



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“MECANISMOS DE RENOPROTECCIÓN EN LA PROGRESIÓN A
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA INDUCIDOS POR UN EPISODIO DE
ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN RATAS HEMBRAS”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Ixchel Quetzalitzli Lima Posada

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Gerardo Gamba Ayala
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Elena Zambrano González
Instituto Nacional de Nutrición
Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Instituto Nacional de Nutrición**

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval y de Dr. Gerardo Gamba Ayala en la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” en el periodo de agosto 2013 a octubre de 2014.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de ésta tesis estuvo formado por la Dra. Elena Zambrano González y el Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.

Al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, por todas las facilidades otorgadas.

A los miembros del Jurado: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, Dr. Jesús Aguirre Linares, Dra. María Elena Chánez Cárdenas, Dr. Rogelio Hernández Pando y Dra. Lourdes Massieu Trigo.

Este trabajo fue realizado con los apoyos otorgados a la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 101030, 235855 y por la UNAM DGAPA 223915 y 203412-3)

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia al congreso “LXIII Reunión Anual del IMIN 2014”

Durante la realización de mis estudios de Maestría recibí una beca otorgada por el

CONACyT con el número de registro 369374.

A la QFB Rosalba Pérez Villalba por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Introducción | 1 |
| La lesión renal aguda (LRA)..... | 2 |
| Fisiopatología de la LRA..... | 5 |
| La lesión renal aguda como un factor de riesgo para la transición a enfermedad renal crónica..... | 8 |
| Enfermedad renal crónica..... | 9 |
| Fisiopatología de la enfermedad renal crónica..... | 10 |
| Dimorfismo Sexual en los mecanismos moleculares en respuesta a la LRA inducida por isquemia/reperfusión..... | 15 |
| Dimorfismo sexual en la progresión a ERC | 19 |
| Objetivos | 24 |
| Material y métodos | 25 |
| Animales..... | 25 |
| Protocolo experimental I..... | 25 |
| Protocolo experimental II..... | 25 |
| Modelo de LRA inducida por isquemia/renal bilateral en la rata..... | 26 |
| Ooforectomía bilateral en la rata hembra..... | 27 |
| Mediciones fisiológicas..... | 27 |
| Estudios histopatológicos..... | 28 |
| Análisis bioquímicos..... | 28 |
| Estudios moleculares..... | 29 |
| Análisis estadístico..... | 30 |
| Resultados | 31 |
| Discusión | 43 |
| Conclusión | 49 |
| Bibliografía | 50 |

MECANISMOS DE RENOPROTECCIÓN EN LA PROGRESIÓN A ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA INDUCIDOS POR UN EPISODIO DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN RATAS HEMBRAS

INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano de estructura compleja adaptada a varias funciones biológicas esenciales. La estructura renal contiene a niveles macro y microscópico organizaciones morfológicas altamente diferenciadas que vienen determinadas por su función. A groso modo el riñón consta de la corteza, la médula y de una pelvis que se conecta con el uréter. La médula se divide en interna y externa. La arteria renal penetra el riñón al lado del uréter bifurcándose hasta formar la arteriola aferente que conduce a la red capilar glomerular.^{1,2}

Las funciones del riñón son:

1. Depurar de la sangre los productos de desecho generados por el organismo, evitando la intoxicación por uremia.
2. Excretar mediante la orina la misma cantidad de agua, sodio, cloro, potasio, calcio y magnesio que se han ingerido, con la finalidad de mantener el balance.
3. Fabricar el bicarbonato que se destruye cada día con la dieta.
4. Fabricar las hormonas renales: eritropoyetina, renina y $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$ (metabolito activo de la vitamina D).

Para llevar a cabo estas funciones, el riñón está organizado en un millón de unidades funcionales denominadas nefronas³.

La nefrona está funcionalmente subdividida en una unidad de filtración llamada corpúsculo renal o glomérulo y un compartimento de reabsorción tubular segmentado. El glomérulo está formado por cuatro diferentes tipos celulares: células endoteliales glomerulares, podocitos, células mesangiales y células epiteliales parietales. La matriz extracelular que comparten los podocitos y las células endoteliales se denomina membrana basal glomerular, que junto con estas células constituyen las tres capas distintivas de la barrera de filtración glomerular. El mesangio proporciona un soporte al sistema vascular glomerular y las células epiteliales que forman la cápsula de Bowman. El filtrado urinario primario se colecta en la cápsula de Bowman y se vacía a través de una serie de túbulos epiteliales conectados que inician desde los túbulos proximales, el asa de Henle, los túbulos distales y finalmente un túbulo colector. Los túbulos de las nefronas y el túbulo colector expresan varios canales iónicos y de agua, así como transportadores que ayudan a concentrar y ajustar la composición del filtrado urinario por reabsorción y secreción. Este último paso es vital para la conservación de fluidos, mantenimiento del balance electrolítico y reabsorción de glucosa ⁴.

La lesión renal aguda (LRA)

La lesión renal aguda es un síndrome que se desarrolla por la reducción transitoria del flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona un aumento repentino en la concentración de creatinina en suero y que es a menudo acompañada por la disminución en el volumen de orina. La LRA se caracteriza por daño al epitelio tubular renal, inflamación y disfunción vascular. El daño y la muerte de las células tubulares son consideradas los factores

precipitantes en la LRA, además la regeneración y reparación tubular son considerados los principales eventos en la recuperación del riñón después del daño ⁵

La LRA es un síndrome de etiología multifactorial y clínicamente se divide en pre-renal, renal y post-renal. La forma prerrenal está caracterizada por un decremento de la tasa de filtración glomerular (TFG) lo cual disminuye la presión de perfusión renal sin daño al parénquima renal; las principales causas son hipovolemia por diarrea, hipotensión, vómito, hemorragias, quemaduras, sudoración excesiva, poca ingesta oral, diuresis, disminución de la resistencia vascular y vasoconstricción renal. Las causas de LRA postrenal están caracterizadas por obstrucción aguda del flujo urinario. La obstrucción del tracto urinario aumenta la presión intratubular y por lo tanto disminuye la tasa de filtrado glomerular. Las causas de LRA postrenal incluyen hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata en hombres; cánceres ginecológicos, especialmente cáncer cervical en mujeres; fibrosis retroperitoneal, cálculos uretrales, necrosis papilar, vejiga neurogénica y obstrucción intratubular por precipitación de diversas sustancias. Las causas renales de LRA son difíciles de clasificar, ya que existe una amplia variedad de alteraciones que pueden ocurrir al riñón; pero para facilitar su comprensión se dividen en las 4 principales estructuras del riñón que pueden ser afectadas:

1) Daño al epitelio tubular: Se denomina necrosis tubular aguda a la LRA que resulta del daño a los túbulos. Las dos causas principales son por isquemia y nefrotoxicidad.

2) Daño glomerular: ocurre en severos casos de glomerulonefritis (GN) aguda, que se puede generar en casos de GN idiopática de rápida progresión o como parte de una enfermedad sistémica como lupus eritematoso sistémico, endocarditis bacteriana o granulomatosis de Wegener.

3) Daño intersticial: por nefritis intersticial aguda por reacciones alérgicas a una variedad de medicamentos (por lo general antibióticos como penicilinas, cefalosporinas o sulfonamidas) o una infección (bacterianas o virales).

4) El daño vascular ocurre debido a que en los vasos intrarenales disminuye la perfusión renal y disminuye la tasa de filtración glomerular. Las causas del daño vascular renal incluyen hipertensión maligna, enfermedad arteroembólica, preeclampsia/eclampsia, y síndrome hemolítico urémico/púrpura trombocitopénica trombótica ⁶.

La prevalencia de LRA está en aumento en países de alto y bajo ingreso económico y se asocia con aumento de la morbilidad y la mortalidad. Estudios recientes reportan a la LRA entre el 3 y 9% de las admisiones en hospitales, con una mortalidad del 20% al 50% en unidades de cuidados intensivos (UCI). La mortalidad a largo plazo para aquellos que sobreviven el periodo de hospitalización también aumenta hasta 1.4 veces, siendo más elevado si la LRA fue más severa. Los casos de LRA que requieren terapia de reemplazo renal ocurre en un 5.6% en la UCI, con un elevado grado de mortalidad de hasta un 60%. Se estima que alrededor de dos millones de personas mueren por LRA cada año y los pacientes que sobreviven tienen un riesgo mayor para desarrollar Enfermedad Renal Crónica ^{7,8}

Fisiopatología de la LRA

En la LRA se produce un decremento rápido de la tasa de filtración glomerular debido a una disminución de flujo sanguíneo renal; la inflamación representa un componente importante que extiende la fase de daño. El daño renal se basa en la existencia de una deficiencia energética en los segmentos de la nefrona con gran actividad metabólica

(túbulos proximales y la parte ascendente gruesa del asa de henle), lo que genera daño renal. La recuperación del daño es mediada por el grado de células que pueden restaurar la función normal y promover la regeneración. El éxito de recuperación de la LRA depende del grado con el cual este proceso de reparación se lleve a cabo de manera adecuada.

Clínicamente la LRA se puede dividir en 4 fases: iniciación, extensión, mantenimiento y recuperación.

- 1) ***Iniciación***: Se inducen varias alteraciones estructurales y funcionales en las células epiteliales del túbulo proximal que se relaciona con una disrupción de los filamentos de actina. La extensión de estas alteraciones depende de la severidad del daño. Además existe un daño isquémico a las células del músculo liso vascular y células endoteliales lo que contribuye a las anormalidades estructurales que se observan en la vasculatura renal durante la LRA. La activación de las células endoteliales y epiteliales produce una liberación de diversas citocinas y quimiocinas que inician la cascada inflamatoria.

- 2) ***Extensión***: La hipoxia se mantiene por un mayor tiempo debido no solo al evento isquémico inicial, sino también por la respuesta inflamatoria. En esta fase las células vasculares endoteliales juegan un rol importante en el mantenimiento de la isquemia de las células epiteliales del túbulo renal, así como de la inflamación. Las células continúan bajo daño y muerte tanto por necrosis como por apoptosis, principalmente en la médula externa. En contraste, las células del túbulo proximal en la corteza externa se reparan y mejoran morfológicamente. Existe una continua producción y liberación de citocinas y quimiocinas que posteriormente potenciarán la cascada inflamatoria.

- 3) **Mantenimiento:** Las células sufren reparación, migración, apoptosis y proliferación con el fin de restablecer y mantener la integridad celular y tubular. Cuando el FSR se normaliza, las células epiteliales restablecen la homeostasis intracelular e intercelular.
- 4) **Recuperación:** La diferenciación celular continúa la polaridad epitelial se restablece y las funciones celulares y orgánicas regresan a la normalidad ^{6,9,10}.

Figura 1. Características fisiopatológicas de la LRA que llevan a ERC. La arquitectura del tejido renal normal comparada con la del tejido lesionado tras un episodio de insuficiencia renal aguda. El tejido lesionado muestra alteración de la arquitectura del tejido y la estructura celular, incluyendo cambios en el borde en cepillo. Una variedad de procesos patológicos se inicia en las células dañadas y en regeneración, incluyendo arresto prematuro del ciclo celular, activación de miofibroblastos y fibrocitos, infiltración de macrófagos y fibrosis. El destino de la célula, así como del microambiente y órganos, depende del balance entre los resultados de la reparación y las vías de regeneración, incluyendo la apoptosis, la dediferenciación, la actividad proinflamatoria y antiinflamatoria, cambios epigenéticos y profibróticos. Estos procesos pueden ocurrir de manera diferencial en conjuntos celulares heterogéneos en el microambiente del riñón. La desregulación crónica de estos factores en el tiempo y sus interacciones determinan el grado de respuestas fibróticas y la función del órgano.

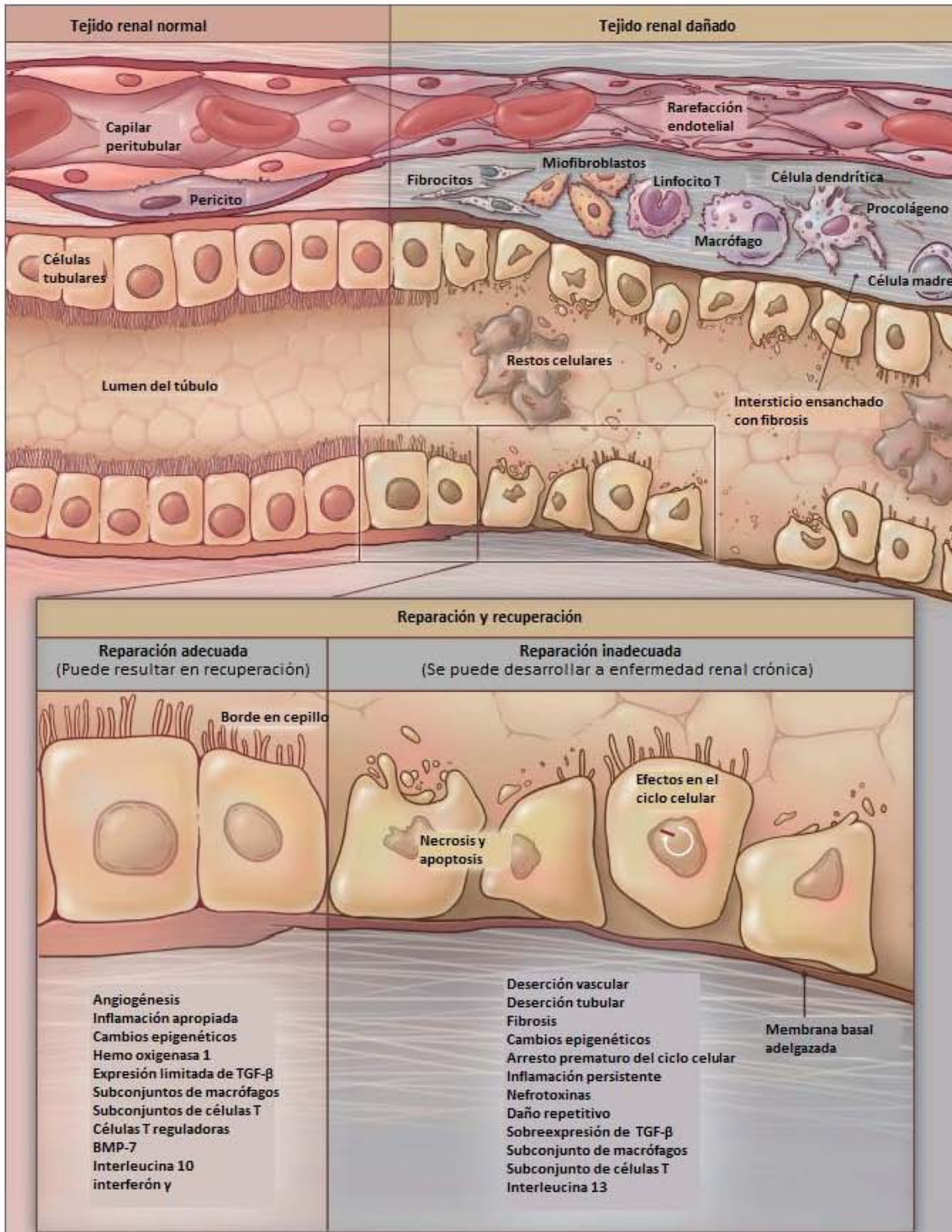


Figura 1. Características fisiopatológicas de la LRA que llevan a ERC.

