



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Carla Cavalheiro da Silva Lemos

**Alterações renais gênero-dependentes em ratos com insuficiência
renal crônica**

Rio de Janeiro
2011

Carla Cavalheiro da Silva Lemos

**Alterações renais gênero-dependentes em ratos com insuficiência
renal crônica**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Rachel Bregman

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

L557 Lemos, Carla Cavalheiro da Silva.
Alterações renais gênero-dependentes em ratos com
insuficiência renal crônica / Carla Cavalheiro da Silva Lemos.-
2011.
139 f.

Orientador : Rachel Bregman.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Ciências
Médicas.

1. Insuficiência renal crônica - Teses. 2. Rins - Doenças -
Teses. 3. Matriz extracelular - Teses. 4. Hormônios sexuais –
Teses. 5. Glicosaminoglicanas - Teses. 6. Glomerulos renais –
Teses. I. Bregman, Rachel. II. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.61-008.64

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carla Cavalheiro da Silva Lemos

Alterações renais gênero-dependentes em ratos com insuficiência renal crônica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de junho de 2011.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Rachel Bregman
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Mirian Aparecida Boim
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Jocemir Ronaldo Lugon
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Carlos Perez Gomes
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Marco Antonio Mello Guimarães
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos e esposo,
pela compreensão, carinho
e amor nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que permitiu a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Rachel Bregman, um agradecimento muito especial, não somente pela presença, atenção e incentivo profissional, mas principalmente pelo carinho e amizade dispensados durante todos os momentos ao longo de todos os anos em que trabalhamos juntas.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, que nos cedeu gentilmente seu Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (IBRAG/UERJ), possibilitando a realização de parte importante deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Antonio S. Mourão, que nos cedeu gentilmente seu laboratório de tecido conjuntivo, localizado no Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ, possibilitando a realização de parte deste trabalho.

A Prof.^a Dra. Ana Maria F.Tovar pela atenção e assessoria a mim dispensadas durante minha permanência no Laboratório de Tecido Conjuntivo do Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ.

A Prof.^a Dra. Marilza de Moura Ribeiro Carvalho por ter sido revisora desta tese.

A Heliomar Pereira Marcos, Thatiany de Souza Marinho e Ana Lucia Rosa Nascimento pelo importante apoio técnico dispensado a este trabalho.

Ao corpo técnico do Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto, pela atenção e apoio técnico dispensados a este estudo.

Aos amigos Marco Antonio e Ana Maria pela presença e incentivo em momentos difíceis deste caminho; além da amizade ao longo de muitos anos de convívio.

A todas (os) as (os) amigas (os) da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Ciências Médicas/UERJ, pelos momentos compartilhados ao longo desses anos.

A todas (os) as (os) amigas (os), que de alguma forma contribuíram para que fosse possível minha realização pessoal e profissional.

De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro.

Fernando Pessoa

RESUMO

LEMOS, Carla Cavalheiro da Silva. *Alterações renais gênero-dependentes em ratos com insuficiência renal crônica*. 2011. 139f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A insuficiência renal crônica (IRC) é caracterizada por alterações glomerulares secundárias aos mecanismos adaptativos ocasionados por perda de néfrons funcionantes. Alterações na hemodinâmica glomerular, proliferação celular, influxo de células inflamatórias, desequilíbrio na síntese de proteínas da matriz extracelular glomerular (MECG) e perda da seletividade de carga e/ou tamanho da membrana basal glomerular têm sido apontados como mecanismos envolvidos na expansão mesangial e conseqüente glomeruloesclerose. A participação dos hormônios sexuais na função renal e na evolução da insuficiência renal crônica tem sido sugerida. Os glicosaminoglicanos, especialmente o heparan sulfato (HS), têm sido associados à seletividade glomerular de macromoléculas. O remodelamento podocitário precoce e a proteinúria (PTN) se relacionam com a progressão da IRC. Neste contexto, o acúmulo de MECG, proliferação de miofibroblastos e PTN têm sido apontados como mediadores precoces que precedem as lesões glomerulares e túbulo-intersticiais. Neste estudo, avaliamos as alterações renais precoces (30 dias de IRC) gênero-dependentes em ratos (M) e ratas (F) Wistar submetidos à redução de 5/6 da massa renal (IRC) e à castração (c). Os animais foram divididos em 10 grupos: Controles (C) (CM, CF, CMc, CFc) e sham (CM sham, CF sham); e aqueles submetidos à nefrectomia 5/6: IRCM, IRCF, IRCMc, IRCFc. Os animais foram castrados com 5 semanas e submetidos à nefrectomia 5/6 com 7 semanas de idade. Resultados significativos mostraram que os machos com IRC apresentaram maior PTN, acompanhada de maior comprometimento mesangial, imunomarcagem positiva para α -actina e maior concentração de heparan sulfato (HS) comparados com as fêmeas IRC ($p < 0,05$). Estas alterações foram reduzidas nos machos castrados. A análise da morfologia podocitária mostrou raras regiões onde ocorreram alterações podocitárias nos grupos IRC. O conjunto de dados sugere que o hormônio masculino pode participar na manutenção do equilíbrio mesangial e que a PTN participa do processo de expansão mesangial. Adicionalmente, a maior concentração de HS nos machos com IRC sugere que durante o processo de remodelação da MEG, tenha ocorrido geração de HS *de novo*, funcionalmente defeituoso, comprometendo a barreira de filtração glomerular, corroborando com a perda de seletividade da mesma e, contribuindo para maior PTN neste grupo. As fêmeas com IRC apresentaram alterações mais discretas quando comparadas aos machos; apresentaram decréscimo de HS renal associado a PTN e a castração não alterou este perfil. Em resumo, a PTN ocorre precocemente na IRC, contribuindo para o desequilíbrio da MECG. Os mecanismos envolvidos nestes processos parecem sofrer influência dos hormônios sexuais; e os hormônios masculinos parecem agravar estas alterações, contribuindo possivelmente para um pior prognóstico da doença renal nos machos.

Palavras-chave: Insuficiência renal crônica. Matriz extracelular. Glomérulo. Gênero. Castração. Proteinúria. Glicosaminoglicanos. Alfa-actina.

ABSTRACT

LEMOS, Carla Cavalheiro da Silva. *Gender-dependent renal alterations in rats with chronic renal failure*. 2011. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Chronic renal failure (CRF) is characterized by adaptive mechanisms secondary to the loss of functioning nephrons. Glomerular hemodynamics alterations, cellular proliferation, inflammatory cells influx, imbalance between synthesis and degradation of the glomerular extracellular matrix (GECM) and loss of charge and/or size selectivity of the glomerular basal membrane are pointed as mechanisms leading to mesangial expansion and glomerulosclerosis. Additionally, participation of gender related hormones on renal function and progression of CRF have been suggested. We evaluated the effect of castration in renal alterations in males (M) and females (F) Wistar rats, after 30 days of 5/6 reduction of renal mass (CRF). The animals were castrated (c) at 5 weeks old and 7 weeks old 5/6 and sham nephrectomy were done. Groups: Control (C) CM, CM sham, CMc, CF, CF sham, CFc, CRFM, CRFMc, CRFF, CRFFc. CRFM group showed higher proteinuria followed by increased mesangial expansion and α -actin immunostaining. Concomitant higher concentration of heparan sulfate (HS) was also observed when compared to CRFF ($p < 0.05$). These alterations were reduced in CRFMc group. Podocyte morphology analysis through electronic microscopy showed few disorders of foot processes in CRF groups Overall, CRFF group showed fewer alterations compared to males, and a reduction of HS was observed in association with PTN. Castration did not change this profile in female rats. Data suggest that male hormones may participate in the maintenance of the mesangial equilibrium and that PTN collaborated with the mesangial expansion process. Additionally, the higher concentration of HS in CRFM suggest that the remodeling process of the GECM, included a synthesis of *de novo* HS, that presented a functioning defect, compromising the glomerular filtration barrier and, ultimately corroborated with the loss of its selectivity and consequently with a higher PTN. This set of results leads us to conclude that PTN appears early in the course of CRF, may contribute to renal GECM imbalance and, the mechanisms involved in these processes seem to be influenced by gender-related hormones. In addition, male hormones seem to aggravate renal alterations contributing to a poor prognosis of CRF progression in male rats.

Keywords: Chronic renal failure. Extracellular matrix. Glomeruli. Gender. Castration. Proteinuria. Glycosaminoglycans. Alfa-smooth-muscle-actin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do modelo experimental combinando IRC e castração.....	28
Figura 2 -	Proteinúria (mg/24h) após 30 dias de estudo.....	41
Figura 3 -	Coloração tricrômico de Masson dos grupos controles e sham.....	45
Figura 4 -	Coloração tricrômico de Masson dos grupos IRC.....	46
Figura 5 -	Coloração tricrômico de Masson dos grupos IRC castrados.....	47
Figura 6 -	Imunomarcação para α -actina nos grupos controles e sham.....	48
Figura 7 -	Imunomarcação para α -actina nos grupos IRC.....	49
Figura 8 -	Imunomarcação para α -actina nos grupos IRC castrados.....	50
Figura 9 -	Controle negativo da reação de imunomarcação.....	51
Figura 10 -	Micrografia eletrônica do grupo CM.....	52
Figura 11 -	Micrografia eletrônica do grupo CM sham.....	53
Figura 12 -	Micrografia eletrônica do grupo CMc.....	54
Figura 13 -	Micrografia eletrônica do grupo CF.....	55
Figura 14 -	Micrografia eletrônica do grupo CF sham.....	56
Figura 15 -	Micrografia eletrônica do grupo CFc.....	57
Figura 16 -	Micrografia eletrônica do grupo IRCM.....	58
Figura 17 -	Micrografia eletrônica do grupo IRCMc.....	59
Figura 18 -	Micrografia eletrônica do grupo IRCF.....	60
Figura 19 -	Micrografia eletrônica do grupo IRCFc.....	61
Figura 20 -	Eletroforese em gel de agarose das amostras de GAGr dos grupos estudados.....	64
Figura 21 -	Proporção dos GAGr (A) e a quantificação em μ g/mg de tecido seco renal do HS (B) e CS+DS (C) estimadas pela densitometria.....	65
Figura 22 -	Eletroforese em gel de agarose das amostras em “pool” do GAGu após coloração de Stains-All.	66
Figura 23 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos GAGr e GAGu de ambos os gêneros.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos grupos após 30 dias de nefrectomia 5/6.....	38
Tabela 2 -	Parâmetros laboratoriais dos grupos estudados obtidos no 30 ^o dia....	40
Tabela 3 -	Dados da análise estereológica glomerular dos grupos estudados...	43
Tabela 4 -	Quantificação do GAGr total e GAGu dos grupos estudados após 30 dias de nefrectomia.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	α -actina de músculo liso
BSA	Albumina bovina sérica
C	Controle
c	Castração
CF	Grupo de ratas controle
CFc	Grupo de ratas controle castradas
CleCre	<i>Clearance</i> da creatinina
CM	Grupo de ratos controle
CMc	Grupo de ratos controle castrados
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
Cre _s	Creatinina sérica
Cre _u	Creatinina urinária
CS	Condroitin sulfato
DAB	Diaminobenzidina
DO	Densidade ótica
DS	Dermatan sulfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Gênero feminino
FN	Fibronectina
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAGr	Glicosaminoglicanos extraídos de rim total
GAGu	Glicosaminoglicanos extraídos de urina de 24 horas
HE	Hematoxilina-eosina
HS	Heparan sulfato
HSPG	Proteoglicano de heparan sulfato
IRC	Insuficiência renal crônica
IRCF	Grupo de ratas com insuficiência renal crônica
IRCFc	Grupo de ratas castradas com insuficiência renal crônica
IRCM	Grupo de ratos com insuficiência renal crônica
IRCMc	Grupo de ratos castrados com doença renal crônica

M	Gênero masculino
MBG	Membrana basal glomerular
MEC	Matriz extracelular
MECG	Matriz extracelular glomerular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MM	Matriz mesangial
PA	Pressão arterial
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAI-1	Inibidor de ativação do plasminogênio-1
PAF	Fator ativador plaquetário
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
PC	Peso corporal
PCi	Peso corporal inicial
PCf	Peso corporal final
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PR	Peso renal
PR/PCf	Peso renal corrigido por 100g de peso corporal final
PTN	Proteinúria
TGF- β	Fator transformante de crescimento beta
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VG	Volume glomerular
VM	Volume mesangial
vs	Versus
Vv	Densidade volumétrica mesangial

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
mg/Kg	miligramma por quilograma
h	hora
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
%	percentual
M	molar
g	grama
mL/min/100g	mililitro por minuto por 100 grammas
mg/dL	miligramma por decilitro
mg/mL	miligramma por mililitro
μm	micrômetro
π	constante pi
r	raio
μL	microlitro
OsO_4	tetróxido de ósmio
FeCNK	Ferricianeto de potássio
KV	Quilovolt
mM	milimolar
v/v	volume a volume
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
mL	mililitro
H_2SO_4	ácido sulfúrico
nm	nanometro
~	aproximadamente
μg	micrograma
V	volts
mA	miliampere
kD	kilodalton
\pm	mais ou menos; aproximadamente

<	menor que
vs	versus
mmHg	milímetros de mercúrio
mg/24h	miligrama por 24 horas
μm	micrometro
μg/mg	micrograma por miligrama
Å	Angstron

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVOS	26
1.1	Geral	26
1.2	Específicos	26
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	Modelo experimental	27
2.2	Procedimentos analíticos	29
2.3	Morfologia e estereologia glomerular	30
2.3.1	<u>Volume glomerular</u>	30
2.3.2	<u>Volume mesangial</u>	30
2.4	Imunohistoquímica – Avaliação de alfa-actina	31
2.5	Morfologia podocitária	32
2.6	Avaliação dos Glicosaminoglicanos (GAGs)	32
2.6.1	<u>Extração total dos Glicosaminoglicanos renais (GAGr) e excretados na urina (GAGu)</u>	32
2.6.2	<u>Análise quantitativa dos Glicosaminoglicanos (GAGs) - Dosagem do ácido hexurônico</u>	33
2.6.3	<u>Análise qualitativa dos Glicosaminoglicanos (GAGs)</u>	34
2.6.3.1	Eletrforese em gel de agarose	34
2.6.3.2	Eletrforese em gel de poliacrilamida	35
2.7	Análises estatísticas	35
3	RESULTADOS	37
3.1	Características gerais dos grupos estudados	37
3.2	Avaliação estereológica glomerular	42
3.3	Morfologia e imunohistoquímica	44
3.4	Microscopia eletrônica de transmissão	51
3.5	Glicosaminoglicanos	62
4	DISCUSSÃO	68
5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	91
ANEXO B - Comprovação de submissão do 1 ^o artigo científico.....	92
ANEXO C - Formato final do 1 ^o artigo científico submetido.....	93
ANEXO D - Comprovação de aceite do 1 ^o artigo científico	116
ANEXO E - Comprovação de submissão do 2 ^o artigo científico.....	117
ANEXO F - Formato final do 2 ^o artigo científico submetido.....	118

INTRODUÇÃO

Insuficiência renal crônica

Alterações glomerulares ocasionadas por adaptações estruturais e funcionais, na tentativa de compensar a perda de néfrons funcionantes, na insuficiência renal crônica (IRC), podem acarretar perda progressiva da função renal evoluindo para doença renal terminal, independentemente da agressão inicial (1). Vários são os mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste processo: alterações na hemodinâmica glomerular, participação de hormônios, citocinas e fatores de crescimento que atuam sobre as células residentes renais e na matriz extracelular glomerular (MEG) (2-4). A hipertrofia e a hiperfunção são algumas das características precoces observadas no rim remanescente (1). Como consequência do aumento do fluxo plasmático glomerular e da pressão intraglomerular ocorre elevação da taxa de filtração por néfron nos néfrons remanescentes (5).

Um dos modelos experimentais bastante utilizados para estudar a IRC é o modelo do rim remanescente, onde ocorre redução de 5/6 da massa renal funcionante, também conhecido como "Nefrectomia 5/6". Neste modelo, a lesão renal é iniciada por hipertensão e hipertrofia glomerular; seguida de estímulos que culminam com mecanismos inflamatórios no glomérulo e no interstício, ocorrendo principalmente proliferação celular e produção anormal de matriz extracelular (MEC) (6,7). É um modelo clássico que reproduz em pouco tempo, e de forma bastante similar, as alterações renais evidenciadas em humanos. Na década de 90, vários estudos contribuíram para um melhor entendimento do processo fisiopatológico da glomeruloesclerose. Dentre estes, alguns utilizando o modelo acima citado, demonstraram que o acúmulo de MEC se correlaciona diretamente com o desenvolvimento de expansão do tufo glomerular e glomeruloesclerose, sugerindo que estes são eventos interligados e sequenciais (7-9). Neste aspecto, pelo menos dois mecanismos fisiopatológicos parecem ser de importância fundamental no processo: proliferação de células glomerulares e proliferação e/ou recrutamento de macrófagos para o local. No modelo do rim remanescente, foi demonstrado que ocorre uma expansão poliantigênica da MEC posterior à proliferação de células

mesangiais (7). Alterações tubulointersticiais similares às aquelas observadas no glomérulo também foram descritas, dentre as quais se destaca uma fase proliferativa e outra de lesão progressiva com transformação fibroblástica, influxo de células inflamatórias e acúmulo de MEC (10). Os miofibroblastos são células fibrogênicas, que apresentam características similares às células do músculo liso e aos fibroblastos; e são caracterizadas por expressarem α -actina (ACT). Estudos têm demonstrado que células mesangiais e intersticiais podem se transdiferenciar em miofibroblastos, passando a expressar ACT, em uma etapa que precede a glomeruloesclerose (10-12). A proliferação de miofibroblastos correlaciona-se significativamente com lesões glomerulares e intersticiais, perpetuando a doença, sendo um indicador da progressão da doença renal (13-19). A correlação existente entre anormalidades glomerulares e intersticiais tem sugerido que ambas, são resultados de processos fisiopatológicos relacionados à progressão da IRC (20).

Estudos *in vitro* também têm contribuído de forma significativa para o entendimento da interação entre células glomerulares e MECG, principalmente quanto às respostas celulares frente a fatores de crescimento e citocinas. Particular atenção tem sido dada ao fator transformante de crescimento beta (TGF- β), que parece estar diretamente relacionado com a regulação da síntese de MEC (4,21,22). Vários estudos mostraram que um desequilíbrio na relação produção/degradação da matriz mesangial (MM), ocasiona expansão mesangial, alteração que tem sido considerada como etapa prévia ao aparecimento da esclerose e perda da viabilidade glomerular (7,11,21).

Apesar de todos os estudos realizados nas últimas décadas, os mecanismos responsáveis pela expansão mesangial não estão esclarecidos até o momento. O que se tem de mais concreto é que, possivelmente, a expansão mesangial é uma resposta do glomérulo a diferentes fatores de crescimento e/ou citocinas, que interagem com o mesângio através de receptores específicos, ocasionando um desequilíbrio local, aumentando o *turnover* da MM, resultando em sua expansão (21,23,24). Outra questão a ser considerada, é a perda parcial de seletividade de carga e/ou tamanho da membrana basal glomerular (MBG), permitindo a passagem de macromoléculas, principalmente proteínas, para o mesângio, contribuindo para a expansão mesangial e consequente glomeruloesclerose (25,26).

Estudos experimentais recentes têm sugerido a existência de um mecanismo de remodelamento da estrutura glomerular que permitiria regeneração parcial dos

capilares (1,27). Como consequência deste remodelamento, além de um novo tecido capilar normal, ocorreria redução dos níveis de proteinúria (PTN) e da glomerulosclerose (28). Entretanto, os mecanismos celulares envolvidos ainda não estão bem esclarecidos. Os podócitos, células epiteliais presentes na barreira de filtração glomerular, poderiam participar deste processo, ao serem estimulados à proliferação e migração pelas células endoteliais glomerulares (29). Adicionalmente, redução dos níveis de TGF- β (21,22,30) e do inibidor de ativação de plasminogênio-1 (PAI-1), também poderiam ser fatores importantes no processo de remodelamento da MECG (31).

Matriz extracelular glomerular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa e tridimensional formada por diferentes proteínas e proteoglicanos, que funciona como uma barreira física e ao mesmo tempo altamente dinâmica, apresentando capacidade contrátil, além de participar de processos de adesão e migração celular (18,32,33). O glomérulo é formado por um emaranhado de capilares, cujas paredes são formadas por uma camada endotelial e pela membrana basal do capilar propriamente dito, circundados por uma camada de células epiteliais, os podócitos. Este conjunto apresenta-se circundado pelo mesângio, que contém as células mesangiais e a matriz mesangial (MM). Este complexo é chamado de matriz extracelular glomerular (MECG)(9,24,34).

A MECG tem um importante papel no desenvolvimento, na homeostase e na fisiologia glomerular. Os componentes bioquímicos desta matriz atuam em mecanismos fisiológicos tais como adesão, crescimento, diferenciação e migração celular; além de contribuir para a organização estrutural do glomérulo, e influenciar a filtração e na permeabilidade do capilar glomerular (24,35). Morfologicamente, a membrana basal glomerular (MBG) é formada por uma lâmina central, a lâmina densa, e duas lâminas mais finas, a lâmina rara externa, que se encontra em contato direto com os podócitos e a lâmina rara interna, que está em contato direto com o endotélio (5,36). Desde a década de 80, estudos sucessivos têm contribuído para a caracterização dos componentes bioquímicos da MBG, dentre os quais se destacam fibronectina (FN), colágeno do tipo IV, laminina, glicosaminoglicanos

(GAG)/proteoglicanos, dentre outros (24,32,37). Além da interação destes componentes com células glomerulares, eles também interagem entre si moldando a arquitetura molecular da MECG. O colágeno do tipo IV forma uma rede basal, onde se ligam outros componentes da MECG (38).

A proximidade da região mesangial com o endotélio permite a difusão de micro e macromoléculas, assim como de mediadores entre o endotélio e células mesangiais e vice-versa. Morfologicamente, as células mesangiais são irregulares, de núcleo denso e citoplasma alongado, rico em microfilamentos de actina e miosina que estendem-se à MBG (39). O posicionamento intercapilar destas células aliado à capacidade de contração e relaxamento, em resposta às substâncias vasoativas, permite que ocorram, eventualmente, extensões citoplasmáticas envolvendo o lúmen capilar. Assim, a alteração da área de superfície disponível para filtração, torna estas células possíveis moduladoras da filtração glomerular (16,40-42). Similarmente aos macrófagos/monócitos, estas células expressam receptores Fc, produzem radicais reativos do oxigênio, fator de ativação de plaquetas (PAF) e Interleucina I (8). No glomérulo maduro, as células mesangiais juntamente com os podócitos são responsáveis pela biossíntese e manutenção da MM (3,24).

A constituição bioquímica da MM é bastante similar a da MBG, sendo os colágenos do tipo IV, V e VI, GAG sulfatados, laminina e FN, os componentes mais bem caracterizados (24,32,37). Estudos mostram que estes constituintes apresentam-se em toda a MECG, porém em concentrações variáveis de acordo com o local. Na MM, por exemplo, a FN apresenta maior concentração na interface endotélio-mesângio, enquanto que a laminina e o colágeno do tipo IV aparecem mais concentrados na matriz intermesangial entre as células mesangiais e a MBG (37). Em condições normais, a integridade estrutural e funcional da MM é mantida pelo equilíbrio entre a síntese e degradação constante dos seus componentes. O controle das atividades das células mesangiais envolve vários mediadores solúveis, tais como TGF- β , fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e hormônios, como a angiotensina II. Da mesma forma, a degradação desta matriz é regulada por proteases glomerulares neutras, as metaloproteases, e seus respectivos inibidores (23). Como descrito anteriormente, alterações qualitativas e/ou quantitativas da MM ocorrem em distintas situações fisiopatológicas contribuindo para a progressão da IRC. Da mesma forma, o aumento

gradativo de ACT na MM pode estar correlacionado a um maior grau de severidade nas anormalidades estruturais no glomérulo (15,19).

Glicosaminoglicanos e filtração glomerular

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são cadeias de polissacarídeos, formados por dissacarídeos repetidos, compostos por um aminoaçúcar (N-acetilgalactosamina ou N-acetilglucosamina) e um ácido hexurônico (ácido D-glucurônico ou L-idurônico). Os GAGs encontram-se covalentemente ligados a uma proteína central, formando macromoléculas mais complexas, os proteoglicanos. Os GAGs são poliânions, cujas cargas negativas são conferidas pelo grupamento sulfato e pela carboxila do ácido hexurônico, salvo o ácido hialurônico, que não é sulfatado, e o queratan sulfato, que não contém ácido hexurônico, e sim D-galactose (açúcar neutro). Até o momento, foram descritos seis tipos de GAGs em tecidos de mamíferos: condroitin sulfato (CS), dermatan sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato (HS), heparina e ácido hialurônico. Com exceção do último, os GAGs ocorrem em tecidos ligados covalentemente a proteínas, formando os proteoglicanos (34).

A função biológica de cada tipo de proteoglicano está diretamente relacionada ao tipo de GAGs presente na molécula. Dentre as principais funções dos proteoglicanos podemos destacar: participação na organização dos tecidos, no crescimento celular, na maturação de tecidos especializados, na modulação da atividade dos fatores de crescimento e na fibrilogênese do colágeno, dentre outros. O principal proteoglicano presente em membranas basais é o proteoglicano de heparan sulfato (HSPG), que apresenta, até o momento, três tipos: Perlecan, agrim e colágeno do tipo XVIII. Encontram-se distribuídos de forma diferente no glomérulo; perlecan e colágeno do tipo XVIII são mais abundantes na MM, enquanto que o agrim é o principal HSPG da MBG (43). O HS apresenta carga negativa, o que parece ser fator determinante na permeabilidade seletiva carga-dependente da MBG (43); e parece estar também envolvido na permeabilidade tamanho-dependente, já que é capaz de se ligar a outros componentes da MBG, tais como laminina e colágenos. Além disso, a proteína central do HSPG agrim contém sítios ligantes para laminina, o que contribui para a manutenção da arquitetura molecular da MBG (43,44). A fluidez conferida a

MECG pelas cargas negativas do HS, ao reterem íons sódio, permite a ancoragem de outras moléculas protéicas no local, principalmente fatores de crescimento e citocinas, modulando proliferação e expansão mesangial, mecanismos precoces importantes no processo da glomeruloesclerose.

Vários estudos têm buscado respostas sobre a importância dos GAGs e proteoglicanos na fisiologia renal, principalmente no que diz respeito a filtração glomerular. Estes têm relatado alterações de GAGs tanto na MBG, como no mesângio. É possível que alterações ocasionadas por uma reorganização estrutural da MBG, ou ainda no metabolismo dos GAGs e proteoglicanos, presentes nessas matrizes, possam modificar as propriedades de filtração glomerular, influenciando diretamente na patogênese de muitas doenças renais (43,45,46). Alguns autores sugerem que a excreção urinária de GAGs pode refletir alterações bioquímicas na MECG, e por esta razão, indicam a concentração de GAGs na urina como um marcador da severidade de doenças glomerulares (46,47). A redução da concentração de GAGs urinário, pode refletir uma menor concentração de GAGs no rim e em outros tecidos, como também alterações na permeabilidade renal às moléculas carregadas negativamente (48), embora recentemente, a permeabilidade seletiva por carga tenha sido questionada (49). É possível que existam múltiplos mecanismos envolvidos no processamento de macromoléculas no rim. Além da filtração glomerular e da secreção ou reabsorção tubular, células renais poderiam participar do processamento de proteínas e GAGs sulfatados (48), o que poderia contribuir para o entendimento do aparente paradoxo encontrado em vários estudos que relacionaram diminuição da excreção urinária de dextran sulfato e de GAGs com aumento de PTN (48,50,51)

Evidências têm relacionado PTN a um pior prognóstico na progressão da doença renal (1,25,52,53), porém os mecanismos pelos quais as alterações nos GAG, especialmente no HS, poderiam alterar a permeabilidade glomerular causando PTN ainda não estão claros (34,43,54,55). Alterações na disposição do HS ao longo da MBG têm sido demonstradas em várias doenças renais correlacionando-se com PTN, enquanto em outras, mesmo com intensa PTN não se evidencia alterações do HS. Em estudo clínico, Petrica et al. (19) descreveram associação entre aumento de depósitos de GAGs no mesângio e interstício e PTN com a severidade do processo de glomeruloesclerose e de lesão intersticial.

Seletividade glomerular e proteinúria

Além das células mesangiais e do endotélio, existe no glomérulo um outro tipo celular, que compartilha característica de células mesenquimal e epitelial (56). As células epiteliais viscerais, conhecidas como podócitos, são altamente diferenciadas e especializadas. Possuem prolongamentos citoplasmáticos primários de onde partem múltiplos prolongamentos secundários, menores e mais delgados, denominados de pedicelos. Estes prolongamentos possuem estrutura contráctil, composta por α -actina, miosina, vinculina e talina e estão firmemente ligados à MBG em determinados pontos de contato via integrina $\alpha 3\beta 1$. Através dos pedicelos, os podócitos repousam ao longo de toda a superfície mais externa da membrana basal do capilar glomerular, estabilizando a arquitetura glomerular por contenção da distensão da MBG (57,58). Toda a estrutura contráctil dos pedicelos é sensível à hormônios vasoativos, e, portanto capaz de modular o coeficiente de ultrafiltração (59). Por entre os pedicelos existem pequenos espaços protegidos por uma fina membrana, chamada diafragma, contendo pequenos espaços ou “poros” (*slit* do diafragma), cujo componente principal é a proteína nefrina (57). O *slit* do diafragma forma um filtro, que controla a passagem do filtrado glomerular, sendo a última barreira efetiva para proteínas plasmáticas na interface podócito-MBG endotelial (59).

Atualmente, a lesão podocitária é reconhecida como uma etapa relevante no desenvolvimento da glomeruloesclerose (60). Os podócitos emergiram como um ponto importante na filtração glomerular devido à associação do remodelamento podocitário existente em fase precoce na nefropatia diabética. Em outras doenças renais, a lesão podocitária parece iniciar o processo de progressão da doença culminando em uma fase mais avançada com glomeruloesclerose (61). Neste processo progressivo, lesões que inicialmente atingiam apenas os podócitos, parecem propagar-se para outras células residentes (mesangiais, endoteliais e células epiteliais parietais), por mecanismos ainda desconhecidos (62). Alterações na morfologia podocitária, incluindo retração dos pedicelos, descolamento dos podócitos e podocitúria, têm sido apontadas como etapas precoces do processo de PTN e glomeruloesclerose (63). A podocitúria reflete múltiplos mecanismos de toxicidade metabólica como remodelamento celular e de MEC devido ao estresse oxidativo (64). Em ratos com nefrectomia 5/6, onde a lesão glomerular se dá de modo constante, o

aparecimento de podocitúria, em torno das primeiras semanas após a indução da doença, vem mostrando uma correlação significativa com a PTN (65).

