



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“INFLUENCIA DEL SEXO EN LA HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA INDUCIDA POR UN EPISODIO DE LESIÓN RENAL AGUDA”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Ixchel Quetzalitzli Lima Posada**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval  
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Elena Zambrano González  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán  
Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Ciudad de México. Mayo, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval 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”. Periodo: Enero 2016 - Junio 2019.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de ésta tesis estuvo formado por la Dra. Elena Zambrano González y el Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

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

A los miembros del Jurado: Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Rocío Ángeles García Becerra, Dr. Jorge Morales Monto, Dr. Luis Eduardo Morales Buenrostro y Dra. Laura Escobar Pérez.

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. 235855, 235964 y 272390; y por la UNAM DGAPA IN223915 y IN201619)

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia al congreso “ASN Kidney Week 2017”

Durante la realización de mis estudios de Maestría recibí una beca otorgada por el CONACyT con el número de registro 436290.

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres **Dolores** y **Miguel**, por apoyarme en todo lo que decido hacer y motivarme a perseguir mis sueños. Estoy muy orgullosa de ustedes y los dos son mi gran ejemplo a seguir.

**Selma** y **Migue**, gracias hermanitos por brindarme su amor incondicional, inspirarme, motivarme y apoyarme siempre, los amo♥.

A mis amigos, por estar siempre conmigo compartiendo momentos felices y apoyándome en los complicados, tanto en mi vida académica como personal.

A la Dra. Norma Bobadilla, por darme la oportunidad de ser parte de un excelente grupo de trabajo, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencia.

A mis compañeros de lab: Rosy, Normita, Cinthya, Francesco, Nathan, Vicky, Tino, Andy, Pedro, Rodrigo, Luis Enrique, Jonatan, Isabel, Miguel, Adrián, Emma y Juan Antonio. Por compartir su amistad, conocimientos, trabajo y experiencia.

## RESUMEN

Este estudio evaluó si existe un dimorfismo sexual en la transición de la lesión renal aguda (LRA) a enfermedad renal crónica (ERC) y el curso temporal de los posibles mecanismos implicados en la respuesta dimórfica. Ratas hembra y macho fueron sometidas a cirugía falsa o isquemia/reperfusión (IR) renal de 45 minutos. Todos los grupos se estudiaron a las 24 h y 1, 2, 3 ó 4 meses después de la IR. Después de 24 h, el grado de LRA fue similar en hembras y machos, pero las ratas exhibieron menos estrés oxidativo y un mayor contenido renal de GSH. Después de 4 meses y a pesar de una LRA similar, el grupo de machos sometidos a IR desarrolló ERC caracterizada por proteinuria, fibrosis tubulointersticial, hipertrofia glomerular, aumento del estrés oxidativo y una reducción de HIF1 $\alpha$  y VEGF a partir del primer mes y persistente durante todo el curso de tiempo estudiado. Curiosamente, el grupo de hembras sometidas a IR no desarrolló ERC debido a un menor estrés oxidativo y aumentos en los niveles de RNAm de eNOS, TGF $\beta$  y HIF1 $\alpha$  desde el primer mes después de la IR. Adicionalmente, ratas ooforectomizadas sometidas a IR, desarrollaron ERC después de 4 meses. El bloqueo de los receptores de estrógenos en ratas hembra sometidas a IR no indujo la transición de LRA a ERC. La castración en las ratas macho, evitó la progresión de LRA a ERC; los mecanismos de renoprotección agudos de las ratas castradas se relacionaron con una rápida recuperación del flujo sanguíneo renal, así como menor inflamación y estrés oxidante. El antagonismo de los receptores de andrógenos en las ratas macho evito la progresión a ERC. Las hormonas tienen un papel fundamental en la transición de la LRA a ERC.

## ÍNDICE

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
La lesión renal aguda (LRA)	2
Fisiopatología de la LRA	4
La lesión renal aguda como un factor de riesgo para la transición a enfermedad renal crónica	6
Enfermedad renal crónica	7
Fisiopatología de la enfermedad renal crónica	8
Respuestas celulares al daño	11
Eventos bioquímicos en la progresión de la pérdida de las nefronas.	12
Dimorfismo sexual en las enfermedades renales	13
El dimorfismo sexual en la progresión a ERC.	14
Evidencia experimental del dimorfismo sexual en el daño renal	16
<b>Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos generales</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>22</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>22</b>
Animales	22

Protocolo experimental I	22
Protocolo experimental II	23
Protocolo experimental III	23
Protocolo experimental IV	24
Protocolo experimental V	24
Modelo de LRA inducida por isquemia/renal bilateral en la rata	25
Ooforectomía bilateral en la rata hembra	25
Castración bilateral en la rata macho	26
Mediciones fisiológicas	26
Estudios histopatológicos	27
Análisis bioquímicos	27
Estudios moleculares	28
Análisis estadístico	30
<b>Resultados</b>	<b>31</b>
Efecto del género en la evolución de la transición de la LRA a ERC	31
Efecto de la reducción de estrógenos en la transición de la LRA a ERC	42
Efecto del bloqueo de la vía genómica y no genómica de los receptores de estrógenos.	44
Reducción de la testosterona en la transición de la LRA a ERC	46
Efecto del bloqueo de los receptores de andrógenos en la transición de la LRA a ERC	52
<b>Discusión</b>	<b>55</b>

<b>Conclusión</b>	<b>64</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>66</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

LRA	Lesión Renal Aguda
ERC	Enfermedad Renal Crónica
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
TFG	Tasa de filtración glomerular
GN	Glomerulonefritis
SRAA	Sistema renina, angiotensina, aldosterona
ERO	Especies reactivas de oxígeno
PTH	Hormona paratiroidea
FGF-23	Factor de crecimiento de fibroblastos 23
FSR	Flujo sanguíneo renal
ATP	Adenosín trifosfato
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
ERCT	Enfermedad renal crónica terminal

HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
ET	Endotelina
ETA	Receptor de endotelina A
ETB	Receptor de endotelina B
RE	Receptor de estrógenos
ECA	Enzima convertidora de Angiotensina
AT1R	Receptor de angiotensina 1
AT2R	Receptor de angiotensina 2
Ang	Angiotensina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
INF $\gamma$	Interferón gamma
CCL-17	Quimiocina ligando 17
GPER	Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G
Sh	Sham
IR	Isquemia/Reperfusión
Oof	Ooforectomía
Hsp72	Proteína de choque térmico 72
NO	Óxido nítrico

## INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano de vital importancia, con una compleja estructura adaptada a varias funciones biológicas esenciales. La estructura renal se organiza morfológicamente a niveles macro y microscópico de manera altamente diferenciada, determinada por su función. Macroscópicamente el riñón consta de corteza, médula y 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<sup>1,2</sup>. La función general del sistema es filtrar aproximadamente 180 litros de sangre al día, lo que permite que las toxinas, los productos de desecho metabólicos y el exceso de iones se eliminen, mientras se mantienen las sustancias esenciales en la sangre. De esta forma, el riñón regula la osmolaridad del plasma mediante la modulación de la cantidad de agua, solutos y electrolitos en la sangre, además de asegurar el equilibrio ácido-base a largo plazo. El riñón es un órgano endócrino, pues produce eritropoyetina que estimula la producción de glóbulos rojos, así como de renina para regular la presión arterial, además de convertir la vitamina D a su forma activa<sup>3</sup>.