Tomado de Chawla et al. 2014

La Lesión Renal Aguda como un factor de riesgo para la transición a Enfermedad Renal Crónica (ERC)

Los mecanismos por los que se da la transición de la LRA a ERC aún no están completamente dilucidados. Estudios en animales sugieren varios procesos causales: desórdenes de regeneración, reparación ineficiente, o ambos. El curso de la enfermedad renal después de un periodo de LRA está determinado por la disminución de la TFG, la reversibilidad del daño y el balance temporal entre los eficientes o ineficientes mecanismos de reparación y regeneración ¹¹.

Anteriormente se pensaba que aquellas personas que habían sufrido un episodio de LRA no experimentaban consecuencias posteriores en la estructura y función renal, sin embargo, estudios epidemiológicos recientes con pacientes que han sufrido periodos de LRA, demuestran que esto no ocurre así ¹². Por ejemplo, en una cohorte de pacientes que desarrollaron LRA y requirieron terapia de reemplazo renal durante su estancia hospitalaria, el riesgo a largo plazo de desarrollar ERC en etapa 4 o 5 aumentó 28 veces, consistente con la pérdida masiva de nefronas asociada con episodios severos de LRA ⁵. En otro estudio realizado en el Hospital Docente de Riad en Arabia Saudita se estudió la evolución de 2574 pacientes que fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos, el 12% (308) desarrollaron LRA y requirieron diálisis, de estos, el 28% (86) sobrevivieron y fueron dados de alta, posteriormente 40 pacientes (47%) de los que habían sido dados de alta continuaron requiriendo diálisis después de la misma ¹³. Por lo tanto se ha propuesto que la LRA es un factor de riesgo para el desarrollo de ERC, ERC en etapa terminal y un aumento de mortalidad.

Ya que diversos estudios sugieren que la LRA no sólo está directamente vinculada con la progresión de la ERC, sino que también causa ERC. Todo esto basado en que el aumento en la severidad del daño también está asociado con la severidad de la progresión de ERC; múltiples episodios de LRA predicen el desarrollo de ERC; la ERC ha sido reportada en niños, los cuales no tienen condiciones preexistentes como hipertensión, diabetes o enfermedad vascular. Todo lo anterior refuerza la idea de que la LRA es un factor de riesgo para el desarrollo de ERC ¹¹.

Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) se ha convertido en unos de los principales problemas de salud pública alrededor del mundo. La incidencia y la prevalencia de la falla renal están en constante aumento, lo que genera altos costos para los sistemas de salud. Las principales causas de falla renal son la diabetes tipo 2 y la hipertensión, que en conjunto representan el 60% de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal ¹⁴. Actualmente está bien establecido que la lesión renal aguda (LRA) es un síndrome asociado al desarrollo paulatino de ERC ¹⁰. En un estudio de más de 4000 pacientes con diabetes tipo 2 en Estados Unidos de América, en el que aproximadamente la mitad requirió una o más hospitalizaciones se observó que en los pacientes que requirieron hospitalización, el 29% experimentó al menos un episodio de LRA. Además este estudio mostró que LRA es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ERC y que cada episodio de LRA fue capaz de duplicar este riesgo ¹⁵.

La guías de la Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) se refieren a la ERC como todo el espectro de la enfermedad que ocurre después del inicio del daño renal. La ERC se define como la presencia de un daño renal estructural con una tasa de filtrado glomerular normal (alrededor de 120 ml/min) o ligeramente reducida (60 a 90 ml/min) independientemente de la etiología subyacente. La evidencia del daño estructural puede derivar de un estudio histológico, imagenológico o de las alteraciones persistentes en el examen de orina por un plazo superior a 3 meses, particularmente por la presencia de albuminuria ¹⁴.

Fisiopatología de la enfermedad renal crónica.

La fisiopatología de la enfermedad es multifactorial y las vías moleculares que se relacionan con el inicio y la progresión constituyen una rara y compleja red de reguladores redundantes. La lesión inicial causa daño histológico en el parénquima renal, la progresión de la enfermedad es el resultado de pérdida progresiva de nefronas, cambios hemodinámicos compensatorios a nivel glomerular; hipertensión e hiperfiltración glomerular de las nefronas remanentes; hipertrofia y atrofia tubular, fibrosis túbulointersticial, esclerosis glomerular progresiva, arterioesclerosis, susceptibilidad genética y respuestas humorales desordenadas. Esto conlleva a la fibrosis del parénquima renal con la pérdida definitiva de la función renal ^{11,14,16,17}.

El proceso que da lugar a la progresión hacia la ERC en general, inicia por diversas respuestas celulares y moleculares en respuesta al daño inicial, las cuales se generan con el fin de mantener la homeostasis, pero en lugar de lograrlo, se programan de manera que terminan dañando a las nefronas funcionales. Los fenómenos compensatorios que ejercen las nefronas remanentes debido a la pérdida de otras nefronas, exacerbaban la fisiopatología

glomerular. La liberación de un gran número de moléculas biológicamente activas en la nefrona distal y el túbulo-intersticio generan inflamación y desdiferenciación. Los requerimientos energéticos por el hiperfuncionamiento de las nefronas remanentes exceden los sustratos metabólicos disponibles y aunado a un inadecuado balance vascular, promueven la hipoxia/isquemia con una consecuente acidosis y generación de especies reactivas de oxígeno¹⁸⁻²².

La progresión de ERC se da a través de 3 fases: 1) Un estímulo de daño inicial 2) Mecanismos de reparación desregulados y empeoramiento de la función de las nefronas 3) Respuesta de las nefronas remanentes, generando mecanismos compensatorios por la pérdida de otras nefronas, lo que las lleva a realizar cambios en su actividad normal que pueden ser deletéreos para la supervivencia de las nefronas funcionales²³.

En la etapa inicial de la pérdida de las nefronas, las nefronas remanentes se hipertrofian con el fin de mantener la tasa de filtración glomerular: la superficie capilar del glomerulo aumenta para suplir esta demanda, pero los podocitos diferenciados no pueden proliferar para cubrir este incremento en el área, por lo tanto se hipertrofian y si esta respuesta hipertrófica es insuficiente, el glomérulo tendrá áreas desnudas de esta cubierta. Sin embargo, en cierto punto se alcanza el límite de este ajuste y como muchas nefronas se perdieron, la tasa de filtrado glomerular comienza a disminuir. Ya que la homeostasis del riñón se gobierna a nivel de las nefronas, pueden comenzar a existir desbalances de iones, por ejemplo, retención de sodio y consecuentemente aumento del volumen, lo cual requiere excreción de sodio, por lo cual se activan regulaciones hormonales que tratan de regular la excreción; en este caso, la habilidad de los mecanismos compensatorios puede permanecer hasta que el 90% de las nefronas hayan sido perdidas. Esto no sucede con otros iones como

los fosfatos o el calcio, los cuales a nivel plasmático aumentan y disminuyen, respectivamente cuando las nefronas se pierden. Estas variaciones encienden una serie de mecanismos que median el incremento de la hormona paratiroidea (PTH) y de la secreción del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23), que incrementan la secreción de fosfatos para normalizar los niveles plasmáticos de fosfatos y calcio. Este nuevo estado se alcanza hasta que el túbulo llega al máximo de respuesta y estas hormonas siguen aumentando en un vano intento de compensar, lo cual afecta de manera sistémica, por ejemplo en la resorción ósea y afectando a otros órganos²⁴.

La pérdida de las nefronas derivada del daño tubular o glomerular originados por inflamación, trombogénesis, disfunción podocitaria, daño isquémico, etc., inician una serie de eventos que desembocan en la hipertrofia de las nefronas remanentes, lo cual es el factor de progresión a ERC. Un mediador principal en la respuesta hipertrófica es el sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS) que puede regular tanto la hemodinámica, como la hipertrofia/hiperplasia celular. El incremento de la actividad de RAAS estimula diversas vías que median la hipertrofia, la producción de citocinas fibrogénicas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés); además el daño inflamatorio y glomerular puede causar daño tubular. Más tarde el aumento en la filtración glomerular de proteínas plasmáticas se ha propuesto que causan daño túbulointersticial, ya que pueden ser moléculas activas oxidantes o inflamatorias. Las vías comunes que generan hipertrofia de la nefrona: respuestas celulares al daño y eventos bioquímicos en la progresión de la pérdida de las nefronas^{18,25}.

Respuestas celulares al daño

1) **Desdiferenciación:** Cuando existe un estímulo estresante, las células se convierten algo menos diferenciadas en un proceso llamado transición epitelio mesénquima. Estas células muestran características de proliferación, migración y producción de citocinas. Esta puede ser una respuesta contraproducente para la reparación del daño ya que puede estar contribuyendo a la fibrosis del parénquima renal, al estar reclutando otras células fibrogénicas o estar produciendo ellas mismas proteínas de matriz extracelular. Citocinas como TGF- β , FGF, PDGF, angiotensina II, endotelina, entre otras, pueden tener roles potenciales en las vías que se encienden en la transición epitelio mesénquima²⁶.

2) **Inflamación:** Evidencia experimental ha mostrado que la inflamación juega un papel central en la progresión a ERC. Se ha propuesto que las moléculas proinflamatorias que se liberan en la nefrona distal, se reabsorben en el túbulo y se concentran de manera que promueven la inflamación. Los macrófagos que junto con las células dendríticas están presentes de manera normal en el riñón pueden estar participando en la señalización inflamatoria, siendo reclutados por quimioatrayentes al túbulo dañado²⁷.

3) **Disfunción endotelial:** El deterioro de la microcirculación renal contribuye potencialmente a la progresión de ERC. Las células endoteliales sufren apoptosis en respuesta a la pobre perfusión, lo cual genera rarefacción vascular, evento central en la pérdida de nefronas. Existe una función endotelial desregulada y un decremento en la angiogénesis, por lo que se generan factores angiogénicos que también pueden ser contraproducentes, ya que pueden actuar como citocinas inductoras de respuestas profibróticas y proinflamatorias. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) por ejemplo, puede promover inflamación y fibrogénesis; el aumento

en la proteína endostatina que es anti-angiogénica y se ha reportado que niveles altos de esta proteína correlacionan con el aumento en la tasa de progresión a ERC. Los niveles plasmáticos de la dimetilarginina asimétrica ADMA, que es un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, también se correlacionan con la severidad de la progresión ²⁸.

Eventos bioquímicos en la progresión de la pérdida de las nefronas.

1) *Aporte insuficiente ante las demandas metabólicas*: El riñón consume grandes cantidades de ATP con el fin de proveer la energía necesaria para el transporte de sales, ácidos orgánicos y otros constituyentes plasmáticos, este ATP es generado por el metabolismo aerobio. Para este fin, es importante recordar, que los riñones consumen el 20% del gasto cardíaco. Al disminuir el flujo sanguíneo renal en la LRA, ocurre un desplazamiento hacia el metabolismo anaerobio para suplir los requerimientos de ATP, lo que genera diversas vías que influyen la pérdida de más nefronas ²⁹.

2) *Acidosis tubular*: La acidosis tiene consecuencias tanto fisiológicas como metabólicas. La producción de amonio en respuesta local a la acidosis podría activar al complemento y causar daño al tejido. Se ha observado experimentalmente que la acidificación tubular estimula la producción de ROS, lo que genera aun mayor daño renal ³⁰.

3) *Metabolismo oxidativo y generación de ROS*: uno de los mecanismos mediante los cuales la hipoxia genera ERC es la generación de especies reactivas de oxígeno, que se presentan en 3 formas inestables; ión hidroxilo, anión superóxido y peróxido de hidrógeno, las cuales juegan un papel importante en la transducción de señales que desembocan en hipertrofia, alteración de las interacciones proteína-proteína, inflamación, proliferación, entre otros procesos deletéreos ³¹.