Assim, em uma etapa paralela ao remodelamento podocitário, proteínas anormalmente filtradas interagem de forma adversa com o mesângio e com células de revestimento do espaço tubular ocasionando alterações intersticiais (1), similares às aquelas observadas no glomérulo. A nefrotoxicidade causada pelo acúmulo de macromoléculas, principalmente no mesângio, pode desencadear um processo inflamatório local, levando à proliferação celular, alterações quantitativas e/ou qualitativas dos componentes da MM, glomeruloesclerose (52,66,67), e finalmente perda de filtração glomerular. Mais que um marcador de lesão glomerular em diferentes doenças, a PTN pode ser considerada um indicador da severidade do comprometimento da função renal.

Morfometria

O estudo do tamanho do néfron ou de suas estruturas separadamente, tem recebido atenção nos modelos de progressão de IRC que são acompanhados de hipertrofia. Vários autores defendem a idéia de que não só as alterações hemodinâmicas, mas a hipertrofia glomerular, por si só, seria responsável pelo processo de glomeruloesclerose (68,69). Portanto, métodos de avaliação de tamanho glomerular e/ou de suas estruturas, podem contribuir para o estudo deste aspecto da fisiopatologia da glomeruloesclerose.

Assim, além dos estudos funcionais *in vivo*, e dos estudos *in vitro*, outra abordagem que tem sido utilizada e que tem colaborado efetivamente para o entendimento da evolução dos processos intraglomerulares, são os métodos quantitativos em morfologia. O estudo do tamanho do glomérulo como um todo ou de cada uma de suas estruturas tem sido de grande valia para a compreensão da evolução da IRC (70-72). É possível a utilização de medidas tais como volume glomerular e mesangial para estimar o grau de hipertrofia glomerular. Os dados morfológicos e estereológicos, associados aos dados funcionais tais como filtração glomerular (FG) e PTN tem elevado valor para o entendimento dos fenômenos que

ocorrem no glomérulo em modelos experimentais utilizados para o estudo da doença renal.

Progressão da insuficiência renal crônica gênero-dependente

Vários estudos experimentais e em humanos têm demonstrado que a progressão da IRC é influenciada pelo gênero (73-80). A perda da função renal é mais rápida no gênero masculino, e muitas vezes independentemente de fatores como dieta, idade, pressão sanguínea e níveis de colesterol, dentre outros (74,81,82). Diferenças estruturais e funcionais determinadas geneticamente, pela ação direta ou indireta de hormônios sexuais sobre a hemodinâmica glomerular (73,83,84), proliferação celular, acúmulo de matriz, agentes vasoativos, citocinas e fatores de crescimento ocasionando alterações no equilíbrio da MM (85,86) vêm sendo apontados como possíveis responsáveis por essa diferença entre os gêneros.

Os hormônios sexuais exercem efeitos diretos sobre a vascularização e se considerarmos a similaridade entre células da musculatura lisa do sistema vascular e células mesangiais, podemos inferir a possível contribuição dos hormônios sexuais na progressão da doença renal. Vários estudos apontam os hormônios sexuais como determinantes na diferente progressão da IRC entre os gêneros (78,87-89). Entretanto, há muitas divergências relacionadas à forma de atuação e quais hormônios estariam envolvidos na progressão da doença. A testosterona, mais que o possível efeito protetor do estrogênio, parece ter importante papel na diferença relacionada ao gênero, na suscetibilidade do rim à lesão isquêmica (90). Em estudo realizado recentemente, foi demonstrado que a PTN, as lesões glomerulares e as intersticiais foram significativamente menores em ratos castrados e avaliados após 90 dias de IRC, o mesmo não ocorrendo em fêmeas (78). Outros apontam o estrogênio como protetor no gênero feminino na progressão da IRC, por exercer uma potente ação antioxidante no mesângio (85,91).

Na glomeruloesclerose induzida por adriamicina, a PTN foi maciça em ratos e discreta nas fêmeas. Após castração dos machos, os níveis de PTN se tornaram similares aos das fêmeas. Da mesma forma, o índice de esclerose glomerular que era significativamente maior em ratos controle comparado às fêmeas, foi reduzido

pela castração (75). Ratos idosos desenvolvem PTN e glomeruloesclerose espontaneamente, enquanto ratas e ratos tratados com estrogênio ou submetidos à orquiectomia, são mais resistentes ao desenvolvimento destas anormalidades (92). Ratos Munich-Wistar-Fröster, com proteinúria espontânea, desenvolveram PTN significativa precocemente (7 semanas) de forma progressiva até o final do estudo (21 semanas). O mesmo não ocorreu com as fêmeas, que mantiveram o nível de PTN estável e dentro da normalidade no mesmo período (83).

O estradiol é o hormônio que tem sido apontado como um possível fator de proteção das fêmeas na progressão da IRC. Estudo com células mesangiais *in vitro*, demonstrou que o estradiol influencia, de forma dose-dependente, a proliferação celular e a síntese de colágenos dos tipos I e IV, ao contrário da testosterona, que não induziu nenhum efeito significativo (90). Se tanto a proliferação celular, como a deposição alterada de componentes na matriz, contribui para a lesão glomerular progressiva, a capacidade do estradiol em suprimir a síntese de colágeno por células mesangiais, pode conferir às fêmeas proteção glomerular na IRC. Além disso, o estradiol parece estimular a síntese renal de Prostaglandina E₂ em ratas, principalmente pela ativação do sistema renina-angiotensina (93). Em outro estudo, o estradiol suprimiu a transcrição do gene COL4A1 (α 1-colágeno IV), revertendo a síntese de colágeno do tipo IV previamente estimulado por TGF- β 1 (94). As concentrações de estradiol utilizadas se encontravam dentro dos limites encontrados em mulheres com ciclo menstrual normal ou fazendo reposição hormonal.

Similarmente, aos estudos da progressão da IRC, outros modelos experimentais também têm demonstrado a influência do gênero no desenvolvimento da hipertensão arterial (95,96). Neste contexto, apesar das várias possibilidades sugeridas, os mecanismos possivelmente envolvidos na proteção à lesão renal observada no gênero feminino, e a maior vulnerabilidade do gênero masculino à progressão da IRC permanecem ainda indefinidos.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar alterações renais precoces (30 dias) na IRC em ratos e ratas submetidos à redução de 5/6 da massa renal, analisando o efeito da castração sobre estas possíveis alterações e relacionando-as à dependência do gênero.

1.2 Específicos

São objetivos específicos desta tese:

- a) investigar e comparar a proteinúria nos diferentes grupos com IRC;
- b) estudar o grau de hipertrofia glomerular e de expansão mesangial
- c) avaliar a presença de células com α -actina no glomérulo e interstício renal;
- d) observar a morfologia podocitária;
- e) analisar os glicosaminoglicanos renais e excretados na urina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

Utilizamos ratos e ratas Wistar provenientes do biotério da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP). Todos os experimentos com os animais realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ - CEA-IBRAG/UERJ (ANEXO A). Aleatoriamente, ratos (M) e ratas (F) com 5 semanas de idade foram divididos em grupos controles (C) castrados (c) e não castrados. Assim, foram formados os seguintes grupos: Controles castrados (CMc, n=5; CFc, n=5); e não castrados (CM, n=5; CF, n= 5). Após duas semanas, grupos de animais foram submetidos à nefrectomia 5/6, formando-se então os grupos: IRCMc, n=10; IRCFc, n=8; IRCM, n=8; IRCF, n=6. Aleatoriamente, animais controles de ambos os gêneros foram submetidos à cirurgia sham de nefrectomia 5/6, formando os grupos (CM sham, n=4 e CF sham, n=4) (Figura 1).

A castração foi realizada através de incisão no saco escrotal com remoção total dos testículos e nas fêmeas através de incisão lombar para retirada de ambos os ovários. Para a cirurgia de nefrectomia 5/6, foi realizada nefrectomia parcial à esquerda, por incisão abdominal mediana, sob anestesia com tiopental sódico, intraperitoneal, na dose de 50 mg/Kg de massa corporal. A artéria renal esquerda foi isolada e, dois ou três dos seus ramos interlobares ligados, dando-se preferência pelos ramos posterior e anterior do pólo inferior. Em seguida, procedemos a nefrectomia total à direita, através de incisão lombar direita. A nefrectomia 5/6 marcou o dia zero do estudo. Os animais foram mantidos em dieta padrão de proteína (Ração Nuvilab CR 1) e água *ad libitum* até o final do estudo (30 dias).

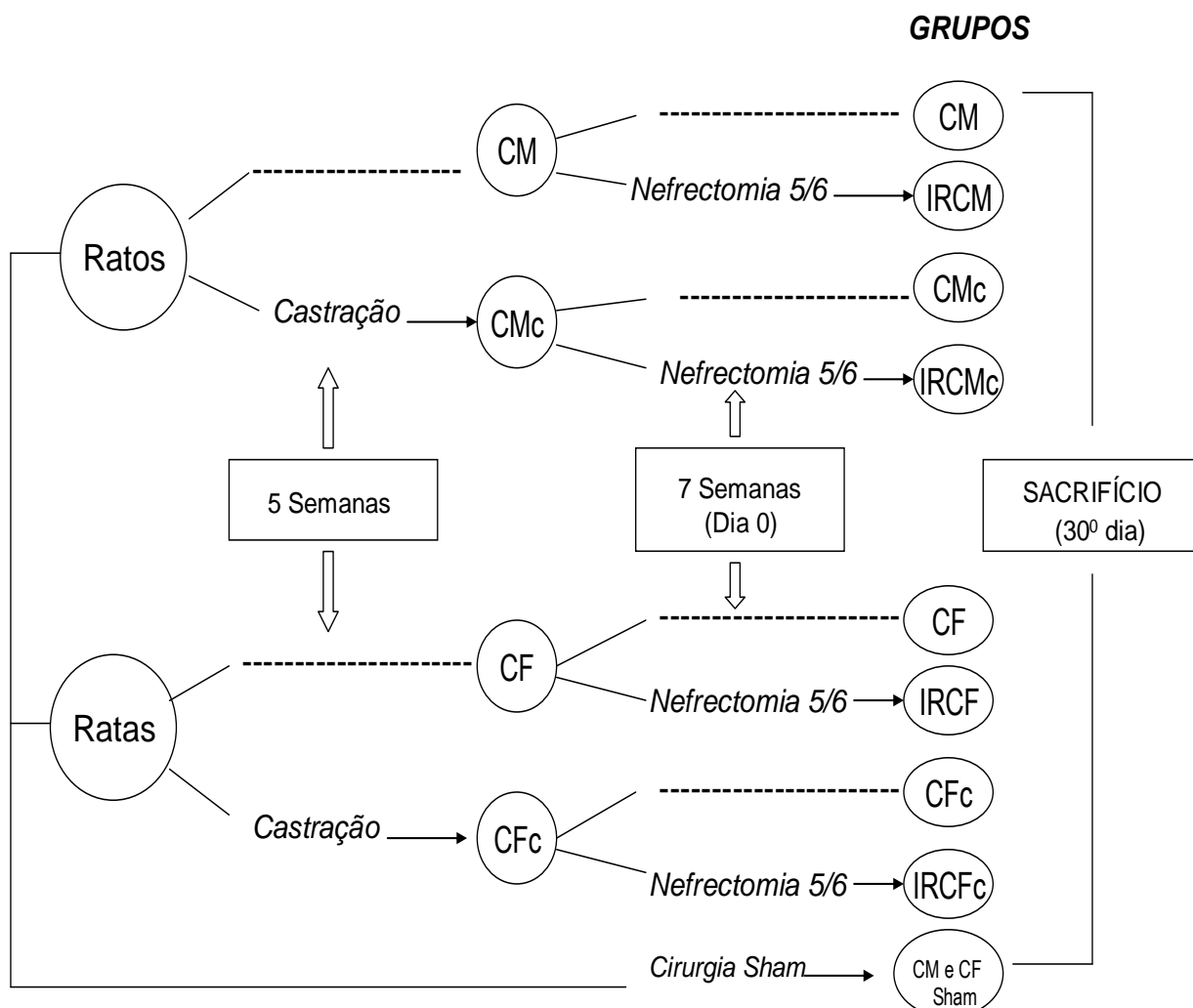


Figura 1 - Representação esquemática do modelo experimental combinando IRC e castração

Legenda: C= controles; c= castração; IRC= insuficiência renal crônica; M=ratos; F= ratas; ----- = Nenhum procedimento cirúrgico.

Ao final do estudo, os animais tiveram sua pressão sanguínea (PS) verificada usando-se o método não invasivo pela técnica de plestimografia de cauda (Pletismógrafo RTBP 1007, Kent Scientific CO, Litchfield, USA). Para a coleta de urina de 24 h, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Nalgene), recebendo apenas água *ad libitum*. Foram coletadas duas amostras de urina de 24 h, entre os dias 29^o e 31^o: uma para dosagem de PTN e creatinina urinária e outra, para extração dos GAGs excretados na urina de 24h; ambas em frascos contendo cristais de timol, a fim de prevenir proliferação bacteriana. Os volumes urinários foram medidos, e as urinas de 24 h armazenadas a -20^o C para avaliações posteriores. Ao término da

segunda coleta, os animais foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação. Uma amostra de sangue foi reservada para dosagem de creatinina, e uréia. O rim foi fixado por perfusão com glutaraldeído a 1,5% em solução de tampão fosfato 0,2M pH 7,4. Posteriormente, o rim foi retirado, pesado, cortado longitudinalmente e colocado em formol tamponado por 18-24h. Após rotina histológica para inclusão em parafina, cortes histológicos sequenciais com 4 μ m de espessura foram submetidos às avaliações morfológicas, estereológicas e de imunohistoquímica.

Animais de cada grupo foram separados (CM, n=5; CF, n=4; CMc, n=5; CFc, n=5; IRCM, n=5; IRCF, n=6; IRCMc, n=5; IRCFc n=6) e após 30 dias de nefrectomia 5/6, não sofreram perfusão e tiveram o rim removido, pesado, cortado longitudinalmente e conservados em acetona P.A., para posterior extração dos GAGs renais.

2.2 Procedimentos analíticos

A PTN foi determinada pelo método sulfossalicílico como previamente descrito (97). As creatininas sérica e urinária foram dosadas pelo método de Jaffé (colorimétrico cinético) e a uréia pelo método da urease (enzimático), em auto-analyser no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ).

A filtração glomerular (FG) foi determinada pelo *clearance* da creatinina, corrigido por 100g de massa corporal (ClCre/100g):

$$FG = [((Cre_u \times Vol_u) / Cre_s) \times 100] / PC_f, \text{ em mL/min/100g}$$

Onde:

Cre_u=creatinina urinária (mg/dL); Vol_u=Volume urinário de 24 horas (mL/min);
Cre_s = creatinina sérica (mg/dL); PC_f= peso corporal final (g).

2.3 Morfologia e estereologia glomerular

Cortes renais de 3-4 μ m foram corados pela hematoxolína-eosina (HE) e tricrômico de Masson para as avaliações histomorfológicas. Para a análise estereológica dos grupos, os cortes foram corados pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS). Todas as avaliações descritas a seguir foram realizadas em áreas distantes do tecido renal infartado.

2.3.1 Volume glomerular

No presente estudo, o glomérulo foi considerado uma estrutura esférica, sendo a média do volume glomerular (VG) estimado através da fórmula $VG = \frac{4}{3} \pi r^3$ (98). Para cada animal, utilizando-se uma ocular graduada com divisões de 4 μ m padronizada para o microscópio NIKON ALPHAPHOT – 2 YS₂, com aumento de 400 vezes, mediu-se os diâmetros máximo e mínimo contidos entre as faces internas da cápsula de Bowman de 10 glomérulos que apresentassem de forma visível os polos urinário e vascular.

2.3.2 Volume mesangial

A densidade de volume (Vv) representa o volume de uma determinada estrutura de interesse de estudo, em relação ao volume do compartimento que a contém (15). A densidade volumétrica mesangial relativa (Vv) foi estimada utilizando-se o sistema de microscopia de luz (LEICA DMRBE MFK II) com aumento final de 3875 vezes. A projeção dos cortes histológicos visualizados no microscópio se deu em uma tela de vídeo e com o auxílio do sistema-teste M42 (grade contendo 42 pontos), colocada sobre a imagem glomerular ao acaso, contamos o número de pontos desta grade que se localizavam exclusivamente no mesângio, o qual incluiu

núcleo, células e MM. De forma semelhante ao VG, para cada animal foram avaliados 10 glomérulos que apresentassem os polos urinário e vascular. A Vv média para cada grupo foi obtida pela relação $Vv = pMes \times 100/42$, onde pMes correspondeu ao número de pontos da grade que ficaram sobrepostos ao mesângio. O volume mesangial absoluto (VM) foi determinado pelo produto entre a densidade volumétrica mesangial relativa (Vv) e o valor do VG de cada animal (97,98).

2.4 Imunohistoquímica – Avaliação de alfa- actina

Os cortes do tecido renal foram colocados sobre lâminas silanizadas, e mantidas a 37°C, *overnight*, para fixação dos cortes. A desparafinização e rehidratação dos cortes decorreram conforme descrito para rotina histológica: Xilol (3x), álcool 100,90,80,70%, H₂O destilada (1x). Em seguida, iniciou-se a recuperação antigênica em tampão citrato, pH 6,0 a 60° C, por 30 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de peróxido de hidrogênio PA 10% em metanol durante 10 min. Os cortes foram incubados por 1 hora, em câmara úmida, em temperatura ambiente, com tampão PBS+BSA 3% para eliminação de reações inespecíficas. Logo a seguir, os cortes foram incubados, em câmara úmida a 2-8° C, *overnight*, com o anticorpo primário monoclonal anti- α -actina (Dako–MO851), diluídos a 1/100 em PBS/BSA 1%.

Para a imunomarcação utilizamos o kit LSAB+System-HRP (Anticorpo secundário+Estreptavidina–HRP, Dako-K0690). Aplicamos 50 μ l do anticorpo secundário do kit e incubamos em câmara úmida, por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados com a Estreptavidina em câmara úmida, por 30 min em temperatura ambiente.

Após cada uma das etapas descritas acima, foram realizadas lavagens cuidadosas dos cortes em tampão PBS 0,1M, pH 7,2.

A revelação da imunomarcação foi feita com solução do cromógeno 3,3'Diaminobenzidina (DAB, Dako K3468). A reação foi acompanhada ao microscópio de luz e realizou-se em torno de 1 min. Os cortes foram lavados em água destilada (2x). A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer por 1

min e as lâminas avaliadas sob microscopia ótica, após clarificação, desidratação e montagem em Entelam (Merck).

O controle negativo da reação foi feito retirando-se o anticorpo primário, que foi substituído apenas por tampão PBS/BSA 1%.

2.5 Morfologia podocitária

Utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliar os podócitos e sua interação com a membrana basal do capilar glomerular. Pequenos fragmentos do córtex renal foram retirados, fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e ácido tânico a 0,25%. A seguir foram pós-fixados por 1 h em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% e ferrocianeto de potássio (FeCNK) a 0,8%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e ácido tânico a 0,25%. Após lavagem no mesmo tampão, os fragmentos foram desidratados em acetona com concentrações crescentes (30-100%) e incluídos em Epon (Embed-812). Posteriormente, cortes semifinos de um micrômetro ($1\mu\text{m}$) de espessura foram corados com azul de toluidina e observados em microscopia de luz para seleção prévia das áreas de interesse. Em outra etapa, cortes ultrafinos feitos em ultramicrotomo (Leica Ultracut-UCT) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio de transmissão Zeiss 906 (Carls Zeiss, OberKöchen, Alemanha) em 80KV.

2.6 Avaliação dos Glicosaminoglicanos (GAGs)

2.6.1 Extração total dos Glicosaminoglicanos renais (GAGr) e excretados na urina (GAGu)

As metodologias utilizadas para extração total de GAGr e GAGu foram previamente descritas por Cadaval et al. (34) e Guimarães e Mourão (50)

respectivamente. Os rins foram retirados da acetona e secos em temperatura ambiente. Posteriormente, o rim foi fixado em solução de metanol:clorofórmio (1:1) *overnight* à temperatura ambiente. Após centrifugação, o precipitado foi seco à temperatura ambiente. O peso seco do rim foi registrado e o material foi reidratado em tampão de digestão (acetado de sódio 0.1 M, cisteína 5 mM e EDTA 5mM), pH 5,0, a 8° C por 24h. O tecido foi digerido com papaína a 10%, em banho-maria a 60° C, sob agitação, por 24 h. Após centrifugação, os GAGs foram precipitados com etanol absoluto a -20° C por 24h. Ao precipitado foi adicionada uma solução de CPC 10%, e este foi mantido à temperatura ambiente por 24h. Após centrifugação por 30 min, o precipitado foi lavado com uma solução de CPC 0,05%; dissolvido com uma solução de NaCl 2M e etanol absoluto (100:15, v/v). Adicionamos o dobro do volume de etanol absoluto e deixamos a -20° C por no mínimo 24h. Centrifugamos e descartamos o sobrenadante. O precipitado foi lavado em etanol 80% (2x) e em etanol absoluto (1x) e seco à temperatura ambiente.

A urina de 24h foi diluída ½ volume em água destilada, teve o pH ajustado para 6,0 e filtrada. Após adição de cetavlon (brometo de cetil trimetil amônio) a 5%, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, *overnight*. Após adição de etanol absoluto, para precipitação dos GAGs, as amostras foram centrifugadas e o precipitado foi seco a vácuo. Após adição de acetato de sódio 10%, o pH foi ajustado para 9,0, e as amostras misturadas vigorosamente em vortex. Após centrifugação, recolhemos o sobrenadante, que teve o pH ajustado para 6,0. A este sobrenadante, adicionamos 1,5 volume de etanol absoluto, e após conservação a 0°C, *overnight*, os tubos foram mantidos a vácuo para secagem total do precipitado contendo os GAGs excretados na urina.

2.6.2 Análise quantitativa dos Glicosamoglicanos (GAGs) - Dosagem do ácido hexurônico

A quantificação dos GAGr e GAGu extraídos foi realizada através da dosagem do ácido hexurônico, utilizando-se o método do Carbazol (99). Neste método, o ácido hexurônico reage com o carbazol, produzindo coloração rosa. A quantificação dos GAGs ocorre de forma indireta, o que se quantifica é o ácido hexurônico, que

representa aproximadamente 1/3 da molécula de GAG. Os sedimentos contendo os GAGs foram ressuspensos em de água destilada e 10 µL de cada amostra foi colocada em 190 µL de água destilada. Em paralelo, preparamos uma curva-padrão utilizando glucuronolactona (Sigma), em concentrações crescentes e conhecidas (2,5–20 µg/mL). A cada tubo (amostras/curva-padrão) foi acrescentado 1,0 mL de H₂SO₄ boratado, incubou-se em banho-seco a 100° C por 12 min. Após o resfriamento em banho de gelo, adicionamos 40 µL da solução de Carbazol a todos os tubos, que retornaram ao banho-seco a 100° C por 10 min. Após resfriamento, a densidade ótica (DO) foi lida em espectrofotômetro (Schimadzu), em comprimento de onda de 525 nm.

As concentrações do ácido hexurônico foram estimadas pela razão entre a DO e o fator de correção da curva-padrão. Para o cálculo das concentrações de GAG, multiplicamos o valor da concentração do ácido hexurônico por 3,33. As concentrações de GAGr foram expressas em µg/mg de tecido seco e as de GAGu em mg/mg de creatinina urinária.

2.6.3 Análise qualitativa dos Glicosaminoglicanos (GAGs)

Esta análise foi realizada em etapas: 1) Identificação do perfil dos GAGs extraídos, 2) determinação da concentração relativa através da eletroforese em gel de agarose e, 3) avaliação dos pesos moleculares destes GAGs através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

Antes da realização das eletroforeses, todas as amostras de GAGr foram previamente tratadas com desoxirribinuclease (2,0 mg/mL - Sigma), em banho-maria a 37° C, por 24h. Este procedimento visou à retirada do DNA presente nessas amostras, para que a visualização das bandas não fosse prejudicada, impossibilitando a avaliação qualitativa.

2.6.3.1 Eletroforese em gel de agarose

As amostras de GAGr e GAGu, juntamente com uma solução-padrão com GAGs (~5 µg de ácido hexurônico), contendo Heparan Sulfato (HS), Condroitin

Sulfato (CS) e Dermatan Sulfato (DS) de aorta torácica humana, foram aplicadas em gel de agarose a 0,5% em tampão 1,3 diaminopropano 50mM, pH 9,0, submetido a 110V/400 mA por 1 hora (100). O gel foi precipitado em cetavlon 0,1%, *overnight*. Posteriormente, o gel seco foi corado em azul de toluidina 0,1%, lavado em solução de ácido acético-água-etanol (0,1:5:5, v/v/v) por 30 min. A seguir, o gel foi corado com Stains-All, que intensifica a metacromasia dos GAGs sulfatados e revela a presença de não sulfatados, corando-os em azul claro (101).

A avaliação da concentração relativa dos GAGu e GAGr foi realizada através de densitometria das bandas visualizadas no gel de agarose, usando-se o programa Molecular Analyst[®] Software 1.4 (Bio-Rad Laboratories). O perfil densitométrico foi obtido para cada banda visualizada e a concentração relativa de cada pico, correspondente a banda, foi estimada através da comparação entre as áreas dos picos das bandas das amostras e dos padrões.

2.6.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os pesos moleculares das amostras dos GAGs extraídos dos rins e das urinas foram estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (100). Aproximadamente 10 µL de cada amostra e dos padrões de pesos moleculares (condroitin 6-sulfato de 60 kD, condroitin 4-sulfato de 40 kD e dextran sulfato de 8kD na concentração de 2µg/mL) foram aplicados em gel de poliacrilamida a 6% com 1 mm de espessura e submetidos a eletroforese (110V/400mA) por 45 min. em tampão TRIS-HCl, pH 8,6. Ao fim da corrida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e lavado em ácido acético 1%, *overnight*. Posteriormente, o gel foi corado com Stains-All, e descorado com água destilada.

2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão ($X \pm EP$). A comparação entre as médias foi feita por análise de variância de um fator (ANOVA),

para dados paramétricos, e pelo Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos. Para avaliarmos o nível de significância entre as médias dos diferentes grupos, utilizamos como *posthoc* o teste de Duncan. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

No presente estudo foram avaliados ratos e ratas Wistar após 30 dias de nefrectomia 5/6, acompanhada ou não de castração, com o objetivo de avaliar alterações renais gênero dependentes.

3.1 Características gerais dos grupos estudados

Na Tabela 1 apresentamos as características gerais dos grupos ao final do estudo (30º dia). Todos os animais iniciaram o estudo (dia 0) com a idade de 7 semanas, e observa-se que as fêmeas apresentaram peso corporal inicial (PCi) significativamente menor ($p < 0,05$) que os machos. Nos ratos IRC, o PCi foi diferente entre os grupos castrados e não castrados (IRCM vs IRCMc, $p < 0,05$). Em relação ao peso corporal final (PCf), o grupo CM apresentou valor significativamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$). Os animais IRC não apresentaram diferenças significativas no PCf quando comparados aos IRC castrados de mesmo gênero. A pressão arterial (PA) dos grupos IRC, castrados e não castrados foi significativamente maior que a dos controles ($p < 0,05$). Nos machos IRC, a castração reduziu significativamente a PA (IRCM vs IRCMc, $p < 0,05$); o mesmo não ocorreu com as fêmeas, que mantiveram PA aumentada após a castração. Observamos diferença gênero dependente após a castração nos grupos IRC: O grupo IRCMc apresentou menor PA que o grupo IRCFc ($p < 0,05$).

Os dados de peso renal (PR) corrigido por 100g de PCf mostram que os animais do grupo IRC apresentaram hipertrofia significativa do tecido renal remanescente em relação aos seus controles ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Características dos grupos após 30 dias de nefrectomia 5/6

GRUPOS	PC _i (g)	PC _f (g)	PA (mmHg)	PR (g)	PR/PC
CM	^a 206 ±2,7	339 ♦ 10,1	119 2,2	1,18 0,01	0,35 0,01
CMc	224 4,0	229 4,8	115 1,1	0,97 0,1	0,42 0,04
CM sham	194 8,2	260 12,2	120 0,8	0,96 0,1	0,37 0,02
IRCM	209 ● 3,8	236 6,7	155 +● 0,7	1,25 0,1	0,53 ■ 0,10
IRCMc	233 ■ 5,4	258 9,4	147 +* 3,2	0,89■ 0,03	0,47 0,01
CF	162 4,8	202 9,4	114 2,3	0,82 0,1	0,40 0,05
CFc	152 7,0	182 9,2	116 2,2	0,76 0,1	0,41 0,04
CF sham	176 3,0	225 4,0	117 2,9	0,82 0,1	0,44 0,02
IRCF	153 ●■ 6,1	190●■ 9,5	150 + 1,2	1,12▼ 0,1	0,59 + 0,02
IRCFc	143●■† 8,6	180●■ 6,8	155 + 0,8	0,97 0,1	0,54 0,10

Legenda: C=Controle; c= Castração; IRC=Insuficiência renal crônica; M=machos; F= fêmeas. PC_i = peso corporal inicial; PC_f = peso corporal final; PA= pressão arterial;

PR = peso renal; PR/PC=Peso renal corrigido por 100g de PC_f.

Nota: ^aX ± EP ; p < 0,05: ■ vs CM; * vs IRCFc; ● vs IRCMc; ♦ vs todos; ■ vc IRCM;

† vs CF;

▼ vs CFc;+ vs controles M e F.

Na Tabela 2 apresentamos os resultados das avaliações bioquímicas realizadas ao final do estudo. A uréia dos grupos IRC foi significativamente maior do que os controles ($p < 0,05$) e, os machos IRC apresentaram uréia significativamente maior que as fêmeas ($p < 0,05$). A creatinina sérica (Cre_s) apresentou diferença significativa entre os animais IRC e controles ($p < 0,05$). Nos machos IRC, a castração não alterou os níveis de Cre_s , porém esta foi menor nas fêmeas IRCc ($p < 0,05$). Nos grupos IRC, houve diferença significativa na Cre_s quando comparamos os gêneros. Após 30 dias de nefrectomia 5/6, os grupos IRC apresentaram redução do *clearance* da creatinina (Cle Cre) quando comparados aos controles ($p < 0,05$), exceto o grupo controle castrado. Não houve diferença gênero dependente no Cle Cre.

Tabela 2: Parâmetros laboratoriais dos grupos estudados obtidos no 30^o dia

GRUPOS	Uréia (mg/dL)	Cre _s (mg/dL)	CleCre (mL/min/100g PC _f)
CM	^a 23 ± 0,9	0,4 0,01	0,51 0,04
CMc	51 1,5	0,5 0,02	0,41 0,05
CM sham	38 3,9	0,4 0,03	0,52 0,10
IRCM	146♦ 16,0	0,9+ 0,10	0,26 # 0,06
IRCMc	132♦ 5,1	0,9+ 0,01	0,30 # 0,03
CF	56 1,9	0,4 0,04	0,55 0,04
CFc	41 1,9	0,5 0,01	0,41 0,05
CF sham	65 2,0	0,4 0,06	0,62*† 0,05
IRCF	87+ 5,8	0,6 *+ 0,03	0,34▼ 0,05
IRCFc	102+ 5,7	0,8 + 0,03	0,27 ▼ 0,07

Legenda: C=Controle; c= Castração; IRC=Insuficiência renal crônica; M=machos; F= fêmeas. Cre_s=creatinina sérica; CleCre=clearance da creatinina.