Para llevar a cabo estas funciones, el riñón está organizado en aproximadamente un millón de unidades funcionales denominadas nefronas<sup>4</sup>. La nefrona está funcionalmente subdividida en una unidad de filtración llamada 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<sup>5</sup>.

### **La lesión renal aguda**

La lesión renal aguda (LRA), que antes se conocía como "insuficiencia renal aguda", se describe como una disminución rápida (que varía de horas a días) en la función renal, medida por el incremento en la creatinina sérica y a menudo acompañada por la disminución en el volumen de orina. Las guías KDIGO (por sus siglas en inglés: Kidney Disease Improve Global Outcomes) definen la LRA como un incremento en la creatinina sérica  $\geq 0.3$  mg/dl en 48h ó  $\geq 50\%$  en 7 días y se clasifica en 3 estadios: 1) incremento de la creatinina sérica en 48h  $\geq 0.3$  mg/dl o 1.5 a 1.9 veces el valor basal, o un volumen urinario menor a 0.5 ml/kg/h por 6-12h; 2) incremento  $\geq$  a 2-2.9 veces el nivel basal de creatinina sérica o un volumen urinario menor a 0.5 ml/kg/h por  $\geq 12$ h; y 3) incremento  $\geq$  a 3 veces el nivel basal de creatinina sérica o al menos 4 md/dl o terapia de reemplazo renal o un volumen urinario menor a 0.3 ml/kg/h por  $\geq 24$ h o anuria  $\geq 12$ h<sup>6</sup>. La LRA se caracteriza por daño al epitelio tubular renal, inflamación y disfunción vascular. El daño y la muerte de las células tubulares son considerados los eventos predominantes de la LRA. La regeneración y

reparación tubular son los principales eventos en la recuperación del riñón después del daño<sup>7</sup>.

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 una disminución de la perfusión renal, lo que ocasiona un decremento de la tasa de filtración glomerular (TFG), sin daño al parénquima renal. Las principales causas son hipovolemia por diarrea, hipotensión, vómito, hemorragia, quemaduras, sudoración excesiva, poca ingesta oral, 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, así como, 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 se dividen con base en las 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 renales. Las dos causas principales son la isquemia y la nefrotoxicidad por fármacos.

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

3) ***Daño intersticial.*** Por nefritis intersticial aguda debida a reacciones alérgicas a diversos 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<sup>8</sup>.

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. A pesar de la diálisis como tratamiento para la LRA grave, la mortalidad asociada es alta, especialmente en las unidades de cuidados intensivos, ya que la incidencia es mayor al 50%. La incidencia de la LRA se ha ido incrementando, en parte, con el envejecimiento de la población, la prevalencia creciente de la enfermedad renal crónica (ERC), que predispone a la LRA y el número cada vez mayor de intervenciones invasivas que pueden comprometer la hemodinámica o bien por complicaciones sépticas<sup>9</sup>. 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 ERC<sup>10,11</sup>.

### **Fisiopatología de la LRA**

En la LRA se produce una disminución abrupta del flujo sanguíneo renal. Posteriormente, se genera inflamación que extiende la fase del daño. El deterioro por hipoperfusión se establece por una deficiencia energética en los segmentos de la nefrona con gran actividad metabólica (túbulos proximales y la parte ascendente gruesa del asa de

Henle). La recuperación del daño renal está mediada por el número de células que pueden restaurar la función normal y promover la regeneración. El éxito de recuperación de la LRA depende de que el proceso de reparación se lleve a cabo de manera adecuada.

El transcurso de la LRA se puede dividir en las fases de: iniciación, extensión, mantenimiento y recuperación.

- 1) **Iniciación.** Se inducen alteraciones estructurales y funcionales en las células epiteliales del túbulo proximal. 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 la liberación de diversas citocinas y quimiocinas que inician la cascada inflamatoria.
- 2) **Extensión.** La hipoxia se mantiene debido no solo al evento isquémico inicial, sino también por la activación del sistema renina, angiotensina, aldosterona (SRAA) y por la respuesta inflamatoria. En esta fase, las células vasculares endoteliales juegan un papel importante en el mantenimiento de la isquemia de las células epiteliales del túbulo renal, así como en la inflamación. Las células epiteliales continúan sufriendo 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 flujo sanguíneo renal se normaliza, las células epiteliales restablecen la homeostasis intracelular e intercelular.
- 4) **Recuperación.** La diferenciación de las células del epitelio tubular continúa, la polaridad epitelial se restablece y las funciones celulares y orgánicas regresan a la normalidad<sup>8,12,13</sup>.

### **La Lesión Renal Aguda como un factor de riesgo para la transición a Enfermedad Renal Crónica**

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 tasa de filtración glomerular, la reversibilidad del daño y el balance temporal entre los eficientes o ineficientes mecanismos de reparación y regeneración<sup>14</sup>.

Anteriormente se pensaba que las personas que sufrían un episodio de LRA no tenían consecuencias posteriores en la estructura y función renal. Sin embargo, estudios epidemiológicos recientes con pacientes que han sufrido periodos de LRA, muestran que algunos de ellos presentan daño renal progresivo<sup>15</sup>. 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 KDIGO 4 ó 5 aumentó 28 veces, consistente con la pérdida masiva de nefronas asociada con episodios severos de

LRA<sup>7</sup>. 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. Este estudio mostró que LRA es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ERC y que cada episodio de LRA duplicó este riesgo<sup>16</sup>. Por lo tanto, se ha propuesto que la LRA es un factor de riesgo para el desarrollo de ERC, ERCT (enfermedad renal crónica etapa terminal) y mayor mortalidad<sup>13</sup>.

Otros estudios sugieren que la LRA no sólo está directamente vinculada con la progresión de la ERC, sino que también causa esta enfermedad. 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; que ha sido reportada en niños, los cuales no tienen enfermedades 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<sup>14</sup>.

### **Enfermedad renal crónica**

La 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 costos altos para los sistemas de salud. Las principales causas de falla renal son la diabetes tipo 2 y la hipertensión, que en conjunto representan al 60% de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal<sup>17</sup>. La guías 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<sup>17</sup>. La KDIGO clasifica los estadios de la ERC en los siguientes, según la tasa de filtrado glomerular: G1 > 90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> normal o elevado; G2 60-89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> ligeramente disminuido; G3a 45-59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> ligera a moderadamente disminuido; G3b 30-44 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> moderada a gravemente disminuido; G4 15-29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> gravemente disminuido; y, G5 < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> fallo renal<sup>18</sup>.

