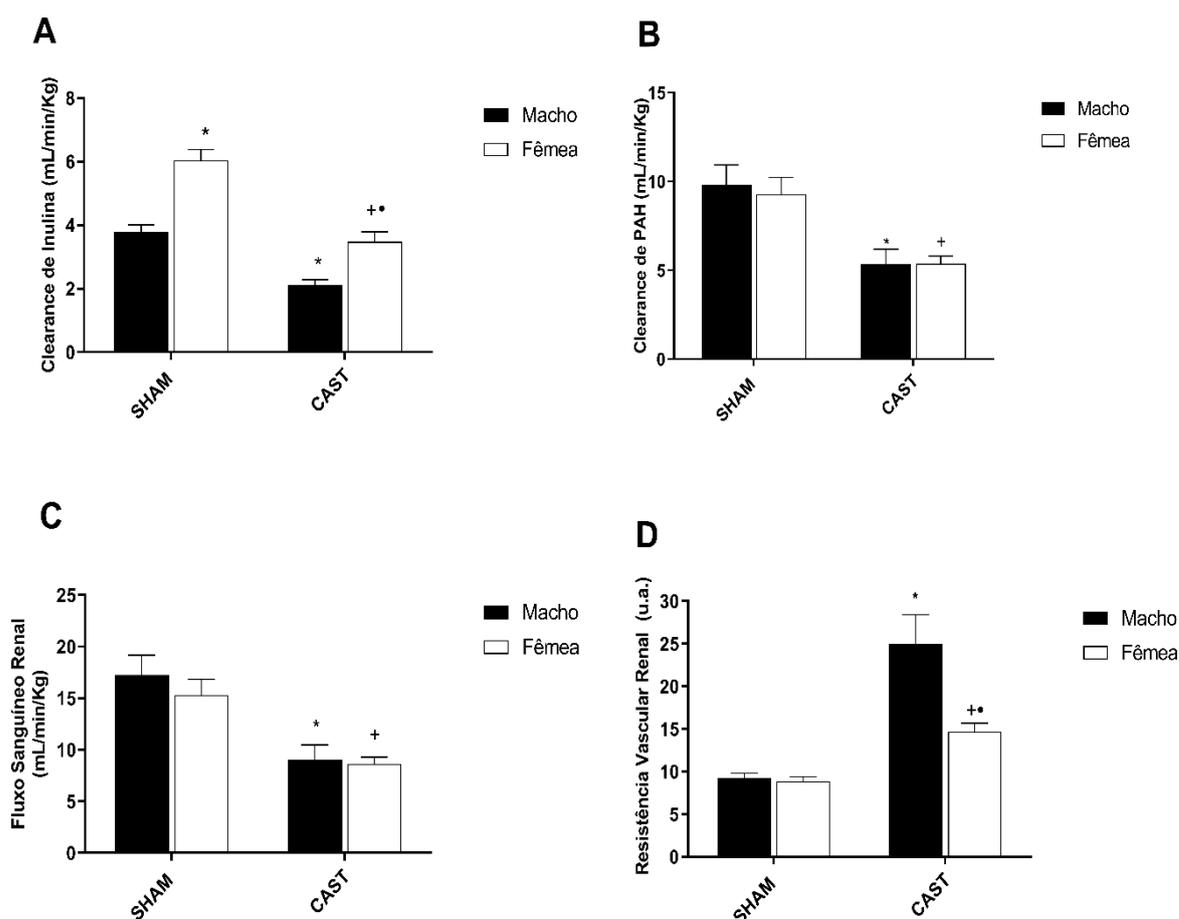


Figura 12. Influência do sexo e HS na FR de Machos e Fêmeas SHR. (A) Clearance de inulina, (B) Clearance de PAH, (C) Fluxo sanguíneo renal e (D)

resistência vascular renal. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6
*p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE EROs NO TECIDO RENAL

A produção de O₂[•] foi detectada por citometria de fluxo com DHE (Figura 13-A). Não foram encontradas diferenças significativas entre Machos e Fêmeas SHAM (1676,16 \pm 54,97 MIFa.u.; 1467,50 \pm 9,17 MIFa.u.). A castração aumenta a produção de O₂[•] em ambos os sexos, entretanto os machos apresentaram níveis mais elevados que as em fêmeas (4357,16 \pm 226,84 MIFa.u.; 2109,83 \pm 93,12 MIFa.u.). O mesmo padrão foi encontrado em relação à produção de H₂O₂ (Figura 13-B) (SHAM Macho 738,00 \pm 31,22 MIFa.u.; SHAM Fêmea 464,16 \pm 4,98 MIFa.u.; CAST Macho 2950,00 \pm 215,79 MIFa.u.; CAST Fêmea 1171,83 \pm 35,53 MIFa.u.).

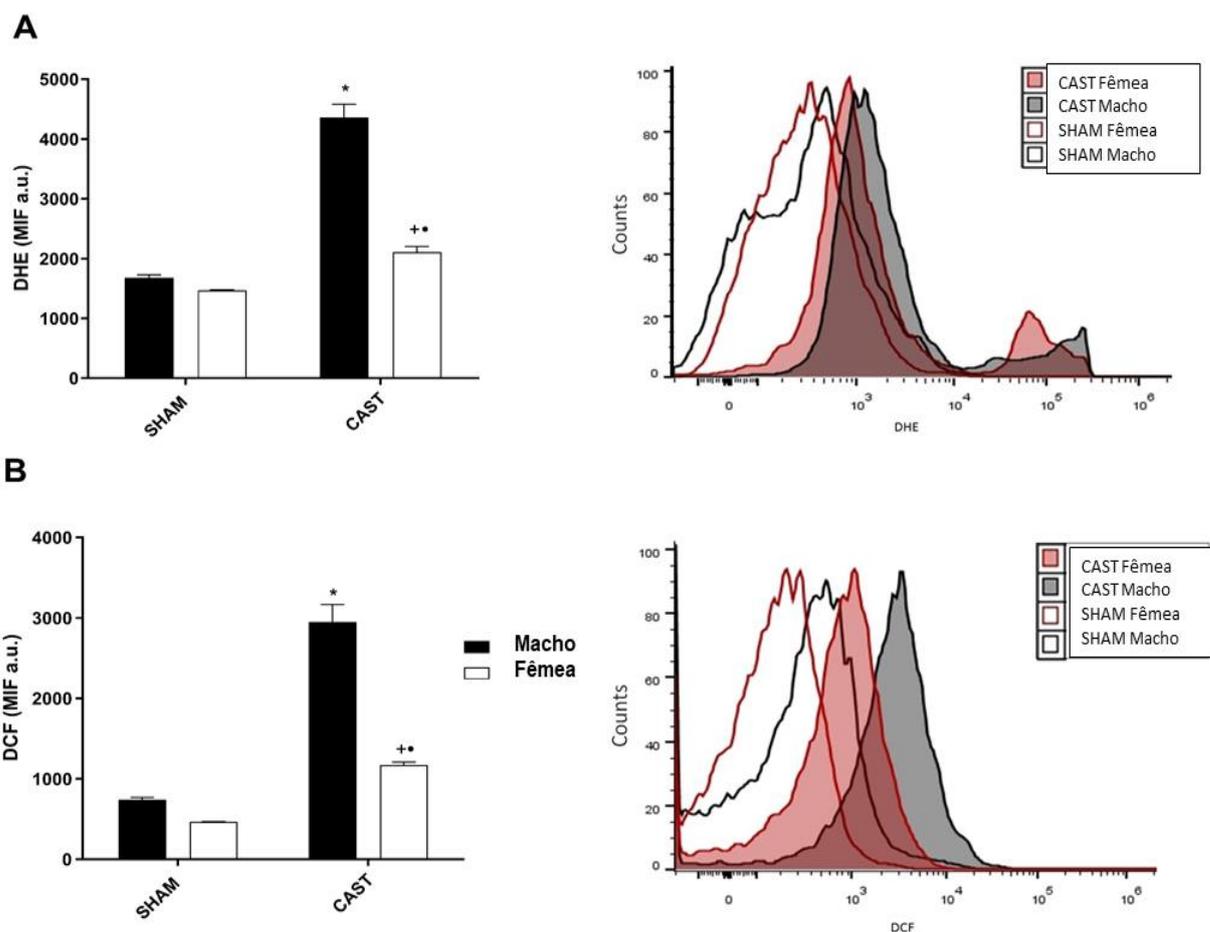


Figura 13. Avaliação de EROs no tecido renal. (A) dihidroetidina e (B) diclorofluoresceína. A análise de EROs foi realizada por citometria de fluxo. O $O_2\cdot$ intracelular e o H_2O_2 foram monitorados separadamente por meio de alterações na intensidade mediana de fluorescência. Os dados foram expressos como média \pm SEM. $n = 6$ * $p < 0,05$ vs SHAM Macho; + $p < 0,05$ vs SHAM Fêmea; • $p < 0,05$ vs CAST Macho.

4.5 DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO GLOMERULAR

A deposição de colágeno glomerular foi determinada por coloração com Picosirius red (Figura 14A-B-C-D). Foram observadas diferenças entre SHAM

Machos e Fêmeas ($10,79 \pm 0,17\%$; $9,12 \pm 0,18\%$), e a castração aumentou esse parâmetro em ambos os grupos ($12,61 \pm 0,17\%$; $13,32 \pm 0,38\%$).