Nota: ^aX ± EP ; p < 0,05: ♦ vs todos; * vs IRCFc; † vs IRCF; # vs CM e CM sham; ▼ vs CF e CF sham; + vs controles M e F.

Na Figura 2 apresentamos os dados referentes à PTN. Esta foi significativamente maior nos grupos IRC comparado aos seus controles (IRCM=112 ± 16 mg/24h vs CM=39 ± 3,6, CMc= 12 ± 2,6 e CM sham= 30 ± 7,5 mg/24h; IRCF= 48,0 ± 13,6 mg/24h vs CF=9,6 ± 1,8, CFc= 8,7 ± 0,9, CF sham= 6,4 ± 0,7 mg/24h; p<0,05). A castração reduziu a PTN dos machos com IRC (IRCM=112 ± 16 vs IRCMc=58,1 ± 10,5 mg/24h, p<0,05). Nas fêmeas com IRC, a PTN não foi diferente (IRCF=56,6 ± 13,6 vs IRCFc=83,9 ± 10,5 mg/24h), embora o grupo IRCFc tenha mostrado tendência de aumento da PTN.

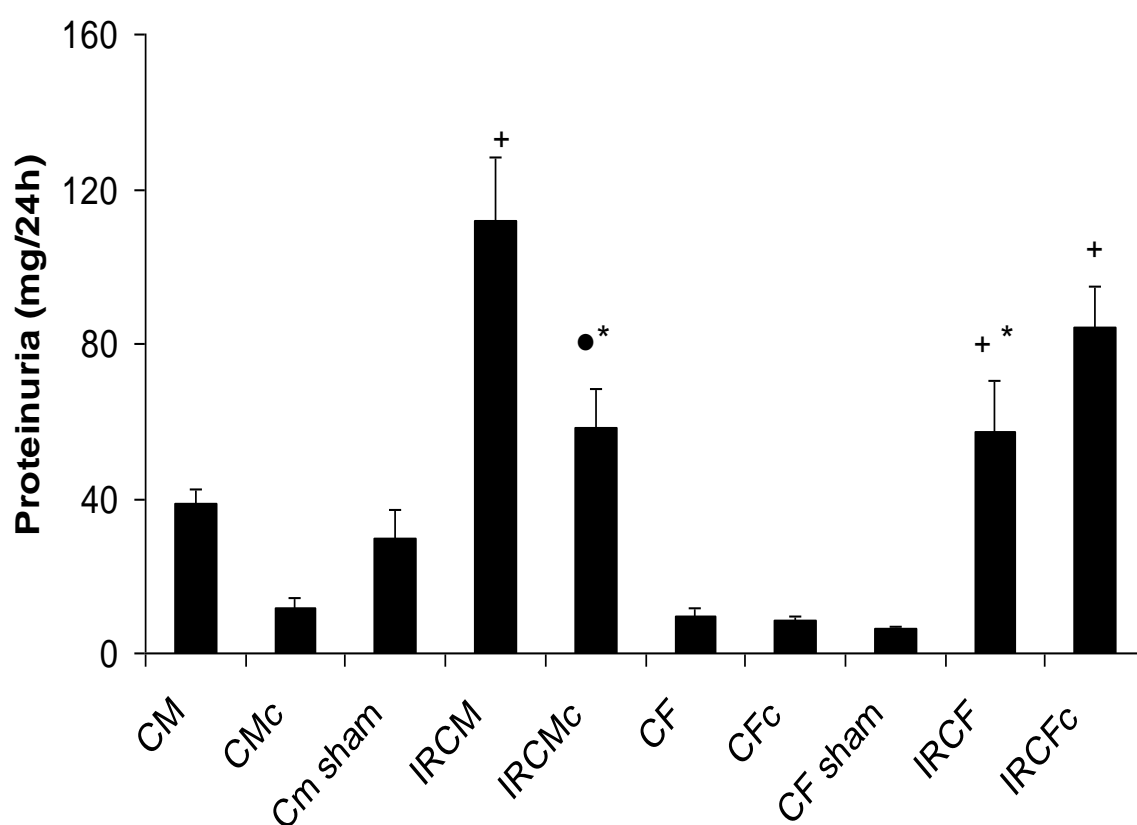


Figura 2 - Proteinúria (mg/24h) após 30 dias de estudo

p< 0,05: + vs respectivos controles; * vs IRCM; • vs CMc.

Legenda: C=Controle; c= Castração; IRC=Insuficiência renal crônica; M= machos; F= fêmeas.

3.2 Avaliação estereológica glomerular

Os dados da análise estereológica dos glomérulos encontram-se na Tabela 3. As mensurações de volume glomerular (VG) não foram significativamente diferentes entre os grupos após 30 dias de IRC, embora estes tenham apresentado aumento de VG em relação aos seus controles. O parâmetro VM ($VG \times V_v$) fornece uma estimativa da quantidade de matriz mesangial contida no volume glomerular mensurado. Ao avaliarmos este dado, observamos que apenas os machos IRC apresentaram expansão mesangial significativa em relação aos seus controles ($p < 0,05$). Não houve diferenças gênero dependentes entre os grupos IRC.

Tabela 3 - Dados da análise estereológica glomerular dos grupos estudados

GRUPOS	VG (x 10 ⁵ μm ³)	VM (x 10 ⁴ μm ³)
CM	^a 8,9 ± 0,9	38,2 3,1
CMc	6,7 0,4	40,8 2,8
CM sham	7,8 0,4	31,9 2,2
IRCM	10,0 1,8	63,9+ 12,1
IRCMc	10,7 0,9	62,4+ 4,7
CF	5,2 0,6	23,3 2,3
CFc	5,3 0,5	25,5 2,1
CF sham	5,9 0,1	25,1 0,5
IRCF	8,0 1,5	47,9 8,3
IRCFc	8,9 1,0	45,6 5,1

Legenda: C=controle; c= castração; IRC=insuficiência renal crônica; M= machos; F= fêmeas. VG = volume glomerular; VM= volume mesangial absoluto.

Nota: ^aX ± EP ; p < 0,05: + vs CM, CMsham e CF.

3.3 Morfologia e imunohistoquímica

A análise dos cortes histológicos mostrou que após 30 dias de IRC, os diferentes grupos estudados não apresentaram fibrose glomerular ou túbulo-intersticial independentemente da castração (Figuras 3-5).

A α -actina (ACT) apresentou o mesmo padrão de distribuição nos grupos controles e sham em ambos os gêneros (Figura 6), com imunomarcacão somente nas paredes dos vasos sanguíneos (veias, artérias e arteríolas). No grupo IRCM, além dos vasos, observamos imunomarcacão para ACT nas membranas basais tubulares, na região periglomerular no espaço de Bowman e no mesângiol em raros glomérulos. No grupo IRCF, a presença de ACT limitou-se aos vasos sanguíneos, similar aos grupos controles (Figura 7). Após a castração, observamos diferenças entre os gêneros: nos machos, a presença de ACT foi reduzida e, nas fêmeas intensificada, com aparecimento de ACT no mesângio (Figura 8). O controle negativo da reação não apresentou imunomarcacão quando retiramos o anticorpo primário da reação de imunohistoquímica (Figura 9).

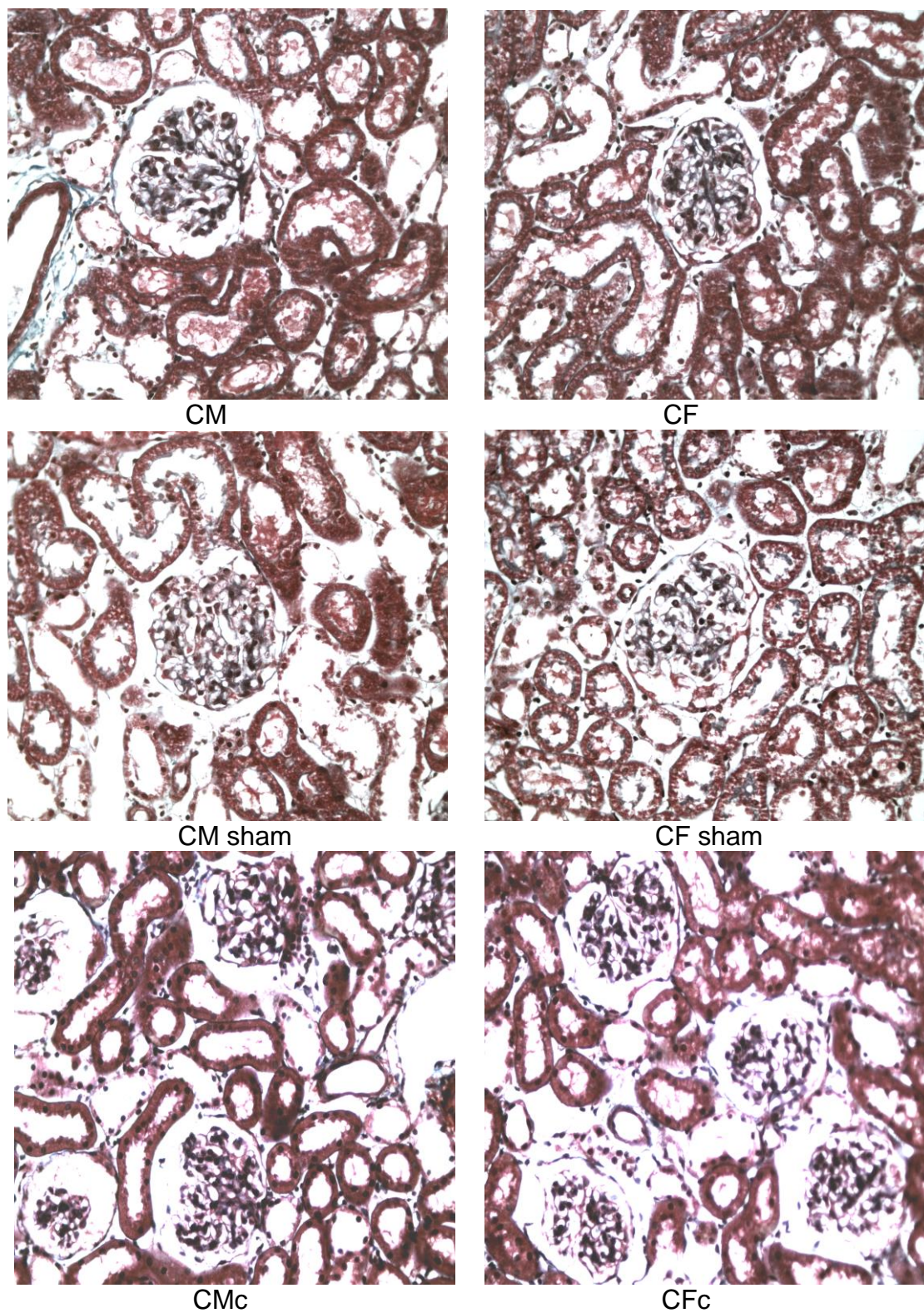
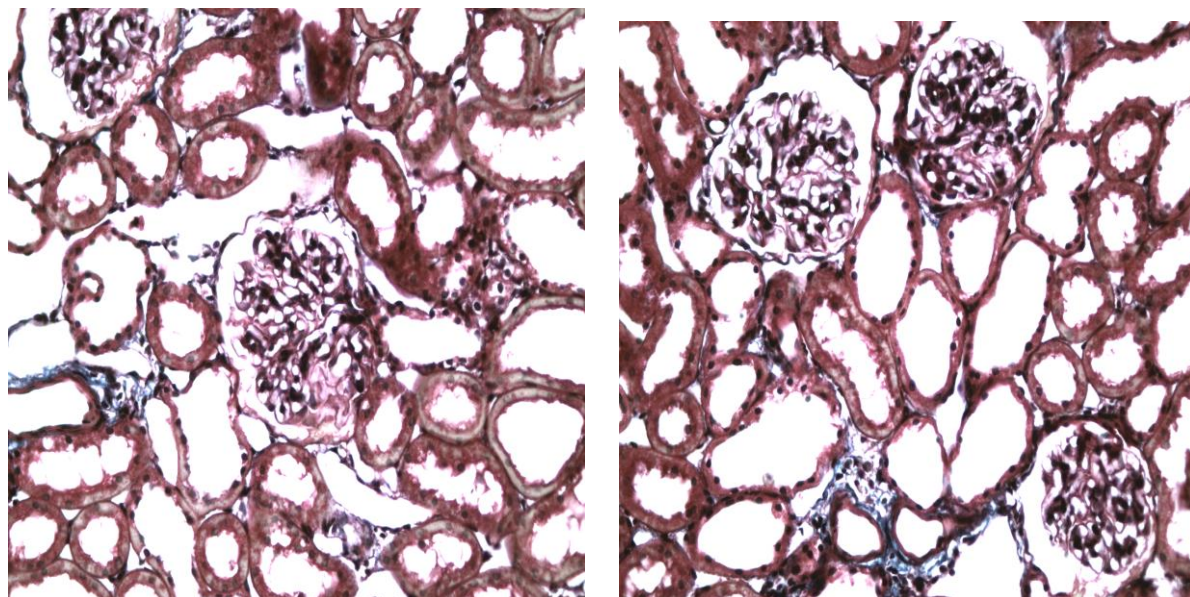
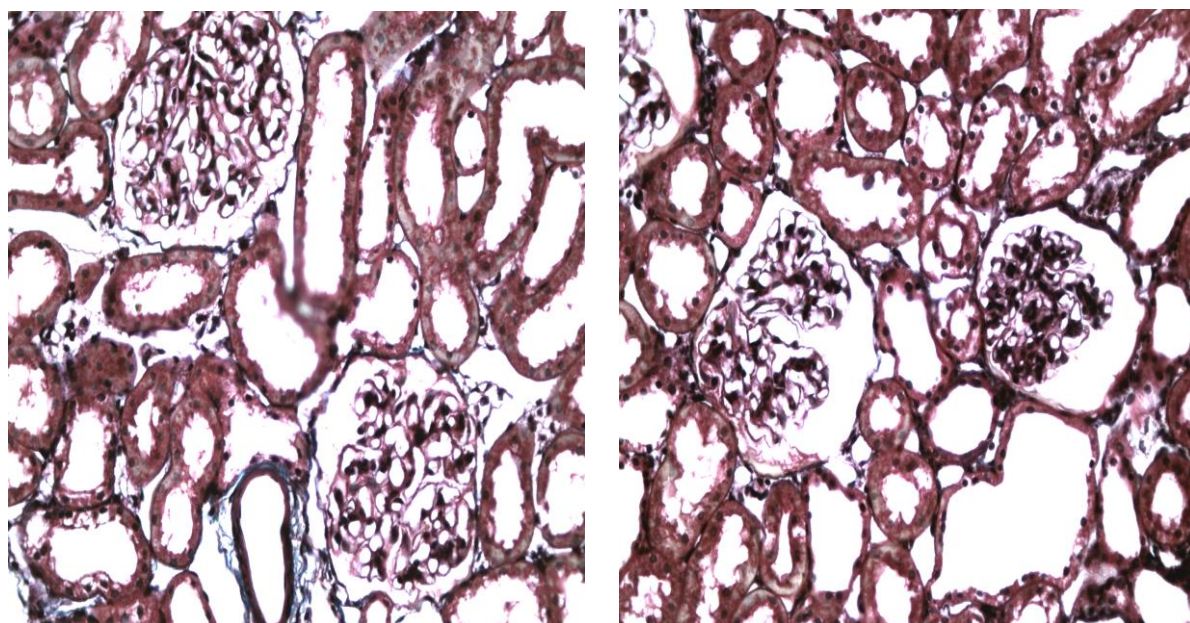


Figura 3 - Coloração tricrômico de Masson dos grupos controles e sham
Legenda: C=controle; c=castração; M=machos; F=fêmeas.
Nota: Aumento final: 400X.

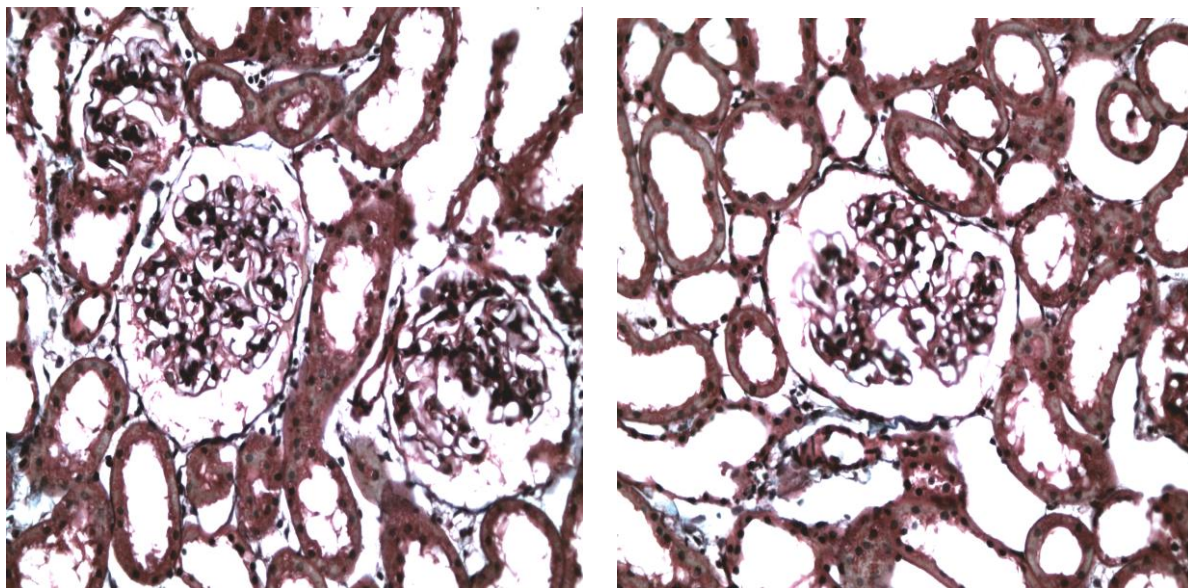


IRCM

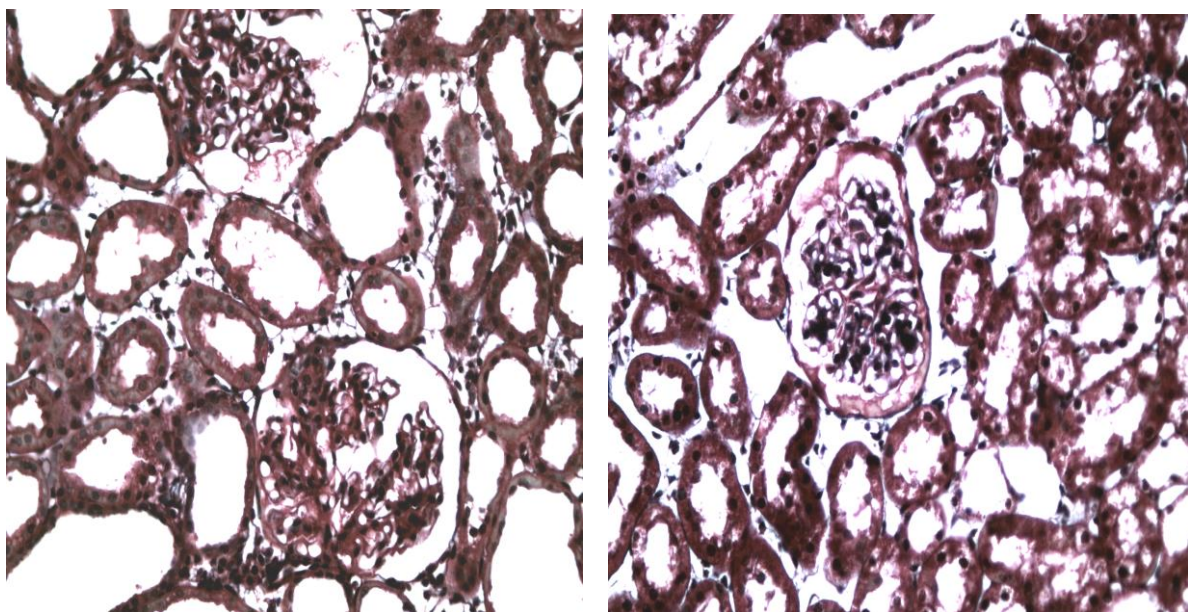


IRCF

Figura 4 - Coloração tricrômico de Masson dos grupos IRC
Legenda: IRC= insuficiência renal crônica; M=machos; F=fêmeas.
Nota: Aumento final: 400X.



IRCMc



IRCFc

Figura 5 - Coloração tricrômico de Masson dos grupos IRC castrados
Legenda: c=castração; IRC= insuficiência renal crônica; M=machos; F=fêmeas
Nota: . Aumento final: 400X.

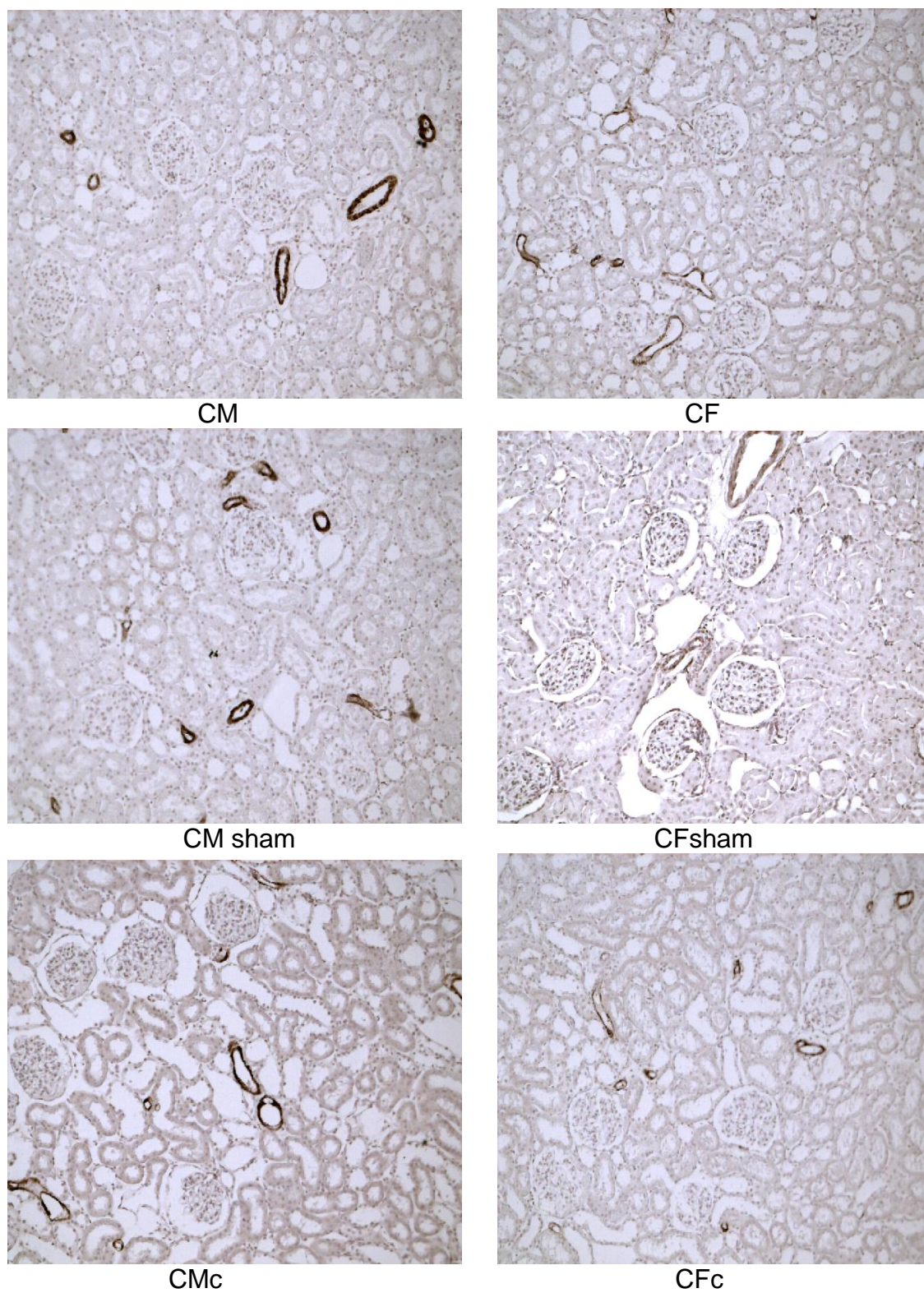
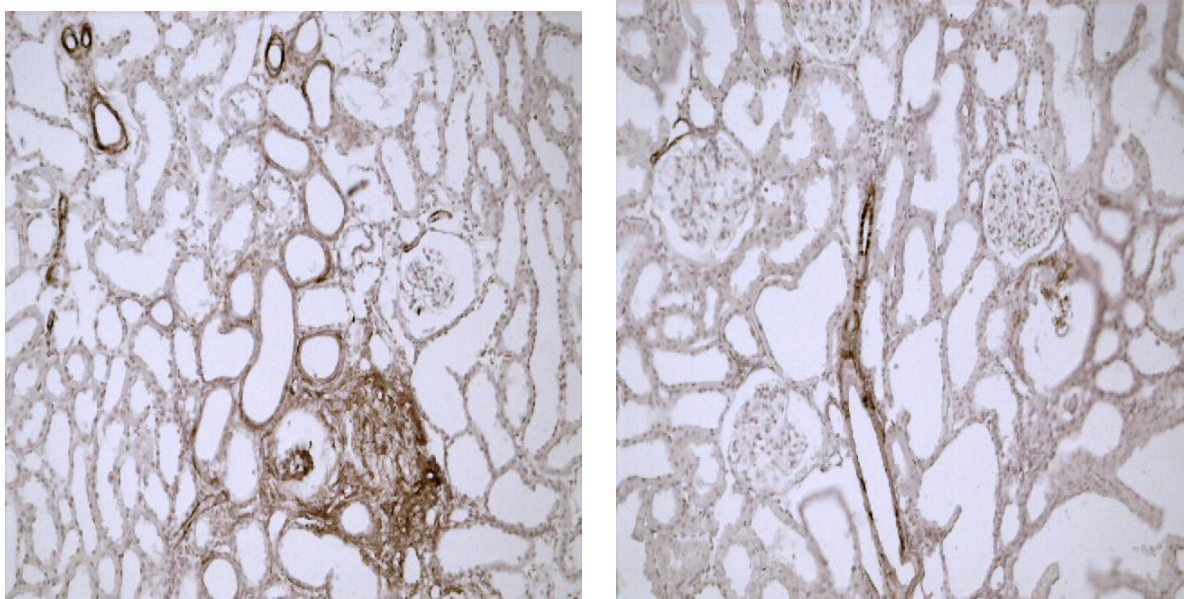
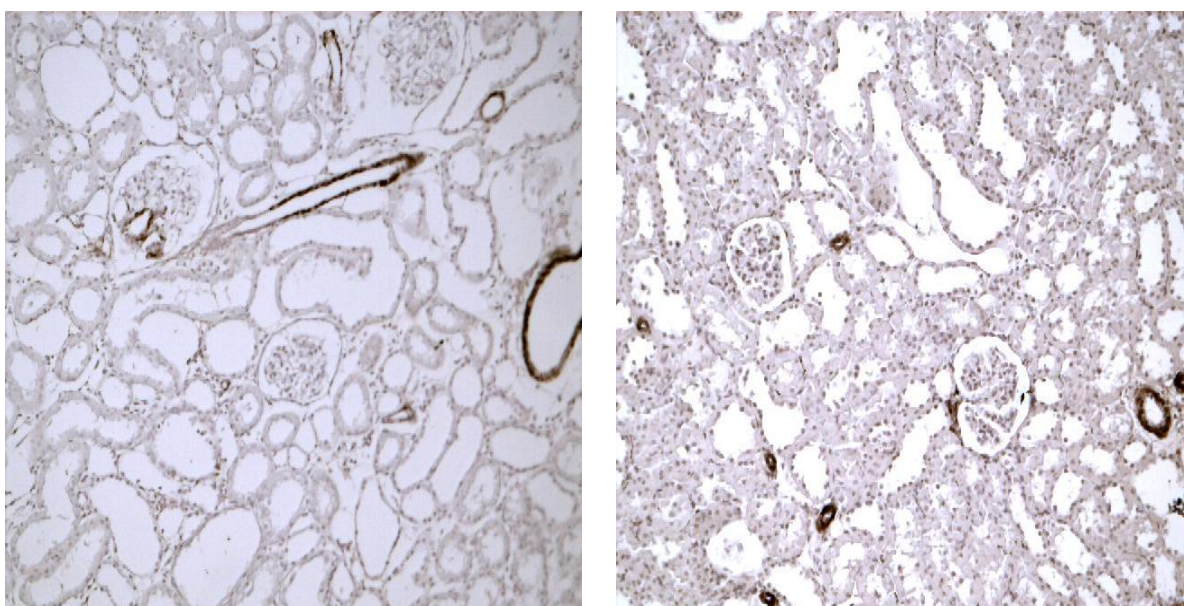


Figura 6 - Imunomarcção para α -actina nos grupos controles e sham
Legenda: C=controle; c=castrado; M=machos; F=fêmeas.
Nota: Aumento final: 200X.



IRCM



IRCF

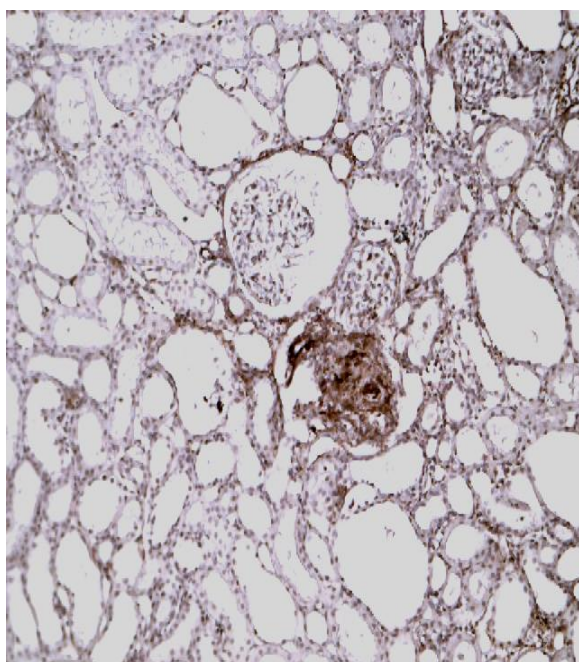
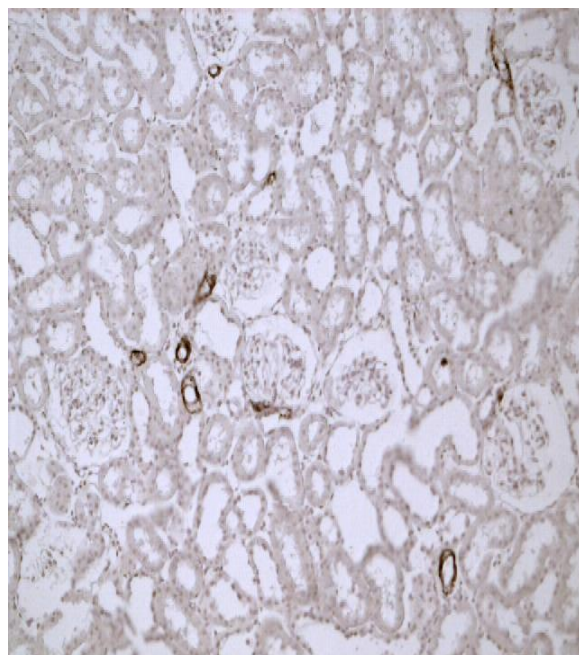
Figura 7 - Imunomarcaco para α -actina nos grupos IRC

Legenda: IRC= insuficiência renal crônica; M=machos; F=fmeas

Nota: Aumento final: 200X.