### **Fisiopatología de la enfermedad renal crónica.**

La fisiopatología de la ERC es multifactorial y las vías moleculares que se relacionan con el inicio y la progresión son diversas. La lesión inicial causa daño histológico en el parénquima renal, mientras que la progresión de la enfermedad es el resultado de la pérdida progresiva de nefronas, cambios hemodinámicos compensatorios a nivel glomerular; la hipertensión e hiperfiltración glomerular de las nefronas remanentes; la hipertrofia y atrofia tubular, la fibrosis túbulointersticial, la esclerosis glomerular progresiva, la arterioesclerosis, la susceptibilidad genética y las respuestas humorales desordenadas. Esto conlleva a la fibrosis del parénquima renal con la pérdida definitiva de la función renal<sup>14,17,19,20</sup>.

El proceso que da lugar a la progresión hacia 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, estas respuestas celulares

terminan dañando a las nefronas funcionales. Los fenómenos compensatorios que ejercen las nefronas remanentes debido a la pérdida de otras nefronas, exacerbando 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 esto aunado a un inadecuado balance vascular, promueven la hipoxia/isquemia crónica con una consecuente acidosis y generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)<sup>21-25</sup>.

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 a largo plazo para la supervivencia de las nefronas funcionales<sup>26</sup>.

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 glomérulo 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, puede comenzar a existir desbalance en los iones, por ejemplo, retención de sodio y consecuentemente aumento del volumen extracelular, lo cual requiere excreción de sodio, por lo que se activan hormonas 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 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 las deficiencias, lo cual afecta de manera sistémica, por ejemplo en la resorción ósea y afectando a otros órganos<sup>27</sup>.

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 un factor de progresión a ERC. Un mediador principal en la respuesta hipertrófica es el SRAA que regula tanto la hemodinámica como la hipertrofia/hiperplasia celular. El incremento de la actividad de SRAA estimula diversas vías que median la hipertrofia, la producción de citocinas fibrogénicas y la generación de ERO; 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 causa daño túbulointersticial, ya que éstas pueden ser moléculas activas oxidantes o inflamatorias. Las vías comunes que generan hipertrofia de la nefrona son: respuestas celulares al daño y eventos bioquímicos que participan en la progresión de la pérdida de las nefronas<sup>21,28</sup>.

## Respuestas celulares al daño

1) **Desdiferenciación.** Cuando existe un estímulo estresante, las células epiteliales tubulares se transforman en menos diferenciadas a través de un proceso llamado transición epitelio-mesénquima. Estas células muestran características de proliferación, migración y producción de citocinas. Esta es una respuesta inadecuada ya que contribuyen a la fibrosis del parénquima renal. Citocinas como el TGF- $\beta$ , el FGF, el PDGF, la angiotensina II, la endotelina, entre otras, juegan un papel potencial en encender las vías que conllevan a la transición epitelio mesénquima<sup>29</sup>.

2) **Inflamación.** Evidencia experimental ha mostrado que la inflamación juega un papel central en la progresión a ERC. Las moléculas proinflamatorias que se liberan en la nefrona distal, se reabsorben en el túbulo y se concentran de manera que promueven la inflamación. Tanto los macrófagos como las células dendríticas están presentes de manera normal en el riñón, y pueden estar participando en la señalización inflamatoria, al ser reclutados por quimioatrayentes al túbulo <sup>30</sup>dañado. La inflamación tiene un papel importante en el inicio y el mantenimiento de la ERC.

3) **Disfunción endotelial.** El deterioro de la microcirculación renal contribuye 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 al actuar como citocinas inductoras de respuestas profibróticas y proinflamatorias<sup>30</sup>.

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

1) ***Aporte insuficiente ante las demandas metabólicas.*** Los riñones consumen el 20% del gasto cardíaco. Al haber hipertrofia renal y estar disminuido el flujo sanguíneo renal en la ERC, ocurre un desplazamiento hacia el metabolismo anaerobio para suplir los requerimientos de ATP de una mayor cantidad de tejido, lo que activa diversas vías que influyen la pérdida de más nefronas, por ejemplo, mayor generación de ERO<sup>26</sup>.

2) ***Acidosis tubular.*** La acidosis tiene consecuencias tanto fisiológicas como metabólicas. La amoniatrosis, en respuesta local a la acidosis, activa al complemento y causa daño al tejido renal. Se ha observado experimentalmente que la acidificación tubular estimula la producción de ERO, lo que genera daño renal aun mayor<sup>31</sup>.

3) ***Metabolismo oxidativo y generación de ERO.*** Las ERO, que se presentan en 3 formas inestables: el ión hidroxilo, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Estos radicales 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<sup>32</sup>.

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 deletéreas, ya que interviene en el desarrollo del fenotipo fibrótico<sup>33</sup>.

## **Dimorfismo sexual en las enfermedades renales**

Alrededor del mundo, el acceso a la educación y atención médica no es equitativo entre hombres y mujeres; las mujeres siguen siendo pobremente representadas en muchos estudios clínicos, esto limita la evidencia en la cual basarse para hacer recomendaciones que mejoren los desenlaces para las pacientes. Además, las mujeres tienen riesgos únicos para enfermedad renal, como el embarazo; y son más propensas a enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso, artritis reumatoide y escleroderma sistémico<sup>34</sup>. En Estados Unidos la prevalencia de ERC es mayor en mujeres comparada con los hombres (15.4% versus 12.8% en 2011-2012). En contraste, el riesgo de progresar a ERCT es 50% mayor en hombres comparado con las mujeres en todos los grupos étnicos<sup>35</sup>. Los efectos de la mayor expectativa de vida y la disminución de la TFG con la edad, así como el potencial sobrediagnóstico de ERC debido a la variabilidad en el uso de ecuaciones para estimar la TFG, podrían ser en parte la razón de la mayor prevalencia de ERC en mujeres, ya que paradójicamente hay una preponderancia de los pacientes hombres de comenzar terapia de reemplazo renal sobre las mujeres<sup>36</sup>. Existen diferencias de sexo en diversos mecanismos de la enfermedad renal, y se ha señalado el papel fundamental de las hormonas sexuales, como responsables de la regulación de los mecanismos moleculares implicados en la progresión de la ERC<sup>35</sup>. La incidencia en las enfermedades renales varía según la etiología, aunque en general, parece que los hombres tienen mayor riesgo de progresión. Los estudios clínicos han demostrado que los hombres con diabetes mellitus tipo 1 o 2, tienen una disminución significativamente mayor en la tasa de filtración glomerular y un mayor riesgo de desarrollar microalbuminuria y macroalbuminuria que las mujeres<sup>37</sup>. En un estudio retrospectivo reciente, se observó que los hombres progresan más rápidamente en la