4) *Transducción de señales estimuladas por hipoxia*: el principal actor es el factor inducible por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés), el cual juega un rol importante en el progreso de la enfermedad. Las acciones angiogénicas de HIF pueden ser protectoras en el daño agudo, mientras que sus acciones crónicas pueden ser deletereas, ya que interviene en el desarrollo del fenotipo fibrótico de las células epiteliales de manera directa o indirecta, así como en la activación de los genes de colágeno estimulada por TGF- β aún en ausencia de hipoxia ³².

Dimorfismo Sexual de los mecanismos moleculares en respuesta a la LRA inducida por isquemia/reperfusión

Existen diferencias de sexo en varios niveles de los mecanismos de la enfermedad, pero el mecanismo principal son las hormonas sexuales. Se ha demostrado que la testosterona y los estrógenos juegan un papel importante en el daño renal inducido por isquemia/reperfusión. Los estudios muestran que ante la castración de las ratas macho, el daño renal por isquemia/reperfusión es menor que en los machos sin castración y la administración de estrógenos reduce parcialmente este tipo de lesión renal ^{33,34}. Diversos laboratorios, incluyendo el nuestro, investigan los mecanismos moleculares de estas diferencias de género. Los mecanismos celulares y las vías de señalización que han sido implicadas en este dimorfismo sexual se resumen a continuación:

Tabla No. 1 Mecanismos moleculares en el dimorfismo sexual de la LRA.

| Mecanismo | Estrógeno | Testosterona |
|--|---|---|
| Cinasas de proteína activada por mitógenos (MAP cinasas) | Aumenta la activación de ERK, disminuye la activación de JNK. ³⁵ | Aumenta la activación de JNK y p38. ³⁵ |
| Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) | Aumenta la actividad de eNOS. ³⁶ | Disminuye la actividad de eNOS. ³⁶ |
| Endotelina | Disminuye su producción. ³⁷ | |
| Canales de ATP sensibles a potasio (K _{ATP}) | Activa los canales K _{ATP} . ³⁸ | Activa los canales K _{ATP} . ³⁸ |
| Adenosina | | Antagoniza. ³⁸ |
| Angiotensina II | Disminuye la expresión de receptores AT1, aumenta niveles de angiotensiógeno y disminuye los niveles de renina. ³⁹ | Estimula su producción. ³⁹ |
| Akt | Aumenta la activación sostenida de Akt. ⁴⁰ | Disminuye la activación sostenida de Akt. ⁴⁰ |

Cinasas de proteína activada por mitógenos MAPK

Las MAPK regulan muchos procesos celulares. Se dividen en 3 subfamilias ERK, JNK y p38. Estas cinasas se activan por el daño por isquemia/reperfusión (I/R). ERK promueve la supervivencia de la célula, mientras que JNK y p38 conducen a la célula hacia la muerte. Estudios muestran que la fosforilación de ERK se activa en la lesión por I/R y que puede estar mediada por estrógenos. Los estrógenos a través del receptor de estrógenos activan la vía Src/Shc/ERK y median un efecto antiapoptótico. Otros estudios muestran que la testosterona media la activación de la MAPK p38 producida por I/R, la cual induce la producción de TNF α que a su vez induce apoptosis ³⁵.

Óxido Nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) juega un papel importante en la regulación del tono vascular renal y la hemodinámica a través de mantener un estado de vasorelajación. Las diferencias de sexo se han visto en el riñón en diferentes modelos animales, en donde se ha observado que las hembras tienen mayor mRNA y proteína de eNOS en comparación con los machos. De acuerdo con esto, la ovariectomía reduce su expresión de eNOS, mientras que la terapia estrogénica la reestablece. También se ha observado que la testosterona disminuye la expresión de eNOS. Los estrógenos activan a la eNOS de manera bifásica: el aumento inicial es mediado por ERK mientras que el tardío ocurre a través de PI3K, ambas vías son activadas a través de las acciones no genómicas del estrógeno ³⁶.

ATPasa sodio-potasio

Se ha observado que el aumento del calcio intracelular contribuye al daño celular que se observa durante la LRA ⁴¹. Y también se ha reportado que un aumento en la concentración intracelular de sodio se correlaciona con un aumento en la concentración de calcio. La acumulación de sodio es causada por la inhibición de la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, que ocurre por la disminución de ATP durante un evento isquémico. El aumento del sodio conduce a la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y por lo tanto a una sobrecarga de calcio. A este respecto, se ha reportado que los machos exhiben una mayor inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa que en la ratas hembras y la administración de estradiol aumenta la expresión de Na^+/K^+ ATPasa ⁴².

Endotelina

Los estrógenos reducen la producción de endotelina, pero el mecanismo por el cual ocurre esta reducción, no está completamente descrito. Una de las posibles explicaciones es que el aumento de NO por estrógenos disminuye la expresión de endotelina, o bien que los estrógenos disminuyen la sobrecarga de calcio y por lo tanto la producción de endotelina causada por un proceso isquémico ³⁷.

Adenosina y canales de ATP sensibles a potasio

Durante la hipoxia, isquemia o inflamación se produce localmente adenosina y ésta media una variedad de funciones. Este efecto se debe a la presencia de múltiples receptores de adenosina localizados en diferentes regiones del riñón. Cuatro tipos de receptores de proteínas G han sido identificados A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . La activación de A_1 y posiblemente de A_3 produce preconditionamiento y provee protección probablemente por aumento de la

actividad de K_{ATP} mitocondrial (ATPasa mitocondrial sensible a potasio). Agonistas de A_{2A} también proveen protección ante lesión renal por I/R, la cual se relaciona con la inhibición de la actividad de la oxidasa de neutrófilos, la acumulación de neutrófilos, la expresión endotelial de moléculas de adhesión y la producción de citosinas. A_{2A} también media la vasodilatación producida por adenosina y el incremento del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular. En isquemia renal la activación del receptor A_1 y A_{2A} es protectora. Estudios muestran que los estrógenos pueden activar canales K_{ATP} y proveer protección de I/R renal a través de ellos. En contraste se ha visto que la testosterona bloquea la vasodilatación mediada por adenosina. Aunque se ha demostrado en modelos celulares que la testosterona disminuye la muerte inducida por isquemia en cardiomiocitos, por activación de canales K_{ATP} ³⁸.

Apoptosis

La isquemia renal prolongada conduce a la muerte celular por necrosis, mientras que en periodos cortos, la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular. La testosterona promueve la apoptosis en células del endotelio vascular y células del túbulo renal. La testosterona sobre-regula Fas, ligando de Fas y el dominio Fas asociado a muerte. También disminuye la expresión de Bcl-2, mientras que aumenta la de Bax. Otros estudios muestran que uno de los reguladores de la supervivencia de la célula es Akt (proteín cinasa B), la cual es activada por diversos estímulos primarios a través de PI3K. Se han encontrado diferencias de sexo en niveles basales de Akt, siendo mayores en mujeres que en hombres⁴⁰.

Dimorfismo sexual en la progresión a ERC

Existe cada vez más evidencia de que la patogénesis, las características clínicas y el pronóstico de enfermedades cardiovasculares y renales es muy diferente entre los hombres y las mujeres, lo cual tiene mucho sentido dado que la fisiología de la mujer es diferente a la del hombre, sin embargo poca atención se ha puesto al dimorfismo sexual. Un ejemplo claro de esta dimorfismo sexual se encuentra en la mayor incidencia de las enfermedades cardiovasculares en los hombres que en las mujeres de edad similar y el aumento de estas enfermedades en la menopausia ⁴³⁻⁴⁵.

Se han observado disparidades con respecto al sexo en la incidencia, prevalencia y progresión de la ERC aunque los mecanismos que explican estas diferencias no han sido completamente descritos. A diferencia de lo que se ha observado con los modelos animales, los estudios que describen la relación del sexo y la progresión a ERC en humanos, muestran resultados contradictorios ⁴⁶.

Para evaluar estas discrepancias se han llevado a cabo diversos meta-análisis, los cuales han arrojado resultados diferentes. Por ejemplo, para determinar el efecto del sexo en la progresión de la enfermedad renal no diabética, la enfermedad renal poliquística autosómica dominante, la nefropatía por IgA, la nefropatía membranosa, o la ERC de etiología desconocida, se llevó a cabo un meta-análisis que incluyó 68 estudios con un total de 11,345 pacientes y se encontró que la progresión de este tipo de enfermedades renales fue más rápida en hombres que en las mujeres ⁴⁴. En apoyo a este meta análisis, dos estudios recientes demostraron que la progresión a ERC es peor en el hombre que en la mujer ^{47,48}. Así mismo, la cohorte PREVEND (del inglés, Prevention of Renal and Vascular End-stage Disease) basada en la comunidad, reveló que en el hombre, la edad, la

albuminuria, el índice de masa corporal y los niveles sanguíneos de glucosa son factores de riesgo que exacerban la progresión a enfermedad renal terminal en mayor magnitud que en la mujer ⁴⁹. En otro meta-análisis que evaluó el efecto de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en la progresión de la enfermedad renal en 11 estudios al azar, los autores concluyeron que las mujeres tuvieron un peor pronóstico de progresión de enfermedad renal que los hombres después de corregirlos por presión arterial y excreción de proteínas en orina. Sin embargo, la mayoría de las mujeres participantes estaban en edad postmenopáusica, lo que podría explicar las diferencias encontradas en estos dos estudios ⁴⁶. En otro estudio realizado para evaluar el impacto del sexo en la glomerulonefritis primaria se observó un aumento de la supervivencia renal en mujeres jóvenes con nefropatía membranosa y glomeruloesclerosis focal y segmentaria, comparada con los hombres, en los cuales fue menor ⁵⁰. Estos estudios sugieren una menor predisposición al desarrollo de enfermedades renales en el sexo femenino, que fue hormonalmente dependiente, aunque los mecanismos específicos por los que las hormonas sexuales influyen en la progresión de la enfermedad renal no están completamente comprendidos.

En la mayoría de los modelos animales de ERC los machos progresan más rápido que las hembras, por lo que se ha sugerido que las hormonas sexuales juegan un papel muy importante en determinar el grado de susceptibilidad al daño renal progresivo ⁵¹. En animales de experimentación se ha demostrado que la testosterona y los estrógenos juegan un papel importante en el daño renal inducido por isquemia/reperfusión. De hecho, la castración en machos reduce el daño renal ante la isquemia, mientras que la administración de estrógenos reduce parcialmente esta enfermedad ^{33,34}.

Diversos investigadores alrededor del mundo investigan los mecanismos

moleculares de este dimorfismo sexual. A este respecto se ha reportado que los estrógenos poseen propiedades antifibróticas y antiapoptóticas en el riñón ⁵². La administración de 17-beta estradiol a ratas hipertensas ovariectomizadas atenuó la glomerulosclerosis y la fibrosis túbulo-intersticial ⁵³ y en las ratas con diabetes tipo II, protegió a los podocitos mediante el incremento de los receptores de estrógenos beta ⁵⁴. Este efecto sobre los podocitos, al parecer es mediado por la estabilización del citoesqueleto de estas células ⁵⁵. De forma contraria, se ha postulado que la testosterona tiene propiedades fibróticas y apoptóticas a través de aumentar la señalización de TNF α ⁵⁶.

Otro mecanismo que se ha explorado es la participación de la endotelina. La endotelina es un péptido de 21 aminoácidos que se une a los receptores ETA produciendo un aumento de calcio en las células del músculo liso y por consiguiente una potente vasoconstricción. Mientras que cuando se une a los receptores ETB produce vasorelajación a través de promover la liberación de óxido nítrico ⁵⁷. El riñón es uno de los órganos más sensible a la vasoconstricción inducida por la endotelina exógena ⁵⁸, siendo mayor su efecto vasoconstrictor sobre la arteriola aferente ⁵⁹. En la mayoría de los modelos experimentales de daño renal se reportado mayor expresión de endotelina en los machos lo que condiciona mayor vasoconstricción cortical y medular, así como mayor daño renal que se reduce significativamente con la gonadectomía, lo que sugiere la participación de las hormonas sexuales en este efecto vasoconstrictor de la endotelina. Por el contrario, las ratas hembras se protegen del daño renal por tener aumentada la señalización a través del receptor ETB ⁶⁰. La mayor progresión de enfermedades renales en el hombre que en la mujer también parece explicarse por varios candidatos como diferencias en la expresión y señalización de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) ³⁵, la síntesis de óxido nítrico por la

sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) ³⁶, y de la Na⁺/K⁺ ATPasa ⁴¹.

Por consiguiente, consideramos que la integración de los aspectos del dimorfismo sexual en la progresión a ERC, nos permitirá identificar nuevos blancos terapéuticos, con el fin de mejorar los tratamientos existentes y reducir el deterioro gradual de la estructura y la función renal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el dimorfismo sexual afecta la transición de la LRA a ERC a nivel funcional, histopatológico y de estrés.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el curso temporal de la ERC inducida por un episodio de LRA en las ratas hembra y en las ratas macho.
2. Determinar si la progresión a ERC es menor en la rata hembra que en el macho y si ésta es modificada por la ooforectomía.
3. Evaluar el curso temporal de la ERC inducida por un episodio de LRA en las hembras ooforectomizadas para determinar la influencia de los estrógenos en el comportamiento de la fisiopatología renal en las hembras después de un evento de isquemia/reperfusión.
4. Estudiar si el dimorfismo sexual en la transición de la LRA a ERC se relaciona con cambios en los niveles de óxido nítrico y en el estrés oxidante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembra y macho, las cuales fueron provistas por el bioterio del INCMNSZ. Los animales se mantuvieron en cajas hasta su sacrificio en un ciclo de luz-obscuridad 12:12 h y con acceso libre al alimento y al agua. El protocolo se condujo con la autorización del comité de ética.