IRCMc



IRCFc

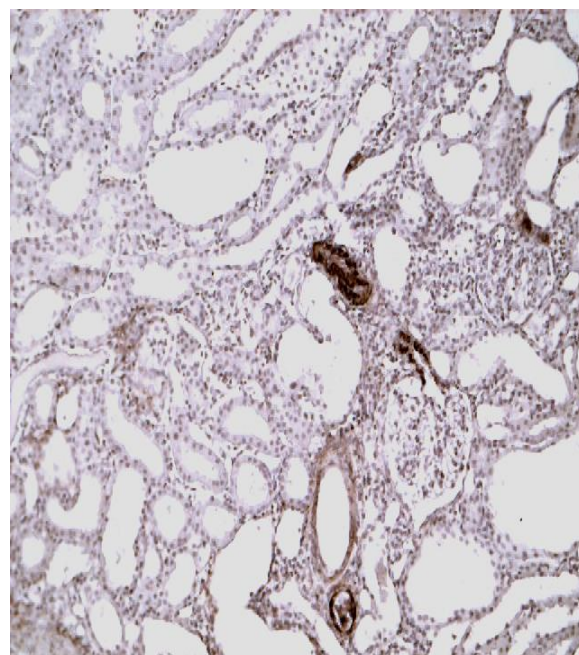


Figura 8- Imunomarcção para α -actina nos grupos IRC castrados
Legenda: c=castração; IRC= insuficiência renal crônica; M=machos; F=fêmeas.
Nota: Aumento final: 200X.

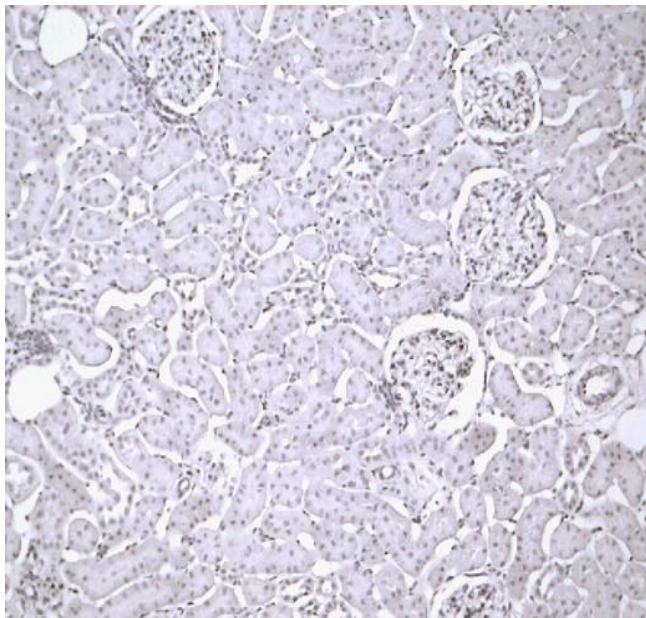


Figura 9 - Controle negativo da reação de imunomarcação.
Nota: Aumento final: 200X.

3.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) verificamos que os grupos controles castrados e sham, em ambos os gêneros, apresentaram ultraestrutura podocitária preservada, com destaque para os prolongamentos podocitários, ancorados à membrana basal do capilar glomerular, mostrando espaçamento regular entre eles, contendo a fenda de filtração (Figuras 10-15). No grupo IRCM, observamos em algumas regiões, espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares, e aparente esfacelamento e fusão de pedicelos (Figura 16). Já no grupo IRCF, a barreira de filtração glomerular pareceu preservada; porém, também foram observadas discretas alterações na morfologia dos podócitos ao longo do capilar glomerular (Figura 18). A castração não influenciou as alterações podocitárias observadas nos animais com IRC (Figuras 17 e 19).

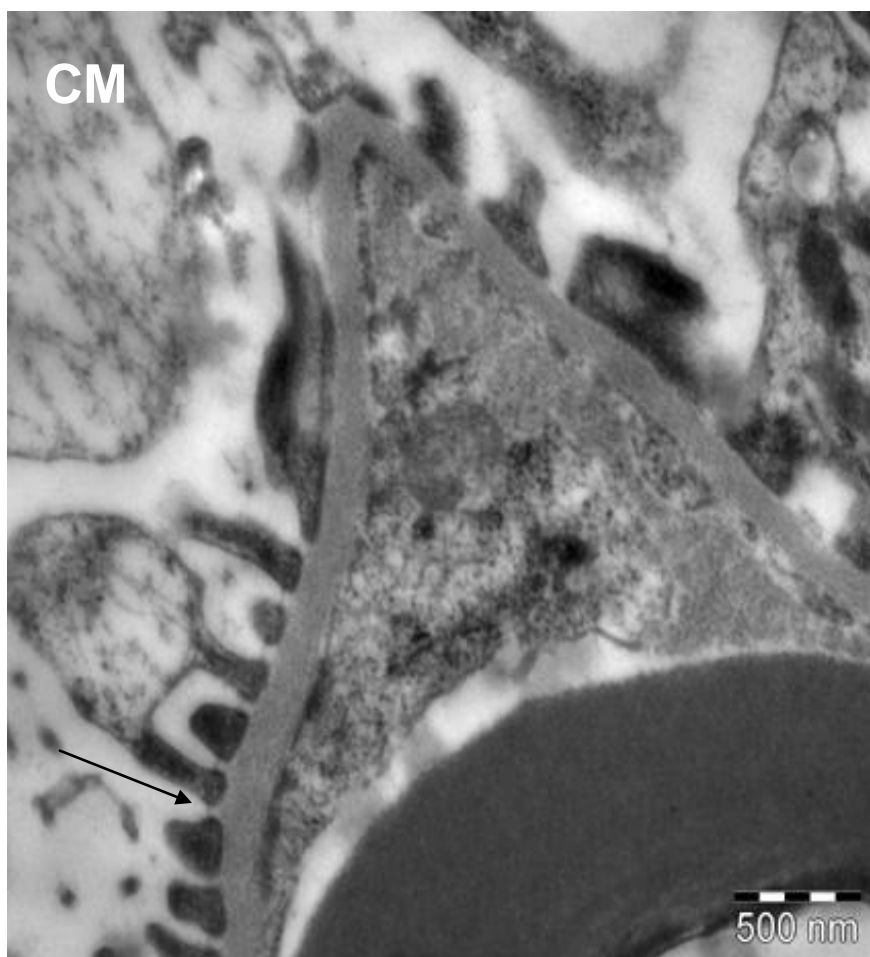


Figura 10 - Micrografia eletrônica do grupo CM

Legenda: C=controle; M=Macho.

Nota: Aumento final: 27800 x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.



Figura 11 - Micrografia eletrônica do grupo CM sham

Legenda: C=controle; M=Macho.

Nota: Aumento final: 27800 x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.

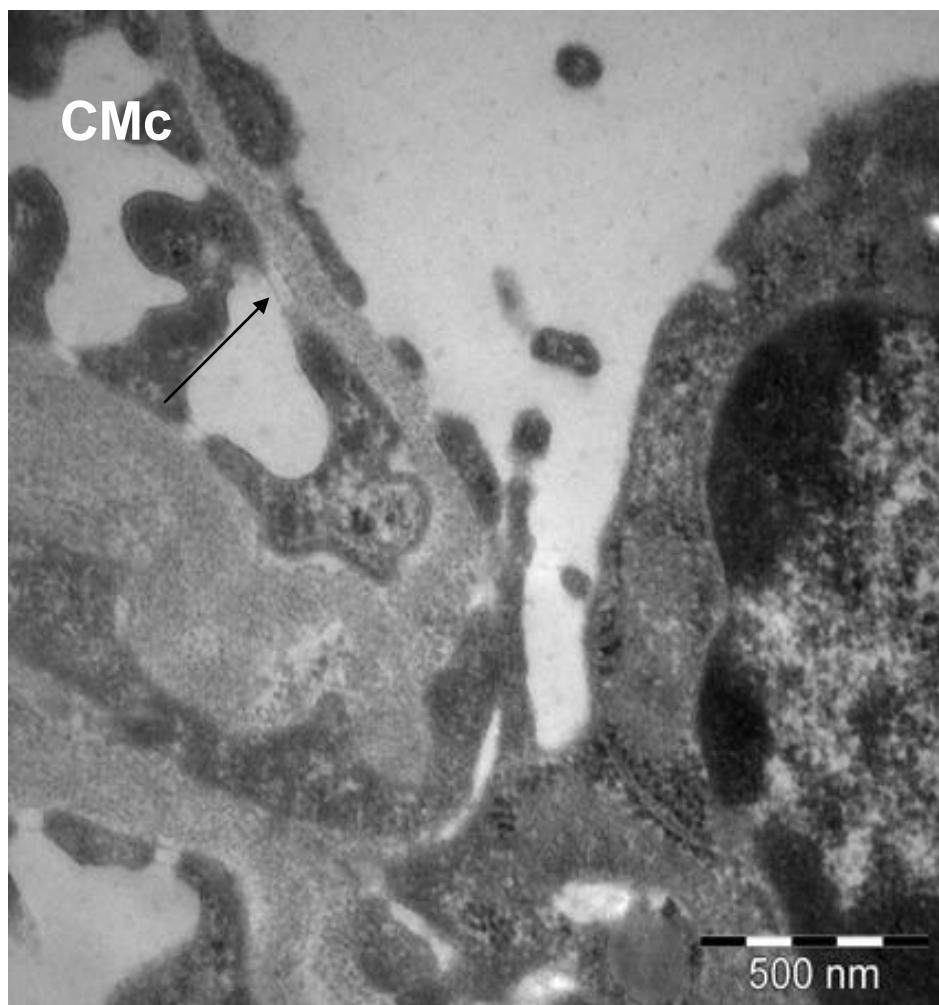


Figura 12 - Micrografia eletrônica do grupo CMc.

Legenda: C=controle; c=castração; M=Macho.

Nota: Aumento final: 27800 x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.

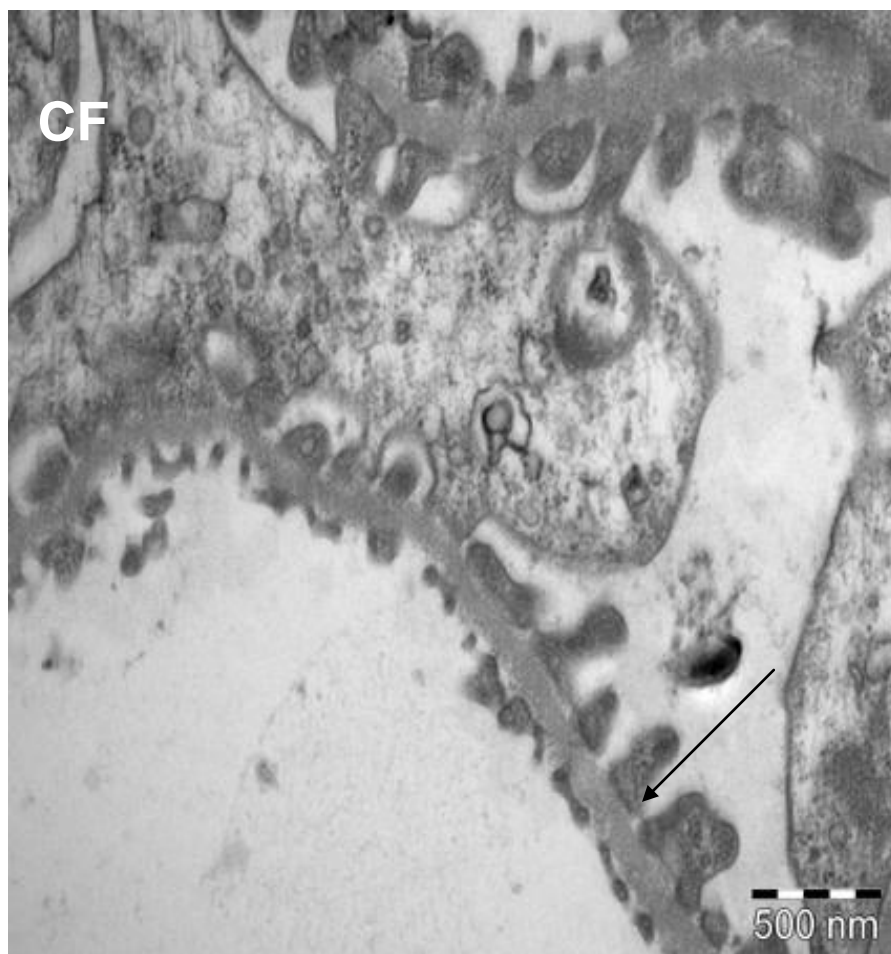


Figura 13: Micrografia eletrônica do grupo CF

Legenda: C=controle; F=fêmea.

Nota: Aumento final: 27000x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.

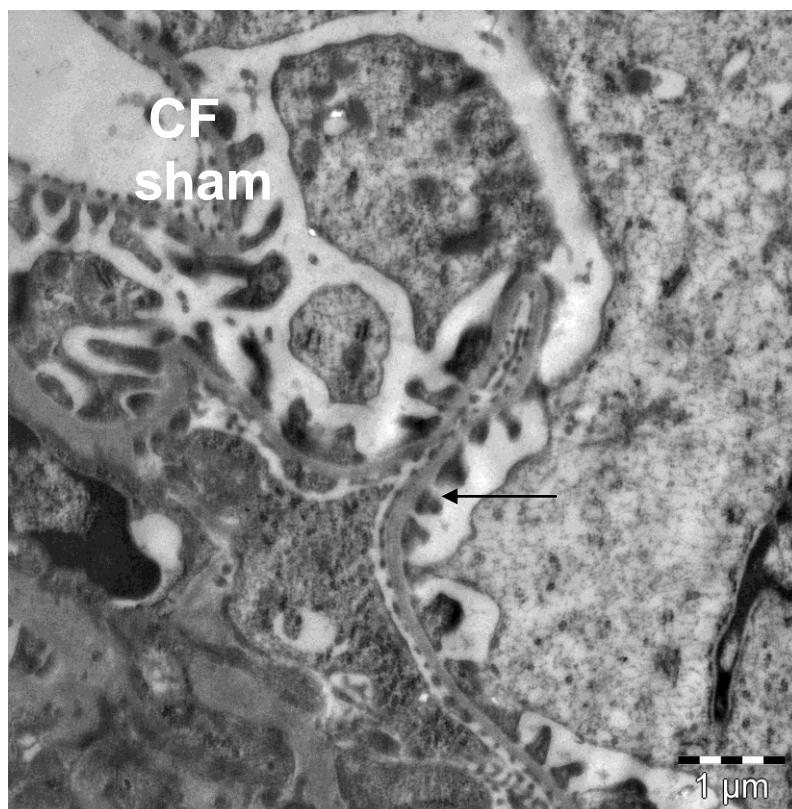


Figura 14 - Micrografia eletrônica do grupo CF sham

Legenda: C=controle; F=Fêmea.

Nota: Aumento final: 12930 x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.

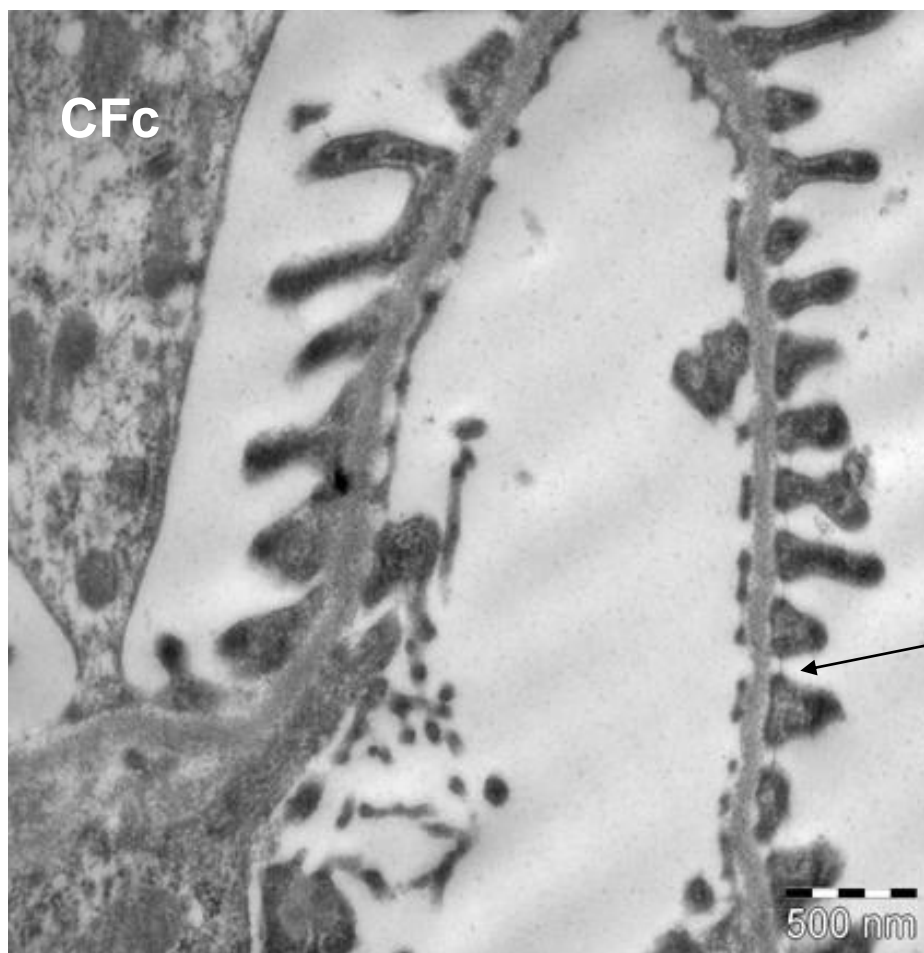


Figura 15: Micrografia eletrônica do grupo CFc
Legenda: C=controle; c=castrada; F=fêmea.
Nota: Aumento final: 27800x. Em destaque (seta), a fenda de filtração

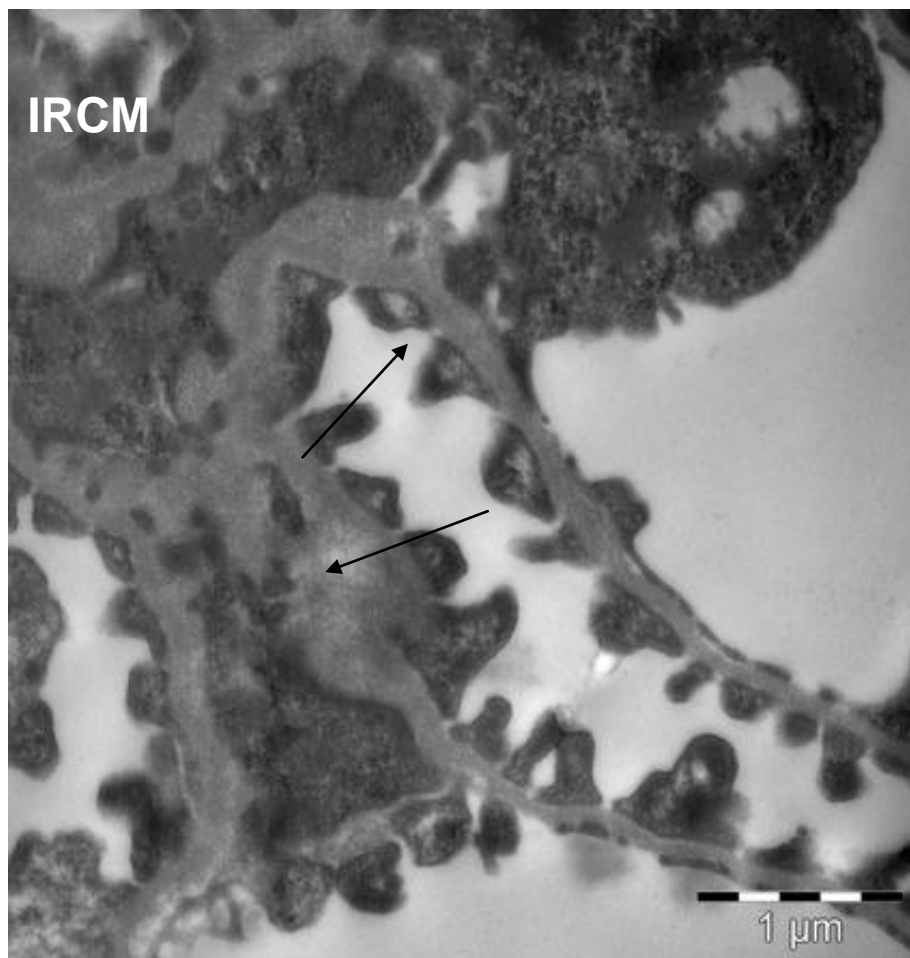


Figura 16: Micrografia eletrônica do grupo IRCM

Legenda: IRC=insuficiência renal crônica; M=macho.

Nota: Aumento final: 21560x. Em destaques (setas), a fenda de filtração e o espessamento da MBG em determinadas regiões do capilar glomerular.

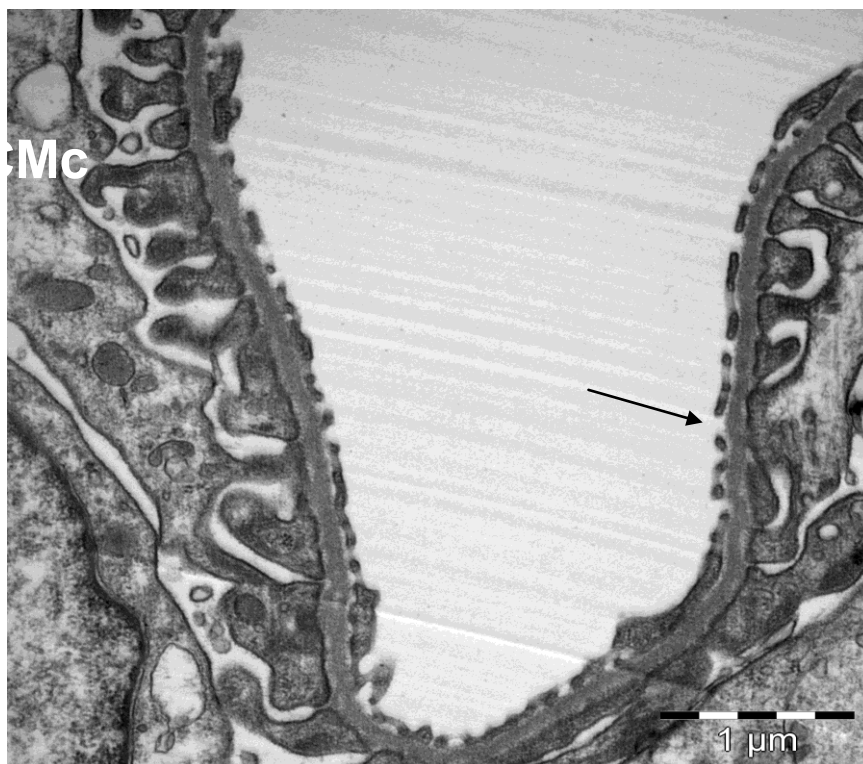


Figura 17: Micrografia eletrônica do grupo IRCMc
Legenda: c=castração; IRC=insuficiência renal crônica; M=Macho.
Nota: Aumento final: 21560x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.



Figura 18: Micrografia eletrônica do grupo IRCF
Legenda: IRC=insuficiência renal crônica; F=fêmea.
Nota: Aumento final: 27800x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.

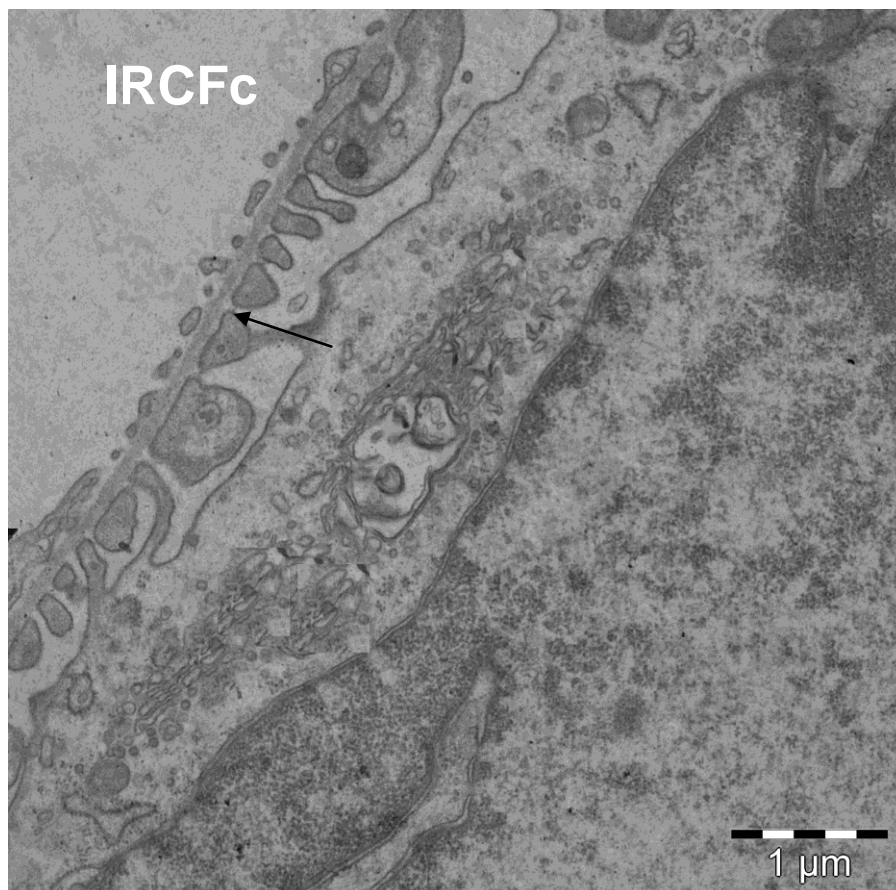


Figura 19 - Micrografia eletrônica do grupo IRCFc
Legenda: c=castração; IRC=insuficiência renal crônica; F=Fêmea.
Nota: 16700 x. Em destaque (seta), a fenda de filtração.

3.5 Glicosaminoglicanos

Os dados referentes aos GAGr e GAGu estão apresentados na Tabela 4. Os GAGu não foram diferentes entre os grupos. No entanto, GAGr foi quase duas vezes maior nas fêmeas em relação aos machos nos grupos controles (CF = $2,27 \pm 0,18$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido seco vs CM= $1,28 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido seco, $p < 0,05$). O grupo IRCM apresentou aumento significativo do GAGr em comparação aos demais grupos dos machos e aos grupos IRC das fêmeas ($p < 0,05$). Após castração, ocorreu redução dos GAGr no grupo IRCM enquanto que nas fêmeas este manteve-se inalterado. Os dados obtidos nos grupos sham foram similares aos grupos controles.

O perfil dos GAGr em gel de agarose e a concentração de HS e CS+DS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido seco), estimada através da densitometria, dos grupos estudados encontram-se nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Após a coloração do gel pelo Stains-All, não evidenciamos presença de GAGs não sulfatado no rim. A densitometria realizada na eletroforese em gel de agarose mostrou que o HS foi o GAG predominante no rim de todos os grupos (Figura 21A). Nos controles, as fêmeas apresentaram maior concentração de HS em relação aos machos. Estes dados enfatizam a diferença em relação ao gênero quando se comparam os grupos IRC: HS foi reduzido nas fêmeas e aumentado nos machos. A castração reduziu o HS nos machos a níveis semelhantes aos encontrados nas fêmeas (Figura 21B). Em relação ao CS+DS (Figura 21C), observamos que as fêmeas foram mais homogêneas. Os ratos IRC apresentaram maior concentração de CS+DS em relação às fêmeas e a seus respectivos controles ($p < 0,05$).

Dados de GAGu mostraram mesmo padrão entre os grupos, com predomínio de CS+DS (Figura 22), excetuando-se os ratos IRC que apresentaram redução na densidade das bandas CS+DS e HS. Ao contrário do rim, a coloração pelo Stains-All revelou bandas de coloração azul mais clara, sugerindo a presença de GAGs não sulfatados, como o ácido hialurônico, ou dessulfatados.

Tabela 4 - Quantificação do GAGr total e GAGu dos grupos estudados após 30 dias de nefrectomia

	Machos				Fêmeas			
	(n)				(n)			
	CM	CMc	IRCM	IRCMc	CF	CFc	IRCF	IRCFc
	(5)	(5)	(5)	(5)	(4)	(5)	(6)	(6)
GAGr ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido seco)	1,28 $\pm 0,05$	1,55 0,12	2,46* 0,13	1,87*• 0,19	2,27* 0,18	2,28* 0,26	1,63♦• 0,18	1,45♦• 0,19
GAGu (mg/mg Cre _u)	0,10 0,03	0,12 0,01	0,15 0,02	0,13 0,01	0,19 0,03	0,14 0,02	0,18 0,02	0,18 0,05

Legenda: C=controle; IRC= insuficiência renal crônica; c= castração; M=machos; F=fêmeas. GAGr= GAG renal total; GAGu= GAG total excretado na urina de 24 h; Cre_u= creatinina urinária.

Nota: Média \pm EP; p<0,05: * vs grupos controles machos; • vs IRCM; ♦ vs grupos controles fêmeas.