nefropatía por IgA que las mujeres<sup>38</sup>. Mientras que, en otro estudio prospectivo realizado en Toronto en pacientes mayores de 16 años y de diferentes etnias, se encontró que las mujeres tenían un mejor pronóstico para la nefropatía membranosa, la nefropatía focal y segmentaria, pero no, en la nefropatía por IgA<sup>39</sup>. Y en el caso de la enfermedad renal poliquística, el uso de la terapia de reemplazo renal fue mayor en los hombres en comparación con las mujeres en la población de los Estados Unidos<sup>40</sup>. Sin embargo, en el lupus eritematoso la incidencia es mayor en mujeres que en hombres<sup>41</sup>. Por esto es importante identificar los mecanismos involucrados en las diferencias de sexo observadas en diversas enfermedades renales. Una vez que se entienden los mecanismos responsables, se pueden traducir acciones para mejorar la salud renal en hombres y mujeres.

### **El dimorfismo sexual en la progresión a ERC.**

Existe cada vez más evidencia de que la patogénesis, las características clínicas y el pronóstico de las enfermedades cardiovasculares y las 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 este 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<sup>42-44</sup>. 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<sup>45</sup>. 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<sup>43</sup>. En apoyo a este meta-análisis, dos estudios recientes demostraron que la progresión a ERC es peor en el hombre que en la mujer<sup>46,47</sup>. 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<sup>48</sup>. 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 controlados, los autores concluyeron que las mujeres tuvieron peor pronóstico de progresión de enfermedad renal que los hombres, después de ser corregidos 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<sup>45</sup>. En otro estudio realizado para evaluar el impacto del sexo en la glomerulonefritis primaria se observó un aumento de la sobrevida renal en mujeres jóvenes con nefropatía membranosa y glomerulosclerosis focal y segmentaria, comparada con los hombres, en los que fue menor<sup>39</sup>. Estos estudios sugieren menor

predisposición al desarrollo de enfermedades renales en el sexo femenino, que probablemente es hormonalmente dependiente, aunque los mecanismos específicos por los que las hormonas sexuales influyen en la progresión de la enfermedad renal no están completamente comprendidos.

### **Evidencia experimental del dimorfismo sexual en el daño renal**

Diversos estudios han mostrado que la testosterona y los estrógenos juegan un papel importante en el daño renal inducido por isquemia/reperfusión. Estudios en modelos murinos muestran que la castración de las ratas macho reduce el daño renal por IR y la administración de estrógenos reduce parcialmente la LRA<sup>49,50</sup>. El dimorfismo sexual en diversos mecanismos de la LRA podría impactar en la progresión a ERC.

**Mecanismos vasculares.** El endotelio y las células del músculo liso vascular de la microcirculación desempeñan un papel crítico en la fisiopatología de la LRA<sup>51</sup>. Estudios en animales muestran que existe dimorfismo sexual en la regulación del tono vascular<sup>52</sup>. El óxido nítrico juega un papel importante en la regulación del tono vascular renal y la hemodinámica a través de mantener un estado de vasodilatación. En modelos animales se ha observado que las hembras tienen mayor cantidad de RNAm y proteína de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en comparación con los machos<sup>53</sup>. Silbiger y cols encontraron que la expresión basal de eNOS y de la isoforma inducible (iNOS) en la médula de ratas hembra es mayor que en las ratas macho y la ooforectomía reduce la expresión de eNOS, mientras que la terapia estrogénica la restablece<sup>54</sup>. Los estrógenos a través de los receptores de estrógenos (RE) activan las cinasas c-Src, ERK, PI3K y Akt, esta última fosforila el residuo de la serina 1177 en la eNOS lo que genera la producción de

NO. Otro mecanismo que se ha explorado es la participación de la endotelina. La endotelina (ET-1) es un péptido de 21 aminoácidos que se une a los receptores ETA produciendo un aumento de calcio en las células musculares lisas y en consecuencia, una potente vasoconstricción, mientras que cuando se une a los receptores ETB produce vasodilatación al promover la liberación de NO<sup>55</sup>. La incubación de células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC) con 17beta-estradiol disminuyó la expresión de RNAm de ET-1, así como, los niveles basales de ET-1<sup>56</sup>. Y en la LRA se ha observado también un dimorfismo sexual en la regulación de la endotelina, por ejemplo, la isquemia reperusión (IR) en ratas Wistar mach, produce un aumento en los niveles de pre-proendotelina, fenómeno que no se observa en las ratas hembra sometidas al mismo periodo de isquemia<sup>50</sup>. El SRAA está dimórficamente regulado, tanto en humanos, como en modelos murinos. Las hembras tienen mayores niveles circulantes de angiotensinógeno, mientras que la renina, la ECA-1 (enzima convertidora de angiotensina 1) y el AT1R (receptor de angiotensina 1) son regulados a la baja por los estrógenos<sup>57</sup>. Por el contrario, en humanos y en diversas especies animales (perros, ratas, ratones y pollos) los machos tienen mayor presión sanguínea y niveles de Ang II (angiotensina II), ya que tienen aumentados los componentes de la vía clásica del SRAA (Ang II, AT1R, ECA1)<sup>58,59</sup>, mientras que, las hembras tienen mayores niveles de componentes de la vía no clásica del SRAA [ECA2, AT2R, Ang (1-7) y receptores Mas (MasR)]<sup>59</sup>. Aumento de los niveles de Ang II en las ratas hembra produce un cambio mínimo en la presión sanguínea, mientras que en los machos, el aumento de la presión es mayor pues poseen más receptores AT1R y menos AT2R que las ratas hembra<sup>57-60</sup>. También se ha observado que los estrógenos reducen la vida media de la Ang II unida al receptor AT1R<sup>52</sup>.