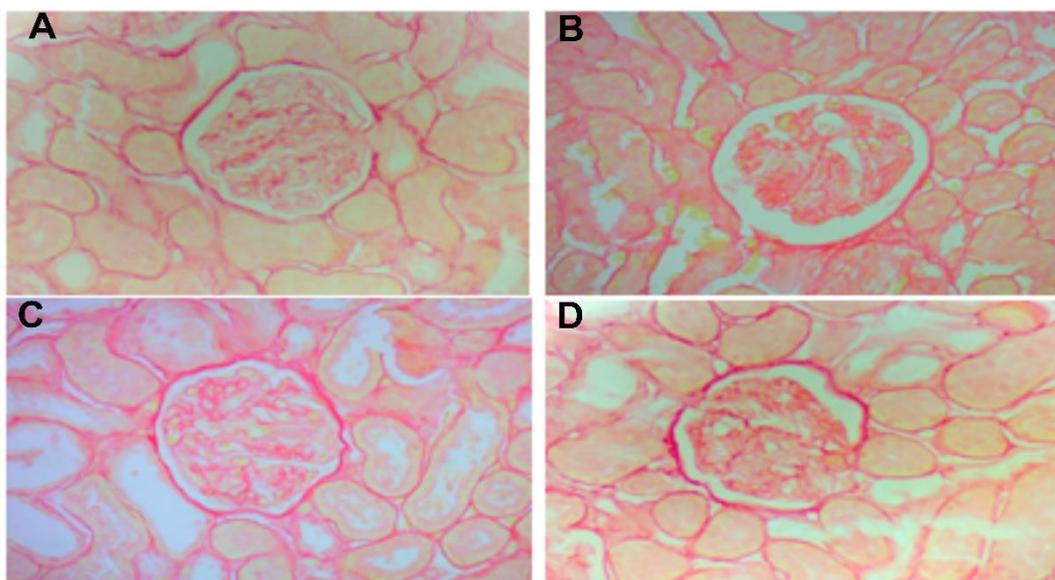
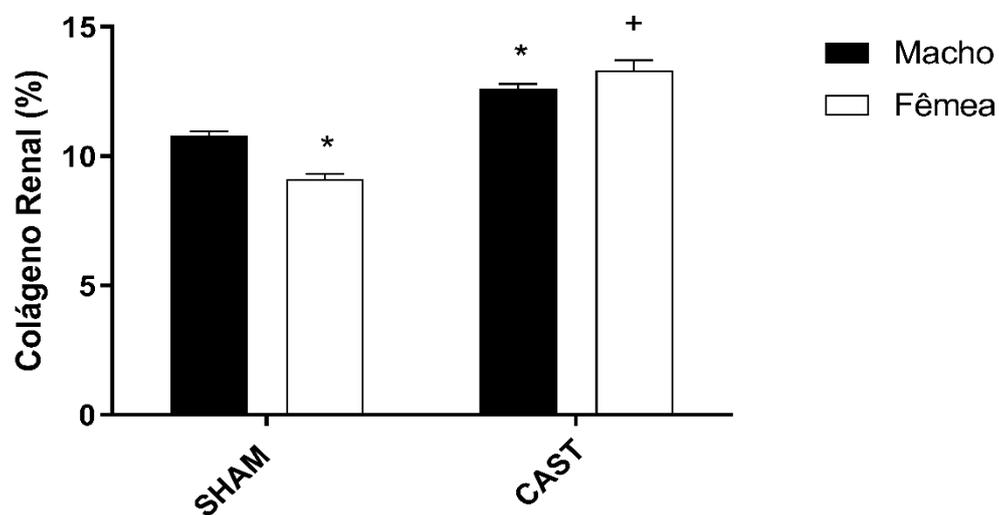


Figura 14. Análise histológica da deposição de colágeno renal. Porcentagem de conteúdo de colágeno renal e imagens representativas (A) SHAM Macho, (B) SHAM Fêmea, (C) CAST Macho, (D) CAST Fêmea. As amostras de rim foram coradas com picosirius red para quantificar o conteúdo de colágeno e visualizadas em microscopia óptica com aumento de 400x. Os dados foram

expressos como média \pm SEM. $n = 6$ * $p < 0,05$ vs SHAM Macho; + $p < 0,05$ vs SHAM Fêmea; ● $p < 0,05$ vs CAST Macho.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

A expressão das proteínas podocina e nefrina (Figura 15-A-B), COX2, CAT, SOD1, SOD2 e NOX2 (Figura 16-A-B-C-D-E) foi avaliada por western blot. Nos animais SHAM, foi verificada maior expressão da podocina em Machos que Fêmeas, entretanto a castração reduziu a expressão dessa proteína em machos enquanto aumentou em fêmeas. Não foram encontradas diferenças entre os grupos com relação a expressão de nefrina.

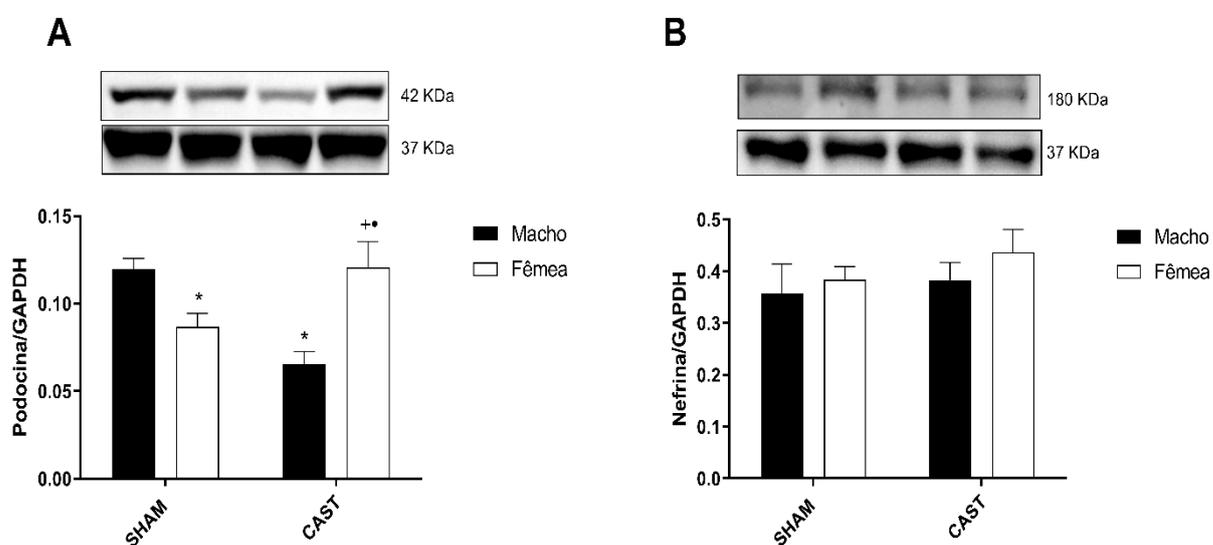


Figura 15. Expressão das proteínas Podocina (A) e Nefrina (B) no tecido renal. A expressão de cada proteína foi normalizado pelo GAPDH. Os dados foram expressos como média \pm SEM. $n = 6$ * $p < 0,05$ vs SHAM Macho; + $p < 0,05$ vs SHAM Fêmea; ● $p < 0,05$ vs CAST Macho.

Considerando a expressão da COX2, não foram observadas diferenças entre SHAM Machos e Fêmeas. A castração aumentou a expressão de COX2 em ambos os grupos, todavia esse aumento foi maior nos animais Machos quando comparados às Fêmeas.