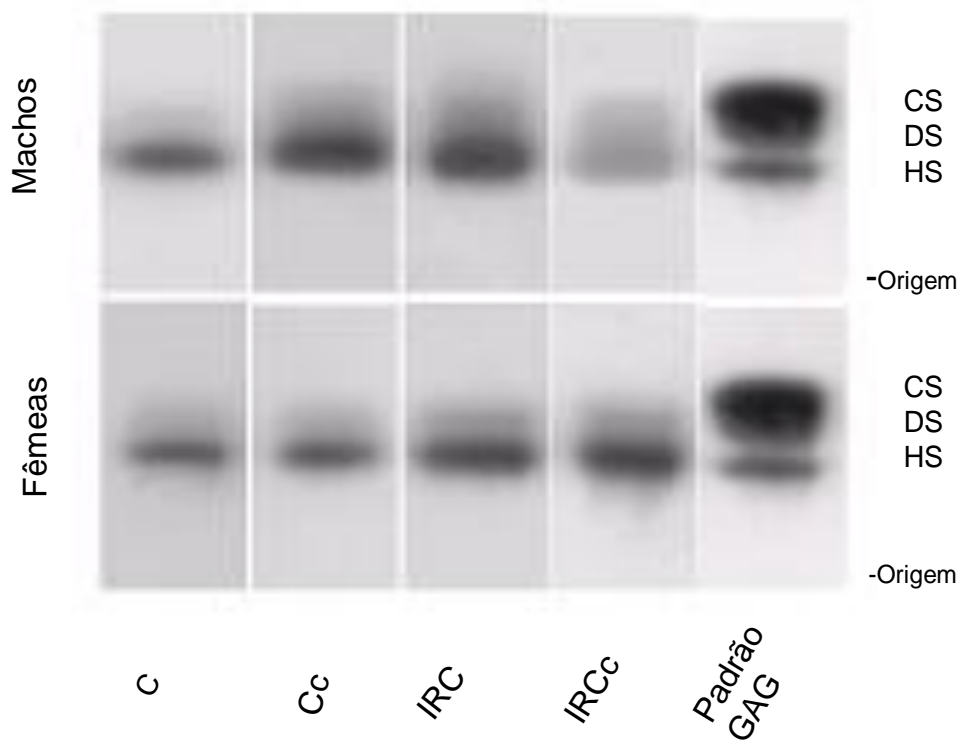


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose das amostras de GAGr dos grupos estudados

Legenda: CS= Condroitin Sulfato; DS= Dermatan Sulfato; HS= Heparan Sulfato; C= Controle; c= Castração; IRC= Insuficiência renal crônica.

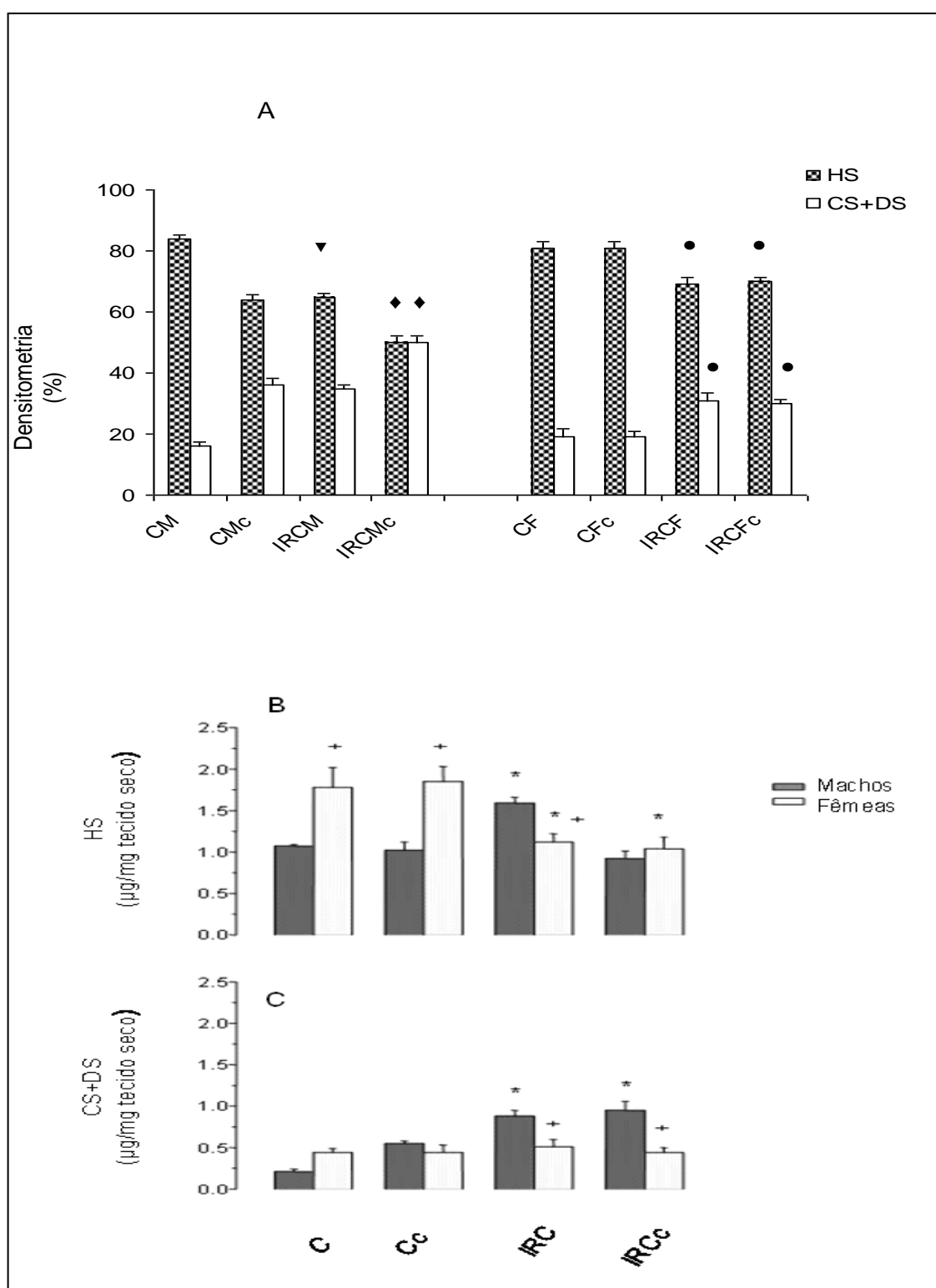


Figura 21- Proporção dos GAGr (A) e a quantificação em µg/mg de tecido seco renal do HS (B) e CS+DS (C) estimadas pela densitometria

Legenda: CS= Condroitin Sulfato; DS= Dermatan Sulfato; HS= Heparan Sulfato; C= Controle; c=castração; IRC= Insuficiência renal crônica. $p < 0,05$: * vs respectivos grupos controles; + vs M; ♦ vs todos; ▼ vs CM; • vs IRCM.

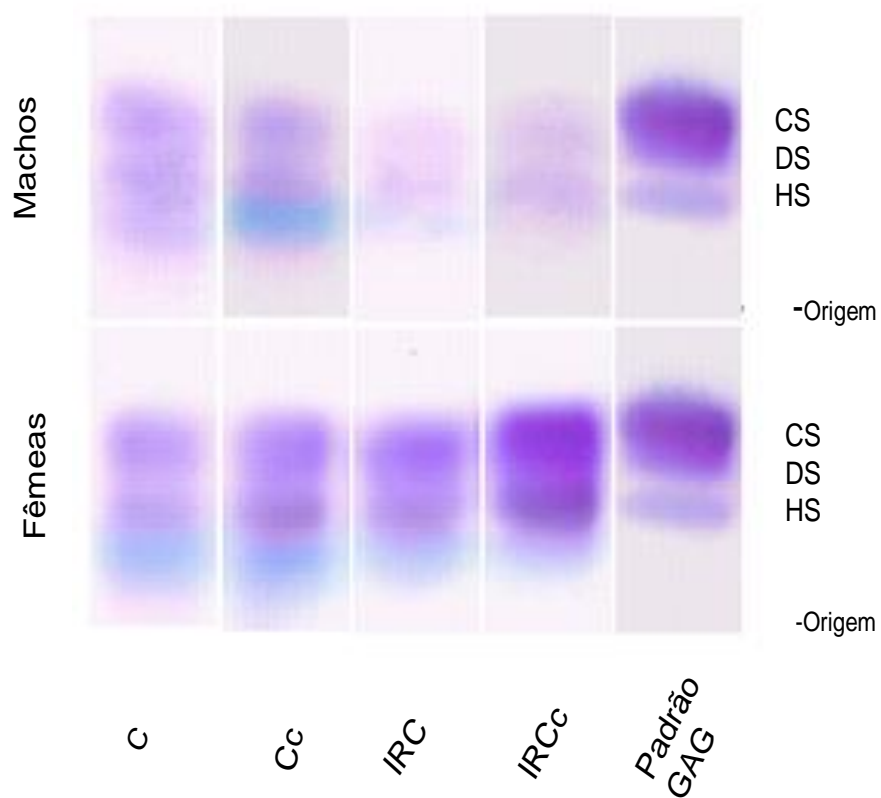


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose das amostras em “pool” do GAGu após coloração de Stains-All

Legenda: CS= Condroitin Sulfato; DS= Dermatan Sulfato; HS= Heparan Sulfato; C= Controle; c=castração; IRC= Insuficiência renal crônica.

A análise dos pesos moleculares do GAGr total não mostrou diferença entre os grupos (~40 kD), enquanto os GAGu não mostraram um padrão definido para o peso molecular (Figura 23).

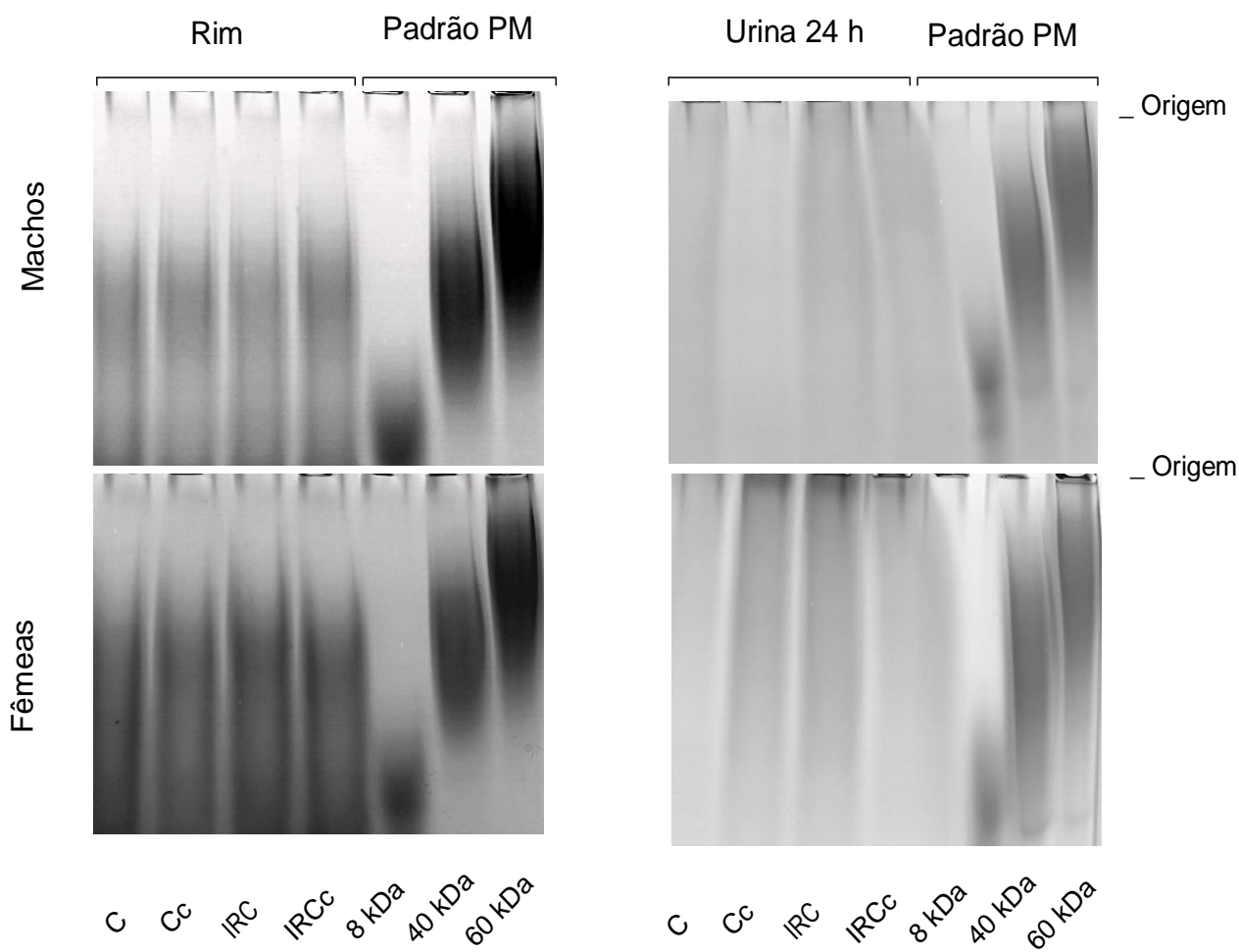


Figura 23 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dos GAGr e GAGu de ambos os gêneros

Legenda: GAGr= GAG total renal; GAGu= GAG total excretado na urina de 24h; PM= Peso molecular. C=controle; c=castração; IRC= Insuficiência renal crônica; M= Machos; F= Fêmeas.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos alterações renais precoces gênero-dependentes em ratos Wistar, comparando-se machos e fêmeas com IRC, após castração realizada com 5-6 semanas de idade. A cirurgia de castração foi realizada no período imediatamente anterior ao início da puberdade (102), a fim de evitarmos a interferência dos hormônios sexuais sobre a função renal.

É sabido que em decorrência da natureza fisiológica intrínseca aos gêneros, existem diferenças nos peso corporal (PC) e peso renal (PR) entre machos e fêmeas, sendo que nos machos as massas corporal e renal são maiores que nas fêmeas (73,78,83,84). No início do estudo, o PC foi distinto entre os gêneros e conforme esperado, as fêmeas apresentaram PC menor que os machos ($p < 0,05$), porém, os animais foram pareados por idade. Ao fim do estudo, sem considerar o grupo CMc, todos os demais grupos apresentaram ganho ponderal, sugerindo que o ganho de peso nos machos nesta faixa etária pode ser hormônio dependente. Os dados demonstram que os animais apresentaram boa recuperação dos procedimentos cirúrgicos aos quais foram submetidos.

A hipertrofia compensatória do tecido renal remanescente é um fenômeno já bem conhecido. Estudos têm demonstrado que os rins de animais submetidos à nefrectomia unilateral apresentam peso significativamente maior que o de animais intactos (74,84). Nossos dados mostram que 30 dias após redução da massa renal, houve aumento do peso renal (PR). Ao corrigirmos o PR por 100 g de PC, encontramos diferença significativa entre os grupos IRC comparados aos seus respectivos controles, achados que estão de acordo com outros estudos (84,103). Estes dados indicam que a hipertrofia renal é uma alteração precoce da IRC em ambos os gêneros. Cabe salientar que a maioria dos estudos com o modelo de redução de massa renal, utiliza os dados de PR corrigido por PC (73,78,92). No entanto, alguns autores advogam que esta forma de expressar os dados poderia mascarar possíveis diferenças existentes entre machos e fêmeas (73).

As avaliações bioquímicas mostraram que a creatinina, como esperado, foi mais elevada nos grupos IRC comparados aos controles, confirmando a insuficiência renal nestes animais. Quando analisamos os dados do *clearance* da creatinina

(CleCre) após 30 dias de estudo, observamos diminuição da função renal nos grupos IRC, sem diferença entre os gêneros.

Em situações patológicas, o mesângio é exposto a uma variedade de macromoléculas (2,16,42). Na dependência do tamanho, concentração, carga e afinidade dessas macromoléculas por componentes da matriz mesangial (MM), ou ainda, da quantidade de receptores expressos na superfície das células mesangiais, muitas destas macromoléculas podem ficar retidas na MM (2,42). As células mesangiais possuem um “processo” de eliminação destas macromoléculas que é de crucial importância no turnover do mesângio. A concentração de receptores mediadores de endocitose expressos na superfície celular e a modificação metabólica sofrida por estas macromoléculas nas células mesangiais são fatores determinantes para que ocorra degradação dessas macromoléculas. No entanto, este processo também pode ativar estas células desencadeando uma resposta inflamatória local (42). Desta forma, a quantidade de macromoléculas que alcança o mesângio tem um papel importante no processo de saturação dos mecanismos fisiológicos responsáveis pelo *turnover* local, podendo em última análise romper o equilíbrio entre síntese e degradação da MM, comprometendo assim a estrutura do mesângio.

Nas últimas décadas, a proteinúria (PTN), que é um marcador de lesão renal, tem sido apontada como o principal fator determinante da progressão da doença renal (52,53,66,67,104). Os animais com IRC do presente estudo, 30 dias após nefrectomia 5/6, já apresentavam PTN quando comparados aos controles. Nos machos IRC, a PTN foi significativamente maior que nas fêmeas, indicando um pior prognóstico para a função renal nos machos. Estes achados estão de acordo com os dados de Lombet et al.(74) que ao estudarem ratos e ratas Sprague-Dawley submetidos à nefrectomia 5/6, detectaram PTN significativamente maior nos ratos comparados às ratas, já com três semanas de IRC. Partindo-se do princípio de que a PTN aumentada reflete um aumento do tráfego de macromoléculas através do mesângio, esta pode ser uma das causas precoces de lesão glomerular nos machos. Em estudo anterior, verificamos que fêmeas IRC apresentam PTN com valores significativamente diferentes em relação aos machos, apenas após 90 dias de IRC (78) e as alterações glomerulares encontradas se relacionaram com os níveis de PTN. Após 30 dias de IRC, nos animais IRC observamos que a PTN nos machos castrados foi menor que nos não castrados, enquanto que nas fêmeas, a PTN foi semelhante entre os grupos IRC. Estes dados sugerem que os hormônios sexuais

apresentam impacto diferente entre os gêneros no que diz respeito à PTN. A ausência do hormônio sexual nos machos parece minimizar a PTN, enquanto que nas fêmeas parece não ter efeito em etapa precoce da IRC.

Os podócitos são células epiteliais viscerais diferenciadas e especializadas que se encontram firmemente ancoradas a membrana basal glomerular participando da barreira de filtração glomerular (58), tanto na manutenção estrutural como na filtração propriamente dita através dos *slits* de filtração, que seriam um filtro mais restritivo com aparência de zíper, permitindo apenas a passagem de proteínas com peso molecular inferior ao da albumina (57). O desenvolvimento de PTN em determinadas doenças renais tem estado associado às alterações na morfologia podocitária decorrentes de mudanças na expressão de proteínas específicas destas células, tais como nefrina, podocina e α -actina-4 (57,105); de interações anormais entre podócitos e MBG, devido à reorganização do citoesqueleto, principalmente nos pedicelos secundários (58); e a perda de cargas negativas presentes na superfície destas células (106). Como consequência destas alterações, ocorre o descolamento dos prolongamentos primários e secundários dos podócitos, ocasionando o desnudamento da parede do capilar glomerular e a perda do *slit* do diafragma (63). Os dados obtidos através da análise ultraestrutural dos podócitos revelaram alterações morfológicas pontuais no grupo dos machos IRC. Em algumas regiões da alça do capilar glomerular, observamos espessamento da MBG e parecem ter ocorrido alterações nos pedicelos, podendo indicar perda do *slit* do diafragma, o que poderia facilitar a PTN nestas regiões, em fase precoce da IRC. Nas fêmeas com IRC, estas alterações foram mais discretas e não observamos espessamento da MBG. Em estudo recente, Gagliardini et al. (107) mostraram a existência de poros, de diferentes formas (elipsóide e circular), na região central do *slit* do diafragma, com diâmetro maior que 50 Å. Estes poros foram demonstrados tanto em ratos Wistar como em ratos Munich-Wistar Fromter, com PTN espontânea, que mantinham morfologia podocitária normal. O aumento da lesão podocitária ocasiona a compactação da camada epitelial impedindo assim a perda de proteínas por estas regiões. Entretanto, em fase inicial de IRC, quando ainda não ocorrem lesões desse grau, pode-se supor que a PTN seja decorrente provavelmente da perda restritiva do *slit* do diafragma. Por outro lado, Comper et al. (108) defendem a hipótese de que a PTN é consequência de uma associação entre perda de proteína por esses poros maiores, mas principalmente, por falha nos mecanismos de reabsorção de proteínas pelas células do túbulo proximal.

A mensuração do volume de estruturas funcionais em diferentes tecidos é um parâmetro muito utilizado para avaliação do grau de hipertrofia tecidual (71,98). Relatos de estudos anátomo-patológicos em rins exibem um número de características comuns que incluem, independentemente de mudanças vasculares e intersticiais, um aumento adaptativo no volume glomerular (VG) sugerindo que a hipertrofia tem um importante papel em mediar o desenvolvimento subsequente de glomeruloesclerose (5). A análise estereológica do VG, realizada ao final do estudo, demonstrou que os grupos IRC não apresentaram hipertrofia glomerular após 30 dias de nefrectomia 5/6, e também não foram observadas diferenças gênero dependentes. Dados de literatura têm apresentado controvérsias quanto ao VG; alguns estudos têm falhado (74,83), enquanto outros têm demonstrado diferenças gênero-relacionadas no VG de ratos após ablação renal (92). A razão mais provável para estas divergências, pode ser decorrente de diferenças relacionadas ao tempo de estudo, sendo possível que 30 dias de IRC seja um período curto para avaliar hipertrofia glomerular.

O volume mesangial (VM) é a densidade de volume de mesângio no glomérulo, isto é, o volume ocupado pelo mesângio por unidade de volume de glomérulo. Alterações no VM podem estar relacionadas com alterações em quaisquer das estruturas glomerulares (109). Assim, o aumento do VM pode ocasionar redução da superfície glomerular disponível para filtração. No presente estudo, a análise do VM, mostrou expansão mesangial nos machos com IRC, sem influência da castração. Nas fêmeas, houve aumento do VM, porém, não significativo quando comparamos as fêmeas IRC e controles. Schwartz et al. (97) observaram expansão mesangial em ratos Wistar-Kyoto com 6 semanas de nefrectomia 5/6 quando comparados aos controles. Esta expansão foi demonstrada pelo aumento significativo do VM, decorrente da proliferação de células mesangiais e do aumento da MM. Neste estudo foi relatado hipertrofia compensatória sem sinais de injúria, resultados que corroboram com os nossos achados. Apesar da hipertensão arterial observada nos grupos com IRC, as avaliações histopatológicas não demonstraram alterações glomerulares, nem túbulo-intersticiais significativas nos grupos IRC estudados nesta fase precoce de IRC.

A existência de uma estreita relação entre hipertrofia glomerular e glomeruloesclerose tem sido associada à atuação local de um conjunto de fatores decorrentes de uma resposta adaptativa à redução de massa renal ao longo do processo de progressão da IRC. Dentre estes fatores, destacam-se os efeitos

autócrinos e/ou exócrinos sobre as células glomerulares residentes ocasionados por citocinas e fatores de crescimento, estimulando hipertrofia, proliferação e acúmulo de MEC. Embora a composição exata dos componentes bioquímicos presentes na MM expandida e na glomeruloesclerose, bem como a função de cada um deles neste contexto permaneçam incertas, vários estudos têm demonstrado alterações de colágeno do tipo IV, fibronectina, laminina (7,74) e glicosaminoglicanos (GAGs) (110,111). Miofibroblastos e/ou células renais residentes transdiferenciadas, que adquirem características de miofibroblastos tornando-se α -actina positiva (ACT+), através de processo mediado por TGF- β e PDGF, têm sido implicadas no processo inicial das lesões glomerulares e túbulo-intersticiais (13,15,112). No rim normal, poucos fibroblastos são encontrados e praticamente nenhum miofibroblasto está presente (113). Alguns estudos (12,13,19) têm demonstrado que o aparecimento de miofibroblastos precede o desenvolvimento de glomeruloesclerose e de lesão túbulo-intersticial. Além disso, mostram também uma estreita correlação entre o acúmulo dessas células com o grau de lesão renal. Aos 30 dias de nefrectomia 5/6, nossos dados mostraram que os machos IRC apresentaram maior imunomarcagem para ACT que as fêmeas, tanto no glomérulo como no interstício, sugerindo que este evento pré-fibrótico parece ser mais precoce nos machos. A presença de células com imunomarcagem para ACT no glomérulo tem sido atribuída a mudanças fenotípicas de células mesangiais que ocorreriam em consequência a estímulos de ativação e proliferação. A modulação fenotípica destas células, e também de fibroblastos intersticiais, para a expressão de ACT, parece ser uma característica precoce na fibrose renal progressiva (13). Da mesma forma, outros estudos descreveram o aparecimento de células ACT+ no interstício já após uma semana de nefrectomia 5/6. Esses estudos mostraram que células ACT+ aparecem no glomérulo em fase posterior, e poderiam ser derivadas da infiltração do tufo glomerular por miofibroblastos intersticiais e/ou periglomerulares (13,19,114). Os mecanismos indutores da transdiferenciação e proliferação de fibroblastos não estão totalmente esclarecidos, porém, miofibroblastos intersticiais expressam receptores para citocinas pró-fibrogênicas, tais como TGF- β e PDGF (115). Em nosso estudo observamos uma relação entre VM aumentado e presença de ACT na MM nos machos em fase precoce da IRC, podendo indicar maior estímulo a proliferação celular.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que células mesangiais de ambos os gêneros expressam receptores para estradiol e testosterona (32). Além disso, células

mesangiais derivadas do gênero masculino, em cultura, expressam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e interleucina 1 β , em presença de testosterona (116). O estradiol quando presente suprime a síntese de colágeno do tipo IV por estas células, sugerindo uma possível proteção do hormônio sexual feminino ao aumento do colágeno do tipo IV no glomérulo em diferentes doenças renais (86). Silbiger et al. (94) demonstraram a capacidade do estradiol em suprimir a transcrição do gene COL4 A1 e em reverter a síntese de colágeno do tipo IV estimuladas por TGF- β 1. Este fato é interessante porque alterações quantitativas no colágeno do tipo IV parecem influenciar a integração dos demais componentes da MECG (20,117). Assim, pode-se supor que outros componentes da MEC renal sofram modulação dos hormônios sexuais via receptores de superfície celular. Quaisquer alterações que quebrem a relação harmônica entre os diferentes tipos de células renais e a MEC, principalmente nas interações sinérgicas entre citocinas e fatores de crescimento (118), podem acarretar desequilíbrio nos mecanismos que regulam a síntese e a degradação dos componentes da MEC renal, desencadeando além de danos estruturais no glomérulo, expansão mesangial e glomeruloesclerose, além de lesão intersticial. Sullivan et al.(119) demonstraram que os hormônios sexuais femininos reduziram a inflamação e o estresse oxidativo renal em ratas espontaneamente hipertensas, implicando estes hormônios como um possível fator de proteção para o gênero feminino.

Nas últimas décadas, os GAGs sulfatados, moléculas carregadas negativamente, têm sido implicados apontados como participantes no mecanismo de seletividade da barreira de filtração glomerular (43-45,120-122). Os GAGs têm sido alvo de estudos na tentativa de relacioná-los ao desenvolvimento de PTN, expansão mesangial e glomerulosclerose (19,121,123). A quantificação dos GAGs renal total (GAGr) foi maior nas fêmeas nos grupos controles. No entanto, em animais com IRC, os GAGr aumentaram nos machos e diminuíram nas fêmeas; nos machos, a castração reverteu este aumento. Estes dados sugerem que, na fase inicial da IRC (após 30 dias), o hormônio masculino pode influenciar os mecanismos de síntese e/ou degradação de GAGr. A concentração de GAGs parece ser distinto entre os gêneros. Alguns autores mostraram que, independente da castração, as fêmeas adultas apresentam maior conteúdo de GAGs total na bexiga quando comparadas a fêmeas jovens (4 semanas) e aos machos, sugerindo que os GAGs podem variar com a idade e sexo (124) e também com o tipo de tecido (89).

Neste estudo, Independentemente do gênero, encontramos predomínio de HS no rim. No entanto, na presença de IRC, os machos apresentaram um aumento de HS e CS+DS, sugerindo um desequilíbrio quantitativo e/ou qualitativo nos GAGs (Figura 21). Sabe-se que vários fatores de crescimento e citocinas se concentram na MBG através da interação com o HS, participando do processo de remodelação tecidual (125), mecanismo apontado como crucial na resposta inflamatória. O aumento do HS no rim, além da presença de CS+DS, seguido pela PTN, pode representar um passo precoce importante nas alterações da matriz extracelular renal em ratos com IRC. Observamos que a castração reduziu significativamente os níveis do HS nos machos com IRC, mas não alterou CS+DS. Dados na literatura que os andrógenos podem aumentar, enquanto que os estrógenos proteger o desenvolvimento de lesões renais por mecanismos diferentes, talvez por uma cascata inversa de eventos que levam a glomeruloesclerose. O estrogênio reduz a proliferação de células mesangiais, síntese de colágeno, atividade de renina-angiotensina e sistema de produção de superóxido, enquanto a testosterona parece potencializar estes efeitos (80,90,96). Estes dados em conjunto, podem sugerir que o hormônio masculino interfere diretamente na síntese de GAGs em animais com IRC.

A seletividade por carga da MBG tem sido amplamente associada às propriedades eletrostáticas do HS, e uma correlação inversa entre HS e PTN tem sido sugerida (43,123,126). Encontramos um aumento simultâneo do HS renal e PTN em ratos com IRC, que foi revertido pela castração. Por outro lado, nas fêmeas IRC, a redução do HS correlacionou-se com o aumento da PTN, eventos não alterados pela castração. Novamente, parece viável a hipótese de que o hormônio sexual masculino pode desempenhar um papel na síntese de GAGr na fase inicial da IRC, interferindo na remodelação renal de MEC (4,86,109). Mudanças estruturais precoces tais como, acetilação e sulfatação de dissacarídeos no HS, semelhantes aos que ocorrem durante a maturação glomerular (110), podem ocorrer nos ratos com IRC, alterando a funcionalidade biológica desse HS *de-novo* na barreira de filtração glomerular.

Os GAGs excretados na urina são considerados como resultado principal do metabolismo glomerular, com pequena contribuição das vias urinárias e células tubulares, o que justificaria sua maior concentração na urina quando comparado ao sangue (127). Semelhantes a outros estudos, não encontramos diferenças no conteúdo GAGu dos grupos estudados, sugerindo que a excreção urinária de GAGs pode não se correlacionar diretamente com o conteúdo GAGr (45,127). Por outro

lado, outros trabalhos (34,48,128) demonstraram redução significativa na GAGu em ratos diabéticos e na presença de glomerulonefrite, sugerindo que a excreção de GAGs na urina pode variar de acordo com a doença renal. Amostras em *pool* por grupo de animais foram utilizadas para analisar o perfil GAGu em gel de agarose. Estes foram similares para ambos os gêneros, como observado em outros estudos (45,127). No entanto, nos ratos com IRC observamos uma redução da densidade do GAGu, refletindo uma possível mudança qualitativa nestes grupos (Figura 18). A presença de GAGs não-sulfatados e/ou dessulfatados foi evidenciada em machos e fêmeas após a coloração com Stains-All.

Diferentemente das amostras de GAGr que apresentaram peso molecular de ~40kD para todos os grupos, os GAGu não apresentaram um padrão de peso molecular definido. Especialmente nas fêmeas, regiões de metacromasia foram observadas próxima a origem, evidenciando moléculas de maior peso molecular (Figura 23). Este achado pode indicar a presença de ácido hialurônico proveniente do sistema urogenital (129). A interpretação destes resultados deve levar em conta a variedade de métodos usados para extração e quantificação de GAGu e, também, o fato de que as análises de urina incluem a presença de diferentes fontes de material biológico com propriedades químicas diferentes.