**Mecanismos de inflamación.** Diversos estudios sugieren que existe diferente regulación por hormonas sexuales sobre los procesos inflamatorios inducidos por daño isquémico en diferentes órganos<sup>61-63</sup>. Por ejemplo, la expresión de citocinas como TNF- $\alpha$ , MCP-1, IFN- $\gamma$  y CCL-17 es mayor en ratones macho que en las hembras sometidos a IR renal, y la disminución de testosterona por la castración atenúa los niveles de expresión de estas citocinas<sup>64</sup>. Efecto similar se ha observado en modelos de nefrotoxicidad por ciclosporina<sup>65</sup>. Estudios en animales han demostrado que existe una mayor infiltración de macrófagos en machos, en modelos de enfermedades que presentan inflamación. Por ejemplo, en un modelo de hipertensión en ratas, se observó que la infiltración de macrófagos CD68+, en la corteza y médula renal, fue mayor en los machos comparado con las hembras<sup>66</sup>. Sin embargo, en ratones macho sometidos a IR renal, el número de macrófagos F4/80+ aumentó en comparación con las hembras con daño renal; esto se previno con la castración y se restituyó con la administración de testosterona. El efecto contrario fue observado en las hembras, ya que la ovariectomía aumentó la infiltración de macrófagos y la administración de estradiol previno este efecto<sup>64</sup>. En modelos animales de hipertensión se ha observado la correlación entre ésta y el número de linfocitos T corticales en machos, pero no así en hembras<sup>66</sup>. De hecho, la proporción de células T reguladoras es menor en las ratas macho con hipertensión<sup>67</sup>. Las células T reguladoras (FOXP3<sup>+</sup>) son esenciales para mantener la tolerancia periférica y limitan la inflamación crónica<sup>68</sup>. También, se ha observado dimorfismo sexual en esta población de linfocitos, ya que en diversos modelos animales, las hembras tienen una mayor cantidad de células T reguladoras después de un daño renal agudo<sup>66,67,69</sup>.

**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<sup>70</sup>. Se ha observado que existe dimorfismo sexual en apoptosis en diversos tejidos, por ejemplo, en el músculo, el 17- $\beta$  estradiol ejerce acciones protectoras principalmente a través de un mecanismo no genómico por la activación de ERK 1/2 y PI3K/Akt y la fosforilación de BAD<sup>71</sup>; siendo ésta vía que se activa en el riñón después de daño podocitario inducido por puromicina, que es un agente que induce apoptosis en los podocitos, ya que, la activación de los RE estimulan la vía de señalización PI3K/Akt incrementando la expresión de las subunidades p85 $\alpha$  y p110 $\alpha$  de PI3K, así como, la fosforilación de Akt<sup>72</sup>. En otros modelos de daño renal, como el del estrés del retículo inducido por tunicamicina en ratones, se observó una mayor activación de Bax y caspasa-3 en machos comparado con hembras<sup>73</sup>. Se ha demostrado que el RE media los efectos antiapoptóticos *in vitro* e *in vivo* en podocitos, a través de la estabilización del potencial de membrana mitocondrial y la activación de la señalización de las MAP<sup>74</sup>. Una de las moléculas involucradas tanto en la producción de citocinas proinflamatorias, como en la apoptosis es la MAPK p38, la cual se activa después de un daño por IR. Estudios en varios sistemas celulares indican que la activación extracelular de ERK durante la activación de JNK, puede bloquear la naturaleza perjudicial de la respuesta de JNK y conducir a la supervivencia celular. Por lo tanto, el destino de la célula puede determinarse por el balance entre la actividad de ERK y JNK<sup>75</sup>. En un estudio realizado por Park, en ratones macho sometidos a IR se previno el incremento de la relación ERK/JNK, protección que se perdió con la castración de los animales<sup>49</sup>. Además, en estudios *in vitro*, en células del epitelio tubular proximal humanas (HK-2), la exposición a testosterona promovió la apoptosis de estas células a través de

inducir la fosforilación rápida de JNK y de su efector río abajo c-Jun; y el bloqueo del receptor de andrógenos disminuyó la fosforilación de JNK<sup>76</sup>. Tanto en células HK-2, como en cultivos primarios de células epiteliales del túbulo proximal (PTECs), niveles fisiológicos de testosterona (1-10nmol/L) inducen incremento en la apoptosis de ambas líneas celulares, mientras que, el antagonismo del receptor de andrógenos con flutamida previene la apoptosis inducida por testosterona. El ligando de Fas (FasL) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) son regulados a la alza por la testosterona en células HK-2. De igual manera, la testosterona incrementa la expresión de Bax, disminuye la expresión de Bcl-2 y aumenta la activación de caspasa 3, comportamiento que es revertido por la administración de 17 $\beta$ -estradiol<sup>77</sup>.

***Estrés oxidante.*** Una de las características fisiopatológicas de la LRA es el incremento en la producción de ERO y de especies reactivas de nitrógeno (RNS). Al respecto se ha reportado en modelos animales dimorfismo sexual en la producción de peroxinitritos y de nitrotirosina, ya que, los machos tienen una mayor producción de esos radicales libres y por lo tanto, mayor estrés oxidante<sup>78</sup>. En la producción de ERO también se ha observado la influencia de las hormonas sexuales. En un modelo de ratas espontáneamente hipertensas que desarrollan albuminuria e infiltración de macrófagos, se encontró que las ratas hembra tuvieron menos daño y esto se asoció con menores niveles de estrés oxidante en la corteza renal, medido por la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>79</sup>. Y en un modelo de IR se observó que la castración acelera la activación de la SOD (superóxido dismutasa) y reduce la producción de ERO y peroxidación lipídica, indicando que la testosterona ejerce una regulación sobre la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>80</sup>. El estrés del retículo endoplasmático es causado por el aumento de proteínas mal plegadas, que cuando se genera

en proceso de LRA resulta en la sobre regulación de CHOP/GADD153 y necrosis tubular aguda (NTA), que se asocia fuertemente con la ocurrencia de células apoptóticas en la región del daño<sup>81</sup>. En un modelo de ratones con tunicamicina, se observó que los machos son más susceptibles que las hembras al estrés del retículo endoplasmático, ya que mostraron mayor inducción de marcadores de estrés, tal como, BiP/GRP78 (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina) y XBP1 (proteína de unión a la caja X 1)<sup>73</sup>.

Como se ha mencionado, existe dimorfismo sexual en la LRA en diversos modelos de daño renal, y por lo tanto 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.

## **HIPÓTESIS**

Las ratas hembras se protegerán del desarrollo de ERC inducida por IR renal, debido a que las hormonas sexuales femeninas promueven mecanismos de renoprotección. Por lo tanto, los estrógenos son los responsables de evitar la transición de la LRA a ERC. Mientras que la testosterona promueve la transición de la LRA a ERC.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- I. Determinar si la transición de la LRA a ERC es diferente entre hembras y machos.
- II. Evaluar los mecanismos de renoprotección en el posible dimorfismo sexual de la enfermedad.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Determinar si existe dimorfismo sexual en el curso temporal de las alteraciones funcionales, estructurales y moleculares en la transición de la LRA a ERC.
- b) Determinar la implicación de los estrógenos en la transición de la LRA a ERC.
- c) Estudiar la implicación de la testosterona en la transición de la LRA a ERC.