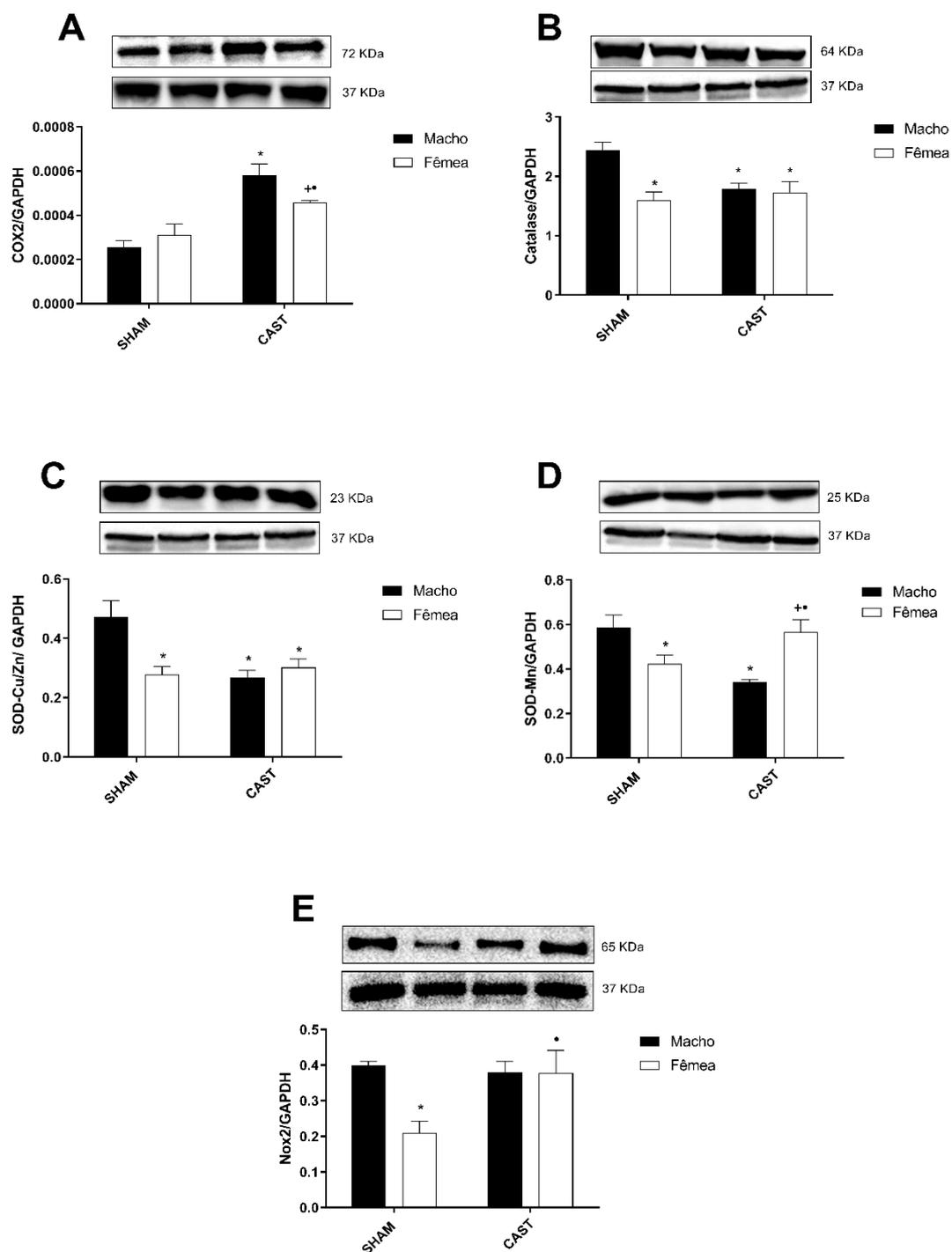


Figura 16. Expressão das proteínas COX2, CAT, SOD-Mn, SOD1 e NOX2 no tecido renal. (A) expressão da proteína COX2, (B) expressão da proteína CAT, (C) expressão da proteína SOD2, (D) expressão da proteína SOD-CuZn e (E) expressão da proteína NOX2. A expressão de cada proteína foi normalizado pelo GAPDH. Os dados foram expressos como média \pm SEM. n= 6 *p <0,05 vs SHAM Macho; +p <0,05 vs SHAM Fêmea; ●p <0,05 vs CAST Macho.

Com relação a CAT, os animais do grupo SHAM Macho demonstraram maior expressão quando comparados às Fêmeas. A castração reduziu a expressão nos Machos, todavia as Fêmeas permaneceram inalteradas. A mesma resposta foi observada na expressão de SOD1. Por outro lado, ao avaliarmos SOD2, verificamos que o dimorfismo permanece, e a castração dos animais Machos reduziu a expressão desta enzima e aumentou nas Fêmeas. Os animais SHAM Machos apresentaram maior expressão da NOX2 em relação as Fêmeas. A castração não alterou este parâmetro nos Machos, entretanto aumentou nas Fêmeas.

4.7 ATIVIDADE RENAL DAS ENZIMAS ECA E ECA2

A atividade das enzimas ECA E ECA2 está apresentada na figura 17. Foi encontrado dimorfismo sexual nos grupos SHAM, com ratos machos exibindo menor atividade ECA ($17,20 \pm 1,28$ AFU) quando comparados as fêmeas ($25,31 \pm 0,33$ AFU), e a castração não alterou este parâmetro (CAST Macho $16,15 \pm 1,71$ AFU; CAST Fêmea $22,81 \pm 0,92$ AFU) (Figura 17-A). Da mesma forma, os Machos do grupo SHAM apresentaram menor atividade da ECA2 que as Fêmeas SHAM ($0,019 \pm 0,0027$ AFU; $0,14 \pm 0,0098$ AFU). No entanto, a

castração aumentou a atividade desta enzima nos Machos ($0,12 \pm 0,0045$ AFU), enquanto a reduziu nas Fêmeas ($0,014 \pm 0,0006$ AFU) (Figura 17-B).

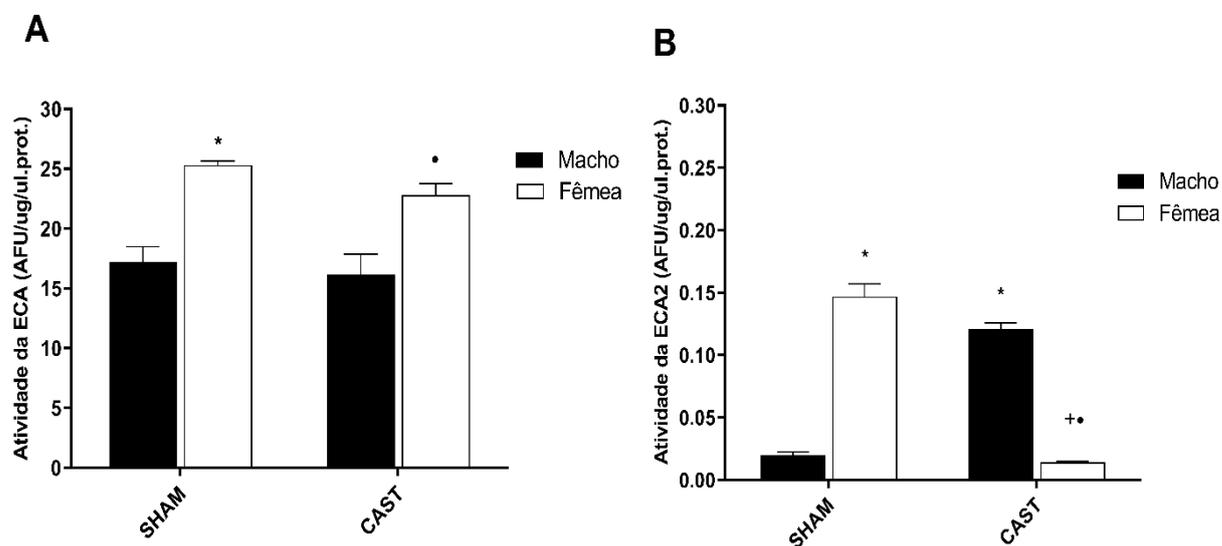


Figura 17. Avaliação da atividade das enzimas ECA e ECA2 no tecido renal. (A) atividade renal da ECA e (B) atividade renal da ECA2. A atividade enzimática foi expressa em AFU (unidades arbitrárias de fluorescência). Os dados foram expressos como média \pm SEM. $n=6$ * $p < 0,05$ vs SHAM Macho; + $p < 0,05$ vs SHAM Fêmea; • $p < 0,05$ vs CAST Macho.

5 DISCUSSÃO

Os hormônios sexuais e o sexo desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção de várias doenças, com atenção especial para as doenças renais em condições de hipertensão (Lindeman et al, 1985; Baylis, 2005; Hemmelgarn et al, 2006; Sullivan et al, 2006; Sullivan et al., 2007). Este é o primeiro estudo a comparar FR em ratos SHR machos e fêmeas, associando EROs, ECA, ECA2, inflamação e a contribuição desses parâmetros para as alterações morfológicas e funcionais do rim. Nossos dados apresentam quatro novas e principais evidências:

- i) a castração reduziu a TFG e aumentou a RVR em ambos os sexos;
- ii) a castração aumentou as EROs, mais severamente em machos do que em fêmeas;
- iii) dimorfismo sexual foi observado em relação à deposição renal de colágeno, que aumentou com a castração em ambos os sexos;
- iv) a atividade renal da ECA2 foi exacerbada no grupo CAST macho e reduzida nas fêmeas.

Verificamos que, para ambos os sexos, a PAS permaneceu inalterada na castração. Esses dados corroboram Dalpiaz et al (2015), onde machos SHR castrados com 12 semanas de idade não apresentaram diferenças na PAS após 7 semanas em relação ao grupo não castrado. Entretanto, Reckelhoff et al (1998) demonstraram que Machos SHR castrados com 5 semanas de idade apresentam redução na PAS após 11 semanas em relação ao grupo não

castrado, desta forma acreditamos que os resultados diferentes estão relacionados a diferentes metodologias utilizadas. Baseado nestes dados, os achados do trabalho parecem ser independente de alterações na PA.

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública mundial que afeta pessoas de várias idades e de ambos os sexos, sendo caracterizada pela perda gradual de FR (Hu & Coresh, 2017). No presente estudo, ratos SHR machos SHAM com 19 semanas de idade apresentaram TFG prejudicada quando comparados às fêmeas. O mesmo pode ser observado na FR de humanos (Sandberg & Ji., 2003; Hemmelgarn et al., 2006) e em ratos Sprague Dawley com 5 e 11 meses de idade (Sutherland et al., 2016) e SRHs com 19 semanas de idade (Veiras et al., 2017). Outro aspecto importante é que a DRC representa maior risco de complicações e mortalidade, principalmente as cardiovasculares. Um paciente adulto é identificado com DRC quando apresenta, por um período igual ou superior a três meses com TFG menor que $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, ou TFG maior que $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, mas com evidência de lesão da estrutura renal (National Kidney Foundation, 2002).

Alguns indicadores de lesão renal são albuminúria, alterações na imagem renal, hematúria/leucocitúria, distúrbios hidroeletrólíticos persistentes, alterações histológicas na biópsia renal e transplante renal prévio. Albuminúria é definida pela presença de mais de 30 mg de albumina na urina de 24 horas ou mais de 30 mg/g de albumina em uma amostra de urina isolada ajustada pela creatinina urinária. As principais causas da DRC incluem diabetes, hipertensão, glomerulonefrite crônica, pielonefrite crônica, uso crônico de medicamentos antiinflamatórios, doenças autoimunes, doença renal policística,

doença de Alport, malformações congênitas e doença renal aguda prolongada (Ammirati, 2020).