Independentemente do envolvimento funcional do HS no mecanismo de ultrafiltração glomerular, o HS também está relacionado a importantes funções fisiológicas no rim, como mencionado anteriormente. Ligando-se a outras moléculas servem de ancoragem e estocagem para fatores de crescimento e citocinas com propriedades pró-inflamatórias, inibem a proliferação de células mesangiais, funções que afetam a inflamação, proliferação e expansão mesangial, etapas importantes na doença renal (43). Em fase inicial da IRC, alterações conformacionais na molécula de HS podem manter células recrutadas e residentes (epiteliais e mesangiais) em constante ativação, sob influência dos hormônios sexuais. Na IRC, mudanças conformacionais causadas por endossulfatases e/ou heparanases (49,121) ou ainda por espécies reativas de oxigênio podem remover epitopos essenciais às funções biológicas do HS, contribuindo para a disfunção (96) da barreira de filtração glomerular, causando PTN nos machos.

Em resumo, ao estudarmos ratos e ratas castrados e 30 dias após redução da massa renal, observamos diferenças gêneros-dependentes em uma fase precoce da IRC. Os machos com IRC apresentaram maior PTN acompanhada de maior

comprometimento mesangial, além da presença de ACT e HS significativamente maior comparados com as fêmeas. Estas alterações foram reduzidas nos machos castrados. Estes dados primeiramente sugerem que o hormônio masculino pode ter um papel na manutenção do equilíbrio mesangial. Em segundo lugar, possivelmente a maior PTN foi também responsável pela expansão mesangial. Adicionalmente, a presença de maior concentração de HS neste grupo sugere que durante o processo de remodelação da MEC, tenha ocorrido geração *de novo* HS, funcionalmente defeituoso, comprometendo a estrutura da barreira de filtração glomerular, corroborando com a perda de seletividade da mesma, e colaborando com a maior PTN observada. Por outro lado, as fêmeas com IRC apresentaram alterações mais discretas comparadas aos machos. Ao contrário dos machos, as fêmeas com IRC apresentaram decréscimo de HS renal associado à PTN e, a castração não alterou este perfil. Concluindo, observamos que a PTN ocorre precocemente na IRC, contribuindo para o desequilíbrio da MEC renal e, que os mecanismos envolvidos nestes processos parecem sofrer influência dos hormônios sexuais, onde os hormônios masculinos agravam estas alterações possivelmente contribuindo para um pior prognóstico da doença renal nos machos.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo observamos algumas alterações gênero-dependentes em fase precoce (30 dias) de insuficiência renal crônica (IRC) em ratos Wistar, submetidos à nefrectomia 5/6:

- a) proteinúria foi maior em ratos IRC;
- b) a expansão mesangial mostrou-se mais exacerbada nos ratos IRC;
- c) a presença de alfa-actina apresentou-se aumentada nos machos com IRC, sugerindo a participação precoce de miofibroblastos, no processo de expansão mesangial;
- d) discretas alterações na morfologia podocitária e espessamentos pontuais da membrana basal glomerular foram observados nos ratos com IRC;
- e) a relação entre proteinúria e heparan sulfato (HS) renal foi distinta entre os gêneros: As fêmeas apresentaram proteinúria elevada e HS diminuído; nos machos, proteinúria e HS renal mostraram-se aumentados. Fato que sugere, nos machos, uma provável síntese *de novo* HS funcionalmente comprometido. A castração reverteu este efeito nos machos, sugerindo a possibilidade da participação do hormônio sexual masculino neste processo;
- f) a quantidade absoluta de proteínas que atravessa o capilar glomerular bem como a síntese de HS parece ter um papel fundamental na expansão mesangial precoce nos ratos com IRC; e os mecanismos responsáveis por este processo parecem ser potencializados pelo hormônio sexual masculino.

REFERÊNCIAS

- 1- Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116:288-296.
- 2- Waldherr R, Cuzic S, Noronha IL. Pathology of the human mesangium in situ. *Clin Investig* 1992;70:865-874.
- 3- Eng E, Floege J, Young BA, Alpers CE, Couser WG, Johnson RJ. Is mesangial cell proliferation required for extracellular matrix expansion in glomerular disease? *Contrib Nephrol* 1994;107:156-162.
- 4- Ruiz-Torres MP, López-Ongil S, Griera M, Díez-Marqués ML, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. The accumulation of extracellular matrix in the kidney: Consequences on cellular function. *J Nephrol* 2005;18:334-340.
- 5- Rennke HG, Anderson S, Brenner BM. The progression of Renal Disease: Structural and Functional Correlations. In: Tisher CC, Brenner BM, editors. *Renal Pathology with Clinical and Functional Correlations*. Vol I, 2th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1993;116-139.
- 6- Zatz R, Noronha IL, Fijihara CK. Experimental and clinical rationale for use of MMF in nontransplant progressive nephropathies. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F1167-F1175.
- 7- Floege J, Alpers CE, Burns MW, Pritzl P, Gordon K, Couser WG, et al. Glomerular Cells, extracellular Matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant Kidney model. *Lab Invest* 1992;66: 485-497.
- 8- Floege J, Johnson RJ, Couser WG. Mesangial cells in the pathogenesis of progressive glomerular disease in animal models. *Clin Invest* 1992;70: 857-864.
- 9- Floege J, Johnson RJ, Gordon K, Yoshimura A, Campbell C, Iruela-Arispe L, Alpers CE, Couser WG. Altered glomerular extracellular matrix synthesis in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 1992; 42:573-585.

- 10- Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 1996;49:666-678.
- 11- Floege J, Burns MW, Alpers CE, Yoshimura A, Pritzl P, Gordon K, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney Int.* 1992;41:297-309.
- 12- Zhang L, Aoyagi D, Nakazawa K, Otani M. Post-inflammatory glomerular remodeling is influenced by transformed mesangial cells. *Pathol Int* 2005; 55:189-201.
- 13- Muchaneta-Kubara EC, El Nahas AM. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:904-915.
- 14- Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, et al. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats *Kidney Int* 1998;54:864-876.
- 15- Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Yang WC, Mu W, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1967-1974.
- 16- Shultz PJ, Raji L. The glomerular mesangium: Role in initiation and progression of renal injury. *Am J Kidney Dis* 1991; 17 (suppl 1):8-14.
- 17- Striker GE, Peten EP, Yang CW, Striker LJ. Glomerulosclerosis: Studies of its pathogenesis in humans and animals. *Contrib Nephrol* 1994;107:124-131.
- 18- Rupperecht HD, Schöcklmann HO, Sterzel RB. Cell-matrix interactions in the glomerular mesangium. *Kidney Int* 1996;49:1575-1582.
- 19- Petrica L, Raica M, Schiller A, Velciov S, Gluhovschi G, Trandafirescu V, et al. Glycosaminoglycans and myofibroblasts modulate the glomerular and tubulointerstitial injury in primary type I mesangiocapillary glomerulonephritis. *Sci J Facta Universitatis* 2000;7:31-38.
- 20- Vleming LJ, Baelde JJ, Weestendorp RG, Daha MR, van ES LA, Bruijn JA. The glomerular deposition of PAS positive material correlates with renal function in human kidney diseases. *Clin Nephrol* 1997; 47:158-167.

- 21- Border WA, Brees D, Noble NA. Transforming Growth Factor-beta and extracellular matrix deposition in the Kidney. *Contrib Nephrol* 1994;107:140-145.
- 22- Ding G, Van Goor H, Ricardo SD, Orłowski JM, Diamond JR. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int* 1997; 51:147-154.
- 23- Davies M, Martin J, Thomas GJ. Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney Int* 1992; 41:671-678.
- 24- Couchman JR, Beavan LA, McCarthy K. Glomerular matrix: Synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney Int* 1994; 45: 328-335.
- 25- Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 1990;38: 384-394.
- 26- Remuzzi A, Remuzzi G. Glomerular perm-selective function. *Kidney Int* 1994; 45:398-402.
- 27- Adamczack M, Gross ML, Amann K, Ritz E. Reversal of glomerular lesions involves coordinated restructuring of glomerular microvasculature. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3063-3072.
- 28- Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, Bonomelli M, Piccinelli M, Benigni A, et al. ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int* 2006; 69:1124-1130.
- 29- Fogo AB. New capillary growth: a contributor to regression of sclerosis? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14:201-203.
- 30- Ruggenenti P, Remuzzi G. The role of protein traffic in the progression of renal diseases. *Ann Rev Med* 2000;51:315-327.
- 31- Ma LJ, Nakamura S, Whitsitt JS, Marcantoni C, Davidson JM, Fogo AB. Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1. *Kidney Int* 2000;58:2425-2436.

- 32- Oomura A, Nakamura T, Arakawa M, Ooshima A, Isemura M. Alterations in the extracellular matrix components in human glomerular diseases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989; 415:151-159.
- 33- Kanahara K, Yorioka N, Arita M, Ohira N, Yamakido M. Immunohistochemical studies of extracellular matrix components and integrins in Ig A nephropathy. *Nephron* 1994;66:29-37.
- 34- Cadaval RAM, Kohlman O, Michelacci YM. Urinary excretion of glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus. *Glycobiology* 2000;10:185-192.
- 35- Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor β_1 *Kidney Int* 1992;41:1213-1221.
- 36- Abrahamson DR. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am J Physiol* 1987; 253:F783-F794.
- 37- Courtoy PJ, Timpl R, Farquhar MG. Comparative distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in the rat glomerulus. *J Histochem Cytochem* 1982; 30:874-886.
- 38- Hudson BG, Kalluri R, Gunwar S, Noel Ken ME. Structure and organization of type IV collagen of renal glomerular basement membrane. In: Koide H, Hayashi T, eds. *Extracellular Matrix in the Kidney. Contrib. Nephrol* vol 107. Basel: Karger, 1994:163-167.
- 39- Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. In: Barry M, Brenner BM, eds. *The Kidney*, vol I, 5th ed. Philadelphia. W.B Saunders, 1996.pg 03-71.
- 40- Kriz W, Elger M, Mundel P, Lemley KV. Structure-Stabilizing Forces in the Glomerular Tuff. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1731-1739.
- 41- Inkyo-Hayasaka K, Sakai T, Kobayashi N, Shirato I, Tomino Y. Three-dimensional analysis of the whole mesangium in the rat. *Kidney Int* 1996;50: 672-683.
- 42- Schlöndorff D. Roles of the mesangium in glomerular function. *Kidney Int* 1996;49:1583-1585.

- 43- Raats CJI, van den Born J, Berden JHM. Glomerular heparan sulfate alterations: Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int* 2000; 57:385-400.
- 44- Denzer AJ, Schulthess T, Fauser C, Schumacher B, Kammerer RA, Engel J, et al. Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *EMBO J* 1998; 17:335-343.
- 45- Michelacci YA, Cadaval RAM, Rovigatti RM, Kohlman O. Renal and urinary glycosaminoglycans in an experimental model of chronic renal failure in rats. *Exp Nephrol* 2001;9:40-48.
- 46- De Muro P, Faedda R, Satta A, Finetti D, Masala A, Cigni A, et al. Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. *J Nephrol* 2005;18:154-160.
- 47- Baggio B, Gambaro G, Briani G, Favaro S, Borsatti A. Urinary excretion of glycosaminoglycans and brush border and lysosomal enzymes as markers of glomerular and tubular involvement in kidney diseases. *Contrib Nephrol* 1984; 42:107-110.
- 48- Lima CR, Aguiar JAK, Michelacci YM. Reduced urinary excretion of sulfated polysaccharides in diabetic rats. *Bioch Biophys Acta* 2005; 1741:30-41.
- 49- Guimarães MA, Nikolovski J, Pratt LM, Greive K, Comper WD. Anomalous fractional clearance of negatively charged Ficoll relative to uncharged Ficoll. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F1118-F1124.
- 50- Guimarães MAM, Mourão PAS. Urinary excretion of sulfated polysaccharides administered to wistar rats suggests a renal permeability to these polymers based on molecular size. *Bioch Biophys Acta* 1997;1335:161-172.
- 51- Burne MJ, Adal Y, Cohen N, Panagiotopoulos S, Jerumns G, Comper WD. Anomalous decrease in dextran sulfate clearance in the diabetic rat kidney. *Am J Physiol* 1998;274:F700-F708.
- 52- Burton C, Harris KPG. The Role of Proteinuria in the Progression of Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* 1996;27:765-775.

- 53- Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* 1997;51:2 - 15.
- 54- Harvey SJ, Miner JH. Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:393-398.
- 55- Morita H, Yoshimura A, Kimata K. The role of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney Int* 2008;73:247-248.
- 56- Miner JH. A molecular look at the glomerular barrier. *Nephron Exp Nephrol* 2003; 94:e119-e122.
- 57- Tryggvason K, Wartiovaara J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypert* 2001;10:543-549.
- 58- Shakland SJ. The podocyte's reponse to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-2147.
- 59- Pavenstädt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol renal Physiol* 2000;178:F173-F179.
- 60- Zoja C, Abbate M, Remuzzi G. Progression of chronic kidney disease: insights from animal models. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:250-257.
- 61- Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR. renal redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic nephropathy: Paying homage to the podocyte. *Am J Nephrol* 2005;25:553-569.
- 62- Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14:205-210.
- 63- Lahdenkari A, Lounatmaa K, Patrakka J, Holmberg C, Wartiovaara J, Kestila M, et al. Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 2611-2618.
- 64- Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: Podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005;54:1626-1634.

- 65- Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 1733-1741.
- 66- Benigni A, Zoja C, Remuzzi G. Biology of Disease – the renal toxicity of sustained glomerular protein traffic. *Lab Invest* 1995;73: 461-468.
- 67- Bruzzi I, Benigni A, Remuzzi G. Role of increased glomerular protein traffic in the progression of renal failure. *Kidney Int* 1997; 52 (suppl 62):S29-S31.
- 68- Fine L. The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int* 1986;29:619-634.
- 69- Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988; 318:1657-1666.
- 70- Akaoka A, White RHR, Raafat F. Glomerular morphometry in childhood reflux nephropathy, emphasizing the capillary changes. *Kidney Int* 1995; 47:1108-1114.
- 71- Cahill MM, Kett MM, McCausland JE, Alcorn D, Bertran JF. Glomerular stereology: Why, what and how to measure glomerular structure. *Nephrology* 1992; 2:305-313.
- 72- Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Estimations of glomerular volume: A comparison of four methods. *Kidney Int* 1992; 41:1085-1089.
- 73- Munger K, Baylis C. Sex differences in renal hemodynamics in rats. *Am J Physiol* 1988; 254 (2 Pt 2): F223-F231.
- 74- Lombet JR, Adler SG, Anderson PS, Nast CC, Olsen DR, Glassock RJ. Sex vulnerability in the subtotal nephrectomy model of glomerulosclerosis in the rat. *J Lab Clin Med* 1989;114:66-74.
- 75- Sakemi T, Ohtsuka N, Tomiyoshi Y, Morito F. Sex difference in progression of adriamycin-induced nephropathy in rats. *Am J Nephrol* 1996; 16:540-547.

- 76- Cowley BD, Rupp JC, Muessel MJ, Gattone VH. Gender and the effect of gonadal hormones on the progression of inherited polycystic kidney disease in rats. *Am J Kidney Dis* 1997; 29:265-272.
- 77- Coggins CH, Lewis JB, Caggiula AW, Castaldo LS, Klahr S, Wang SR. Differences between women and men with chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1430-1437.
- 78- Lemos CCS, Mandarim-de-Lacerda CA, Dorigo D, Coimbra TM, Bregman R. Chronic renal failure in male and female rats. *J Nephrol* 2005;18:368-373.
- 79- Silbiger S, Neugarten J. Gender and human chronic renal disease. *Gender Med* 2008; 5 (suppl A): S3-S10.
- 80- Sandberg K. Mechanisms underlying sex differences in progressive renal disease. *Gender Med* 2008; 5:10-23.
- 81- Rosman JB, Langer K, Brandl M, Piers-Becht TP, van der Hem GK, ter Wee PM, et al. Protein-restricted diets in chronic renal failure: a four-year follow-up shows limited indications. *Kidney Int* 1989; 36 (suppl 27): S96-S106.
- 82- Hannedouche T, Chauveau P, Kalou F, Albouze G, Lacour B, Jungers P. Factors affecting progression in advanced chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1993;39: 312-320.
- 83- Remuzzi A, Puntoriere S, Mazzoleni A, Remuzzi G. Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int* 1988; 34: 481-486.
- 84- Baylis C, Wilson CB. Sex and the single kidney. *Am J Kidney Dis* 1989; 13:290-298.
- 85-. Neugarten J, Silbiger R. Effects of sex hormones on mesangial cells. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:147-151.
- 86- Kwan G, Neugarten J, Sherman M, Ding Q, Fotadar U, Lei J, et al. Effects of sex hormones on mesangial cell proliferation and collagen synthesis. *Kidney Int* 1996; 50:1173-1179.

- 87- Verhagen MG, Attia DMA, Koomans HA, Joles JA. Male gender increases sensitivity to proteinuria induced by mild NOS inhibition in rats: role of sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:F664-F670.
- 88- Seliger SL, Davis C, Stehman-Breen C. Gender and the progression of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:219-225.
- 89- Fortepiani LA, Yanes L, Zhang H, Racusen LC, Reckelhoff JF. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. *Hypertension* 2003; 42:952-955.
- 90- Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem* 2004; 279: 52282-52292.
- 91- Gross ML, Adamczak M, Rabe T, Harbi NA, Krtil J, Koch A, et al. Beneficial effects of estrogens on indices of renal damage in uninephrectomized SHRsp rats. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 348-358.
- 92- Silbiger SR, Neugarten J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 515-533.
- 93- Katayama S, Lee JB. Estradiol stimulates rat renopapillary prostaglandin E₂ (PGE₂), but not alpha biosynthesis. *Endocrinology* 1985; 117:656-661.
- 94- Silbiger SR, Lei J, Ziyadeh FN, Neugarten J. Estradiol reverses TGF- β 1-stimulated type IV collagen gene transcription in murine mesangial cells. *Am J Physiol (6 Pt 2)* 1998;274:F1113-F1118.
- 95- Okuniewski R, Davis EA, Jarrot B, Widdop RE. A comparison of the development of renal hypertension in male and female rats. *Clin Science* 1998; 95:445-451.
- 96- Ji H, Pesce C, Zheng W, Kim J, Zhang Y, Menini S, et al. Sex differences in renal injury and nitric oxide production in renal wrap hypertension. *Am J Physiol Heart Physiol* 2005;288:H43-H47.
- 97- Schwartz MM, Bidani A. Mesangial structure and function in the remnant kidney. *Kidney Int* 1991;40:226-237.

- 98- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966;30:23-38.
- 99- Taylor KA, Buchanan-Smiter JG. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Analytical Biochemistry* 1992;201:190-196.
- 100- Tovar AMF, Cesar CF, Leta GC, Mourão PAS. Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans. Species with low affinity for plasma low-density lipoproteins, and not species with high affinity, are preferentially affected. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 604-614.
- 101- Volpi N, Maccari F. Simultaneous detection of submicrogram quantities of hyaluronic and dermatan sulfate on agarose-gel by sequential staining with toluidine blue and stains-all. *J Chromatography B* 2005;820:131-135.
- 102- Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002.
- 103- Gretz N, Ceccherini I, Kränzlin B, Klötting I, Devoto M, Rohmeiss P, et al. Gender-dependent disease severity in autosomal polycystic disease of rats. *Kidney Int* 1995; 48:496-500.
- 104- Ruggenti P, Perna A, Mosconi L, Matalone M, Pisoni R, Gaspari F, et al. Proteinuria predicts end-stage failure in non-diabetic chronic nephropathies. *Kidney Int* 1997; 52(suppl 63): S54-S57.
- 105- Koop K, Eikmans M, Wehland M, Baelde H, Ijpelaar D, Kreutz R, et al. Selective loss of podoplanin protein expression accompanies proteinuria and precedes alterations in podocyte morphology in a spontaneous proteinuric rat model. *Am J Pathol* 2008; 173:315-326.
- 106- Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, et al. Loss of heparin sulfate glycosaminoglycan assembly podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 2008;74:289-299.
- 107- Gagliardini E, Conti S, Benigni A, Remuzzi G, Remuzzi A. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:2081-2089.

- 108- Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM. Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1589-F1600.
- 109- Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DER, Mauer M. Cell and matrix components of the glomerular mesangium in the type I diabetes. *Diabetes* 1992;41:679-684.
- 110- Bernardini N, Cupisti A, Mattii L, Segnani C, Dolf A, Barsotti M, et al. Effect of heparan sulphate on kidney tissue expression of TGF- β , RhoA, laminin and fibronectin in subtotaly nephrectomized rats. *J Nephrol* 2002;15:530-538.
- 111- Lauer ME, Hascall VC, Wang A. Heparan sulfate analysis from diabetic rat glomeruli . *J Biol Chem* 2007; 282:843-852.
- 112- Desmolière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: Role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003;83:1689-1707.
- 113- Hischberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:43-52.
- 114- El Nahas AM. Glomerulosclerosis: Intrinsic and extrinsic pathways. *Nephrol Dial Transpl* 1996;11:773-777.
- 115- Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int* 2009; 75:475-481.
- 116- Pawluczyk IZA, Tan EKC, Harris KPG. Rat mesangial cells exhibit sex-specific profibrotic and proinflammatory phenotypes. *Nephrol Dial Transpl* 2009;24:1753-1758.
- 117- Cosio FG. Fibronectin metabolism by human mesangial cells effects of collagens. *Am J Physiol* 1993; 264(Renal Fluid Electrolyte Physiol 33):F106-F119.
- 118- Pawluczyk IZA, Harris KPG. Cytokine interations promote synergistic fibronectin accumulation by mesangial cells. *Kidney Int* 1998;54:62-70.

- 119- Sullivam JC, Semprun-Prieto L, Boesen EI, Pollock DM, Pollock JS. Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293:R1573-R1579.
- 120- Wijnhoven TJ, Lensen JF, Wismans RG, Lefeber DJ, Rops AL, van der Vlag J, et al. Removal of heparan sulfate from the glomerular basement membrane blocks protein passage. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 3119-3127. Retraction in: *J Am Soc Nephrol* 2008;19:647.
- 121- van den Hoven MJ, Wijnhoven TJ, Li JP, Zcharia E, Dijkman HB, Wismans RG, et al. Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 2008; 73: 278-287.
- 122- Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K, Miner JH. Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2044-2051.
- 123- van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Weening JJ, et al. Distribution of GBM heparan sulfate proteoglycan core protein and side chains in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1993;43:454-463.
- 124- Cabral CAP, Sampaio FJB, Cardoso LEM. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycans and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol* 2003;170:512-516.
- 125- Parish CR. The role of heparin sulphate in inflammation. *Nature Rev Immunol* 2006;6:633-643.
- 126- Celie JW, Reijmers RM, Slot EM, Beelen RH, Spaargaren M, Ter Wee PM, et al. Tubulointerstitial heparan sulfate proteoglycan changes in human renal diseases correlate with leukocyte influx and proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F253-F263.
- 127- Lee EY, Kim SH, Whang SK, Hwang KY, Yang JO, Hong SY. Isolation, identification and quantification of urinary glycosaminoglycans. *Am J Nephrol* 2003;23:152-157.

- 128- Kaznowska-Bystryk I, Al Naal M, Jaroszynski A, Solski J. Changes in the excretion of glycosaminoglycans with urine in patients with glomerular disease. *Ann Uni. Mariae Curie Sklodowska Med* 2007;20:35-40.
- 129- de Deus JM, Girão MJ, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, et al. Glycosaminoglycans profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progestogen, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1654-1659.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/220/2008** sobre "**Diferenças gênero-dependentes na progressão da doença renal crônica**", sob a responsabilidade de **Carla Carneiro da Silva Lemos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **25/03/2008**. Este certificado expira em **25/03/2010**.

Rio de Janeiro, 25 de março de 2008.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonio Carlos da Silva', is written over a horizontal line.

Prof. Antonio Carlos da Silva
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ

ANEXO B - Comprovação de submissão do 1º artigo científico



MANUSCRIPT HOME AUTHOR INSTRUCTIONS REFEREE INSTRUCTIONS HELP TIPS LOG-OUT JOURNAL HOME

Detailed Status Information

Manuscript #	2339R2
Current Revision #	2
Other Versions	2339 2339R1
Submission Date	2012-12-04 08:23:14
Current Stage	Under Review
Title	EFFECTS OF CASTRATION ON RENAL GLYCOSAMINOGLYCANS AND THEIR URINARY EXCRETION IN MALE AND FEMALE RATS WITH CHRONIC RENAL FAILURE.
Running Title	Glycosaminoglycans and chronic renal failure
Manuscript Type	Full Paper
Corresponding Author	Carla Lemos (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)
Contributing Authors	Ana Maria Tovar , Marco Antonio Guimarães , Rachel Bregman Glycosaminoglycans participate in a variety of processes in the kidney, and evidences suggest gender-related hormones participating in renal function. The aim of this study was to analyze the relation of glycosaminoglycans, gender and proteinuria in male and female rats with chronic renal failure. Glycosaminoglycans were analyzed in total kidney tissue and 24-hours urine of castrated (c) male (M) and female (F) Wistar control (C) rats (CM, CMc, CF, CFc) and after 30 days of chronic renal failure induced by 5/6 nephrectomy (CRFM, CRFMc, CRFF, CRFFc). Total glycosaminoglycans quantification and their composition were determined using agarose and polyacrylamide gel electrophoresis respectively. Renal glycosaminoglycans were higher in CF compared to CM. CRFM presented increase in renal glycosaminoglycans, heparan sulfate and proteinuria, while castration reduced these parameters. Differently, CRFF and CRFFc groups presented a decrease of renal glycosaminoglycans concomitant with an increase in proteinuria. Our results suggest that in CRFM, the absence of sex hormones alters quantitatively GAGs, mainly HS, and possibly glomerular filtration barrier leading to proteinuria. Corroborates with this theory the lack of this response in CRFMc, where heparan sulfate did not increase. Lastly, this pattern was not observed in females. Further studies in chronic renal failure are needed to clarify gender-dependent differences in heparan sulfate synthesis.
Abstract	
Section Editor	Assigned
Key Words	Castration, Chronic renal failure, Gender, Glycosaminoglycans, roteinuria
Subject Areas	Biomedical Sciences/Experimental Biology
Conflict of Interest	No , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Publication Charges	CCL

Stage	Start Date
Under Review	2012-12-13 08:21:39
Reviewing Editor Assigned	2012-12-13 08:21:38
Initial QC	2012-12-04 08:23:14
Manuscript Submission	2012-12-04 08:01:57

ANEXO C - Formato final do 1^o artigo científico submetido

EFFECTS OF CASTRATION ON RENAL GLYCOSAMINOGLYCANS AND THEIR URINARY EXCRETION IN MALE AND FEMALE RATS WITH CHRONIC RENAL FAILURE.

Carla C.S. Lemos¹, Ana Maria F. Tovar³, Marco Antonio M. Guimarães², Rachel Bregman¹

¹ Disciplina de Nefrologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

² Departamento de Patologia e Laboratórios, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

³ Laboratório de Tecido Conjuntivo, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil .

Correspondence:

C.C.S. Lemos

Estrada Engenho da Pedra 281/201

21031 030, Ramos, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

Phone number: 55 21 28688045

Fax number: 55 21 2565 7210

E-mail: lemoscc@hotmail.com

Running Title: Glycosaminoglycans and chronic renal failure

Key words: Castration; Chronic renal failure; Gender; Glycosaminoglycans;

Proteinuria.

Abstract

Glycosaminoglycans participate in a variety of processes in the kidney, and evidences suggest gender-related hormones participating in renal function. The aim of this study was to analyze the relation of glycosaminoglycans, gender and proteinuria in male and female rats with chronic renal failure. Glycosaminoglycans were analyzed in total kidney tissue and 24-hours urine of castrated (c) male (M) and female (F) Wistar control (C) rats (CM, CMc, CF, CFc) and after 30 days of chronic renal failure induced by 5/6 nephrectomy (CRFM, CRFMc, CRFF, CRFFc). Total glycosaminoglycans quantification and their composition were determined using agarose and polyacrylamide gel electrophoresis respectively. Renal glycosaminoglycans were higher in CF compared to CM. CRFM presented increase in renal glycosaminoglycans, heparan sulfate and proteinuria, while castration reduced these parameters. Differently, CRFF and CRFFc groups presented a decrease of renal glycosaminoglycans concomitant with an increase in proteinuria. Our results suggest that in CRFM, the absence of sex hormones alters quantitatively GAGs, mainly HS, and possibly glomerular filtration barrier leading to proteinuria. Corroborates with this theory the lack of this response in CRFMc, where heparan sulfate did not increase. Lastly, this pattern was not observed in females. Further studies in chronic renal failure are needed to clarify gender-dependent differences in heparan sulfate synthesis.

Introduction

Glycosaminoglycans (GAGs) are anionic polysaccharides composed of repeating disaccharides units of amino sugar and hexuronic acid. Six types of GAGs are described in mammalian tissues: chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate, heparan sulfate (HS), heparin and hyaluronic acid. Their characteristics is the presence of anionic charges due to the presence of sulfate and carboxyl groups from the hexuronic acid, exceptions are hyaluronic acid which is not sulfated and the keratan sulfate which contains D-galactose instead of hexuronic acid. In tissues, besides hyaluronic acid, all occurring GAGs are covalently attached to proteins forming the proteoglycans; they are widely distributed on cell surface, in intracellular granules, and are essential components of the extracellular matrix (1).

GAGs have been implicated in several pathophysiological processes: tissue organization, cell growth and maturation, modulation of the action of growth factors and collagen fibrillogenesis, among others. In the kidney, HS is the most abundant GAGs, mainly present in the glomerular extracellular matrix (ECM), which is formed by the mesangium and basement membrane of the glomerular capillary. Besides its ability to bind to other components of glomerular ECM, especially laminin and collagen, helping in maintaining the molecular architecture of this matrix, an important role in the glomerular permselectivity is also suggested to HS (2). Changes in this selectivity may be responsible for proteinuria (PTN), which has been considered the main marker of glomerular injury and, is directly correlated to the renal function loss (3-5).

Moreover, glomerular ECM presents fluidity as a consequence of the negative charge of HS, which retains sodium ions and water molecules, allowing thus the anchoring of growth factors and cytokines, which ultimately modulates the mesangial expansion. These mechanisms are pointed as the early steps in the process of progression of chronic renal failure (CRF) that together with the PTN, precede glomerulosclerosis (4,6).

GAGs excreted in the urine (uGAGs) have been used as a marker of the severity of glomerular diseases, since they may reflect biochemical changes in the glomerular ECM (7,8). However, the precise role of GAGs on the mechanisms that compromised the glomerular filtration barrier is not totally clarified.