## **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 con el número 1228.

### **Diseño experimental**

#### **Protocolo experimental I: Efecto del género en la evolución de la transición de la LRA a ERC**

Se incluyeron 39 ratas Wistar **hembra** con un peso entre 260 y 300 g. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos: 1) control, cirugía falsa (H) (los animales control se estudiaron y sacrificaron a las 24 h y a los 120 días) 2) isquemia bilateral de 45 minutos (H+IR), (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 dividieron en los siguientes grupos: 1) control, cirugía falsa (M): (los animales control se

estudiaron y sacrificaron a las 24 h y a los 120 días) 2) isquemia bilateral de 45 minutos (M+IR), (fueron estudiados a las 24 h y a los 30, 60, 90 y 120 días post-isquemia).

### **Protocolo experimental II: Reducción de los estrógenos en la transición de la LRA a ERC**

Se incluyó un segundo grupo de 40 ratas Wistar hembra las cuales fueron **ooforectomizadas** a los 70 días de edad y se dejaron evolucionar por un mes hasta que disminuyeron los niveles de estrógenos. Los animales se dividieron en 2 grupos: 1) ooforectomizadas + cirugía falsa (Oof), 2) ooforectomizadas + IR de 45 min (Oof+IR), (Los animales se estudiaron y sacrificaron a las 24 h y a los 30, 60, 90 y 120 días después de la cirugía).

### **Protocolo experimental III: Efecto del bloqueo de la vía genómica y no genómica de los RE.**

Se incluyeron 35 ratas Wistar **hembra** con un peso entre 260 y 300 g. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos: 1) control, cirugía falsa H 2) isquemia bilateral de 45 minutos (IR) H+IR 3) IR+**fulvestrant** (Faslodex®) (5mg/kg/día), que es un antagonista de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos administrado un día a la semana por vía intraperitoneal, durante 5 meses (IR+Fulv) 4) animales sometidos a IR y que recibieron el antagonista del receptor GPER (receptor de estrógenos acoplado a proteínas G) de los estrógenos **G-15** (160  $\mu$ g/kg/día Cayman Chemical), IR+G-15; a las ratas se les administró el G-15 de dos formas diferentes a) administrado 3 veces por semana de manera subcutánea durante 2 meses, o b) administrado con bombas subcutáneas por 2 meses a una dosis diaria

de 160 µg/kg/día. Los animales se estudiaron a las 24 h y mensualmente; y se sacrificaron a los 150 días.

#### **Protocolo experimental IV: Reducción de la testosterona en la transición de la LRA a ERC**

Se incluyeron 92 ratas Wistar **macho** con un con un peso entre 260 y 300 g. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos: 1) machos intactos control, cirugía falsa (M) 2) machos intactos, isquemia bilateral de 45 minutos (M+IR), 3) machos **castrados** a los 30 días de edad y que se dejaron evolucionar un mes hasta que disminuyeron los niveles de testosterona. Control cirugía falsa (C) 4) machos castrados isquemia bilateral de 45 minutos (C+IR). Los animales se estudiaron y sacrificaron a las 24 h, 48 h, 7 días y 150 días.

#### **Protocolo experimental V: Efecto del bloqueo de los receptores de andrógenos en la transición de la LRA a ERC**

Se incluyeron 92 ratas Wistar **macho** con un con un peso entre 260 y 300 g. Las ratas se dividieron en cuatro grupos: 1) control, cirugía falsa M 2) isquemia bilateral de 45 minutos (IR) M+IR. Los animales se estudiaron y sacrificaron a los 150 días. 3) Ratatas tratadas con **flutamida** (3mg/rata/día, s.c., Sigma Aldrich) que es un antagonista de los receptores de andrógenos (M+Flut) y sometidas a cirugía falsa. 4) IR renal de 45 minutos más flutamida (IR+Flut). La flutamida fue administrada diariamente durante 7 días previos a la cirugía falsa o IR y 7 días posteriores. Los animales se estudiaron y sacrificaron a los 150 días.

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

La LRA 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 IR, 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 h, 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 i.p. 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; a continuación fueron devueltos a sus jaulas con alimento y agua *ad libitum*.

### **Castración bilateral en la rata macho**

Las ratas hembra del protocolo IV se sometieron a castración bilateral a los 30 días de edad. Los animales fueron anestesiados mediante inyección i.p. de pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/Kg. Posteriormente se colocó a los animales en una cama termoregulada, los testículos fueron ligados y removidos; el tejido muscular y la piel fueron suturados. Después de la cirugía, los animales permanecieron en las camas termoreguladas hasta que desapareció el efecto de la anestesia; a continuación 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  $-70^{\circ}\text{C}$  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 y área 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:** Las 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinaron mediante el estuche comercial Amplex® RedHydrogen Peroxide/Peroxidase Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta metodología se basa en reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  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.

## **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- $\beta$  (1:100), HIF1- $\alpha$  (1:100), eNOS (1:100), VEGF (1:100), ET<sub>A</sub> (1:10), ET<sub>B</sub> (1:10), AT<sub>1</sub> (TR), AT<sub>2</sub> (TR), Catalasa (1:100), IL-10 (TR) y 18S (1:1000). Posteriormente se realizó la amplificación del cDNA, mediante PCR en tiempo real utilizando sondas marcadas con un fluoróforo específicas para cada gen (Sondas Taqman de Applied Biosystems); utilizando 18S como gen control endógeno. eNOS (Rn02132634\_s1), catalasa (Rn00560930\_m1), HIF1 $\alpha$ , (Rn0057756\_m1), VEGF (Rn01511602\_m1), ETA (Rn00561137\_m1), ETB (Rn00569139\_m1), AT1 (Rn00561409\_s1), AT2 (Rn00560677\_s1), TGF- $\beta$  (Rn00572010\_m1), IL-10 (Rn99999012\_m1) y 18S (Rn03928990\_g1). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). La cuantificación relativa de cada expresión génica se realizó por el método comparativo (Ct).

***Niveles urinarios de Hsp72:*** Se cargaron 10  $\mu$ l 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 a 4° y el anticuerpo secundario IgG-HRP goat anti-mouse 1:5000 (Sta. Cruz) 90 minutos a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas con el sustrato quimioluminiscente Millipore.

***Niveles de proteína de VEGF en corteza renal.*** Los niveles de proteína VEGF se detectaron mediante Western blot, utilizando 30  $\mu$ g de proteína en gel de electroforesis SDS-PAGE al 8.5% y electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anti-VEGF mouse (1: 1000, ThermoScientific) durante la noche a 4°. A

continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario IgG anti-mouse conjugada con HRP (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology) durante 90 min a temperatura ambiente. Las proteínas fueron detectadas con un Kit de quimioluminiscencia (Millipore) y por radiografía. Las bandas fueron escaneadas para análisis densitométrico utilizando el sistema de imágenes UVP EC3 y el software de adquisición y análisis de imágenes VisionWorks LS de UVP.