Diseño experimental

Protocolo experimental I

Se incluyeron 39 ratas Wistar **hembra** con un peso entre 260 y 300 g. Las ratas se subdividieron en 7 grupos: Dos grupos de animales control sometidos a cirugía falsa que se estudiaron y sacrificaron a las 24 h y a los 120 días; y cinco grupos que se sometieron a isquemia renal bilateral de 45 min y fueron estudiados a las 24 h y a los 30, 60, 90 y 120 días post-isquemia.

También se incluyeron 39 ratas Wistar **macho** con un con un peso entre 260 y 300 g. Las ratas se subdividieron en 7 grupos: Dos grupos de animales control sometidos a cirugía falsa que se estudiaron y sacrificaron a las 24 h y a los 120 días; y cinco grupos que se sometieron a isquemia renal bilateral de 45 minutos y fueron estudiados a las 24 horas y a los 30, 60, 90 y 120 días post-isquemia.

Protocolo experimental II

Se incluyó un segundo grupo de 40 ratas Wistar hembra las cuales fueron ooforectomizadas a los 70 días de edad y se dejaron evolucionar 1 mes hasta que disminuyeron los niveles de

estrógenos. Los animales se dividieron en 7 grupos: Dos grupos de animales control sometidos a cirugía falsa que se estudiaron y sacrificaron a las 24 h y a los 120 días; y cinco grupos que se sometieron a isquemia renal bilateral de 45 min y fueron estudiados a las 24 h y a los 30, 60, 90 y 120 días post-isquemia.

Modelo de LRA inducida por isquemia/renal bilateral en la rata

La lesión renal aguda se realizó mediante el modelo de isquemia renal bilateral de 45 min, seguido de reperfusión. Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/Kg. Posteriormente, los animales se colocaron en una mesa termoregulada, la cual permitió tener a los animales en condiciones de temperatura óptimas. Se realizó una incisión en la línea media para exponer los riñones y se interrumpió el flujo sanguíneo renal de los animales, mediante la colocación de un clip en cada arteria renal durante 45 min. Posteriormente, se retiraron los clips, se dejó que los riñones reperfundieran, los animales fueron suturados de la pared abdominal y se dejaron evolucionar según el tiempo correspondiente a cada grupo. Los animales control sometidos a cirugía falsa se manipularon de igual manera que los sometidos a isquemia/reperfusión, exceptuando la colocación de clips. Después de la cirugía, los animales permanecieron en las camas termoreguladas hasta que desapareció el efecto de la anestesia; posteriormente se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina de 24 horas, con agua *ad libitum*. Posterior a la recolección, los animales fueron devueltos a sus jaulas con alimento y agua *ad libitum*.

Ooforectomía bilateral en la rata hembra

Las ratas hembra del protocolo II se sometieron a ooforectomía bilateral a los 70 días de edad. Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/Kg. Posteriormente se colocó a los animales en una cama termoregulada, los oviductos fueron ligados y removidos; la pared abdominal y piel fueron suturadas. Después de la cirugía, los animales permanecieron en las camas termoreguladas hasta que desapareció el efecto de la anestesia; posteriormente fueron devueltos a sus jaulas con alimento y agua *ad libitum*.

Mediciones fisiológicas

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas para recolección de orina correspondiente a las 24 h post-cirugía y cada 30 días hasta completar el periodo de tiempo de cada grupo. Se midió el volumen de la recolección de 24 h. También se obtuvo una muestra de sangre para extraer plasma. Se cuantificó la proteinuria y la depuración de creatinina. Al finalizar el periodo experimental, las ratas fueron nuevamente anestesiadas con pentobarbital sódico (30 mg/Kg); se colocó a la rata en una mesa termoregulada a 37°C, se determinó la tensión arterial media (TAM) mediante cateterización de la arteria femoral con un tubo de polietileno (P50) acoplado a un polígrafo de Grass. El flujo sanguíneo renal (FSR) se determinó a través de una sonda de ultrasonido conectada a un flujómetro, la cual se colocó en la arteria renal izquierda previamente disecada. Se ligó el paquete vascular del riñón derecho y se extrajo completamente, se determinó el peso del riñón y posteriormente fue seccionado en corteza y médula. Ambas secciones se congelaron en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -70°C para posteriores estudios moleculares. El riñón izquierdo se perfundió con solución salina al 0.9% y posteriormente con una solución de con

formaldehído al 4% a través del catéter colocado en la arteria femoral; una vez perfundido se retiró el riñón y se realizó un corte sagital y otro transversal. Los tejidos fueron incluidos en parafina y se realizaron las tinciones de PAS (Ácido peryódico de Schiff) y Rojo de sirio.

Estudios histopatológicos

El análisis de las laminillas se efectuó de manera cegada. En las laminillas con tinción de PAS se evaluó la hipertrofia mediante la determinación del diámetro glomerular. Se capturaron 10 campos de corteza renal de las ratas utilizando una cámara digital incorporada en un microscopio marca Nikon y se midieron los diámetros de al menos 100 glomérulos por rata con el programa *eclipse net*. También se midió el espesor tubular de al menos 100 túbulos para determinar el grado de dilatación tubular. En los cortes histológicos teñidos con rojo de sirio se digitalizaron 10 campos subcorticales y se evaluó el porcentaje de área tubular afectada mediante morfometría. El porcentaje de fibrosis se calculó al dividir el área fibrótica entre el área túbulo-intersticial total excluyendo el área glomerular y de la luz tubular.

Análisis Bioquímicos

Proteinuria: La excreción de proteínas en orina se cuantificó mediante el método turbidimétrico de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 10%, usando una curva estándar de albúmina, sobre la cual se interpolaron las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Depuración de Creatinina: Se determinaron la creatinina sérica y la urinaria mediante el un estuche comercial (QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit). Posteriormente se calculó la depuración mediante la fórmula: $\text{DepCr (ml/min)} = \frac{[\text{Creat orina (mg/dl)}] [\text{flujo urinario (ml/min)}]}{[\text{Creat sérica (mg/dl)}]}$. Esta determinación se basa en el método de Jaffe para medir directamente la creatinina en muestras biológicas, utilizando picrato que se une con la creatinina y forma un complejo con color rojo que puede medirse mediante espectrofotometría a 510 nm.

Excreción urinaria de Peróxido de Hidrógeno: los niveles urinarios de H_2O_2 se determinaron mediante el estuche comercial Amplex® RedHydrogen Peroxide/Peroxidase Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta metodología se basa en reacción del H_2O_2 con la peroxidasa, lo que genera un producto de oxidación, la resurfina de color rojo-fluorescente, la cual puede ser cuantificada espectrofotométricamente a 560 nm.

Excreción urinaria de Nitritos y nitratos: a partir de muestras de orina se determinó la producción de NO a través de la medición de sus metabolitos estables: los nitritos y los nitratos, mediante el kit comercial Colorimetric Nitric Oxide Assay Kit (Oxford Biomedical Reserch), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la reducción de nitratos en nitritos usando la enzima nitrato reductasa, posteriormente se cuantifican los nitratos totales por espectrofotometría mediante la reacción de Griess a 540 nm.

Estudios Moleculares

Extracción de RNA total: Se extrajo RNA total de las muestras de corteza renal mediante el método de homogeneizado con trizol (Invitrogen). Posteriormente se cuantificó la concentración de las muestras del RNA extraído mediante espectrofotometría con luz UV

(260/280 nm) y se verificó la integridad del mismo mediante el corrimiento de 2 µg de RNA en un gel de agarosa al 1%.

RT-PCR: Se realizó la transcripción reversa (TR) de 1 µg de RNA de cada una de las muestras, utilizando el kit M-MLV, Reverse transcriptase Invitrogen, para la obtención de cDNA. Se llevó a cabo la validación de cada sonda para el tejido mediante curvas de concentración de cDNA (Producto de la TR, 1:10, 1:100, 1:1000). Se determinó la concentración de cDNA para cada sonda como sigue: TGF-β (1:100), HIF1-α (1:100), y eNOS (1:100) y 18S (1:1000). Posteriormente se realizó la amplificación del cDNA, mediante PCR en tiempo real utilizando sondas marcadas con un fluoróforo específicas para los genes de TGF-β, HIF1-α, y eNOS, (Sondas Taqman de Applied Biosystems); utilizando 18S como gen control para el cálculo de los niveles relativos de RNA mensajero de cada uno de éstos genes. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Western blot: Se cargaron 10 µl de orina diluida en solución fisiológica (1:10) en geles de SDS-PAGE al 8.5%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti-Hsp72 mouse (Enzo) dilución 1:5000 toda la noche y el anticuerpo secundario IgG-HRP goat anti-mouse 1:5000 (Sta. Cruz). Las membranas fueron reveladas con el sustrato quimioluminiscente Millipore.

Análisis estadístico

El tratamiento de los datos fue mediante ANOVA, el cual se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5. En el caso de las diferencias en la distribución de los diámetros y áreas

glomerulares se evaluaron por un análisis de contingencia y por la prueba de Bonferroni. Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar y las diferencias estadísticamente significativas se presentan en aquellas en las cuales p es menor a 0.05.

RESULTADOS

A) RESULTADOS DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

Nuestro primer objetivo se centró en evaluar el curso temporal de la transición de la LRA a ERC en las ratas hembra, inducida por un episodio de LRA y compararlo con el de las ratas macho. La LRA se indujo mediante un periodo de isquemia renal bilateral durante 45 min y se compararon con el grupo control sometido a cirugía falsa; estos grupos se estudiaron 24 h después de la reperusión. En la figura 2 se muestra la excreción urinaria de proteínas y la función renal a las 24-h post-isquemia comparada con los grupos controles respectivos. Como se puede apreciar, los animales sometidos a isquemia presentaron una elevación significativa de la proteinuria. Siendo la magnitud del incremento con respecto al grupo control de 15 veces para las hembras y de 2 veces para los machos. La isquemia/reperusión también produjo disfunción renal que se caracterizó por la reducción significativa de la depuración de creatinina y del flujo sanguíneo renal, sin cambios en la tensión arterial media.

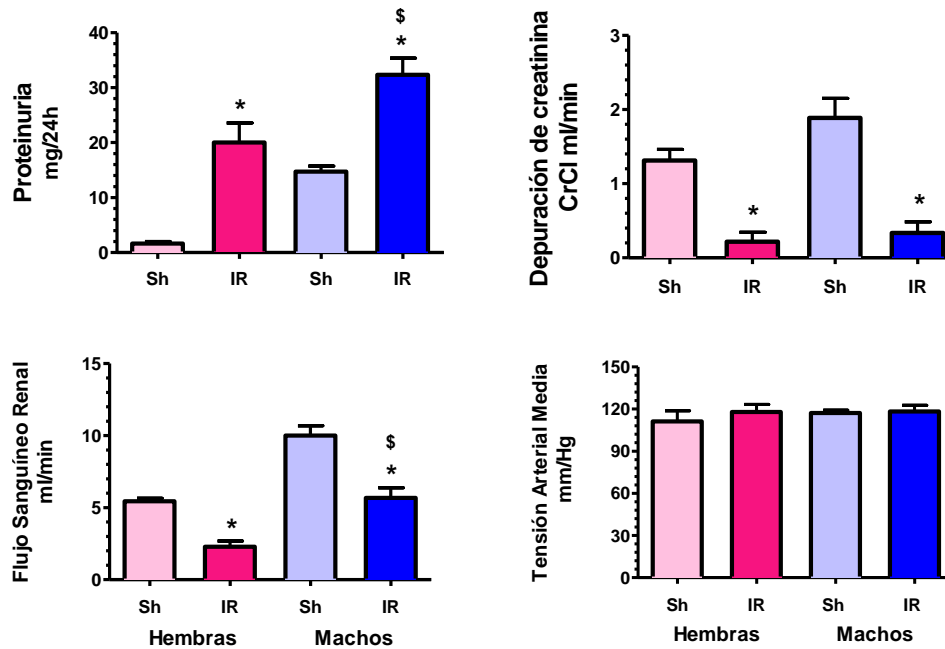


Figura 2. Inducción de un periodo de LRA por isquemia renal bilateral de 45 minutos genera aumento en la proteinuria y disfunción renal. A) Niveles de proteinuria a las 24h (n=5-6 por grupo) B) Depuración de creatinina a las 24 h (n=5-6 por grupo). C) Flujo sanguíneo renal a las 24 h (n=5-6 por grupo). D) Tensión arterial media a las 24h (n=5-6 por grupo). *p<0.05 vs Sh Hembras ó Sh Machos; \$p<0.05 vs IR Hembras.

En nuestro laboratorio hemos encontrado un nuevo biomarcador sensible y temprano de la LRA, que es la proteína de choque térmico Hsp72. Con el fin de evaluar que la isquemia/reperfusión producía el mismo grado de daño renal en las hembras y en los machos, decidimos analizar la excreción urinaria de Hsp72, 24-h post-isquemia por un análisis de Western blot.