Additionally, some studies point sex hormones as being responsible for a faster progression of CRF in males (9-13). However, studies focusing GAGs composition and content in the kidney and urine in deprivation of sex hormones are lacking.

The aim of the present study was to evaluate the composition of GAGs in the kidney and in the urine of male and female rats with CRF undergoing castration, in order to analyze possible gender-dependent changes between GAGs and renal function. We found quantitative differences in HS and PTN related to sex hormones in CRF model.

Materials and Methods

Experimental Model

Randomly, male (M) and female (F) Wistar rats with 5 weeks old were divided in castrated (c) and non castrated groups (Figure 1). After two weeks they randomly undergone 5/6 nephrectomy, which was the study day 0. Animals were separated in 8 groups: castrated and non castrated control (C) groups (CMc, n=5; CFc, n=5; C: CM, n=5; CF, n= 4) and those submitted to 5/6 reduction of total renal mass (CRFMc, n=5; CRFFc n=6; CRF: CRFM, n=5; CRFF, n=6). Animals were submitted to sham nephrectomy (CM sham, n=4 e CF sham, n=4). Surgical procedures were performed with animals anesthetized intraperitoneally with sodium thiopental (50 mg/Kg body weight). In male rats, castration was performed through the removal of the testicles; in female, the ovaries were removed through bilateral lumbar incision. Reduction of total renal mass was performed through abdominal incision, and left renal artery was isolated and 2 or 3 branches were ligated; right nephrectomy was then performed through lumbar incision. This procedure was performed on day 0, and the animals were maintained on a standard rat chow (57% carbohydrate, 22% protein and 4% fat - Nuvilab® CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) and water *ad libitum* until the end of the study (after 30 days). All procedures were carried out in accordance with the conventional guidelines of the Care and Use

of Laboratory Animals (US National Institutes of Health 85-23, revised in 1996). The experimental protocols were approved by the local Committee for the Use and Care of Experimental Animals of the Institute of Biology of the State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Proteinuria and Glomerular Filtration Rate

At the day 30, animals were placed in metabolic cages (Nalgene), where they were previously been trained to, and received only water *ad libitum*, to collect 24-h urine. Two samples for each animal were collected: one for measurement of urinary creatinine and PTN; and the other for extraction of urinary GAGs (u GAGs). Urine volumes were measured, and urine stored at -20°C for subsequent evaluations. At the end of the collection, animals were anesthetized and sacrificed by exsanguination. A blood sample was taken for creatinine determination. The kidneys were removed, weighed and, conserved in acetone. PTN was measured by sulfosalicylic method (14). Urinary and serum creatinine were determined by kinetic modified Jaffé method in the Central Laboratory of the Pedro Ernesto Hospital. Renal function was determined by creatinine clearance corrected by 100g of body weight (CreCl/100g):

$$\text{CreCl} = [(\text{Cre}_U \times \text{Vol}_U / \text{Cre}_S) \times 100] / \text{BW}, \text{ mL/min/100g.}$$

Where: Cre_U = urinary creatinine (mg/dL); Vol_U = urine volume in 24 hours (mL/min); Cre_S = serum creatinine (mg/dL); BW = body weight (g).

Isolation and Purification of total GAGs

These methods have been described previously (15). The kidneys were re-hydrated

in ~5 mL of 0.1 M sodium acetate buffer, containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, pH5.0, at 4°C for 24 h. Thereafter, total renal GAGs (rGAGs) were isolated by proteolysis with papain followed by subsequent cetylpyridinium and ethanol precipitations. All pellets were previously treated with deoxyribonuclease 2mg/mL, 37° C/24h. The final pellet was dried under vacuum and dissolved in 2.0 mL distilled water. After dilution in ½ volumes, urine was filtered and pH adjusted to 6.0. The precipitation of uGAGs was performed by adding N-cethyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromide 5% (overnight), and absolute ethanol. After centrifugation, the pellet was kept at room temperature until completely dry. The pellet was eluted in sodium acetate 10%, the pH was adjusted to 9.0 and mixing vigorously. After centrifugation, the supernatant was collected and the pH adjusted to 6.0. New precipitation was performed by adding 1.5 volumes of absolute ethanol at 0 ° C (overnight). After centrifugation, the final pellet containing the uGAGs was dried under vacuum.

Quantification of total GAGs

The total GAGs samples were dissolved in ~2.0 mL distilled water and assayed by the metachromasia produced by hexuronic acid using the carbazole reaction (16). Under these conditions more than 90% of the total GAGs were recovered. Concentrations of rGAGs were expressed in µg/mg of dry tissue and uGAGs in mg/24h and mg/mg creatinine.

Qualitative Analysis of GAGs

Agarose Gel Electrophoresis:

Total rGAGs (~5 µg) were applied to a 0.5% agarose gel in 0.05 mol/L 1,3-diaminopropane/acetate buffer (pH 9.0). After electrophoresis (120 V / hour), the GAGs in the gel were fixed with 0.1% N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide (Sigma, St Louis, USA) in water, stained with 0.1% toluidine blue in acetic acid/ethanol/water(0.1:5:5, vol/vol/vol), and washed for about 30 minutes in acetic acid/ethanol/water(0.1:5:5, vol/vol/vol). GAGs on the agarose gel were quantified by Molecular Analyst[®] Software 1.4 (Bio-Rad Laboratories). One densitometry profiles was obtained for each samples. Quantification of materials represented by the peaks was made by estimating peak areas from these typical profiles. Then, the gel was stained with Stains-All, which intensifies the metachromasia of sulfated GAGs and reveals the presence of non-sulfated (17). Due to low concentration of urinary excretion, total uGAGs were grouped in "pool" (~ 2µg/sample) for electrophoretic analysis.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis:

The molecular weights of the GAGs chains were estimated by polyacrylamide gel electrophoresis as previously described (18). Briefly, GAGs samples (~5 µg) were applied to a 6% 1-mm-thick polyacrylamide gel slab in TRIS-HCl buffer (pH 8.6). After electrophoresis (100 V/30 minutes), the gel was stained with 0.1% toluidine blue in 1% acetic acid and washed for about 4 hours in 1% acetic acid. Then, the gel was stained with Stains-All, and bleached in distilled water. Chondroitin 6-sulfate (60 kDa) from shark cartilage and chondroitin 4-sulfate

(40 kDa) from whale cartilage (2 μ g/mL) and dextran sulfate (8kDa, 3 μ g/mL) were used as molecular weight markers.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm Standard Error ($X \pm SE$). For comparison of means one-way analysis of variance was used, and the difference pointed by Duncan test. Significance was assigned as $p < 0.05$ (SPSS version 13.0 for windows, IBM, USA).

Results

Characteristics of groups 30 days after 5/6 nephrectomy are presented in table 1. The rate of death during surgical procedures was 5-8%; and survival after recovery from anesthesia was 100%. Data from sham groups were similar to intact control groups (Data not shown). CRF animals showed reduction of creatinine clearance (CreCl). Urinary GAGs was not different among the groups. However, rGAGs was almost twice higher in control females compared to males (CF=2.27 \pm 0.18 vs CM=1.28 \pm 0.05; $p < 0.05$). CRFM showed increased total rGAGs compared to all male groups and to the CRF females ($p < 0.05$). After castration, rGAGs decreased in CRF males, and remained unchanged in females.

CRF animals showed increased PTN when compared to their controls and CRFM presented higher PTN than CRFF in the same period of time (Figure 2). Castration resulted in different effects on PTN between genders, regardless of CRF. In control groups, castrated males showed decreased PTN as compared to non-castrated (CM=33.3 \pm 2.6 vs CMc=6.8 \pm 0.7 mg/24h; $p < 0.05$) but not in female rats (CF=7.1 \pm 1.8 vs CFc=4.8 \pm 0.6 mg/24h). In castrated CRF males, PTN was decreased (CRFM=105.8 \pm 17.3 vs CRFMc=68.3 \pm 14.6 mg/24h; $p < 0.05$); and did not change in female castrated rats (CRFF=53.0 \pm 17.5 vs CRFFc=56.9 \pm 7.3 mg/24h).

The agarose gel electrophoresis showed the profile of the GAGs extracted from kidney after 30 days (Figure 3). After staining the agarose gel by Stains-All, there was no evidence to suggest the presence of non-sulfated GAGs in the kidney. Densitometry on agarose gel electrophoresis showed one predominant band, corresponding to HS, in the kidney of all studied groups.

The quantification of rGAGs, hexuronic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry tissue), and the estimated content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry tissue) of HS and CS+DS from male and female rats are presented in figure 4. Females showed higher concentration of HS compared to males in controls. These data further emphasize the difference related to gender when comparing CRF groups: HS was reduced in females and increased in males. Castration reduced HS in males to levels similar to those found in females (Figure 4B). CS+DS (Figure 4C) were more homogeneous more females. CRFM presented significantly higher values of CS+DS compared to females and their respective controls ($p < 0.05$).

Molecular weights (MW) analysis of total rGAGs showed no difference between male and female rats (~ 40 kDa), while uGAGs did not show a defined pattern for MW (Figure 5).

Data for uGAGs showed a similar pattern among the groups, with predominance of CS+DS (Figure 6), except for CRF male groups that presented a decrease of CS+DS and HS. After staining the agarose gel by Stains-All, the presence of another clearer blue band was observed suggesting the presence of hyaluronic acid or non-sulfated GAGs.

Discussion

In the present study we analyzed the GAGs profile in the kidney of castrated and non-castrated male and female rats at an early stage of CRF. Reports relating sex hormones to

GAGs and PTN in CRF model are lacking. Animals presented a good recovery after surgery and renal changes as reduction of CreCl and renal hypertrophy were observed. Castration did not influence these parameters in both genders. Hormonal dosage was not performed after castration because hormonal reposition was not done. Animals with CRF developed PTN that was higher in males and reduced after castration. This data concurs with our previous observations (19), suggesting that sex hormones may interfere in PTN appearance.

The evaluation of rGAGs showed higher values for CRF in males and a decrease after castration. Some authors showed GAGs concentration to be distinct between genders, independent of castration; adult females presented higher total GAGs content in the bladder compared to young female (4 weeks old) and male rats, suggesting that GAGs can vary with age and sex (20) and also with tissue type (21). However, studies evaluating rGAGs profiles in female rats are lacking. Present data suggest that in early stage of CRF (after 30 days), male sex hormones may interfere with synthesis and/or degradation of rGAGs.

Regardless of gender, predominance of HS was found in the kidney. Furthermore, CRF males presented increased CS + DS. Females did not present differences in CS+DS among the groups (Figure 4B e C). It is known that several growth-factors and cytokines stored in the glomerular basement membrane interact with HS, ultimately this interaction contributes to the tissue remodeling process (6). We observed in CRFM an increase in kidney HS as well as in PTN and, a decrease in HS after castration, maintaining the same pattern observed with rGAGs.

Available data suggest that androgens may exacerbate, while estrogens protect the development of mechanisms that ultimately lead to glomerulosclerosis. It has been suggested that the impact of gender on renal disease progression, may reflect direct receptor-mediated effects of sex hormones (12,13). Estradiol and testosterone receptors are expressed on the surface of mesangial cells (22). Endogenous estrogens have in general been considered to have

anti-fibrotic and anti-apoptotic effects on the kidney (23). On the other hand androgens present proapoptotic and profibrotic properties (24). Estrogen reduces proliferation of mesangial cells, collagen synthesis, renin-angiotensin system activity and superoxide production, while testosterone potentiates these effects (10,12,25). These data may also suggest that sex hormone could directly interfere with GAGs synthesis.

Urinary GAGs are considered mainly the result of glomerular metabolism, with some contribution of tubular and urinary tract cells, justifying the higher concentration in urine compared to blood (26). A pooled sample of animal groups was used to analyze uGAGs in agarose gel. No gender-related difference in uGAGs was observed in accordance to (26,27). Molecular weights of uGAGs were similar for all groups. In females, however, regions of metachromasia were observed near to the origin, and it might suggest the presence of higher molecular weight molecules (Figure 5), like the presence of hyaluronic acid from urogenital system (28).

Although uGAGs were similar in all groups, CRF males showed a reduction of sulfated GAGs and the presence of non-sulfated GAGs, reflecting a qualitative change of GAGs in this group (Figure 6). Conversely, female groups did not change the uGAGs profile. A reduction of uGAGs was found in diabetic rats and in experimental glomerulonephritis suggesting that uGAGs excretion can vary with the renal baseline pathology (1,29,30).

Evidences show that alterations in the glomerular basal membrane (GBM) are the main cause of PTN. Charge selectivity of the GBM has been widely associated with the electrostatic property of HS, and an inverse correlation between HS and PTN is suggested (2,31,32). Mechanisms linking changes in GAGs and, especially HS, compromising glomerular permeability leading PTN are still unclear (1,2,33,34). Regardless of functional involvement on the charge of the glomerular barrier, HS is also involved in other biological functions. Conformational changes of HS molecule are able to maintain constant activation of residents

(epithelial and mesangial) and recruited cells, these mechanisms are also linked to sex hormones (22). Changes caused by endosulfatases and/or heparanases (35,36) and reactive oxygen species may remove few, but essential epitopes to the biological functions of HS (10), contributing to the dysfunction of the glomerular filtration barrier, causing PTN.

Early structural changes in the acetylation and sulfation of HS disaccharides, such as those occurring in glomerular maturation (37), give rise to an enormous structural diversity, which corresponds to the variety of biological functions mediated by HS including its role in inflammation. (38). These modifications may have occurred in CRF males, altering the functionality of the de-novo synthesized HS molecule in the glomerular filtration barrier. However, the present study did not analyze rGAGs structure.

Apparent paradoxical data from CRF males, i.e, simultaneous increase of HS and PTN, was observed, but the reversion of this pattern in castrated animals may favor the hypothesis of a functionally compromised HS molecule. Contributes to this conclusion the CRF females behavior, where a reduction in HS and as expected an increase on PTN was observed, additionally, these data remained unchanged after castration.

Conclusion

Summarizing the data it is feasible to hypothesize that male sex hormones may play a role in the synthesis of rGAGs on early stage of CRF, interfering in renal remodeling of ECM. Thus, gender-dependent quantitative differences were observed in the CRF model when measuring HS and PTN. Further studies analyzing rGAGs structure in both sexes are needed to clarify how sex hormones and GAGs contribute to gender-dependent differences in CRF.

References

- 1- Cadaval RAM, Kohlman O, Michelacci YM. Urinary excretion of Glycosaminoglycans and albumin in experimental diabetes mellitus. *Glycobiology* 2000; 10: 185-192.
- 2- Raats CJI, van den Born J, Berden JHM. Glomerular heparan sulfate alterations: Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int* 2000; 57: 385-400.
- 3- Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int* 1990; 38: 384-394.
- 4- Burton C, Harris KPG. The Role of Proteinuria in the Progression of Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 765-775.
- 5- Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116: 288-296.
- 6- Parish CR. The role of heparin sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 633-643.
- 7- Mitsuhashi H, Tsukada Y, Ono K, Yano S, Naruse T. Urine glycosaminoglycans and heparan sulfate excretions in adult patients with glomerular diseases. *Clin Nephrol* 1993; 39: 231-238.

- 8- de Muro P, Faedda R, Satta A, Finetti D, Masala A, Cigni A, et al. Urinary glycosaminoglycan composition in chronic glomerulonephritis. *J Nephrol* 2005; 18: 154-160.
- 9- Verhagen AM, Attia DM, Koomans HA, Joles JA. Male gender increases sensitivity to proteinuria induced by mild NOS inhibition in rats: role of sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F664-F670.
- 10- Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim J, Wu X, et al. Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. *Gender Med* 2007; 4: 56-71.
- 11- Sullivam JC, Semprun-Prieto L, Boesen EI, Pollock DM, Pollock JS. Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R1573-R1579.
- 12- Sandberg K. Mechanisms underlying sex differences in progressive renal disease. *Gender Med* 2008; 5: 10-23.
- 13- Silbiger S, Neugarten J. Gender and human chronic renal disease. *Gender Med* 2008; 5 (suppl A): S3-S10.
- 14- Schwartz MM, Bidani A. Mesangial structure and function in the remnant kidney. *Kidney Int* 1991; 40: 226-237.

15- Guimarães MAM, Mourão PAS. Urinary excretion of sulfated polysaccharides administered to Wistar rats suggest a renal permselectivity to these polymers based on molecular size. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1335: 161-172.

16- Taylor KA, Buchanan-Smiter JG. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. *Anal Biochem* 1992; 201:190-196.

17- Volpi N, Maccari F. Simultaneous detection of submicrogram quantities of hyaluronic and dermatan sulfate on agarose-gel by sequential staining with toluidine blue and stains-all. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 820: 131-135.

18- Tovar AMF, Cesar CF, Leta GC, Mourão PAS. Age-related changes in populations of aortic Glycosaminoglycans. Species with low affinity for plasma low-density lipoproteins, and not species with high affinity, are preferentially affected. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 604-614.

19- Lemos CCS, Mandarim-de-Lacerda CA, Dorigo D, Coimbra TM, Bregman R. Chronic renal failure in male and female rats. *J Nephrol* 2005; 18: 368-373.

20- Cabral CAP, Sampaio FJB, Cardoso LEM. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycans and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol* 2003; 170: 512-516.

21- Fortepiani LA, Yanes L, Zhang H, Racusen LC, Reckelhoff JF. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. *Hypertension* 2003; 42: 952-955.

22- Pawluczyk IZ, Tan EK, Harris KP. Rat mesangial cells exhibit sex-specific profibrotic and proinflammatory phenotypes. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1753-1758.

23-Elliot SJ, Berho M, Korach K, Doublier S, Lupia E, Striker GE, et al. Gender-specific effects of endogenous testosterone: female alpha-estrogen receptor-deficient c57bl/6j mice develop glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2007; 72:464-472.

24- Metcalfe PD, Leslie JA, Campbell MT, Meldrum DR, Hile KI, Meldrum KK. Testosterone exacerbates obstructive renal injury by stimulating TNF-alpha production and increasing proapoptotic and profibrotic signaling. *Am J Physiol* 2008; 294:E435-443.

25-Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV. Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J Biol Chem* 2004; 279: 52282-52292.

26- Lee EY, Kim SH, Whang SK, Hwang KY, Yang JO, Hong SA. Isolation, identification, and quantification of urinary glycosaminoglycans. *Am J Nephrol* 2003; 23:152-157.

27- Michelacci YM, Cadaval RAM, Rovigatti RM, Kohlman O. Renal and urinary glycosaminoglycans in an experimental model of chronic renal failure in rats. *Exp Nephrol* 2001; 9: 40-48.

28- de Deus JM, Girão MJBC, Sartori MGF, Baracat EC, de Lima GR, Nader HB, et al. Glycosaminoglycans profile in bladder and urethra of castrated rats treated with estrogen, progestogen, and raloxifene. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1654-1659.

- 29- de Lima CR, Aguiar JA, Michelacci YM. Reduced urinary excretion of sulfated polysaccharides in diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 30-41.
- 30- Kaznowska-Bystryk I, Al Naal M, Jaroszynski A, Solski J. Changes in the excretion of glycosaminoglycans with urine in patients with glomerular disease. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 2007; 20: 35-40.
- 31- van den Born J, van den Heuvel LP, Bakker MA, Veerkamp JH, Assmann KJ, Weening JJ, et al. Distribution of GBM heparan sulfate proteoglycan core protein and side chains in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1993; 43: 454-463.
- 32- Celie JW, Reijmers RM, Slot EM, Beelen RH, Spaargaren M, Ter Wee PM, et al. Tubulointerstitial heparan sulfate proteoglycan changes in human renal diseases correlate with leukocyte influx and proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F253-F263.
- 33- Harvey SJ, Miner JH. Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 393-398.
- 34- Morita H, Yoshimura A, Kimata K. The role of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney Int* 2008; 73: 247-248.
- 35- Guimarães MAM, Nikolovski J, Pratt LM, Greive K, Comper WD. Anomalous fractional clearance of negatively charged Ficoll relative to uncharged Ficoll. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F1118-F1124.

36- van den Hoven MJ, Wijnhoven TJ, Li J-P, Zcharia E, Dijkman HB, Wismans RG, et al. Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 2008; 73: 278-287.

37- Lauer ME, Hascall VC, Wang A. Heparan sulfate analysis from diabetic rat glomeruli. *J Biol Chem* 2007; 282: 843-852.

38- Rops AWMM, van der Vlag J, Lensen JFM, Wijnhoven TJM, van der Heuvel LPWJ, van Kuppevelt TH, et al. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. *Kidney Int* 2004; 65: 768-785.

Table 1: Data of the groups after 30 days

	Males				Females			
	CM	CMc	CRFM	CRFMc	CF	CFc	CRFF	CRFFc
BW (g)	338±11	316±10	254±20 *	263±20 *	238±10	285±8 [■]	188±9 [•]	202±7 [•]
KW (mg/100gBW)	0.29±0.01	0.29±0.02	0.41±0.10 *	0.40±0.04 *	0.45±0.01	0.36±0.02	0.51±0.03 [♦]	0.48±0.03 [♦]
CreCl (mL/min/100gBW)	0.51±0.04	0.41±0.05	0.30±0.06 *	0.30±0.03 *	0.55±0.01	0.41±0.05	0.34±0.05 [■]	0.27±0.07 [■]
rGAGs (µg/mg dry tissue)	1.28±0.05	1.55±0.12	2.46±0.13 *	1.87±0.19 ⁺	2.27±0.18	2.28±0.26	1.63±0.18 ^{•+}	1.45±0.19 ^{•+}
uGAGs (mg/mg Cre)	0.10±0.03	0.12±0.01	0.15±0.02	0.13±0.01	0.19±0.03	0.14±0.02	0.18±0.02	0.18±0.05

Mean±SE; p<0.05: * vs control male groups; ⁺ vs CRFM; [■] vs CF; [♦] vs CFc; [•] vs all female groups.

BW= body weight; KW= kidney weight; CreCl= creatinine clearance; rGAGs= total renal glycosaminoglycans; uGAGs= total excreted glycosaminoglycans in 24 h-urine; C= control; c= castration; CRF= chronic renal failure; M= male rat; F= female rat.

Figures:

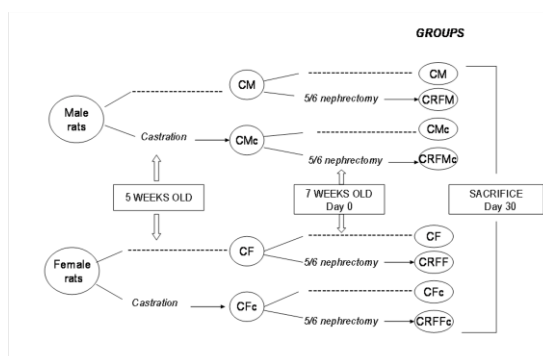


Figure 1: Schematic representation of the study design combining castration and CRF.

C= control; c= castration; CRF= chronic renal failure; F= female rat; M= male rat; -----
= no surgical procedure.

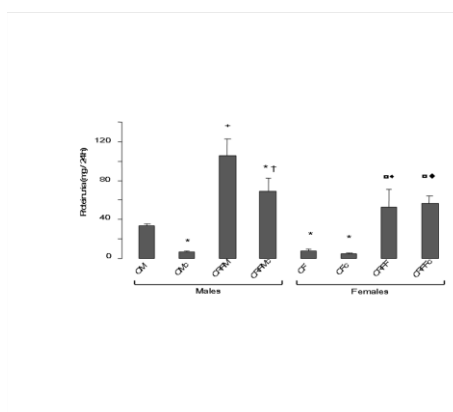


Figure 2: Proteinuria (mg/24h) after 30 days.

$p < 0.05$: + vs all; * vs CM; † vs CMc; ■ vs CF; ◆ vs CFc.

C=control; c= castration; CRF= chronic renal failure; F= female rat; M= male rat.

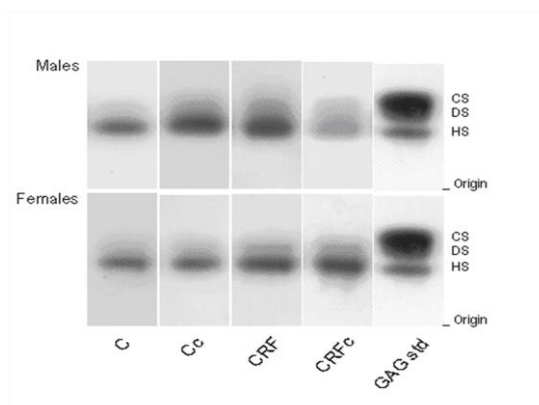


Figure 3: Agarose gel electrophoresis of rGAGs after toluidine blue staining.

rGAGs=renal total glycosaminoglycans; GAGs Std=mixture of standard glycosaminoglycans:

CS= chondroitin sulfate, DS= dermatan sulfate and HS= heparan sulfate; C= control; c= castration; CRF= chronic renal failure.

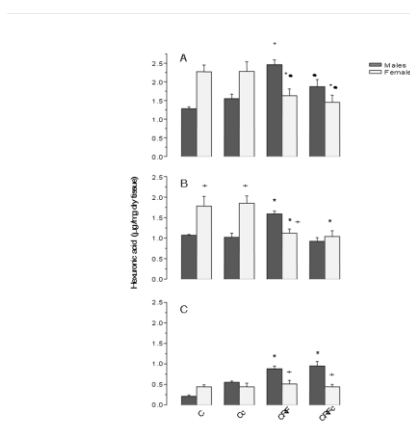


Figure 4: Total GAGs (A), Heparan (B) and Chondroitin + Dermatan sulfate (C) in kidney from male and female rats. $p < 0.05$: * vs respective control groups; + vs M; • vs CRFM. C= control; c= castration; CRF= chronic renal failure; GAGs= glycosaminoglycans.

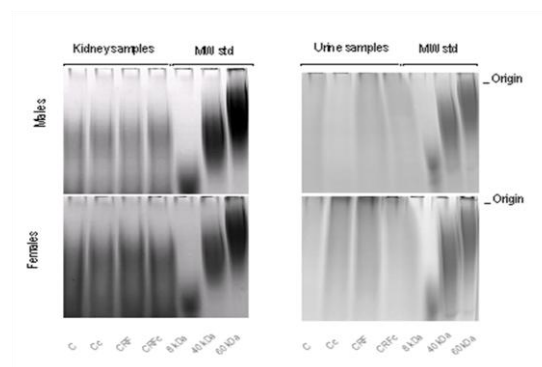


Figure 5: Polyacrylamide gel electrophoresis of the rGAGs and uGAGs from male and female rats. rGAGs= total renal glycosaminoglycans; uGAGs= total excreted glycosaminoglycans in 24-h urine; MW std= molecular weight standard; C= control; c= castration; CRF= chronic renal failure.

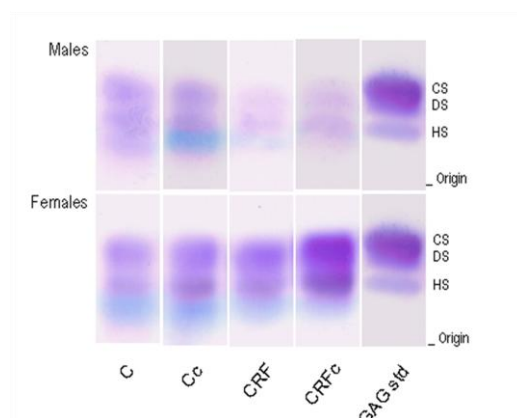



Figure 6: Agarose gel electrophoresis of uGAGs pool after Toluidine blue and Stains-All stainings. GAGs Std=Mixture of standard GAGs: CS= Chondroitin Sulfate, DS= Dermatan Sulfate and HS= heparan sulfate; C= control; c= castration; CRF= chronic renal failure; F= female rat; M= male rat.

ANEXO D - Comprovação de aceite do 1º artigo científico



**BRAZILIAN JOURNAL
OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH**

MANUSCRIPT HOME AUTHOR INSTRUCTIONS REFEREE INSTRUCTIONS HELP TIPS LOGOUT JOURNAL HOME

This is a revised manuscript.

Manuscript #	2339R3
Current Revision #	3
Other Versions	2339 2339R1 2339R2
Submission Date	2013-04-12 12:05:59
Current Stage	Manuscript Ready for Publication
Title	EFFECTS OF CASTRATION ON RENAL GLYCOSAMINOGLYCANS AND THEIR URINARY EXCRETION IN MALE AND FEMALE RATS WITH CHRONIC RENAL FAILURE.
Running Title	Glycosaminoglycans and chronic renal failure
Manuscript Type	Full Paper
Corresponding Author	Carla Lemos (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)
Contributing Authors	Ana Maria Tovar , Marco Antonio Guimarães , Rachel Bregman
Abstract	Glycosaminoglycans participate in a variety of processes in the kidney, and evidences suggest gender-related hormones participating in renal function. The aim of this study was to analyze the relation of glycosaminoglycans, gender and proteinuria in male and female rats with chronic renal failure. Glycosaminoglycans were analyzed in total kidney tissue and 24-hours urine of castrated (c) male (M) and female (F) Wistar control (C) rats (CM, CMc, CF, CFc) and after 30 days of chronic renal failure induced by 5/6 nephrectomy (CRFM, CRFMc, CRFF, CRFFc). Total glycosaminoglycans quantification and their composition were determined using agarose and polyacrylamide gel electrophoresis respectively. Renal glycosaminoglycans were higher in CF compared to CM. CRFM presented increase in renal glycosaminoglycans, heparan sulfate and proteinuria, while castration reduced these parameters. Differently, CRFF and CRFFc groups presented a decrease of renal glycosaminoglycans concomitant with an increase in proteinuria. Our results suggest that in CRFM, the absence of sex hormones alters quantitatively GAGs, mainly HS, and possibly glomerular filtration barrier leading to proteinuria. Corroborates with this theory the lack of this response in CRFMc, where heparan sulfate did not increase. Lastly, this pattern was not observed in females. Further studies in chronic renal failure are needed to clarify gender-dependent differences in heparan sulfate synthesis.
Section Editor	Assigned
Key Words	Castration, Chronic renal failure, Gender, Glycosaminoglycans, roteinuria
Subject Areas	Biomedical Sciences/Experimental Biology
Conflict of Interest	*No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Decision	Accept / 2013-05-03
Publication Charges	CCL

ANEXO E - Comprovação de submissão do 2^o artigo científico

Reception of paper B-4975

De: **Carla Lemos** (lemoscc@hotmail.com)
 Enviado: quarta-feira, 27 de fevereiro de 2013 17:10:59
 Para: Rachel bregman (bregmanr@terra.com.br)
 1 anexo
 Informação bibliotecária.pdf (1424,1 KB)

Carla Lemos

De: **F Hernández** (fhcalvo@um.es)
 Enviado: quarta-feira, 27 de fevereiro de 2013 14:52:29
 Para: lemoscc@hotmail.com
 1 anexo
 Información bibliotecaria.pdf (1426,2 KB)

Reference: B-4975

Dear Dr. Lemos et al.,

I am pleased to acknowledge receipt today of the paper entitled "GENDER-RELATED DIFFERENCES IN KIDNEY OF RATS WITH CHRONIC RENAL FAILURE" submitted for publication in HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY (2011 IMPACT FACTOR:2.480).