Modelos animais têm sido amplamente usados para esclarecer a patogênese e os mecanismos subjacentes da doença renal. Entre esses modelos, camundongos e ratos são os mais comumente usados para estudar eventos de nefropatia e potenciais alvos terapêuticos e para identificar biomarcadores específicos da doença. Camundongos e ratos são facilmente reproduzidos e são relativamente baratos para abrigar e manter (Wei; Dong, 2012). A doença renal aguda clássica pode ser induzida em uma variedade de modelos murinos por cirurgia ou administração de drogas ou toxinas (Ortiz et al., 2015; Singh et al., 2012). Além disso, camundongos geneticamente modificados e cepas consanguíneas fornecem uma nova plataforma para investigar nefropatia humana complexa (como nefropatia por IgA e nefropatia diabética) (Marchant et al., 2015; Suzuki et al., 2014).

O papel da testosterona no desenvolvimento de lesão renal e no comprometimento da FR foi relatado anteriormente, enquanto o estrogênio demonstrou atuar como um protetor (Ji et al., 2005; Eshraghi-Jazi et al., 2015). Nossos resultados demonstraram que a castração reduz a TFG em ambos os grupos, embora os resultados encontrados na literatura ainda sejam controversos. Ji et al (2005) demonstraram que a castração de ratos Sprague Dawley machos com 2 meses de idade melhoram a proteinúria, mas não altera a TFG. Azurmendi et al (2013) verificaram que ratos Wistar machos e fêmeas castrados com 2 meses de idade, apresentaram redução da TFG ao final dos experimentos, quando tinham 5,2 meses de idade. De acordo com Fortepiani et

al (2003) ratos SHR machos castrados aos 8 meses de idade apresentaram aumento da TFG ao final dos experimentos, aos 18 meses.

A TFG é influenciada pelo número de glomérulos funcionais e pela hemodinâmica renal, que é, por sua vez, controlada pela resistência dos vasos renais encontrados antes e depois dos glomérulos atuando na regulação do FPR (Brenner et al., 1996). Em relação à hemodinâmica renal, nossos resultados não mostraram diferenças no FPR, FSR e RVR entre os grupos SHAM, enquanto que a castração foi capaz de diminuir o FPR e FSR em ambos os sexos e aumentar a RVR, mais pronunciadamente nos Machos que nas Fêmeas. Essas alterações podem ser responsáveis pela redução da TFG observada após a castração, confirmando que os HS podem influenciar a FR.

Com o passar dos anos, os homens sofrem maior declínio do FPR do que as mulheres na pré-menopausa (Berg, 2006). De acordo com Fortipiani (2003), ratos SHR machos idosos apresentaram redução de 30% nos níveis de testosterona sérica em comparação a machos jovens, associado com redução na TFG e aumento na RVR. Baylis (1994) demonstrou que a resistência da arteríola aferente é ligeiramente maior e a TFG um pouco menor em machos Wistar castrados quando comparados aos não castrados.

A deficiência de testosterona é comum em pacientes com DRC, tanto nos estágios iniciais quanto em diálise (Dhindsa et al., 2015; Hylander; Lehtihet, 2015). Adicionalmente, o estágio de DRC está inversamente associado aos níveis de testosterona livre (Grossmann et al., 2015). Além disso, aumento na testosterona também foi relatado após o transplante renal, e esse aumento

depende do tempo após o recebimento do órgão transplantado (Saha et al., 202; Park; Koo; Lee, 2013). Os mecanismos para a diminuição dos níveis de testosterona em homens não foram completamente elucidados, mas o aumento na depuração da prolactina (Schmidt; Luger; Ho"rl, 2002) e a inibição dos efeitos do hormônio luteinizante nas células de Leydig (Dunkel et al., 1997) parecem estar envolvidos.

Como demonstrado, os hormônios sexuais desempenham papel no controle da FR. Esse papel pode ocorrer, principalmente, devido à sua influência no SRA. Inicialmente, esse efeito pode ser demonstrado por dados clínicos, em que os inibidores da ECA são as drogas de primeira escolha para pacientes com hipertensão e DRC, dada a influência bem estabelecida do SRA nas doenças cardiovasculares e renais (Kalaitzidis & Elisaf; 2018). Nas doenças renais, os níveis da ECA e ECA2 podem se alterar em direções opostas (Soleret al., 2013), com os peptídeos ativos produzidos por essas enzimas, Ang II e Ang-(1-7), respectivamente, apresentando efeitos contra-regulatórios ou mesmo semelhantes em diferentes modelos (Dilauro et al., 2010; R"uster & Wolf, 2011).

O SRA também é conhecido por promover aumento das EROs no rim. Na arteríola eferente e tecido renal, a Ang II aumenta as EROs (Wang et al., 2003; Carlstrom et al., 2010), contribuindo para aumento da RVR em camundongos e coelhos machos (Wang et al., 2003; Lai et al., 2012). Adicionalmente, o EO contribui para surgimento e manutenção de doenças renais e o tratamento com antioxidantes é capaz de reduzir a injúria renal e melhorar a FR em ratos SHR machos (Schnackenberg; Welch; Wilcox, 1998; Rodriguez-Iturbe et al., 2003). De acordo com Lodha et al (2002) o tratamento agudo com Ang II por 24 horas

induz diretamente o estresse oxidativo, apoptose e necrose em culturas de células mesangiais (MMC, SV40 MES-13) e o ácido ascórbico foi capaz de prevenir esses efeitos, demonstrando que o EO está diretamente correlacionado com os efeitos prejudiciais da AngII.

Adicionalmente, Lazaro et al (2003) demonstraram que o tratamento de Machos SRH com inibidor da ECA ou bloqueador de AT1-R é capaz de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a transcrição do gene da enzima SOD-1. Comprovadamente, a Ang II aumenta a produção de EROs via AT1-R ativando e aumentando a expressão das diversas subunidades da NADPH (Griendling; Ushio-Fukai, 2000) e o tratamento com bloqueadores de AT1-R é capaz de reduzir o EO e promover melhoras na função renal (Lazaro et al., 2005).

As EROs contribuem para a inflamação crônica (Alvarez; Sanz, 2001), perda de podócitos, atribuídos a redução da SOD1 (Zhao et al., 2018; Wang et al., 2018) e para a morte celular por apoptose (Allen et al., 2003), que quando ocorre de maneira excessiva não regulada, promove perda de células renais em nefropatias crônicas progressivas, incluindo a nefroesclerose hipertensiva (Ortiz et al., 2001). O dimorfismo sexual encontrado no SRA contribui para diferentes níveis de EROs no rim, onde machos SHR apresentam níveis mais elevados que fêmeas SHR (Fortepiani; Reckelhoff, 2005).

Segundo Bonventre et al (2004) e JinJung et al (2013), a inflamação é o resultado mais provável do aumento de EROs, pois quando submetida a altos níveis de EO a célula produz citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, Kaur et al (2006) demonstraram que o tratamento de cardiomiócitos

com TNF-alfa (importante citocina pró-inflamatória) é capaz de aumentar a produção de EROs. Assim, acreditamos que haja uma associação entre EROs e inflamação em nossos animais, e ambas parecem ser moduladas pelo SRA, uma vez que encontramos níveis elevados de EROs, COX2 em ambos os animais castrados e desequilíbrio no SRA, com Machos apresentado hiperatividade da ECA2 e Fêmeas com atividade dessa enzima reduzida.

No presente estudo, sugerimos que existe um aparente equilíbrio no SRA no grupo SHAM Fêmea, devido a apresentarem atividades da ECA e ECA2 elevadas, enquanto no grupo SHAM Macho a atividade ECA se mostra maior que da ECA2. A castração foi capaz de alterar a atividade da ECA em ambos os grupos; no entanto, reduziu a atividade da ECA2 nas Fêmeas, ao mesmo tempo que a aumentou nos Machos. Esses desequilíbrios parecem ser as principais causas dos danos observados na função e remodelamento renal. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças no EO nos grupos SHAM. Entretanto, verificamos maior expressão das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2 no grupo SHAM Macho em relação as fêmeas. Após a castração os animais machos apresentaram maiores valores de $O_2\cdot$ e H_2O_2 intracelular do que as fêmeas, o que pode explicar a alta RVR encontrado nesses animais (Schnackenberg et al., 1998). Além disso, encontramos as isoformas da SOD reduzidas em Machos e aumento da SOD2 em grupos de Fêmeas castradas.

Assim como em outros tecidos e órgãos, existem numerosas fontes intrarrenais de EROs. Entre elas estão as ciclooxigenases (COXs), que são moduladas por Ang II (Sies, 1997; Locatelli et al., 2003) e Ang-(1-7) (Esteban et al., 2009). Em relação à expressão da COX2, não encontramos diferenças entre SHAM

Machos e Fêmeas, todavia a castração aumentou a expressão dessa enzima em machos e fêmeas, embora os machos tenham apresentado maiores níveis.