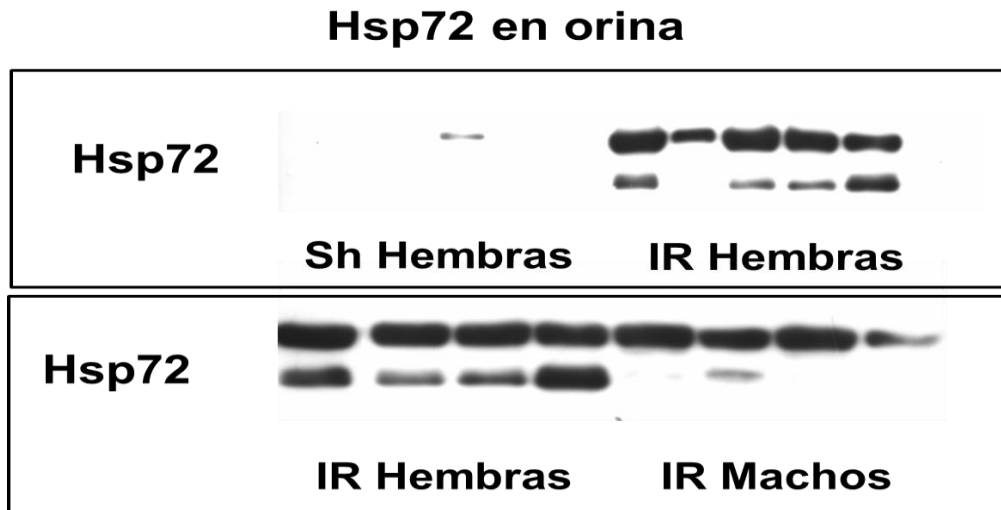


Figura 3. Expresión de Hsp 72 en orina de 24 h. Se observa el aumento del marcador de LRA tanto en hembras como en machos sometidos a isquemia renal bilateral de 45 minutos (n=5 por grupo).

Como se muestra en la Figura 3. Las ratas controles prácticamente no presentaron niveles Hsp72 en la orina, en cambio en las ratas hembra sometidas a isquemia tuvieron una gran cantidad de este biomarcador de daño renal en la orina (blot superior). Cuando se compararon las ratas hembras y macho sometidas a isquemia/reperfusión (blot inferior) podemos observar cómo la expresión de esta proteína en orina es igual en todos los grupos, lo cual evidencia que el grado de LRA fue similar en todos los grupos estudiados.

Posteriormente, en otro set de animales evaluamos la evolución de la función renal y la proteinuria, desde un mes hasta cuatro meses post-isquemia (Figura 4).

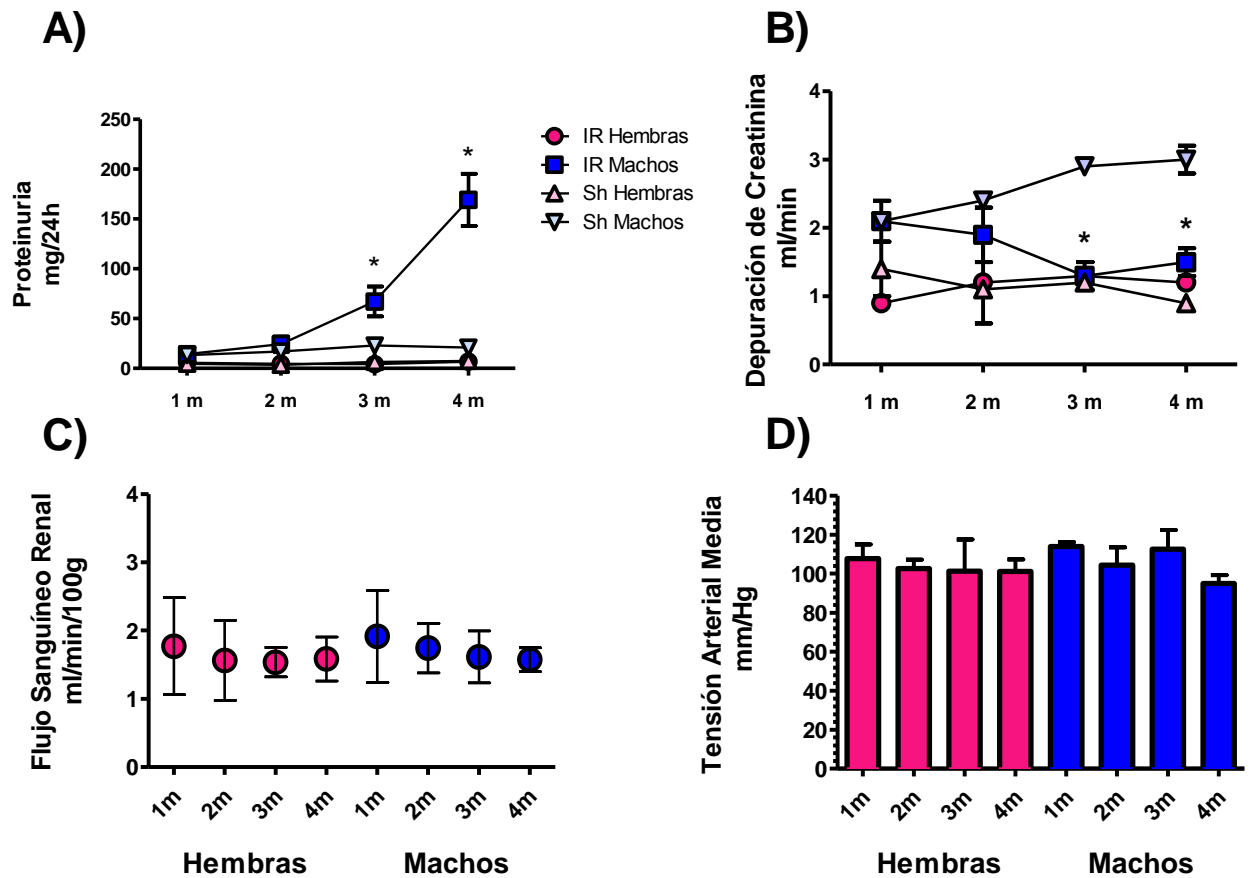


Figura 4. El curso temporal de la inducción de ERC por un periodo de LRA por isquemia renal bilateral de 45 min es diferente en hembras y machos. A) Niveles de proteinuria mensuales (n=4-8 por grupo) B) Depuración de creatinina mensual (n=4-8 por grupo). C) Flujo sanguíneo renal por mes (n=4-8 por grupo). D) Tensión arterial media por mes (n=4-8 por grupo). * $p < 0.05$ vs Sham hembras ó Sham machos.

En la figura 4A, se muestra que en el grupo de machos con isquemia, la proteinuria fue aumentando gradualmente en el transcurso del estudio, siendo estadísticamente significativa a partir del tercer mes y estableciéndose muy marcada al cuarto mes. En las hembras no se observaron cambios en este parámetro, manteniéndose los valores iguales a su grupo control. Así mismo, en la figura 4 se presentan los parámetros fisiológicos de

estos grupos de animales. Como se puede apreciar, el grupo de ratas macho sometidas a un periodo de isquemia presentó disfunción renal (por la disminución de la depuración de creatinina) desde el tercer mes comparado con su grupo control, mientras que la depuración de creatinina en el grupo de hembras con isquemia renal no presentó cambios (Fig. 4B). No hubo cambios estadísticamente significativos en el flujo sanguíneo renal de las hembras con respecto al de los machos, ni en la tensión arterial media (Figuras 4C y 4D).

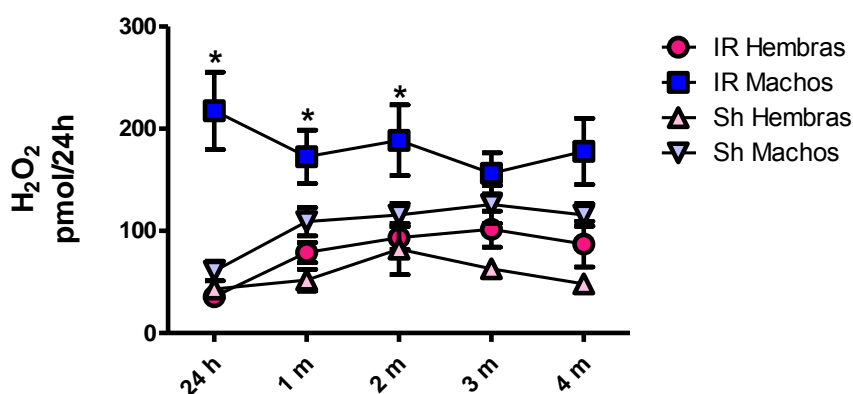


Figura 5. El estrés oxidante se mantuvo elevado en las ratas macho a lo largo del curso temporal de la enfermedad. Excreción urinaria de peróxido de hidrógeno a lo largo de los 4 meses de estudio (n=4-8 por grupo). * p<0.05 vs Sh machos ó Sh hembras.

También evaluamos la excreción urinaria de peróxido de hidrógeno, como un indicador de estrés oxidante. En la Figura 5 se puede apreciar que el grupo de machos sometidos a isquemia presentaron un aumento en la excreción urinaria H₂O₂ desde las 24 h y que se mantuvo elevado a lo largo del periodo analizado, en comparación con su grupo control. Mientras que la excreción urinaria de H₂O₂ no tuvo diferencias estadísticamente significativas en el grupo de hembras sometidas a isquemia con respecto a su grupo control. Esto sugiere que las hembras se protegen de la ERC por mantener menor estrés oxidante.

Para evaluar, de manera indirecta, la síntesis de óxido nítrico, determinamos la excreción urinaria de nitritos y nitratos. Como se muestra en la figura 6, no observamos cambios significativos entre los grupos de estudio.

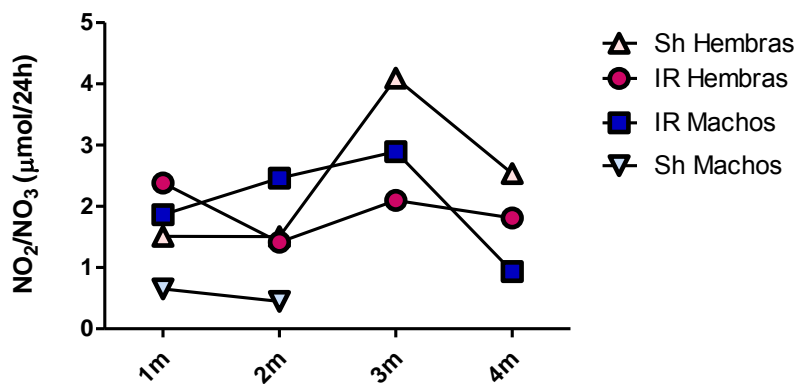


Figura 6. Excreción urinaria de nitritos y nitratos. Excreción urinaria de nitritos y nitratos (NO₂/NO₃) a lo largo de los 4 meses de estudio (n=4-8 por grupo). * p<0.05 vs Sh machos ó Sh hembras.

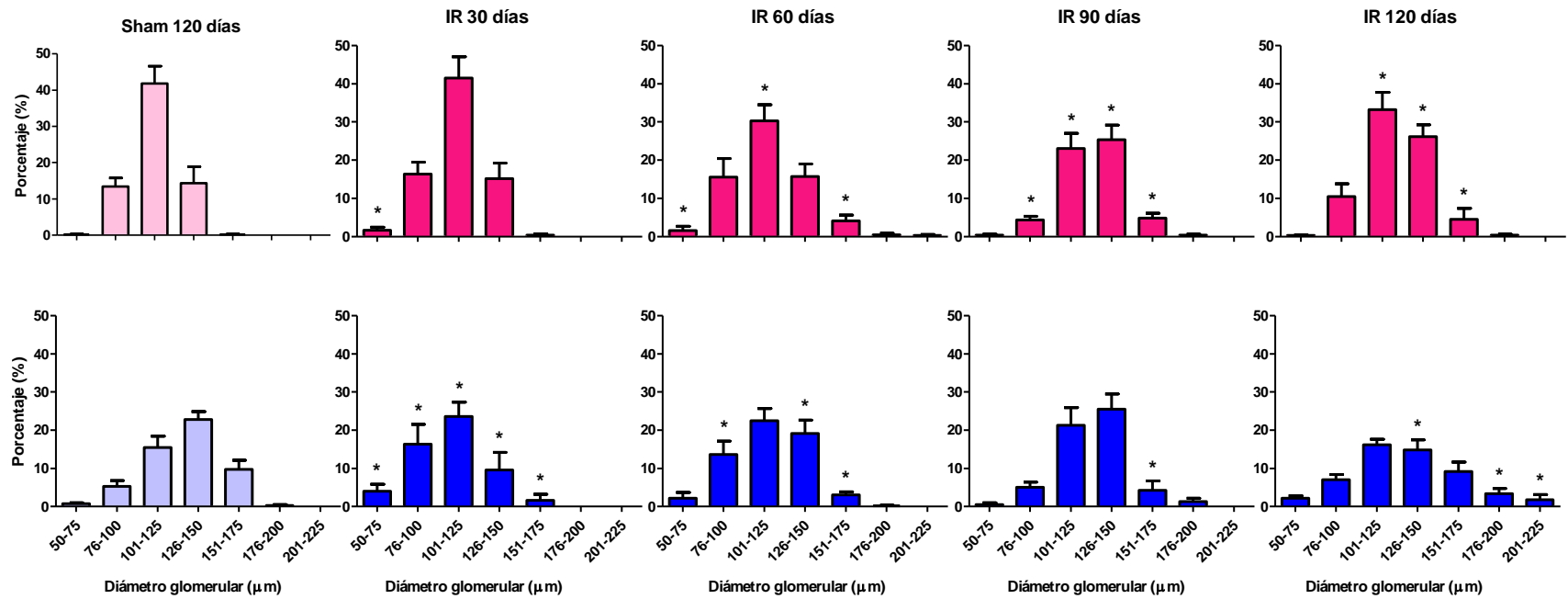


Figura 7. Hipertrofia glomerular. Los diámetros glomerulares se incrementaron en los machos y se observaron cambios mínimos en las hembras; parte superior hembras, parte inferior machos (n=4-8 por grupo). * p< 0.05 vs Sh hembras ó Sh machos.