As soon as the manuscript has been seen by the referees, you will be informed as to whether it can be accepted.

If it is accepted, the authors are requested to cover part of the printing cost (each paper about 600 euros; with colour, about 900 euros; or equivalent USD).

P.S.(NOTE):

The cost of the 1 institutional subscription for 1 year (2013)is 600 euros or equivalent USD.

Yours sincerely,

Prof. Francisco Hernández-Calvo
 Founder and Editor of
 HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY
<http://www.hi.um.es>
 E-mail:<fhcalvo@um.es>
 Department of Cell Biology and Histology
 School of Medicine
 University of Murcia
 30100 Espinardo - MURCIA
 SPAIN

ANEXO F - Formato final do 2^o artigo científico submetido

GENDER-RELATED DIFFERENCES IN KIDNEY OF RATS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

Carla C S Lemos^{1*}, Carlos A Mandarim-de-Lacerda², Jorge J Carvalho³, Rachel Bregman¹.

¹ Nephrology Division, ² Laboratory of Morfometry, Metabolism and Cardiovascular Disease and ³ Laboratory of Cellular Ultrastructure and Tissue Biology, Department of Histology and Embriology, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author*:

Faculdade de Ciências Médicas
Avenida 28 de setembro, 87, fundos, 4º andar, Patologia Geral. Vila Isabel, Rio de Janeiro, 20551-030, Brazil.

Phone number: + 55 21 2868 8045 Fax number: + 55 21 2565 7210

E-mail: lemoscc@hotmail.com

Short running title: Chronic renal failure and gender-related differences

Summary

Chronic renal failure (CRF) is characterized by adaptive mechanisms secondary to the loss of functioning nephrons. Clinical and experimental studies suggest participation of gender-related hormones on renal function and progression of CRF.

We evaluated the effect of castration (c) on renal alterations in males (M) and females (F) Wistar control (C) rats (CM, CMc, CF, CFc) and after 30 days of chronic renal failure (CRF) induced by 5/6 nephrectomy (CRFM, CRFMc, CRFF, CRFFc).

CRFM group showed higher proteinuria (PTN). Glomerular hypertrophy was similar among groups. Podocyte morphology showed disorders of foot processes and thickening of the basement membrane in CRFM. CRFF group showed fewer alterations compared to males. Castration changed the profile in CRFM animals and the filtration barrier was preserved. CRF males showed the presence of alfa-smooth muscle actin (α -SMA) suggesting an early profibrotic event in this group. After castration this phenomenon was not observed. Noteworthy, in females, castration exacerbated the presence of α -SMA.

In summary, proteinuria was higher in males and appears early in the course of CRF, probably contributing to fibrotic events. Data were influenced by gender suggesting that male sex hormones aggravate renal alterations.

Keywords: Alfa-smooth muscle actin, Castration, Chronic renal failure, Gender, Proteinuria.

Introduction

Chronic renal failure (CRF) is characterized by structural and functional responses of remnant nephrons, which ultimately led to glomerulosclerosis and tubulo-interstitial injury (Remuzzi et al., 2006). The unbalance between synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM) components, associated to loss of size and/or charge-selectivity of the glomerular barrier, have been pointed as important mechanisms in the process of mesangial expansion and glomerulosclerosis (Ruiz-Torres et al., 2005).

Alterations in glomerular permselectivity lead to proteinuria (PTN) and abnormally filtered proteins interact with the mesangium and tubular cells promoting progressive glomerular and interstitial injury (Hischberg and Wang, 2005). In this context, myofibroblasts appear to play an important role in the onset of early renal changes. Myofibroblasts are fibrogenic cells, which have similar characteristics to smooth muscle cells and fibroblasts; and are characterized by expressing α -smooth actin (α -SMA). Studies have shown that mesangial and interstitial cells can transdifferentiate into myofibroblasts in a step that precedes glomerulosclerosis (Klien et al., 1996; Zhang et al., 2005). The proliferation of myofibroblasts correlates significantly with glomerular and interstitial lesions, thereby perpetuating the disease and is an excellent marker of renal disease progression (Ng et al., 1998; Yang et al., 1998). The correlations between glomerular and interstitial abnormalities are related to pathophysiological processes in the progression of CRF (Petrica et al., 2000).

Although the mechanisms of glomerular filtration are not completely elucidated, it is clear that podocyte is an important component in this process. Podocytes stabilize glomerular architecture and the contractile structure of the pedicels is sensitive to vasoactive hormones, and therefore able to modulate the ultrafiltration coefficient (Miner, 2003; Shakland, 2006). Changes in podocyte morphology, including retraction of the pedicels, and detachment of

podocytes have been implicated in early stages of the process of PTN and glomerulosclerosis (Pavenstädt, 2000; Ichikawa et al., 2005). Injury that initially reached only the podocytes appears to spread to other resident cells by still unknown mechanisms (Hayden et al., 2005). Thus, in a parallel step to remodeling, abnormally filtered proteins interact adversely with the mesangium and cells lining the tubular space causing interstitial changes similar to those observed in the glomerulus (Remuzzi et al., 2006). Nephrotoxicity caused by the accumulation of macromolecules, mainly in the mesangium, may trigger a local inflammatory process, leading to cell proliferation, changes in quantitative or qualitative components of the mesangial matrix (MM), glomerulosclerosis, and finally loss of glomerular filtration (Ruggenti and Remuzzi, 2000). Actually, more than a marker of glomerular injury, PTN can be considered as an indicator of the severity of renal disease.

Several studies suggest that the impact of gender on renal disease progression reflects genetically determined differences between genders in renal structure and function, as well as direct effects of sex hormones on mesangial cells. Sex hormones probably interfere in cellular proliferation, matrix accumulation, synthesis and release of cytokines, vasoactive agents and growth factors actions (Silbiger and Neugarten, 1995; Ji et al., 2005). Progression of renal disease is faster in male, and some authors suggest that estrogens may contribute to the protective effect of female gender in renal disease progression (Lemos et al., 2005; Sandberg, 2008; Silbiger and Neugarten, 2008). The present study evaluated early gender-related differences on chronic renal failure, studying castrated and non-castrated subtotally nephrectomized animals.

Material and Methods

Experimental model

Randomly, male (M) and female (F) Wistar rats with 5 weeks old were divided in castrated (c) and non castrated groups; after castration, animals were separated in 4 groups: Castrated and non castrated control (c) groups (CMc, n=7; CFc, n=7; C: CM, n=7; CF, n= 7). At seven weeks old, animals randomly undergone 5/6 nephrectomy (CRF) and separated in castrated and non castrated (CRFMc, n=10; CRFFc n=8; CRFM, n=8; CRFF, n=7). Surgical procedures were performed with animals anesthetized intraperitoneally with sodium thiopental (50 mg/Kg body weight). In male rats, castration was performed through the removal of the testicles; in female, the ovaries were removed through bilateral lumbar incision. Reduction of total renal mass was performed through abdominal incision, and left renal artery was isolated and 2 or 3 branches were ligated; right nephrectomy was then performed through lumbar incision. Nephrectomy 5/6 was performed on day 0, and the animals were maintained on a standard rat chow and water *ad libitum* until the end of the study (30 days). The animals received proper care according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no 85-23, revised 1996). All experimental procedures were previously approved by the Ethics and Research Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Institute of Biology of State University of Rio de Janeiro (UERJ, Rio de Janeiro/RJ, Brazil).

General data

The general data were verified after 30 days post-5/6 nephrectomy. The systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious rats, using the non-invasive method of the tail-cuff plethysmography (RTBP 1007, Kent Scientific CO, Litchfield, USA). This procedure was performed in a quiet room on trained unanesthetized animals. Measurement of

creatinine and proteinuria (PTN) were performed in 24-hour urine samples, collected from metabolic cages (Nalgene), where animals were previously trained and received only water *ad libitum*. Urine volumes were measured, and urine stored at -20°C. PTN was measured by sulfosalicylic method (Schwartz and Bidani, 1991). After the collection of 24-hour urine samples, animals were anesthetized and a blood sample was taken for creatinine determination. Urinary and serum creatinine were determined by kinetic modified Jaffé method in the Central Laboratory of Pedro Ernesto Hospital. Renal function was determined by creatinine clearance corrected by 100g of body weight (CreCl/100g). Kidneys were perfused with 4% ρ -formaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4, were removed, weighed, fixed in formalin and embedded in paraffin to subsequent morphologic evaluations. Kidneys from 2 animals per group were perfused with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2 for transmission electron microscopy analysis.

Morphologic data

Morphological evaluations were made in Periodic Acid-Schiff (PAS) and Masson's trichrome stained sections. Glomerular volume (GV) was calculated from the formula $4/3\pi r^3$ (Weibel et al., 1966); the maximum and minimum individual glomerular diameters between the internal edges of Bowman's capsule were measured and GV was estimated as the mean of 10 measurements.

Immunohistochemistry

Kidney tissue sections of 3-4 μm were evaluated for α -smooth muscle actin (α -SMA) tissue distribution. Antigen retrieval was performed with citrate buffer, pH 6.0, endogenous

peroxidase was quenched with Methanol/hydrogen peroxide 10% and nonspecific binding was inhibited with phosphate-buffered saline/bovine serum albumin 3%. Sections were incubated with anti- α -SMA antibody (1:100; Dako, Denmark). The reaction was amplified with a biotin-streptavidin system (Universal DakoCytomation LSAB + kit, Peroxidase, Glostrup, Denmark). The reaction was visualized after incubation with 3,3' Diaminobenzidine tetrachloride (DakoCytomation) and sections were counterstained Mayer's hematoxylin.

Transmission Electron Microscopy

Small pieces ($\sim 1\text{mm}^3$) of the kidney were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH7.2) and 0.25% tannic acid (Merck), for 4 hours and post-fixed with 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) and 0.8% ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer (pH7.2). After, the species were dehydrated in ascending grades of alcohol and embedded in Epon. Later, semithin ($1\mu\text{m}$) and ultrathin (100nm) sections were cut in ultramicrotome (Leica Ultracut-UCT, Viena), collected on copper grids, and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Ultrastructural analyses were performed with a transmission electron microscope (Zeiss EM 906; Carl Zeiss, OberKöchen, Germany) at 80 kV.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error. The differences between groups were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and it was used Duncan *post-hoc* test by comparing the groups. Significance was assigned as $p < 0.05$ (SPSS version 13.0, IBM, USA).

Results

All animals started the study with the same age (7 weeks). Body weight was 30% lower in females compared to male rats. Systolic blood pressure (SBP) was similar in control animals. Castrated and non-castrated CRF groups showed higher levels for SBP compared to controls ($p < 0.05$). Castration reduced SBP in CRF males, but not in CRF females. Kidney weight (KW) corrected by 100g of body weight (BW) showed hypertrophy of the remaining renal tissue in CRF groups. Glomerular volume (GV) was not different among groups, although CRF groups showed a tendency of increasing this parameter when compared to their controls. Creatinine clearance (CreCl) as expected was reduced in CRF groups (Table 1).

Figure 1 shows that proteinuria (PTN) (mg/24h) was significantly higher in CRF groups compared to controls (CRFM = 112 ± 16 vs CM = 39 ± 3.6 ; CRFF = 56.6 ± 13.6 vs CF = 9.6 ± 1.8 and CFc = 8.7 ± 0.9 mg/24 h, $p < 0.05$). Castration reduced PTN in control and CRF males (CMc = 12 ± 2.6 mg/24 h; CRFMc = 58.1 ± 10.5 mg/24 h) when compared to non-castrated ($p < 0.05$). CRF females, did not change PTN after castrations, (CFc = 8.7 ± 0.9 mg/24 h; CRFFc = 83.9 ± 10.5 mg/24h), however CRFFc group showed a tendency to increase the PTN.

Table1: General data after 30 days.

GROUPS (n)	SBP (mmHg)	KW/BW (mg/100g BW)	GV (x 10 ⁵ μm ³)	CreCl (mL/min/100g BW)
CM (7)	^a 119 ±2.2	0.35 0.01	8.9 0.9	0.51 0.04
CMc (7)	115 1.1	0.42 0.04	6.7 0.4	0.41 0.05
CRFM (8)	155 + 0.7	0.53 # 0.10	10.0 1.8	0.26 # 0.06
CRFMc (10)	147 + * ▣ 3.2	0.47 0.01	10.7 0.9	0.30 # 0.03
CF (7)	114 2.3	0.40 0.05	5.2 0.6	0.55 0.04
CFc (7)	116 2.2	0.41 0.04	5.3 0.5	0.41 0.05
CRFF (7)	151 + 1.2	0.59 +♦ 0.02	8.0 1.5	0.34 + 0.05
CRFFc (8)	155 + 0.8	0.54 0.10	8.9 1.0	0.27 + 0.07

^aMean±SE; p < 0.05: # vs CM; ▣ vs CRFM; * vs CRFFc; + vs control M and F simultaneously; ♦ vs CF and CFc. C=control; c=castration; M=male; F=female; CRF=chronic renal failure, SBP= systolic blood pressure; KW/BW= kidney weight by 100g of body weight; GV= glomerular volume; CreCl= creatinine clearance.

Morphological evaluation did not present glomerular or tubulo-interstitial alterations, the same was observed in castrated groups (Fig.2).

Electron microscopy showed preserved filtration barrier in control groups in both genders, with a normal relationship of the foot process with the endothelial cells and glomerular capillaries (Fig. 3). Pedicels anchored to the basement membrane of glomerular capillary, with regular spacing between them and containing preserved "slit" diaphragm. CRFM group showed a thickening of the basement membrane (arrow), while in CRFF glomerular filtration barrier was preserved, but presented a slight shortening of podocyte foot processes. Castration changed the profile in CRFM animals and the filtration barrier was better preserved.

Immunostaining for α -SMA in control groups (castrated or not) was present only in blood vessels (Fig. 4). CRF groups presented gender differences: CRFM showed immunostaining of tubular basement membranes, periglomerular region, Bowman's space and mesangial matrix, while in CRFF group the presence of α -SMA was limited to blood vessels, similar to control groups. After castration, gender differences were also observed, males did not show alterations while in females it was more prominent.

Discussion

It is suggested that gender differences exist with regard to the evolution of chronic kidney disease (CKD). By other hand, the burden of CKD occurs in a population of postmenopausal women. However there are some evidences that cellular differences exist regarding gender. The scarcity of information about the role of sex hormones after menopause and sex-specific tissue responses make this issue unclear.

The present study evaluated renal alterations in castrated and non castrated CRF male and female rats, in order to assess gender dependent renal changes. Castration was

performed immediately prior the onset of puberty to avoid interference of sex hormones on renal function.

Compensatory hypertrophy of the remaining renal tissue is a well known phenomenon. Animals submitted to unilateral (Baylis and Wilson, 1989) and subtotal (Lemos et al., 2005) nephrectomy showed higher kidney weight compared to intact animals. We found renal hypertrophy 30 days after 5/6 nephrectomy in both genders, suggesting that renal hypertrophy is likely to occur early in the remnant kidney model.

Blood pressure plays a role in the progression of renal failure (Hannedouche et al., 1993). Spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit gender differences in SBP, where males present higher levels compared to females (Lopes-Ruiz et al., 2008), other studies showed that castration reduces SPB in SHR animals (Sartori-Valinotti et al., 2007; Toot et al., 2008). Our data showed similar SBP in CRF animals, except in CRFMc group that presented a slight decrease in this parameter compared to CRFM.

PTN is considered by many as a major risk factor for progression of CRF (Strutz, 2009; Gagliardini et al., 2010) and, gender differences are also implicated. One study shows that in men urinary albumin excretion was the strongest independent predictor of renal function decline (Halbesma et al., 2008). However, another study showed that differences in renal disease progression were no longer significant, after adjusting for baseline PTN and mean arterial pressure comparing males and females (Coggins et al., 1998).

We found a higher PTN in CRFM group compared to its control and to CRFF. This finding is in accordance with Lombet et al. (1989), that found higher PTN in male rats 3 weeks after 5/6 nephrectomy compared to females. Castration of male rats was associated to PTN reduction in hyperlipidemic rats (Sakemi and Baba, 1993). In the present study, after castration, PTN was reduced in CRF males while increased in females. These data suggest gender participation in PTN.

PTN is also associated to changes in podocytes morphology which in turn are secondary to changes in the expression of specific proteins such as nephrin, α -actin-4 and podocin (Tryggvason and Wartiovaara, 2001; Koop et al., 2008). These changes trigger abnormal interactions between podocytes and the glomerular basement membrane (GBM) due to actin cytoskeleton reorganization, especially in pedicels (Shakland, 2006). These alterations lead to foot process effacement, loss of the podocytes slit and finally total denudation of the glomerular capillary wall (Lahdenkari et al., 2004). Ultrastructural analysis showed morphological alterations in the glomerular filtration barrier of CRF groups. These alterations did not change with castration, suggesting therefore that sexual hormones did not participate in these processes early in the course of CRF.

Histopathological data did not show glomerular nor tubulo-interstitial alteration, neither glomerular hypertrophy, in CRF groups after 30 days. The same was observed by Badid et al. (2000) after 4 weeks; and significant morphological alterations were present only after 8 weeks. However, Tapia et al. (2003) showed glomerular hypertrophy after 30 days. Schwartz and Bidani (1991) studying Wistar-Kyoto rats six weeks after 5/6 nephrectomy, observed compensatory renal hypertrophy, however, it was not followed by injury. Castrated hyperlipidemic male rats presented glomerular hypertrophy after 24 weeks (Sakemi and Baba, 1993). These apparent discrepancies are likely to be due to strains differences. Thus, it seems that 30 days after nephrectomy, in Wistar rats, is a short period of time to detect significant histopathological alterations in both genders.

In normal kidney, interstitial fibroblasts are rare and myofibroblasts are not present (Hischberg and Wang, 2005). Myofibroblasts originated from the trans differentiation of the resident renal cells, which express α -SMA, is implied in the early process of CKD injury; some data corroborate the theory that the presence of myofibroblasts precedes glomerular and tubulointerstitial injury (Ng et al., 1998; Yang et al., 1998; Strutz, 2009). After 30 days of 5/6

nephrectomy, CRF males showed the presence of α -SMA, both in periglomerular and tubulointerstitial regions, suggesting an early profibrotic event in these animals.

It has been suggested that the impact of gender on renal disease progression, may reflect direct receptor-mediated effects of sex hormones (Kwan et al., 1996) since estradiol and testosterone receptors are expressed on mesangial cells (Neugarten and Silbiger, 1995; Pawluczyk et al., 2009). The faster kidney function decline in men has been attributed to the specific proapoptotic and profibrotic properties of androgens (Elliot et al., 2007; Metcalfe et al., 2008). Besides, female sex hormones reduced inflammation and oxidative stress in kidney of SHR (Sullivan et al., 2007). Considering these hormones as protective for females, we could explain the absence of α -SMA in female CRF group despite the increased PTN.

In summary, PTN was an early finding and was associated to the presence of α -SMA in males, while castration inhibited these alterations. Conversely, castrated females presented an increase of α -SMA. Although available data still do not allow to a definitive conclusion, higher PTN probably contributing to fibrotic events, seems to be influenced by gender, suggesting a link of renal alterations with male sex hormones.

References

Badid C., Vincent M., McGregor B., Melin M., Hadj-Aissa A., Veysseyre C., Hartmann D.J., Desmouliere A., Laville M. (2000). Mycophenolate mofetil reduces myofibroblasts infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int.* 58, 51-61.

Baylis C., Wilson C.B. (1989). Sex and the single kidney. *Am. J. Kidney Dis.* 13, 290-298.

Coggins C.H., Lewis J.B., Caggiula A.W., Castaldo L.S., Klahr S., Wang S.R.(1998). Differences between women and men with chronic renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13,1430-1437.

Elliot S.J., Berho M., Korach K., Doublier S., Lupia E., Striker G.E., Karl M.(2007). Gender-specific effects of endogenous testosterone: female alpha-estrogen receptor-deficient C57Bl/6J mice develop glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 72, 464-72.

Gagliardini E., Conti S., Benigni A., Remuzzi G., Remuzzi A.(2010). Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 2081-2089.

Halbesma N., Brantsma A.H., Bakker S.J., Jansen D.F., Stolk R.P., De Zeeuw D., De Jong P.E., Gansevoort R.T. PREVEND study group. (2008). Gender differences in predictors of the decline of renal function in the general population. *Kidney Int.* 74, 505-512.

Hannedouche T., Chauveau P., Kalou F., Albouze G., Lacour B., Jungers P. (1993). Factors affecting progression in advanced chronic renal failure. *Clin. Nephrol.* 39, 312-320.

Hayden M.R., Whaley-Connell A., Sowers J.R. (2005). Renal redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic nephropathy: Paying homage to the podocyte. *Am. J. Nephrol.* 25, 553-569.

Hischberg R., Wang S. (2005). Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 43-52.

Ichikawa I., Ma J., Motojima M., Matsusaka T. (2005). Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 205-210.

Ji H., Pesce C., Zheng W., Kim J., Zhang Y., Menini S., Haywood J.R., Sandberg K. (2005). Sex differences in renal injury and nitric oxide production in renal wrap hypertension. *Am. J. Physiol. Heart. Physiol.* 288, H43-H47.

Kliem V., Johnson R.J., Alpers C.E., Yoshimura A., Couser W.G., Koch K.M., Floege J. (1996). Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int.* 49, 666-678.

Koop K., Eikmans M., Wehland M., Baelde H., Lipelaar D., Kreutz R., Kawachi H., Keriaschki D., de Heer E., Bruijn J.A. (2008). Selective loss of podoplanin protein expression accompanies proteinuria and precedes alterations in podocyte morphology in a spontaneous proteinuric rat model. *Am. J. Pathol.* 173, 315-326.

Kwan G., Neugarten J., Sherman M., Ding Q., Fotadar U., Lei J., Silbiger S. (1996). Effects of sex hormones on mesangial cell proliferation and collagen synthesis. *Kidney Int.* 50,1173-1179.

Lahdenkari A., Lounatmaa K., Patrakka J., Holmberg C., Wartiovaara J., Kestila M., Koskimies O., Jalanko H. (2004). Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2611-2618.

Lemos C.C., Mandarim-de Lacerda C.A., Dorigo D., Coimbra T.M. (2005). Chronic renal failure in male and female rats. *J. Nephrol.*18, 368-373.

Lombet J.R., Adler S.G., Anderson P.S., Nast C.C., Olsen D.R., Glasscock R.J. (1989). Sex vulnerability in the subtotal nephrectomy model of glomerulosclerosis in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 114, 66-74.

Lopez-Ruiz A., Sartori-Valinotti J., Yanes L.L., Iliescu R., Reckelhoff J.F. (2008). Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 295, H466-H474.

Metcalfe P.D., Leslie J.A., Campbell M.T., Meldrum D.R., Hile K.L., Meldrum K.K. (2008). Testosterone exacerbates obstructive renal injury by stimulating TNF-alpha production and increasing proapoptotic and profibrotic signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E435-43.

Miner J.H. (2003). A molecular look at the glomerular barrier. *Nephron. Exp. Nephrol.* 94, e119-e122.

Ng Y.Y., Huang T.P., Yang W.C., Chen Z.P., Yang A.H., Mu W., Nikolic-Paterson D.J., Atkins R.C., Lan H.Y. (1998). Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* 54, 864-876.

Neugarten J., Silbiger S.R. (1995). Effects of sex hormones on mesangial cells. *Am. J. Kidney Dis.* 26, 147-151.

Pavenstädt H. (2000). Roles of the podocyte in glomerular function. *Am. J. Physiol. renal Physiol.* 178, F173-F179.

Pawluczyk I.Z.A., Tan E.K.C., Harris K.P.G. (2009). Rat mesangial cells exhibit sex-specific profibrotic and proinflammatory phenotypes. *Nephrol. Dial. Transpl.* 24, 1753-1758.

Petrica L., Raica M., Schiller A., Velciov S., Gluhovschi G., Trandafirescu V., Bozdog G., Gluhovschi C., Bob F. (2000). Glycosaminoglycans and myofibroblasts modulate the glomerular and tubulointerstitial injury in primary type I mesangiocapillary glomerulonephritis. *Sci. J. Facta. Universitatis.* 7, 31-38.

Remuzzi G., Benigni A., Remuzzi A. (2006). Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J. Clin. Invest.* 116, 288-296.

Ruggenti P., Remuzzi G. (2000). The role of protein traffic in the progression of renal diseases. *Ann. Rev. Med.* 51, 315-327.

Ruiz-Torres M.P., López-Ongil S., Grier M., Díez-Marqués M.L., Rodríguez-Puyol M., Rodríguez-Puyol D. (2005). The accumulation of extracellular matrix in the kidney: Consequences on cellular function. *J. Nephrol.* 18, 334-340.

Sakemi T., Baba N. (1993). Castration attenuates proteinuria and glomerular injury in hyperlipidemic male Imai rats. *Nephron* 1993, 64:429-435.

Sandberg K. (2008). Mechanisms underlying sex differences in progressive renal disease. *Gender Med.* 5, 10-23.

Sartori-Valinotti J., Iliescu R., Fortepiani L.A., Yanes L.L., Reckelhoff J.F. (2007). Sex differences in oxidative stress and the impact on blood pressure control and cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharma. Physiol.* 34, 938-945.

Schwartz M.M., Bidani A.K. (1991). Mesangial structure and function in the remnant kidney. *Kidney Int.* 40, 226-237.

Shakland S.J. (2006). The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 69, 2131-2147.

Silbiger S.R., Neugarten J. (1995). The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 25, 515-533.

Silbiger S., Neugarten J. (2008). Gender and human chronic renal disease. *Gender Med.* 5 (suppl A), S3-S10.

Strutz F.M. (2009). EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int.* 75, 475-481.

Sullivan J.C., Semprun-Prieto L., Boesen E.I., Pollock D.M., Pollock J.S. (2007). Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1573-R1579.

Tapia E., Franco M., Sanchez-Lozada L.G., Soto V., Avila-Casado C., Santamaria J., Quiroz Y., Rodriguez-Iturbe B., Herrera-Acosta J. (2003) Mycophenolate mofetil prevents arteriolopathy and renal injury in subtotal ablation despite persistent hypertension. *Kidney Int.* 63, 994-1002.

Toot J., Jenkins C., Dunphy G., Boehme S., Hart M., Milsted A., Turner M., Ely D. (2008). Testosterone influences renal electrolyte excretion in SHR/y and WKY males. *B.M.C. Physiology.* 8, 1-10.

Tryggvason K., Wartiovaara J. (2001). Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 10, 543-549.

Yang N., Wu L.L., Nikolic-Paterson D.J., Ng Y.Y., Yang W.C., Mu W., Gilbert R.E., Cooper M.E., Atkins R.C., Lan H.Y. (1998). Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 1967-1974.

Weibel E.R., Kistler G.S., Scherle W.F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.* 30, 23-38.

Zhang L., Aoyagi D., Nakazawa K., Otani M. (2005). Post-inflammatory glomerular remodeling is influenced by transformed mesangial cells. *Pathol. Int.* 55, 189-201.

Figures

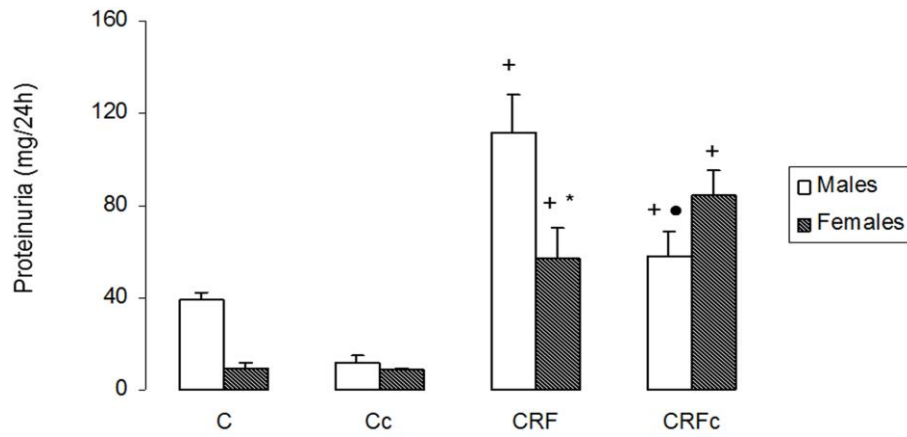


Figure 1: Proteinuria after 30 days.

Mean \pm SE; $p < 0.05$: + vs respective controls; * vs CRFM; • vs CMc.

C=control; c=castration; CRF=chronic renal failure.

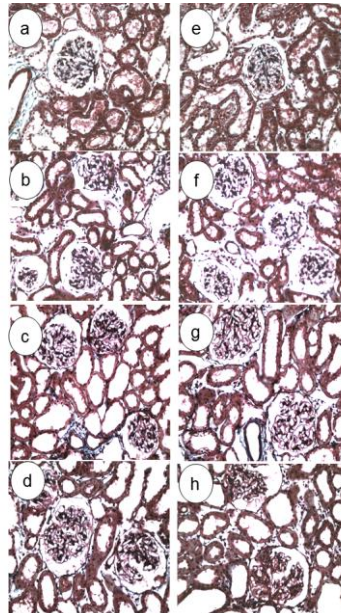


Figure 2: Photomicrographs of Masson's trichrome stained sections: CM (a), CMc (b), CRFM (c), CRFMc (d), CF (e), CFc (f), CRFF (g), CRFFc (h). (Original magnification x 200).

C=control; c=castration; M=male; F=female; CRF=chronic renal failure.

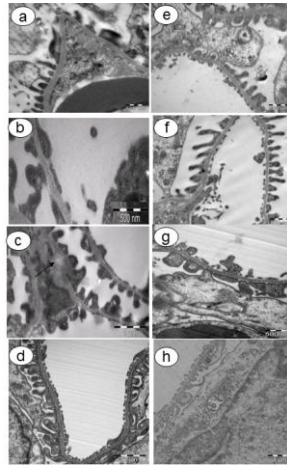


Figure 3: Electron microscopy image of groups after 30 days: CM (a; 27800x), CMc (b; 27800x), CRFM (c; 21560x), CRFMc (d; 21560x), CF (e;27800x), CFc (f; 27800x), CRFF (g; 27800x), CRFFc (h; 16700x).

C=control; c=castration; M=male; F=female; CRF=chronic renal failure.

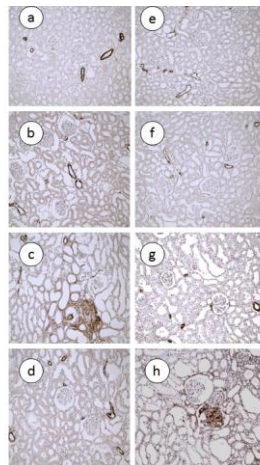


Figure 4: Photomicrographs of immunohistochemical expression of α -smooth muscle actin: CM (a), CMc (b), CRFM (c), CRFMc (d), CF (e), CFc (f), CRFF (g), CRFFc (h). (Original magnification x 200).

C=control; c=castration; M=male; F=female; CRF=chronic renal failure.