De acordo com Tomida et al (2003), a inibição do ON via tratamento com L-NAME por 21 dias em ratos Sprague Dawley induziu aumento da expressão de COX2 nos rins e o tratamento com o inibidor seletivo dessa enzima preveniu a hipertensão e a proteinúria induzidas pela inibição do ON, adicionalmente a COX2 foi capaz de aumentar o estresse oxidativo nesse modelo de hipertensão L-NAME, demonstrando a possibilidade de que o aumento da expressão de COX2 possa ter papel importante na progressão da hipertensão e lesão renal. Além disso, Elmarakby et al (2018) sugeriram que, em SHR, a COX2 promove maior geração de EROs em machos do que fêmeas. Nossos dados corroboram ambos os estudos, revelando elevada expressão da COX2, mais pronunciada em animais castrados e consequente elevação do EO.

EROs são conhecidos por causar danos celulares, contribuindo para a perda gradual de FR e deposição de colágeno (Youet al., 2013), inflamação crônica (Alvarez & Sanz, 2001) e para a morte celular por apoptose (Allenet al., 2003). Demonstramos que embora a nefrina permanecesse inalterada em todos os grupos, havia dimorfismo em relação à expressão da podocina. A castração reduz a expressão desta proteína nos machos enquanto a aumenta nas fêmeas. A podocina, que é facilmente substituída por colágeno, está relacionada ao processo de filtração e sua perda pode estar ligada à piora da filtração renal (Bonseet al., 2018). A base fisiopatológica da DRC inclui perda de células tubulares renais e subsequente substituição por fibroblastos,

autofagia desregulada, inflamação e formação excessiva de oxidantes (Shiraziet al., 2018).

Segundo Ruiz-Ortega et al (2006) a Ang II tem efeitos pró-inflamatórios e promove fibrose. Em resposta à expressão de Ang II, as células epiteliais tubulares mudam seu fenótipo, migram para o interstício e adquirem fenótipo miofibroblástico (transdiferenciação epitelial-mesenquimal). Os miofibroblastos, então, produzem colágeno tipo 1 envolvido no processo fibrótico, ainda promove indiretamente a ativação de receptores de tirosina quinase que induzem a fibrose por meio da produção de fator de crescimento de transformação beta (TGF- β). Ang II promove resposta inflamatória renal por meio da ativação do receptor AT1-R em células residentes e a ativação da via do Fator de transcrição (NF-KB) com produção de quimiocinas, citocinas como Interleucina 1 (IL-1) e TNF-alfa. O recrutamento de leucócitos dependente de Ang II também está envolvido na progressão da glomeruloesclerose.

Ao se ligar no receptor AT1-R, a Ang II ativa a proteína G, fosfolipase C e produção de inositol trifosfato responsável pelo aumento de cálcio intracelular levando à vasoconstrição intrarrenal e remodelação vascular (Ruiz-Ortega et al., 2006). Por outro lado, ao reduzir a pressão arterial, os inibidores do SRA limitam a ativação imunológica secundária no rim. O uso de fimasartan (inibidor de AT1-R) atenuou a regulação positiva de citocinas inflamatórias (TNF-alfa e IL-1), diminuição da apoptose das células tubulares renais (diminuição da atividade da caspase-3) e, finalmente, preserva a função renal e a arquitetura tubular após lesão de isquemia-reperfusão em um modelo de camundongo.

Outro fármaco inibidor de AT1-R, o Losartan foi capaz de reduzir a fibrose renal, mortalidade e DCR subsequente a Insuficiência Renal Aguda (IRA) grave em camundongos (Chou et al., 2017). Uma semana após a administração de Losartan em camundongos hipertensos, as expressões gênicas e proteicas de colágeno I, colágeno IV e TGF- β diminuíram e a glomeruloesclerose foi menos marcada. Após 4 semanas de tratamento com Losartan, os parâmetros funcionais renais e histológicos foram completamente normalizados.

Outros estudos em animais mostraram que a ativação do SRA durante e após a IRA desempenharia papel crucial na transição da IRA para a DRC (Chou; Chu; Lin, 2018). Ainda, a administração de Losartan antes da isquemia-reperfusão manteve o FSR, diminuiu a inflamação e preveniu o desenvolvimento de doença renal crônica (Rodríguez-Romo et al., 2016). Curiosamente, a ativação do SRA parece persistir por muito tempo após a IRA e o tratamento com Losartan pode reduzir a progressão e a mortalidade quando administrado após IRA (Cheng et al., 2016). Em conjunto, esses dados sugerem que os bloqueadores do SRA podem prevenir a progressão da fibrose renal após a IRA e conseqüentemente reforçar o papel desse sistema nessas situações clínicas.

Neste estudo foi demonstrado que SHAM fêmeas apresentaram menor deposição de colágeno em relação aos Machos, com a castração aumentando o colágeno em ambos os grupos. Sabe-se que a via clássica da Ang II resulta em alterações hemodinâmicas que levam à vasoconstrição da arteríola eferente e elevação da pressão intraglomerular, crescimento celular e produção de matriz extracelular, culminando em glomeruloesclerose e fibrose

tubulointersticial, desequilíbrio entre agentes antioxidantes e pró-oxidantes e efeitos inflamatórios, que podem influenciar a fisiopatologia do podócito e a patogênese da proteinúria via Ang II (Lobo et al., 2003; Komers & Plotkin, 2016).

Diversos estudos sugerem o papel protetor da ECA2 em diferentes modelos de doenças renais, incluindo nefrectomia subtotal (Dilauro et al., 2010), isquemia e lesão renal de reperfusão (Silveira et al., 2010) e obstrução ureteral unilateral (Liu et al., 2012). Uma possível explicação para lesão renal e proteinúria detectada em modelos animais com deficiência adquirida ou genética da ECA2 pode ser atribuída ao predomínio anormal de ações deletérias da Ang II (Dilauro et al., 2010; Oudit et al., 2006; Wysocki et al., 2006; Ye et al., 2006). A administração crônica de MLN4760, um inibidor de ECA2, produziu albuminúria e deposição de proteína de matriz em ratos controle ou diabéticos (Soler et al., 2007). A administração de MLN 4760 em 5/6 camundongos nefrectomizados aumentou a albuminúria por meio de um mecanismo dependente do receptor AT1-R, independente da pressão arterial (Dilauro et al., 2010).

De acordo com Silveira et al., 2010 a expressão renal da ECA2 foi reduzida no córtex renal de camundongos que foram submetidos a nefrectomia subtotal e em um modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos. Adicionalmente, Camundongos knockout para ECA2 submetidos à obstrução ureteral unilateral exibiram uma razão 4 vezes maior de Ang II/ Ang-(1-7) e concentrações aumentadas de TNF-alfa e IL-1 β no tecido renal do que os animais selvagens (Liu et al., 2012). A deficiência genética da atividade da ECA2 em camundongos promoveu estresse oxidativo via efeito dependente de AT1-R no

rim (Wysocki et al., 2014). Resumidamente, esses estudos sugeriram que o eixo ECA2-Ang-(1-7) modula o estresse oxidativo, a inflamação e a fibrose no tecido renal.

Alguns estudos também sugeriram uma estreita correlação entre albuminúria e ECA2. O tratamento de células HK-2 com albumina de soro bovino levou a mudanças significativas na expressão de ECA/ECA2, com o balanço favorecendo a formação de Ang II (Liu et al., 2009). Adicionalmente, Marquez e colaboradores demonstraram que a insulina aumenta o gene da ECA2, a expressão da proteína e a atividade enzimática em podócitos cultivados e esses aumentos foram mantidos ao longo do tempo (Márquez et al., 2014). Na presença de albumina, o efeito benéfico da insulina na expressão e atividade da ECA2 desapareceu. Dessa forma, a redução de ECA2 pode aumentar a excreção urinária de albumina, enquanto a albuminúria, por sua vez, pode perturbar o equilíbrio da expressão de ECA/ECA2.

Em humanos, a ECA2 é amplamente estudada em pacientes diabéticos. Os primeiros estudos em pacientes com diabetes tipo 2 e nefropatia diabética evidente mostraram declínio na ECA2 e um aumento na expressão da ECA nos glomérulos e túbulos, resultando em uma relação ECA/ECA2 dramaticamente aumentada (Mizuiru et al., 2008; Wang et al., 2016). Consistente com esses estudos, os pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 e glomeruloesclerose nodular apresentaram regulação negativa da ECA2 no tecido renal (Wang et al., 2016). Esses pacientes também mostraram regulação negativa de ECA, o que contradiz estudos anteriores.

De modo geral, os estudos sugerem que a ECA2 está alterada nos rins de humanos com diabetes. Segundo Mizuiri et al (2011) a detecção não invasiva da ECA2 na urina pode fornecer informações consideráveis sobre a lesão renal e a progressão da doença, refletindo a atividade do RAS no rim. O mesmo autor, demonstrou aumento significativo de ECA2 na urina de pacientes com DRC em comparação com controles saudáveis, e aumento adicional dos níveis urinários de ECA2 em pacientes com nefropatia diabética em comparação com pacientes com outras doenças renais. A ECA2 urinária foi descrita como um fator de risco independente para microalbuminúria em humanos e correspondeu ao estágio da DRC e declínio da função renal (Park et al., 2013). Em um estudo mais recente em adolescentes com Diabetes tipo 1 não complicado, os níveis de excreção e atividade da enzima ECA2 urinária foram elevados em comparação com controles saudáveis e correlacionados com hemoglobina glicada mais alta, entretanto não foram associados com a TFG, pressão arterial ou albuminúria (Burns et al., 2017).

A atividade da ECA2, mas não a proteína, foi aumentada em adultos com diabetes tipo 1 de longa data e doença renal diabética em comparação com controles diabéticos sem doença renal (Wysocki et al 2017). Esses estudos indicam que o grau de ECA2 na urina é variável e pode depender do estágio da doença e da gravidade da lesão, fazendo alusão ao uso da ECA2 urinária como um marcador clínico precoce promissor para nefropatia diabética.