Los diámetros glomerulares fueron distribuidos por rangos, como se aprecia en la Figura 7. Las ratas control hembras presentaron una distribución de los diámetros glomerulares en forma de campana, esta distribución fue similar a los 30 días seguidos de la isquemia renal y a partir de los 60 días se empezó a observar un desplazamiento a la derecha, es decir, hubo un mayor porcentaje de glomérulos con un diámetro mayor a $150\ \mu$. En cambio en las ratas macho, en los primeros 60 días se incrementó el número de glomérulos con diámetros pequeños y a partir de este punto empezaron a observarse glomérulos con un diámetro mayor a $150\ \mu$ que en proporción a las hembras, la hipertrofia glomerular fue francamente exacerbada.

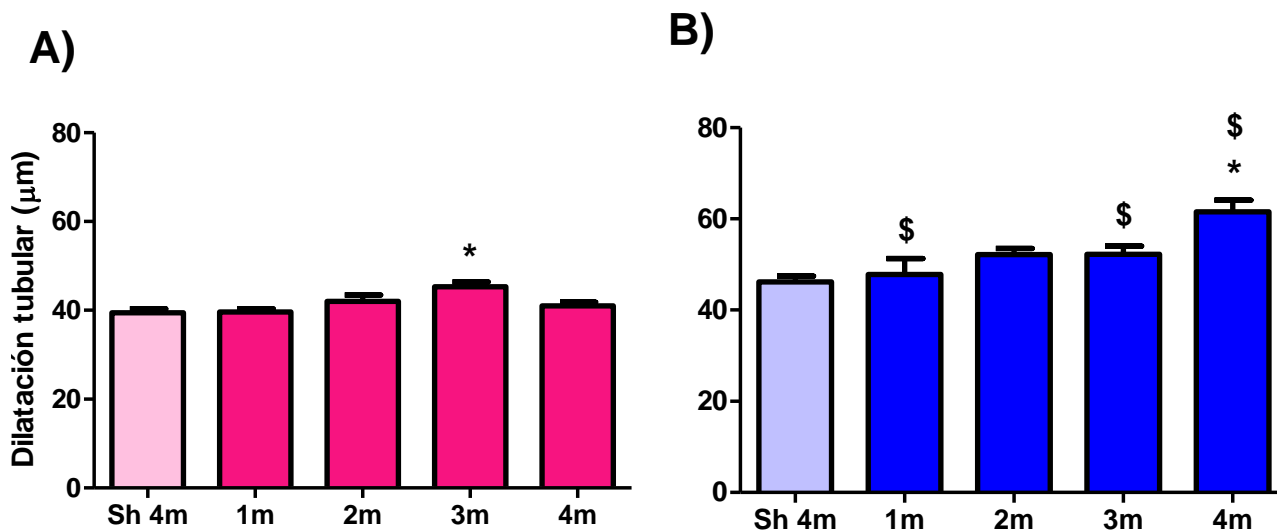


Figura 8. La dilatación tubular se observó en las ratas macho, pero no en las ratas hembra . A) Dilatación tubular en las hembras a lo largo de los 4 meses de estudio (n=4-8 por grupo). B) Dilatación tubular en los machos a lo largo de los 4 meses de estudio (n=4-8 por grupo). *p<0.05 vs Sh Hembras ó Sh Machos; \$p<0.05 vs IR Hembras.

En cuanto a la dilatación tubular no se observaron cambios a lo largo del tiempo en las hembras sometidas a isquemia con respecto a su control; en los machos se observó

diferencia estadísticamente significativa sólo en el cuarto mes, sin embargo, la dilatación tubular fue mayor en los machos con respecto a las hembras a lo largo de los cuatro meses (Fig. 8).

Se cuantificó la fibrosis túbulointersticial y de manera similar a los resultados anteriores encontramos que prácticamente la fibrosis estuvo ausente en las hembras y solo se observó un discreto aumento significativo hasta el cuarto mes (12% vs. 4%). En cambio en los machos, la presencia de fibrosis túbulointersticial fue muy evidente, observándose desde el primer mes post-isquemia, aunque esta diferencia fue estadísticamente significativa a partir del segundo mes, alcanzando aproximadamente el 38% de área afectada por fibrosis túbulointersticial al cuatro mes (Fig. 9).

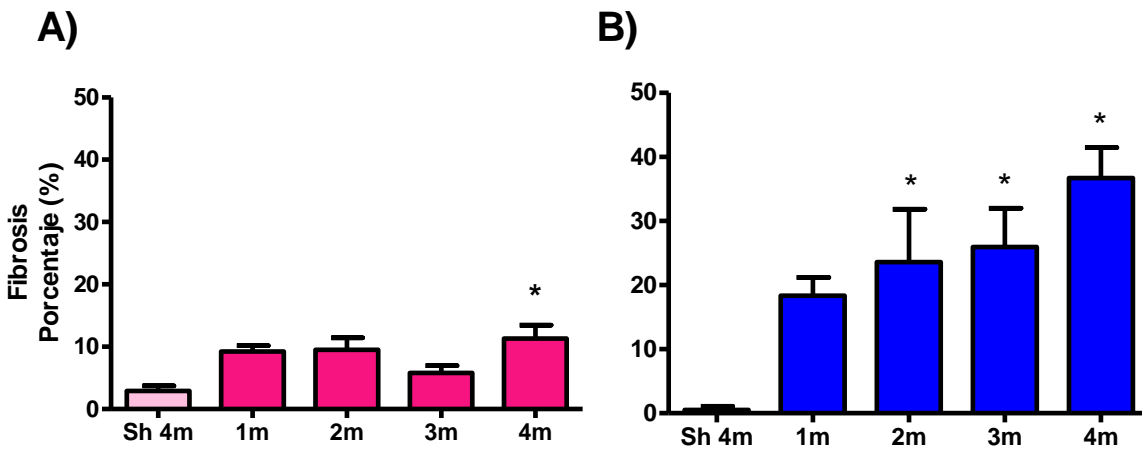


Figura 9. La fibrosis túbulo intersticial aumenta en las ratas macho y no así en las ratas hembra. A) Porcentaje de fibrosis en las hembras a lo largo de los cuatro meses de estudio (n=4-8 por grupo). **B)** Porcentaje de fibrosis en los machos a lo largo de los cuatro meses de estudio (n=4-8 por grupo). *p<0.05 vs Sh Hembras ó Sh Machos.

Después de determinar que la progresión de ERC es diferente en las hembras con respecto a los machos, nos dimos a la tarea de evaluar algunos de los posibles mecanismos involucrados en la renoprotección que instalan las hembras sometidas a un periodo de LRA.

Para esto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar los niveles de mRNA en el tejido renal de diversas moléculas involucradas en la fisiopatología de esta enfermedad. Primero evaluamos los niveles de RNAm de TGF- β ; interesantemente encontramos que hubo un aumento significativo en los niveles de mRNA de esta citocina desde el primer mes en las ratas hembras sometidos a isquemia, este efecto no se observó en los machos quienes permanecieron con niveles de mRNA de TGF- β similares al grupo control (figura 10). En la Figura 11A se muestran los niveles de mRNA de eNOS, la cual mostró un aumento estadísticamente significativo en las ratas hembras sometidas a isquemia, comparado con su grupo control; así mismo los niveles de mRNA de eNOS de las ratas macho, permanecieron similares a los de su grupo control.

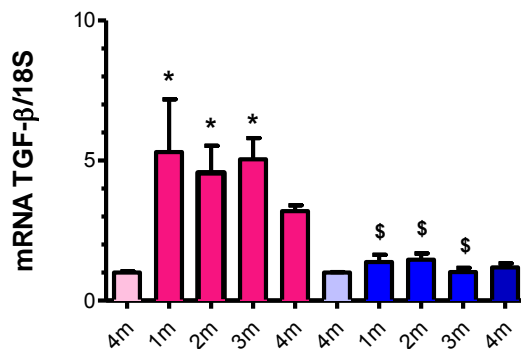


Figura 10. Los niveles de mRNA de TGF- β se observaron elevados en las ratas hembra, pero no en las ratas macho. Se observaron niveles de mRNA elevados en las hembras, mientras que en los machos se observan similares a su grupo control (n=4-8 por grupo). * p< 0.05 vs Sh Hembras ó Sh Machos. \$ p<0.05 vs IR Hembras.

También encontramos que los niveles de RNAm de HIF-1 α se encontraban regulados a la alza en el grupo de las hembras a lo largo de todo el periodo experimental, mientras que

en el grupo de los machos estuvieron por debajo de los niveles de las ratas control (Fig. 11B).

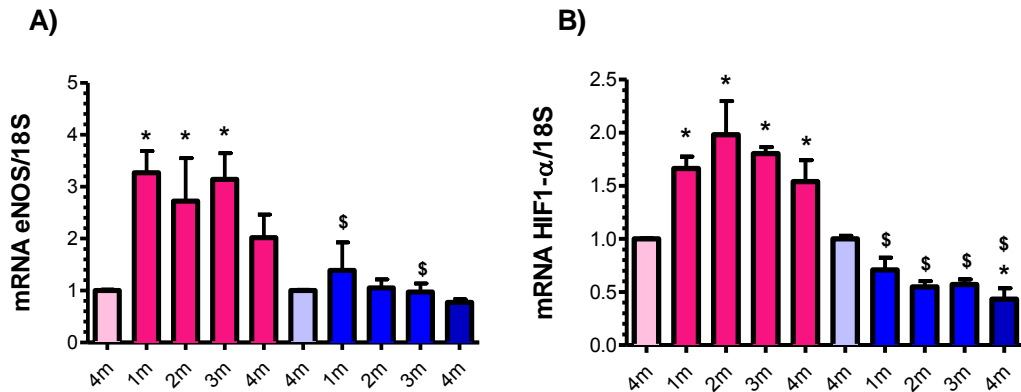


Figura 11. Los niveles de mRNA de eNOS y HIF-1α se mantuvieron elevados a lo largo del tiempo en las ratas hembras a diferencia de los machos. A) mRNA de eNOS (n=4-8 por grupo). B) mRNA de HIF-1α (n=4-8 por grupo). * p< 0.05 vs Sh Hembras ó Sh Machos. \$ p<0.05 vs IR Hembras.

B) RESULTADOS DEL GRUPO DE HEMBRAS OOFORECTOMIZADAS

Existen diferencias de sexo en varios niveles, pero el mecanismo principal pueden ser las hormonas sexuales. Por lo que, nuestro objetivo en este grupo de ratas fue influir sobre los niveles de estrógenos, para lo cual nos dimos a la tarea de ooforectomizar a un grupo de ratas hembra. En la Figura 12 se muestra que la ooforectemia fue correctamente realizada, evidenciándose por la reducción de los niveles de estrógenos, comparado con el grupo control que solo fue sometido a cirugía falsa.

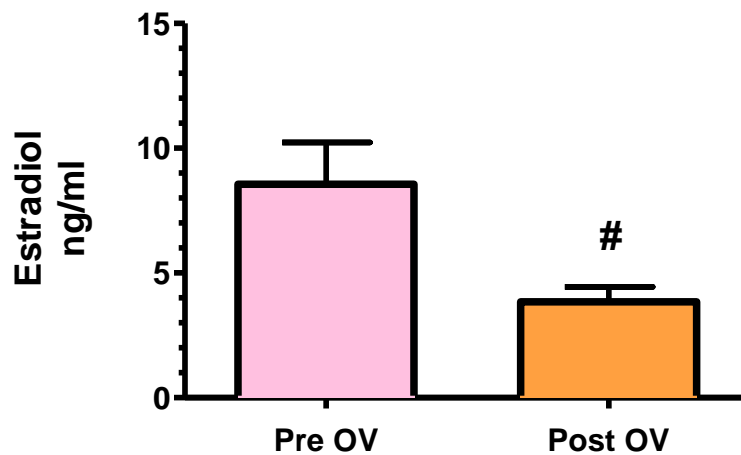


Figura 12. La ooforectomía en las ratas hembra reduce los niveles de estrógenos. Niveles de estrógenos en las ratas sometidas a ooforectomía antes (rosa) y después (naranja) de la ooforectomía (n= 40, Pre OV y Post OV). # $p < 0.05$ vs Pre OV.

Nuestro siguiente objetivo fue comparar si estos animales al ser sometidos a un periodo de LRA por isquemia renal bilateral de 45 min, tenían un comportamiento distinto a las hembras normales. En la Figura 13A observamos que ante un insulto isquémico, el comportamiento de la proteinuria de 24 h de las hembras ooforectomizadas (OV) fue similar al de los machos (Figura 2A), así también se observó una disminución de la función renal (Figura 13B). Al analizar el curso temporal de la proteinuria en las ratas ooforectomizadas, pudimos observar un aumento progresivo y estadísticamente significativo a partir del tercer mes post-isquemia, siendo un comportamiento bastante parecido al observado en los machos (Fig. 13C). No observamos cambios en la depuración de creatinina (Fig. 13D). Estos resultados sugieren que los estrógenos juegan un papel crucial en los mecanismos de renoprotección que instalan las hembras durante la transición de LRA a ERC.