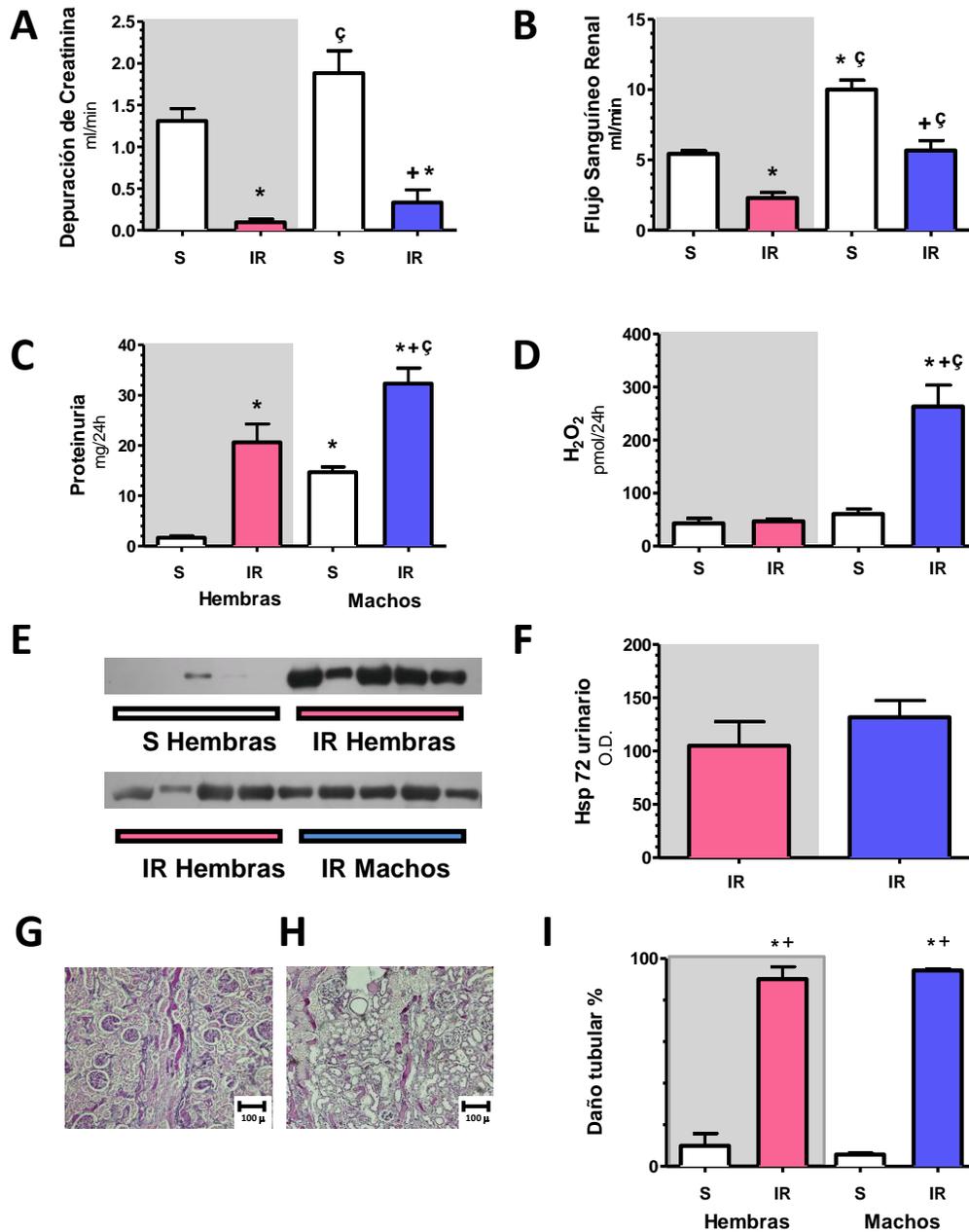
### **Análisis estadístico**

El tratamiento de los datos fue mediante ANOVA y prueba t de Student, 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

### *Efecto del género en la evolución de la transición de la LRA a ERC*

Con el fin de evaluar el dimorfismo sexual en el curso temporal de la transición de la LRA a ERC, se indujo un episodio de LRA mediante un insulto de isquemia renal bilateral durante 45 min así como cirugía falsa para los animales control, y los grupos sometidos a IR fueron comparados con los grupos control. Ambos grupos se estudiaron 24 h después de la reperusión o cirugía falsa. Nuestro primer objetivo se centró en evaluar la gravedad del IR en ratas macho y hembra. Los grupos M+IR y H+IR desarrollaron LRA, caracterizada por una reducción de la función renal determinada por la depuración de creatinina (Fig. 1A) y flujo sanguíneo renal (Fig. 1B), además se observó un aumento significativo de la proteinuria (Fig. 1C). La excreción urinaria del peróxido de hidrógeno ( $\text{UH}_2\text{O}_2\text{V}$ ) aumentó 4 veces en el grupo M+IR en comparación con su grupo control, de manera muy interesante, en el grupo H+IR, el  $\text{UH}_2\text{O}_2\text{V}$  permaneció en niveles similares al grupo control (Fig. 1D). Anteriormente nuestro grupo ha mostrado que los niveles de excreción urinaria de la proteína de choque térmico de 72 kDa (UHsp72) es un biomarcador sensible y temprano de LRA, capaz de estratificar el daño tubular epitelial<sup>82</sup>. Como se muestra en la Fig. 1E y F, el grupo de hembras control mostró niveles muy bajos de UHsp72. En cambio, el grupo H+IR mostró un aumento significativo en UHsp72 (WB superior). Una excreción similar de Hsp72 se encontró en los grupos M+IR y H+IR (WB inferior y análisis densitométrico). El grado similar de daño por IR se confirmó mediante el análisis histopatológico, como se muestra en los cortes de riñón teñidos con PAS representativos y en la cuantificación de los túbulos dañados (Fig. 1G-I).



**Figura 1. Daño renal inducido por IR renal después de 24-h en hembras y machos.** A) Depuración de creatinina, B) Flujo sanguíneo renal, C) Niveles de proteinuria, D) Excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, E) Niveles urinarios de Hsp72 por western blot (n=4-5 por grupo), F) Análisis densitométrico de los niveles de Hsp72, G) Imágenes representativas de cortes de riñón teñidos con PAS (tinción de ácido periódico de Schiff) de una rata sometida a IR hembra y H) una rata macho sometida a IR, I) Porcentaje de túbulo dañado. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra blanca y el grupo H+IR

está representado en barras rosa, seguido de los M en barras blancas y grupo de M+IR en barras azules. Grupos control n=4; IR hembras o machos n=6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*p<0.05 vs. H; +p<0.05 vs. M;  $\zeta$ p<0.05 vs H+IR.