A relação entre Ang II e alterações estruturais e funcionais pode explicar os resultados encontrados nos grupos SHAM Machos e CAST Fêmeas, mas não parece estar associada aos resultados observados no grupo CAST Macho,

uma vez que este grupo apresentou aumento significativo da ECA2 em relação ao SHAM Macho. No entanto, embora os efeitos benéficos da Ang-(1-7) no sistema cardiovascular tenham sido relatados na última década, estudos recentes mostraram que, entre outros efeitos, a infusão crônica de Ang-(1-7) foi responsável por acelerar a lesão renal em ratos diabéticos, que apresentaram níveis aumentados de proteinúria e fator de crescimento 1 (Shao et al., 2008).

Além disso, Dilauro et al (2010) demonstraram que o tratamento de camundongos com Ang-(1-7) aumenta a proliferação de células mesangiais que estão relacionadas a deposição de colágeno. Esteban et al (2009) demonstraram que a infusão de Ang-(1-7) é capaz de aumentar a inflamação renal e possivelmente o estresse oxidativo. Nossos dados corroboram os apresentados acima, pois observamos aumento da atividade renal dos ECA2 e elevada deposição de colágeno nos grupos Machos.

CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram o papel dos HS, modulando o SRA e esse promovendo desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema antioxidante em ratos SHR machos e fêmeas na presença e ausência de hormônios sexuais. O desbalanço observado foi capaz de promover severos danos à função renal desses animais, sendo os machos os mais afetados pela castração, tendendo a insuficiência renal.

Assim, sugerimos que nossos resultados são influenciados pelo SRA e especialmente no grupo CAST Macho pela elevada atividade de ECA2 e CAST Fêmeas pelo desequilíbrio entre a atividade ECA / ECA2 encontrada após a castração.

FINANCIAMENTO

Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), número FAPES-CNPq 23/2018 (Termo de outorga nº: 591/18), FAPES 19/18 (Termo de outorga nº: 220/2019) e [Termo de outorga nº 0581 / 2015 e 033/2016]. Bolsista de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

REFERÊNCIAS

Allen DA, Harwood S, Varagunam M, Raftery MJ, and Yaqoob MM. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J* 17: 908–910, 2003.

Alvarez A; Sanz MJ. Reactive oxygen species mediate angiotensin II induced leukocyte–endothelial cell interactions in vivo. *J Leukoc Biol* 70: 199–206, 2001.

Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *REV ASSOC MED BRAS* 2020; 66(SUPPL 1):S3-S9. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.66.S1.3>

Armando I, Jezova M, Juorio A V, Semino-mora C, Imboden H, Falco A, et al. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT 2 receptors. *Am J Physiol Ren Physiol.*283:934–43, 2002.

August P, Oparil S. Hypertension in Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(6):1862–6, 2015.

Baylis C. Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. *Exp Gerontol.* 40: 271–278, 2005. <https://doi:10.1016/j.exger.2005.01.00>

Bellomo R et al. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care.* 2004 Aug;8(4):R204-12. doi: 10.1186/cc2872.

Bhatia K, Zimmerman MA, Sullivan JC. Sex differences in angiotensin-converting enzyme modulation of Ang (1-7) levels in normotensive WKY rats. *Am J Hypertens.* 26(5):591–8, 2013.

Birben E, Murat U, Md S, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J* 5:9–19, 2012.

Brosnihan KB, Li P, Ganten D, Ferrario CM. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am J Physiol.* 273(6 Pt 2):R1908–15, 1997.

Brown RD, Hilliard LM, Head GA, Jones ES, Widdop RE, Denton KM. Sex Differences in the Pressor and Tubuloglomerular Feedback Response to Angiotensin II. *Hypertension.*59:129–35, 2012.

Burns KD, Lytvyn Y, Mahmud FH, et al. The relationship between urinary renin angiotensin system markers, renal function, and blood pressure in adolescents with type 1 diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 312: F335–F342, 2017.

Burton GJ; Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 25 .287–299, 2011. doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 24:471 – 8, 2003.

Caliman IF, Lamas AZ, Dalpiaz PLM, Medeiros ARS, Abreu GR, Figueiredo SG, et al. Endothelial relaxation mechanisms and oxidative stress are restored by atorvastatin therapy in ovariectomized rats. *PLoS One.* 8(11):e80892, 2013.

Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira BV, Casarini DE, Vasquez EC, Meyrelles SS. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. *Int J Hypertens;* 305302, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/305202>

Carlstrom M, Lai EY, Ma Z, Steege A, Patzak A, Eriksson UJ, Lundberg JO, Wilcox CS, Persson AE. Superoxide dismutase 1 limits renal microvascular remodeling and attenuates arteriole and blood pressure responses to angiotensin II via modulation of nitric oxide bioavailability. *Hypertension.*56:907–913, 2010. <https://doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.159301>

Carmona AK, Schwager SL, Juliano M a, Juliano L, Sturrock ED. A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nat Protoc.* 1(4):1971–6, 2006.

Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature.* 434(7031):400–4, 2005.

Cheng SY, Chou YH, Liao FL, Lin CC, Chang FC, Liu CH, et al. Losartan reduces ensuing chronic kidney disease and mortality after acute kidney injury. *Sci Rep.* 6(1): 34265, 2016.

Chou YH, Chu TS, Lin SL. Role of renin-angiotensin system in acute kidney injurychronic kidney disease transition. *Nephrology (Carlton).* 23 Suppl 4:121–5, 2018.

Chou YH, Huang TM, Pan SY, Chang CH, Lai CF, Wu VC, et al. Renin-Angiotensin System Inhibitor is Associated with Lower Risk of Ensuing Chronic Kidney Disease after Functional Recovery from Acute Kidney Injury. *Sci Rep.* 7(1):46518, 2017.

Cohen DL, Townsend RR. Treatment of hypertension in patients with chronic kidney disease. *US Cardiol.* 6:54–58, 2009.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 20;417(6891):822–8, 2002.

Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M et al. Today's oxidative stress markers. *Med Pr* 66:393–405, 2015.

Daenen K, Andries A, Mekahli D et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology.* 34:975–991. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>, 2019.

Dalle Lucca, J. J.; Adeagbo, A. S.; Alsip, N. L. Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 15, n. 4, p. 961–8, abr. 2000.

Dalpia, P. L. M.; Lamas, A Z.; Caliman, I. F., et al. The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 46, n. 2, p. 171–7, fev. 2013.

Dhindsa S, Reddy A, Karam JS, et al. Prevalence of subnormal testosterone concentrations in men with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Eur J Endocrinol*. 173:359–366, 2015.

Dilauro M, Zimpelmann J, Robertson S. J., et al. Effect of ACE2 and angiotensin (1–7) in a mouse model of early chronic kidney disease . *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F1523–F1532, 2010. <https://doi:10.1152/ajprenal.00426.2009>.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000.

Drummond IA: Kidney development and disease in the zebrafish. *J Am Soc Nephrol* 16: 299–304, 2005. doi: 10.1681/ASN.2004090754

Dunkel L, Raivio T, Laine J, Holmberg C. Circulating luteinizing hormone receptor inhibitor(s) in boys with chronic renal failure. *Kidney Int*. 51:777–784, 1997.

Dzau VJ, Burt D, Pratt R. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol*. 255(1):F563–73, 1988.

Eknoyan G. Sir William Bowman: His contributions to physiology and nephrology. *Kidney Int* 50: 2120–2128, 1996. DOI: 10.1038/ki.1996.538

Elmarakbya AA, Katarya M, Pollockc JS. Influence of the selective COX-2 inhibitor celecoxib on sex differences in blood pressure and albuminuria in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 135. 16–20, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2018.02.002>

Ely D, Boehme S, Dunphy G, Hart M, Chiarappa F, Miller B, et al. The Sry3 Y chromosome locus elevates blood pressure and renin-angiotensin system indexes. *Genet Med*. 8(2):126–38, 2011.

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

Ferrario CM. New Physiological Concepts of the Renin-Angiotensin System From the Investigation of Precursors and Products of Angiotensin I Metabolism. *Hypertension*. 55:445–52, 2010.

Ferreira AJ, Santos RAS, Bradford CN, Mecca AP, Sumners C, Katovich MJ, et al. Therapeutic Implications of the Vasoprotective Axis of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Hypertension*. 55:207–13, 2010.

Fortepiani LA, Reckelhoff JF. Role of oxidative stress in the sex differences in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23: 801–805, 2005.

Freitas FPS, Porto ML, Gava AL., et al. Diocleaviolacea lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury. *Am J Transl Res*. 7(12):2573-2588, 2015.

Freshour JR, Chase SE, Vikstrom KL. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(5):H1997–2003.

Gong R, Dworkin LD, Brenner BM, Maddox DA: The renal circulations and glomerular ultrafiltration. In: Brenner & Rector's *The Kidney*, edited by Brenner BM, Philadelphia, Elsevier Saunders. 91–129, 2008.

Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91: 21–27, 2000.

Grossmann M, Hoermann R, Ng Tang Fui M, et al. Sex steroids levels in chronic kidney disease and kidney transplant recipients: associations with disease severity and prediction of mortality. *Clin Endocrinol*. 82:767–775, 2015.

Hall JE. Historical Perspective of the Renin – Angiotensin System. *J Exp Med*. 2003;24(601).

Halliwell B & Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.