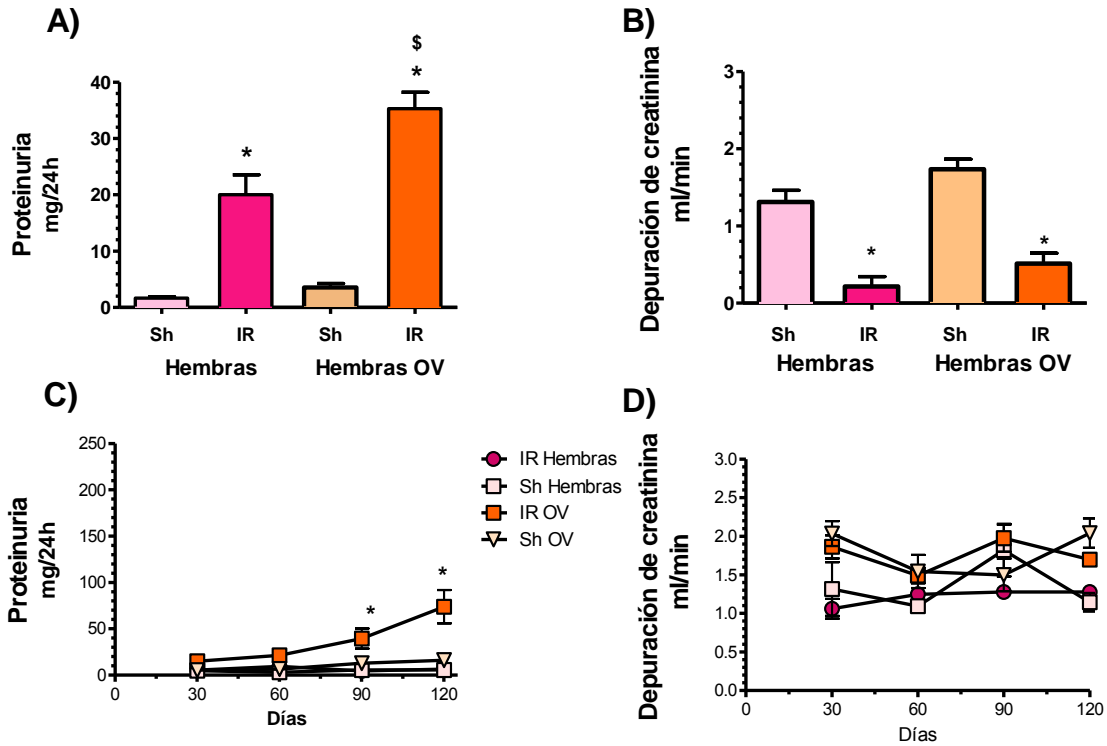


Figura 13. La inducción de un episodio de LRA por isquemia renal bilateral de 45 minutos conduce al desarrollo de ERC en hembras ooforectomizadas. A) Niveles de proteinuria a las 24 h en hembras y hembras ooforectomizadas (n= 6-8 por grupo). B) Depuración de creatinina a las 24 h en hembras y hembras ooforectomizadas (n= 6-8 por grupo). C) Proteinuria en un periodo de 4 meses en hembras y hembras ooforectomizadas (n= 6-8 por grupo). D) Depuración de creatinina en un periodo de 4 meses en hembras y hembras ooforectomizadas (n= 6-8 por grupo). * p< 0.05 vs Sh Hembras ó Sh OV.

Ya que los estrógenos tienen un efecto antioxidante, nuestro siguiente objetivo fue evaluar el comportamiento de las ratas OV en la producción de especies reactivas de oxígeno. En la figura 14A podemos observar que la simple ooforectomía aparentemente dispara la producción de H₂O₂, mientras que los niveles de peróxido se encuentran un poco más elevados en las hembras OV sometidas a isquemia, mostrando de igual forma un

comportamiento similar al de los machos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

De igual forma evaluamos la excreción urinaria de nitritos y nitratos y obtuvimos resultados similares a los observados con los machos, sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 15).

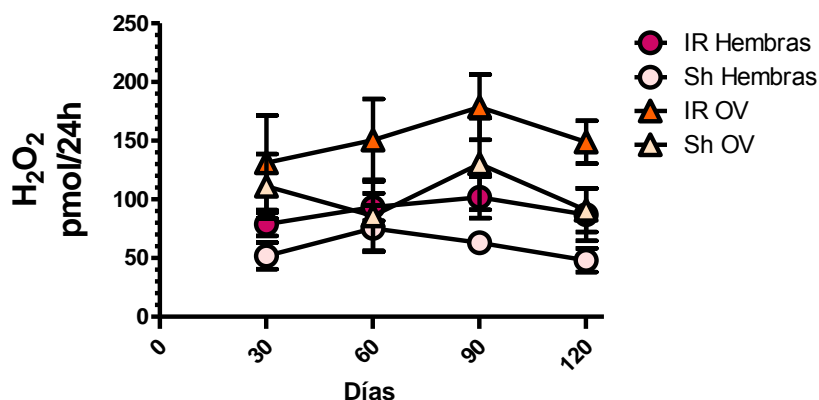


Figura 14. El estrés oxidante tendió a elevarse en las ratas OV a lo largo del curso temporal de la enfermedad. Excreción urinaria de peróxido de hidrógeno a lo largo de los 4 meses de estudio (n=6-8 por grupo). * p<0.05 vs Sh OV ó Sh hembras.

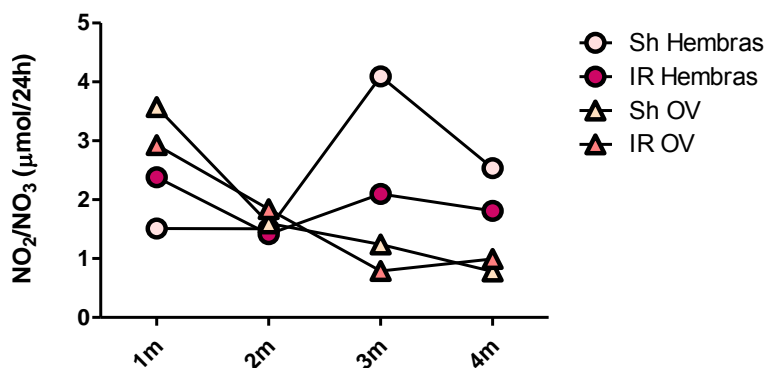


Figura 15. No hubo cambios en la excreción urinaria de nitritos y nitratos. Excreción urinaria de nitritos y nitratos (NO₂/NO₃) a lo largo de los 4 meses de estudio (n=6-8 por grupo). * p<0.05 vs Sh hembras ó Sh OV.

DISCUSIÓN

Como se ha reportado previamente en nuestro laboratorio, las ratas macho desarrollaron ERC después del noveno meses de la isquemia, la cual se caracteriza por el aumento progresivo en la proteinuria y una reducción de la función renal ⁶¹. A pesar de que se indujo la misma magnitud de LRA en ambos sexos, las ratas hembra no desarrollaron ERC en este periodo experimental. La depleción de estrógenos por la ooforectomía de las ratas hembra, produjo que estos animales se comporten como las ratas machos y desarrollen ERC después de 4 meses reperusión. Con un aumento progresivo de la proteinuria y reducción de la función renal. Con base en los resultados de este trabajo, el dimorfismo sexual observado puede atribuirse a las hormonas sexuales, ya que la depleción de los estrógenos generó un comportamiento de la enfermedad en las ratas hembra sometidas a ooforectomía similar al de los machos. Diversos estudios han mostrado que las hormonas sexuales juegan un papel importante en la evolución de las enfermedades renales ^{34,62,63}.

Nuestros resultados no mostraron dimorfismo al estudiar los animales a corto plazo, es decir, después de 24 horas de reperusión. Utilizando marcadores de daño funcional: la depuración de creatinina y la reducción del flujo sanguíneo, así como biomarcadores de daño tubular como los niveles de proteínas en la orina y excreción urinaria de Hsp72, encontramos que tanto las ratas hembra como los machos, presentaron el mismo grado de disfunción renal y de daño estructural. Es decir, no encontramos diferencias en estos marcadores, lo que demuestra que los animales fueron sometidos al mismo daño inicial y reaccionaron de la misma manera.

Contrario a esto, observamos un marcado dimorfismo sexual cuando analizamos a los animales a largo plazo. Las ratas macho mostraron una disminución de la función renal,

así como un aumento en la excreción de proteínas en orina, mientras que las hembras se mantuvieron en condiciones normales a lo largo del periodo estudiado. Este dimorfismo no estuvo relacionado con cambios en la presión arterial, ya que hasta el final del estudio, todos los animales se mantuvieron normotensos.

Una característica importante en la enfermedad renal inducida por isquemia/reperfusión es el estrés oxidante persistente, caracterizado por la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales producidas en exceso generan peroxidación lipídica, activación de leucocitos, daño endotelial y producción de citocinas ⁶⁴. Cuando medimos los niveles de H₂O₂ presentes en la orina de los animales pudimos observar que en las ratas macho éstos se encontraron elevados a lo largo del periodo experimental, mientras que en las hembras se mantuvieron en los valores basales. Por lo tanto es posible que el estrés oxidante esté jugando un papel primordial en el dimorfismo sexual que se observa en el desarrollo de ERC. Estos hallazgos fueron similares en las ratas ooforectomizadas, las cuales mostraron niveles de estrés oxidante elevados a lo largo de todo el periodo de estudio. Esto sugiere que los estrógenos juegan un papel antioxidante en el desarrollo y evolución de la enfermedad renal. De hecho se ha reportado que los estrógenos exhiben propiedades antioxidantes en las células a través de su grupo hidroxilo en la posición C3 del anillo A de la molécula esteroide. La oubaina, un inhibidor de la Na⁺/K⁺ ATPasa bloquea estos efectos protectores, lo que sugiere que el efecto antioxidante ayuda a mantener la función de esta bomba y disminuye la acumulación de sodio. Esto lo que conduce a una disminución de la entrada de calcio al interior de la célula y la disminución del daño a la misma ⁶⁵.

La disfunción endotelial es causada por la disminución de los niveles de óxido nítrico (NO) derivado del endotelio. La cantidad de NO biológicamente activo, juega un rol clave en la homeostasis vascular. Y está determinada por el balance entre la biosíntesis de NO y su degradación por ROS (al reaccionar el NO con O₂⁻)⁶⁶. Por esta razón analizamos los niveles de nitritos y nitratos excretados en orina, los cuales son metabolitos estables de la degradación del NO. Esperábamos ver diferencias en los niveles de degradación del NO, ya que la producción de ROS en los machos fue más elevada que en las hembras, pero no pudimos observar cambios significativos en los niveles de estos metabolitos. Esto puede deberse a que al medir los nitritos y nitratos excretados en la orina, se evalúa la síntesis sistémica de NO, así como, el NO derivado de las tres sintasas de NO. Por lo que, en un trabajo posterior evaluaremos la expresión de la sintasa de NO endotelial (eNOS) y su activación por fosforilación tanto en la corteza como en la médula renal y de esta forma disecar la participación de la eNOS en este dimorfismo sexual. Más aún cuando se ha reportado que los estrógenos incrementan la actividad de esta sintasa.

Como se ha reportado en diversos modelos de ERC en animales, la enfermedad está caracterizada por alteraciones estructurales como hipertrofia glomerular, dilatación tubular y fibrosis túbulo-intersticial^{61,67}. En nuestro estudio pudimos observar que el diámetro de los glomérulos en el grupo de las ratas macho aumentó al cuarto mes, lo que concuerda con lo previamente reportado⁶¹. Los diámetros glomerulares en las ratas hembra se mantuvieron similares a sus controles, evidenciando una mayor progresión a ERC en los machos con respecto a las hembras, y se asocia con hipertrofia glomerular. Así mismo observamos un aumento progresivo en la dilatación tubular en los machos, la cual fue significativa desde el primer mes de evolución, exacerbándose al cuarto mes; mientras que

en el grupo de animales hembra, no hubo tal dilatación hasta el cuarto mes, manteniéndose en condiciones normales.

Observamos también un marcado incremento en la fibrosis túbulointersticial en los machos, la cual fue progresiva llegando hasta un 40% al cuarto mes, mientras que en este periodo, las hembras se mantuvieron normales, mostrando un aumento de apenas 10% al finalizar el periodo experimental. Nuevamente pudimos observar a nivel estructural el dimorfismo de la ERC, ya que en este periodo solo los animales macho desarrollaron alteraciones características de la ERC. Las hembras no progresaron a ERC y no exhibieron estas alteraciones. Estos estudios no se han realizado hasta este momento en el grupo de las ratas ooforectomizadas, pero esperamos encontrar las mismas alteraciones que pudimos observar en el grupo de los machos, en concordancia con los otros parámetros estudiados.

Con todos estos resultados, decidimos analizar algunos de los mecanismos que pudieran estar involucrados en el dimorfismo funcional y estructural que observamos en nuestros grupos experimentales, que nos permita conocer el efecto protector de las hormonas sexuales femeninas. Después de una lesión isquémica, se activan diversas vías para promover la regeneración del epitelio tubular; sin embargo, algunas de éstas permanecen activadas incluso después de la completa reparación tisular, una de estas vías es la de TGF- β . Este mecanismo es de particular importancia ya que TGF- β puede promover la trans-diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos con un consecuente fenotipo pro-fibrótico ⁶⁸. Los análisis en los niveles de RNAm de TGF- β mostraron una expresión diferencial de las hembras con respecto a los machos. Sorpresivamente, los niveles de mRNA TGF β intra-renal fueron mayores en las ratas hembra, mientras que no hubo cambios en las ratas macho con respecto a sus controles. Dadas las observaciones

estructurales en la histología de los machos, con un elevado porcentaje de fibrosis, comparado con lo observado en las hembras, consideramos que la elevación temprana de esta citocina en las ratas hembra, podría estar ejerciendo un efecto protector. Se ha reportado que TGF- β juega un papel neuroprotector después de un episodio de isquemia cerebral ⁶⁹, y que posee propiedades anti-inflamatorias, ya que favorece la polarización de macrófagos anti-inflamatorios Th2 ⁷⁰. Por lo tanto, la elevación de esta citocina en las ratas hembra indica que el TGF β podría estar jugando un protector, más que deletereo.