Hemmelgarn BR, Zhang J, Manns BJ. Progression of kidney dysfunction in the community dwelling elderly. *Kidney Int*. 69: 2155–2161, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000270>

Hilliard LM, Sampson AK, Brown RD, Denton KM. The “his and hers” of the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 15(1):71–9, 2013.

Hylander B, Lehtihet M. Testosterone and gonadotropins but not SHBG vary with CKD stages in young and middle aged men. *Basic Clin Androl*. 25:9, 2015.

Ji H, Menini S, Zheng W, Pesce C, Wu X, Sandberg K. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17beta-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Exp Physiol*. 93(5):648–57, 2008.

Kinne-Saffran E, Kinne RK. Jacob Henle: The kidney and beyond. *Am J Nephrol* 14: 355–360, 1994.

Kneeder S. C, Phillips L.E, Hudson K. R., et al. Renal inflammation and injury are associated with lymphangiogenesis in hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1; 312(5): F861–F869, 2017. [https://doi:\[10.1152/ajprenal.00679.2016\]](https://doi:[10.1152/ajprenal.00679.2016]).

Komers R, Plotkin H. Dual inhibition of renin-angiotensin-aldosterone system and endothelin-1 in treatment of chronic kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310: 877-884, 2016. <https://doi:10.1152/ajpregu.00425.2015>.

Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. Gender and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol*. 24:687–98, 2010.

Kuba K, Imai Y, Penninger JM. Multiple Functions of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Its Relevance in Cardiovascular Diseases. *Circ J*. 77(2):301–8, 2013.

Lai E. Y, Solis G, Luo Z., et al. p47phox Is Required for Afferent Arteriolar Contractile Responses to Angiotensin II and Perfusion Pressure in Mice. *Hypertension*. 59; 415-420, 2012. [https://doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.184291](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.184291)

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 111:1201 – 9, 2003.

Lazaro A, Gallego-Delgado J, Justo P., et al. Long-Term Blood Pressure Control Prevents Oxidative Renal Injury. *Antioxid Redox Signal*. 7(9-10):1285-93, 2005. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1285>.

Lima R, Wofford M, Reckelhoff JF. Hypertension in Postmenopausal Women. *Curr Hypertens Rep*. 14(3):254–60, 2013.

Lindeman RD, Tobin J, Shock NW: Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J Am Geriatr Soc*. 33: 278–285, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1985.tb07117.x>

Liu BC, Gao J, Li Q, Xu LM. Albumin caused the increasing production of angiotensin II due to the dysregulation of ACE/ACE2 expression in HK2 cells. *Clin Chim Acta*. 403: 23-30, 2009.

Liu Z, Huang XR, Chen HY, Penninger JM, Lan HY. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 enhances TGF- β /Smad-mediated renal fibrosis and NF- κ B-driven renal inflammation in a mouse model of obstructive nephropathy. *Lab Invest*. 92: 650-661, 2012.

Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med* 8: 830–840, 2002.

Loutzenhiser R, Griffin K, Williamson G, et al. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290:R1153–R1167, 2006.

Lunn, K. F. The kidney in critically ill small animals. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 41, p. 727-744, 2011.

Magalhães JCG, da Silveira AB, Mota DL, Pai-xão AD. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *ExpPhysiol*; 91: 611-619, 2006. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032995>

Marchant V, Droguett A, Valderrama G, Burgos ME, Carpio D, Kerr B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Mezzano S. Tubular overexpression of Gremlin in transgenic mice aggravates renal damage in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 15; 309(6):F559-68, 2015.

Mark C Chappell. The Non-Classical Renin-Angiotensin System and Renal Function. *Compr Physiol*. 2(4):2733–52, 2012.

Márquez E, Riera M, Pascual J, Soler MJ. Albumin inhibits the insulin-mediated ACE2 increase in cultured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 306: F1327-1334, 2014.

McIlroy D, Sladen RN. Renal physiology, pathophysiology, and pharmacology. In: Miller R, ed. *Miller's Anesthesia*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier. 545–589, 2015.

Meltzer J. *Renal Physiology*. 10.1016/B978-1-4377-1679-5.00032-6.2013.

Miller J. A, Anacta L. A, Cattran D. C. Impact of gender on the renal response to angiotensin II. *Kidney International*. 55;278–285, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00260.x>

Miller VM, Kaplan JR, Schork NJ, Ouyang P, Berga SL, Wenger NK, et al. Strategies and methods to study sex differences in cardiovascular structure and function: a guide for basic scientists. *Biol Sex Differ*. 2(1):2–14, 2011.

Mizuiru S, Aoki T, Hemmi H, et al. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in patients with CKD. *Nephrology (Carlton)*. 16:567–572, 2011.

Mizuiru S, Hemmi H, Arita M, et al. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis*. 51:613–623. 24, 2008.

Mizuiru S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease. *World J Nephrol*. 4(1): 74-82, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5527/wjn.v4.i1.74>

National Kidney Foundation. K-DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*. 39(2 Suppl 1):S1-266, 2002.

Neugarten J, Silbiger SR. Effects of sex hormones on mesangial cells. *Am J Kidney Dis* 26: 147–151, 1995.

Ortiz A, Lorz C, Justo P, Catalan MP, and Egido J. Contribution of apoptotic cell death to renal injury. *J Cell Mol Med* 5: 18–32, 2001.

Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Garcia-Bermejo L, Moreno JA, Ruiz-Ortega M, Draibe J, Cruzado JM, Garcia-Gonzalez MA, Lopez-Novoa JM, Soler MJ, Sanz AB, Red de Investigacion Renal (REDINREN) and Consorcio Madrileño para investigación del fracaso renal agudo (CIFRA). Translational value of animal models of kidney failure. *Eur J Pharmacol*. 15; 759():205-20, 2015.

Os I, Franco V, Kjeldsen SE, Manhem K, Devereux RB, Gerds E, et al. Effects of losartan in women with hypertension and left ventricular hypertrophy: Results from the losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*. 51(4):1103–8, 2008.

Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM, Scholey JW. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II-dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol*. 168:1808-1820, 2006.

Outtandy P et al. Zebrafish as a model for kidney function and disease. *Pediatric Nephrology*. 34:751–762, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3921-7>

Papinska AM, Rodgers KE. Long-Term Administration of Angiotensin (1-7) to db/db Mice Reduces Oxidative Stress Damage in the Kidneys and Prevents Renal Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2018:1841046, 2018.

Park MG, Koo HS, Lee B. Characteristics of testosterone deficiency syndrome in men with chronic kidney disease and male renal transplant recipients: a cross-sectional study. *Transpl Proc*. 45:2970–2974, 2013.

Park SE, Kim WJ, Park SW, et al. High urinary ACE2 concentrations are associated with severity of glucose intolerance and microalbuminuria. *Eur J Endocrinol*. 168:203–210, 2013.

Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 57(2):313–70, 1977.

Pedersen KB, Sriramula S, Chhabra KH, Xia H, Lazartigues E. Species-specific inhibitor sensitivity of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and its implication for ACE2 activity assays. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 301:1293–9, 2011.

Perry HM Jr, Miller JP, Fornoff JR, et al: Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patients. *Hypertension* 25(4 Pt 1):587–594, 1995.

Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* 83:84–92, 2007.

Pollak MR et al. The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1461–1469, 2014. doi: 10.2215/CJN.09400913

Puelles VG et al. Glomerular number and size variability and risk for kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20. 7–15, 2011.

Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 31:435–9, 1998.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive Rats: Role of androgens and androgen receptor. *Hypertension*. 1;34(4):920–3, 1999.

Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*. 37(5):1199–208, 2001.

Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 68:57–65, 2005.

Rocco L, Gil FZ, Pletiskaitz TM da F, Cavanal M de F, Gomes GN. Effect of sodium overload on renal function of offspring from diabetic mothers. *PediatrNephrol*; 23: 2053-2060, 2008.DOI: 10.1007/s00467-008-0884-0

Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41: 341–346, 2003.

Rodríguez-Romo R, Benítez K, Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Gómez A, AguilarLeón D, et al. AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int*. 89(2):363–73, 2016.

Roumenina LT et al. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators. *Immunological Reviews*. 274: 307–329, 2016.

Ru" ster C, Wolf G. Angiotensin II as a Morphogenic Cytokine Stimulating Renal Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 22: 1189 –1199, 2011. <https://doi:10.1681/ASN.2010040384>.

Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, et al. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 15(2):159–66, 2006.

Saha MT, Saha HH, Niskanen LK, et al. Time course of serum prolactin and sex hormones following successful renal transplantation. *Nephron*. 92:735–737, 2002.

Sainz J, Osuna A, RosemaryWangensteen, Luna J de D, Rodriguez-Gomez I, Duarte J, et al. Role of sex , gonadectomy and sex hormones in the development of nitric oxide inhibition-induced. *Exp Physiol*. 89(2):155–62, 2004.

Sandberg K, Ji H. Sex and the renin angiotensin system: implications for gender differences in the progression of kidney disease. *Adv Ren Replace Ther* 10: 15–23, 2003. <https://doi:10.1053/jarr.2003.50006>

Sandberg K, Ji H. Why can't a woman be more like a man?: Is the angiotensin type 2 receptor to blame or to thank? *Hypertension*. 52(4):615–7, 2008.

Sanjuliani AF, Torres MRSG, Paula LN, Bassan FB. Eixo Renina - Angiotensina - Aldosterona : Bases Fisiológicas e Fisiopatológicas. *Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto, UERJ*. 10(3):20–30, 2011.

Santos R, Campagnole-Santos M, Andrade S. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 91(1):45–62, 2000.

Santos R. Angiotensin-(1–7). *Hypertension*. 63:1138–47, 2014.

Sata Y et al. Role of the Sympathetic Nervous System and Its Modulation in Renal Hypertension. *Front Med (Lausanne)*. 5:82, 2018.

Schmidt A, Luger A, Hořrl WH. Sexual hormone abnormalities in male patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 17:368–371, 2002.

Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic. Role of nitric oxide. *Hypertension* 32: 59–64, 1998.

Silva ACS, Pinheiro SVB, Santos RAS. Peptídeos e interação coração-rim. *Rev Bras Hipertens.* 15(3):134–43, 2008.

Silva-antonialli MM, Tostes RCA, Fior-chadi R, Hiromi E, Helena M, Carvalho C. A lower ratio of AT 1 / AT 2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 62:587–93, 2004.

Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LR, Carmona AK, Cassali GD, Bruna-Romero O, de Sousa LP, Teixeira MM, Santos RA, Simões e Silva AC, Ribeiro-Vieira MA. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond).* 119:385-394, 2010.

Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep.* 64(1):31-44, 2012.

Soler MJ, Wysocki J, Batlle D. ACE2 alterations in kidney disease. *Neprol Dial Transpl.* 28(11):1–10, 2013.

Soler MJ, Wysocki J, Ye M, Lloveras J, Kanwar Y, Batlle D. ACE2 inhibition worsens glomerular injury in association with increased ACE expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Kidney Int.* 72:614-623, 2007.

Soler, M. J; Wysocki, J; Batlle, D. ACE2 alterations in kidney disease. *Neprol Dial Transpl.* v.28, n.11, p.1–10, 2013.

Song J, Kost CK, Martin DS. Androgens augment renal vascular responses to ANG II in New Zealand genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1608–R1615, 2006.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84:1381–1478, 2004. DOI: 10.1152/physrev.00047.2003

Sullivan JC, Bhatia K, Yamamoto T, Elmarakby AA. Ang (1–7) Receptor Antagonism Equalizes Angiotensin II-Induced Hypertension In Male And Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension.* 56(4):658–66, 2010.

SULLIVAN, J. C. et al. Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v.293, n.4, p.1573–9, 2007. <https://doi:10.1152/ajpregu.00429.2007>.

Sutherland M.R et al. Age- and sex-related changes in rat renal function and pathology following neonatal hyperoxia exposure. *Physiol Rep.* 4 (15): 12887, 2016. <http://doi:10.14814/phy2.12887>.

Suzuki H, Suzuki Y, Novak J, Tomino Y. Development of Animal Models of Human IgA Nephropathy. *Drug Discov Today Dis Models.* Spring. 11():5-11, 2014.

Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme Cloning and Functional Expression as a Captopril-Insensitive Carboxypeptidase. *Biol Chem.* 275(43):33238–43, 2000.

Tomida T, Numaguchi Y, Nishimoto Y., et al. Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF₂α formation in L-NAME-treated rats. *J. Hypertens.* 21 (3):601–609, 2003. <https://10.1097/01.hjh.0000052478.40108.f6>.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth. *Pharmacol Rev.* 52(4):639–72, 2000.

Wang D, Chen Y, Chabrashvili T, Aslam S, Borrego L, Umans J, Wilcox CS. Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to Ang II of afferent arterioles from rabbits infused with Ang II. *J Am Soc Nephrol.* 14:2783–2789, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000090747.59919.D2>

Wang M, Zhang X, Song X, et al. Nodular glomerulosclerosis and renin angiotensin system in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 427:92–100, 2016.

Wang Y., et al. Loss of slit protein nephrin is associated with reduced antioxidant superoxide dismutase expression in podocytes shed from women with preeclampsia. *Physiol Rep.* 6.(13);13785, 2018. <https://doi.org/10.14814/phy2.13785>

Wei Q.Q., Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *American journal of physiology: Renal Physiology.* 303(11):F1487–F1494, 2012. doi: 10.1152/ajprenal.00352.2012.

White KE. Research into the structure of the kidney glomerulus – making it count. *Micron.* 43.1001–1009, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.04.013>

Wiinberg N, Høegholm A, Christensen H, Bang L, Mikkelsen K, Nielsen P, et al. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens.* 8(1):978–86, 1995.

Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (Ace2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol.* 171(2):438–51, 2007.

World Health Organization. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. 2013. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/.

Wysocki J, Goodling A, Burgaya M, et al. Urine RAS components in mice and people with type 1 diabetes and chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 313:F487-F494, 2017.

Wysocki J, Ortiz-Melo DI, Mattocks NK, Xu K, Prescott J, Evora K, Ye M, Sparks MA, Haque SK, Battle D, Gurley SB. ACE2 deficiency increases NADPH-mediated oxidative stress in the kidney. *Physiol Rep.* 2: e00264, 2014. doi: 10.1002/phy2.264.

Wysocki J, Ye M, Soler MJ, Gurley SB, Xiao HD, Bernstein KE, Coffman TM, Chen S, Batlle D. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes*. 55:2132-2139, 2006.

Yanes LL, Reckelhoff JF. A new piece in the hypertension puzzle: central blood pressure regulation by sex steroids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(5):H1583–4, 2009.

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

Zeide ML et al. A New CJASN Series: Renal Physiology for the Clinician. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1271, 2014. doi: 10.2215/CJN.10191012

Zhang, Z., Jiang, S., Ma, Y. et al. Expression of the intrarenal angiotensin receptor and the role of reninangiotensin system inhibitors in IgA nephropathy. *Mol Cell Biochem*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3435-4>.

Zhao, S., X. Gu, L. J. Groome, Y. Wang. Decreased nephrin and GLEPP-1, but increased VEGF, Flt-1, and nitrotyrosine, expressions in kidney tissue sections from women with preeclampsia. *Reprod. Sci*. 16: 970–979, 2009.

Zimmerman MA, Sullivan JC. What's sex got to do with it? *Hypertension*. 28:234–44, 2013.



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Involvement of sex hormones, oxidative stress, ACE and ACE2 activity in the impairment of renal function and remodelling in SHR



Antonio F. Melo Junior^a, Polyana Lima M. Dalpiaz^a, Leonardo da Silva Escouto^a,
 Glauciene Januário Sousa^a, Rafaela Aires^a, Nayara Damacena Oliveira^a,
 Adriana Karaoglanovic Carmona^b, Ágata Lages Gava^a, Nazaré Souza Bissoli^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^b Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Renal function
 Sexual dimorphism
 Oxidative stress
 ACE2
 Inflammation

ABSTRACT

Aims: Hypertension is a relevant sex and sex hormones-dependent risk factor where the cardiovascular and renal health of the population are concerned. Men experience greater losses of renal function (RF) than women, but the mechanisms remain somewhat unclear. Our goal was to evaluate the relationship between oxidative stress (OS), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) activities and RF in male and female SHR.

Main methods: Twelve-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were submitted to either castration or SHAM surgery and divided into 4 groups, SHAM or Castrated (CAST) males or females. After 51 days we evaluated RF (inulin and sodium para-aminohippurate), ACE and ACE2 activities (fluorimetry), OS (flow cytometry), collagen deposition (picrosirius red) and protein expression (western blot).

Key findings: Males presented lower RF than females and castration impaired this parameter in both groups. Sexual dimorphism was not observed regarding OS and inflammation; however, castration increased this parameter more severely in males than in females. SHAM males exhibited higher collagen deposition than females, though castration increased it in both sexes, eliminating the difference. We found sexual dimorphism regarding renal ACE and ACE2 activities, which were lower in males than in females. Although castration did not alter ACE activity, it reduced ACE2 activity in females and increased it in males.

Significance: These results indicate that sex hormones affect RF in SHR. As alterations in the oxidative system were capable of promoting podocyte injury, inflammation, and collagen deposition, we put forward that these effects are differently modulated by ACE and ACE2.

1. Introduction

Hypertension is an important risk factor for cardiovascular diseases, affecting more than 1 billion people worldwide [1]. It is also strongly related to the development and progression of renal dysfunction in both sexes [2]. It is known that men over forty years old suffer a gradual reduction of glomerular filtration rate (GFR), while in women the process is delayed and attenuated [3]. These differences can be observed in both humans and rats [4].

It has been shown that sex and sex hormones play a crucial role in renal tissue injury, with testosterone having a negative impact on the process while estrogen appears to work as a protector [5]. Among the factors contributing to the onset and progression of renal injury are

oxidative stress (OS) [6], inflammation [7] and the renin angiotensin system (RAS) [8,9].

RAS – a complex, pivotal system for the control of systemic blood pressure and renal function (RF) – comprises the enzymes angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which produce the peptides angiotensin II (Ang II) and angiotensin 1–7 (Ang 1–7), respectively. Imbalances in this system effectively contribute to the onset of hypertension and chronic kidney disease (CKD) [10,11].

In addition, RAS is also known to increase OS in the kidney, for Ang II increases the levels of reactive oxygen species (ROS) in the efferent arteriole and renal tissue [12], contributing to increased renal vascular resistance (RVR) in mice and male rabbits [12,13]. Ang II seemingly

* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, Centre for Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29042-755 Vitória, ES, Brazil.

E-mail address: nazarebissoli@gmail.com (N.S. Bissoli).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118138>

Received 2 May 2020; Received in revised form 20 July 2020; Accepted 20 July 2020

Available online 23 July 2020

0024-3205/ © 2020 Published by Elsevier Inc.