También observamos que los niveles de mRNA de eNOS están regulados a la alza en las ratas hembra. Sabemos que esta molécula media la producción de NO que funciona a su vez como vasodilatador y evita la producción de otras sintasas que generan peroxinitritos, los cuales aumentan el daño al epitelio tubular por su potencial de generar estrés oxidativo, así como mayor inflamación ⁷¹⁻⁷³. Por lo tanto, la sobreproducción de esta molécula en el caso de las hembras sugiere que tiene efecto renoprotector sobre éstas.

Se ha observado que la elevada expresión de HIF-1 α se relaciona con niveles bajos de creatinina plasmática, mayor tasa de filtración glomerular, menor proporción de fibrosis intersticial y baja esclerosis glomerular ^{32,74,75}. En este estudio encontramos un dimorfismo sexual en los niveles de mRNA de HIF-1 α . Nuevamente las ratas hembras presentaron mayores niveles de HIF-1 α que los machos, por lo que, esta diferencia podría estar mediando la protección de los riñones en las hembras ya que observamos una mayor cantidad de mRNA de HIF-1 α en los grupos de ratas hembra sometidas a isquemia, y no así en los grupos de machos, los cuales se mantuvieron similares a los controles.

Actualmente continuamos analizando los mecanismos de renoprotección que instalan las ratas hembras frente a un episodio de LRA.

CONCLUSIÓN

La elaboración de este trabajo permitió demostrar que las ratas machos desarrollaron ERC después de cuatro meses de reperfusión, mientras que las ratas hembra no desarrollaron la enfermedad en este periodo experimental. El desarrollo de ERC se caracterizó por el aumento de la proteinuria desde el tercer mes de evolución y exacerbándose en el cuarto mes; disfunción renal por disminución en la depuración de creatinina; alteraciones histopatológicas como fibrosis túbulointersticial, dilatación tubular e hipertrofia glomerular. La evolución de la enfermedad en las ratas hembra se vio modificada por la ooforectomía, ya que este grupo experimental desarrolló ERC después de cuatro meses de reperfusión, evidenciada por el aumento en los niveles de proteinuria. El dimorfismo sexual puede estar relacionado con cambios en la producción de óxido nítrico y estrés oxidante. Ya que en las ratas macho observamos niveles de estrés oxidante persistentes a lo largo de la evolución de la enfermedad, mientras que en las ratas hembra los niveles de estrés oxidante fueron similares a los del grupo control. Además los niveles de mRNA de eNOS se mantuvieron elevados en las ratas hembra a lo largo del periodo experimental. Así mismo se observaron niveles elevados de mRNA de TGF- β y HIF-1 α en las hembras, comparados con los niveles de mensajero en los machos. Estas citocinas pueden estar implicadas en el dimorfismo sexual de la enfermedad observado en los grupos experimentales. Estos resultados nos llevan a concluir que si existe dimorfismo sexual en la transición de LRA a ERC a nivel funcional e histopatológico, y podrían estar relacionadas con el estrés oxidante. Seguimos analizando los mecanismos renoprotectores que instalan las hembras en el desarrollo de ERC a partir de un fenómeno de I/R.

PERSPECTIVAS

- Diseñar los mecanismos moleculares específicos por los cuales las ratas hembra no progresan a ERC ante un insulto isquémico.
- Estudiar los aspectos inflamatorios en el dimorfismo de la ERC.
- Analizar los cambios epigenéticos que pueden estar participando en el dimorfismo sexual.
- Analizar si existe un papel deletéreo de la testosterona en la transición de LRA a ERC en las ratas macho.
- Proponer terapias renoprotectoras en base a los resultados obtenidos y sugerir manejos distintos de la ERC en pacientes hombres y mujeres.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez Maldonado M. *Tratado de nefrología*. (1993).
2. Heinz Valtin, M. D. *Renal Function*. (1983).
3. Li, W., Hartwig, S. & Rosenblum, N. D. Developmental origins and functions of stromal cells in the normal and diseased mammalian kidney. *Dev. Dyn.* **243**, 853–63 (2014).
4. Dressler, G. R. The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 509–29 (2006).
5. Lombardi, D., Becherucci, F. & Romagnani, P. How much can the tubule regenerate and who does it? An open question. *Nephrol. Dial. Transplant.* gfv262 (2015). doi:10.1093/ndt/gfv262
6. Basile, D., Anderson, M. & Sutton, T. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr. Physiol.* **2**, 1303–1353 (2012).
7. Li, P. K., Burdmann, E. A. & Mehta, R. L. Acute kidney injury: global health alert. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **24**, 345–350 (2013).
8. Miyahira Arakaki, J. M. Insuficiencia renal aguda. *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.* **58**, 365–374 (2011).
9. Malek, M. & Nematbakhsh, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J. Ren. Inj. Prev.* **4**, 20–7 (2015).
10. Lewington, A. J. P., Cerdá, J. & Mehta, R. L. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int.* **84**, 457–67 (2013).
11. Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A. & Kimmel, P. L. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 58–66 (2014).

12. Romo, R. R. & Sandoval, N. A. B. in (2013).
13. Alsultan, M. A. The renal recovery of critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **24**, 1175–9 (2013).
14. Mezzano A., S. & Aros E., C. Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev. Med. Chil.* **133**, 338–348 (2005).
15. Thakar, C. V, Christianson, A., Himmelfarb, J. & Leonard, A. C. Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 2567–72 (2011).
16. Heinzl, A. *et al.* Molecular disease presentation in diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, iv17–iv25 (2015).
17. Zoja, C., Zanchi, C. & Benigni, A. Key pathways in renal disease progression of experimental diabetes: Figure 1: *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, iv54–iv59 (2015).
18. Shah, S. V., Baliga, R., Rajapurkar, M. & Fonseca, V. A. Oxidants in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 16–28 (2007).
19. Boubred, F. *et al.* Developmental origins of chronic renal disease: an integrative hypothesis. *Int J Nephrol* **2013**, 346067 (2013).
20. Zoccali, C., Tripepi, G., Dounousi, E. & Mallamaci, F. Chronic kidney disease (CKD) as a systemic disease: whole body autoregulation and inter-organ cross-talk. *Kidney Blood Press. Res.* **39**, 134–41 (2014).
21. Machowska, A., Carrero, J. J., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. Therapeutics targeting persistent inflammation in chronic kidney disease. *Transl. Res.* 1–10 (2015). doi:10.1016/j.trsl.2015.06.012
22. Kovesdy, C. P. & Kalantar-Zadeh, K. *Inflammation in Chronic Kidney Disease. Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation* **6**, (Elsevier Inc., 2010).
23. Schnaper, H. W. Remnant nephron physiology and the progression of chronic kidney disease. **29**, 1–17 (2015).

24. Bricker, N. S. On the pathogenesis of the uremic state. An exposition of the 'trade-off hypothesis'. *N. Engl. J. Med.* **286**, 1093–9 (1972).
25. Taal, M. W. & Brenner, B. M. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int.* **57**, 1803–17 (2000).
26. Quaggin, S. E. & Kapus, A. Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int.* **80**, 41–50 (2011).
27. Shankar, A. *et al.* Markers of inflammation predict the long-term risk of developing chronic kidney disease: a population-based cohort study. *Kidney Int.* **80**, 1231–8 (2011).
28. Long, D. A., Norman, J. T. & Fine, L. G. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 244–50 (2012).
29. Lewy, P. R., Quintanilla, A., Levin, N. W. & Kessler, R. H. Renal energy metabolism and sodium reabsorption. *Annu. Rev. Med.* **24**, 365–84 (1973).
30. Souma, T. *et al.* Luminal alkalinization attenuates proteinuria-induced oxidative damage in proximal tubular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 635–48 (2011).
31. Wolf, G. Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1337–45 (2005).
32. Sun, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* **75**, 1278–87 (2009).
33. Park, K. M., Kim, J. I., Ahn, Y., Bonventre, A. J. & Bonventre, J. V. Testosterone Is Responsible for Enhanced Susceptibility of Males to Ischemic Renal Injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 52282–52292 (2004).
34. Müller, V. *et al.* Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int.* **62**, 1364–1371 (2002).
35. Wang, M. *et al.* Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ.*

Physiol. **288**, H221–6 (2005).

36. Ji, H. *et al.* Sex differences in renal injury and nitric oxide production in renal wrap hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H43–7 (2005).
37. Wilhelm, S. M., Simonson, M. S., Robinson, A. V, Stowe, N. T. & Schulak, J. A. Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int.* **55**, 1011–8 (1999).
38. Sato, T., Sasaki, N., O'Rourke, B. & Marbán, E. Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning? *Circulation* **102**, 800–5 (2000).
39. Ojeda, N. B., Royals, T. P. & Alexander, B. T. Sex differences in the enhanced responsiveness to acute angiotensin II in growth-restricted rats: role of fasudil, a Rho kinase inhibitor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**, F900–7 (2013).
40. Schumer, M. *et al.* Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am. J. Pathol.* **140**, 831–8 (1992).
41. Schrier, R. W. & Hensen, J. Cellular mechanism of ischemic acute renal failure: role of Ca²⁺ and calcium entry blockers. *Klin. Wochenschr.* **66**, 800–7 (1988).
42. Dzurba, A., Ziegelhöffner, A., Vrbjar, N., Styk, J. & Slezák, J. Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol. Cell. Biochem.* **176**, 113–8 (1997).
43. Gangula, P. R. *et al.* Protective cardiovascular and renal actions of vitamin D and estrogen. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **5**, 134–48 (2013).
44. Neugarten, J., Acharya, a & Silbiger, S. R. Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: a meta-analysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 319–329 (2000).
45. Fung, M. M., Poddar, S., Bettencourt, R., Jassal, S. K. & Barrett-Connor, E. A cross-sectional and 10-year prospective study of postmenopausal estrogen therapy and blood pressure, renal function, and albuminuria: the Rancho Bernardo Study. *Menopause* **18**, 629–37 (2011).

46. Jafar, T. H. *et al.* The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: A patient-level meta-analysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 2047–2053 (2003).
47. Eriksen, B. O. & Ingebretsen, O. C. The progression of chronic kidney disease: a 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int.* **69**, 375–382 (2006).
48. Evans, M. *et al.* The natural history of chronic renal failure: Results from an unselected, population-based, inception cohort in Sweden. *Am. J. Kidney Dis.* **46**, 863–870 (2005).
49. Halbesma, N. *et al.* Gender differences in predictors of the decline of renal function in the general population. *Kidney Int.* **74**, 505–12 (2008).
50. Cattran, D. C. *et al.* The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 2247–2253 (2008).
51. Neugarten, J. & Golestaneh, L. Gender and the prevalence and progression of renal disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **20**, 390–395 (2013).
52. Elliot, S. J. *et al.* Gender-specific effects of endogenous testosterone: female alpha-estrogen receptor-deficient C57Bl/6J mice develop glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **72**, 464–72 (2007).
53. Maric, C., Sandberg, K. & Hinojosa-Laborde, C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1546–56 (2004).
54. Catanuto, P. *et al.* 17 beta-estradiol and tamoxifen upregulate estrogen receptor beta expression and control podocyte signaling pathways in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int.* **75**, 1194–201 (2009).
55. Catanuto, P. *et al.* In vivo 17 β -estradiol treatment contributes to podocyte actin stabilization in female db/db mice. *Endocrinology* **153**, 5888–95 (2012).
56. Metcalfe, P. D. *et al.* Testosterone exacerbates obstructive renal injury by stimulating TNF-alpha production and increasing proapoptotic and profibrotic signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294**, E435–43 (2008).

57. Yamamoto, T. & Uemura, H. Distribution of endothelin-B receptor-like immunoreactivity in rat brain, kidney, and pancreas. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31 Suppl 1**, S207–11 (1998).
58. Clozel, M. & Clozel, J. P. Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 1125–31 (1989).
59. Loutzenhiser, R., Epstein, M., Hayashi, K. & Horton, C. Direct visualization of effects of endothelin on the renal microvasculature. *Am. J. Physiol.* **258**, F61–8 (1990).
60. Kittikulsuth, W., Sullivan, J. C. & Pollock, D. M. ET-1 actions in the kidney: evidence for sex differences. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 318–26 (2013).
61. Barrera-Chimal, J. *et al.* Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **83**, 93–103 (2012).
62. Wei, Q., Wang, M.-H. & Dong, Z. Differential gender differences in ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Am. J. Nephrol.* **25**, 491–9 (2005).
63. Lu, H., Lei, X. & Klaassen, C. Gender differences in renal nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* **70**, 1920–1928 (2006).
64. Kim, J. *et al.* Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **281**, 20349–56 (2006).
65. Sugishita, K., Li, F., Su, Z. & Barry, W. H. Anti-oxidant effects of estrogen reduce [Ca²⁺]_i during metabolic inhibition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 331–6 (2003).
66. Cai, H. & Harrison, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840–4 (2000).
67. Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V & Bonventre, J. V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat. Med.* **16**, 535–43, 1p following 143 (2010).

68. Schnaper, H. W. *et al.* TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **14**, 2448–65 (2009).
69. Klempt, N. D. *et al.* Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **13**, 93–101 (1992).
70. Hunt, N. H. & Grau, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* **24**, 491–9 (2003).
71. Xu, J. & Zou, M.-H. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* **120**, 1266–86 (2009).
72. Rask-Madsen, C. & King, G. L. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 46–56 (2007).
73. Albrecht, E. W. J. A., Stegeman, C. A., Heeringa, P., Henning, R. H. & van Goor, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* **199**, 8–17 (2003).
74. Haase, V. H. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291**, F271–81 (2006).
75. Basu, R. K. *et al.* Interdependence of HIF-1 and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *AJP Ren. Physiol.* **300**, F898–F905 (2011).