Estos resultados indican que la IR causó alteraciones estructurales y funcionales de la misma magnitud en ratas macho y hembra, excepto en el estrés oxidante. La respuesta dimórfica observada en el UH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>V se analizó adicionalmente midiendo la relación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), un metabolito subrogado de la oxidación de GSH en el riñón (Fig. 2). Como se aprecia en la Fig. 2A, la relación GSH/GSSG en la corteza renal de las H+IR fue similar al grupo control (H). En contraste, el grupo M+IR mostró una reducción significativa del 60% en la relación de los niveles de GSH y GSSG en comparación con su grupo control. En la médula renal se observó el mismo comportamiento, la relación en el grupo H+IR no cambio con respecto al grupo control, en cambio, el grupo M+IR mostró disminución en la relación GSH/GSSG en comparación con el grupo M (Fig. 2B). Estos hallazgos indican que, a pesar de que las ratas hembra tuvieron un daño renal inducido por IR similar, presentaron una mayor capacidad para generar GSH.

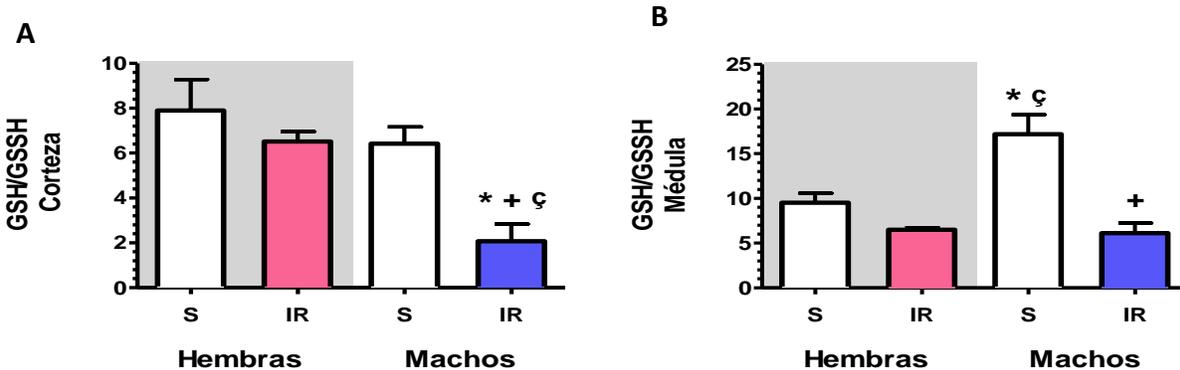
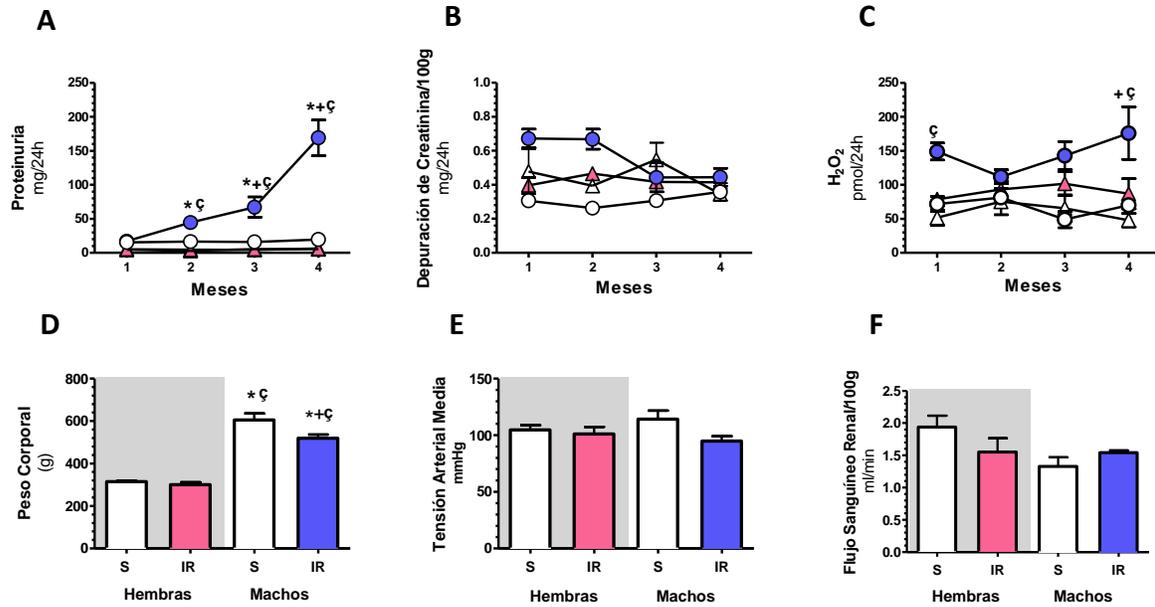


Figura 2. La IR renal inducida por IR renal induce una respuesta dimórfica sobre la relación del contenido renal de GSH/GSSG. A) Relación del contenido de GSH/GSSG en la corteza renal. B) Relación

del contenido de GSH/GSSG en la médula renal. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra blanca y el grupo H+IR está representado en barras rosa, seguido de los M en barras blancas y grupo de M+IR en barras azules. Grupos control n=4; IR hembras o machos n=6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*p<0.05 vs. H; +p<0.05 vs. M;  $\zeta$ p<0.05 vs H+IR.

Nuestro segundo objetivo se centró en evaluar el curso temporal de la transición de la LRA a ERC en ratas hembra y macho. Como habíamos reportado anteriormente<sup>83-85</sup>, un episodio isquémico en ratas macho indujo un aumento progresivo de la proteinuria de  $17.2 \pm 1.4$  (primer mes) a  $169.2 \pm 26.2$  mg / dL (cuarto mes) y este aumento fue evidente desde el segundo mes (Fig. 3A). El curso temporal de la función renal corregida por el peso corporal fue similar entre los grupos y no se modificó por la isquemia reperusión (Fig. 3B). En cambio se observó un aumento temprano de UH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>V en el grupo M+IR (primer mes, comparado con el grupo H+IR). Los niveles de UH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>V permanecieron elevados durante el transcurso del tiempo del estudio al compararlos con su grupo control mediante la prueba t, pero solo significativo por ANOVA al cuarto mes, comparado con el grupo M y H+IR (Fig. 3C). A pesar del mismo daño por IR inicial, el grupo H+IR no desarrolló proteinuria ni elevación de UH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>V (Fig. 3A y 3C). Al final del período experimental (4 meses), ambos grupos de ratas hembra exhibieron un peso corporal menor que el de los machos, debido a la bien conocida diferencia biológica de sexo en tamaño y peso corporal. En el grupo M+IR hubo una ligera reducción que se asoció con la transición de LRA a ERC que mostraron las ratas macho, efecto que no se observó en las hembras (Fig. 3D). No se observaron diferencias en la presión arterial media entre los grupos estudiados (Fig. 3E). Los grupos M+IR y H+IR no mostraron cambios en el FSR corregido por peso corporal, (Fig. 3F).

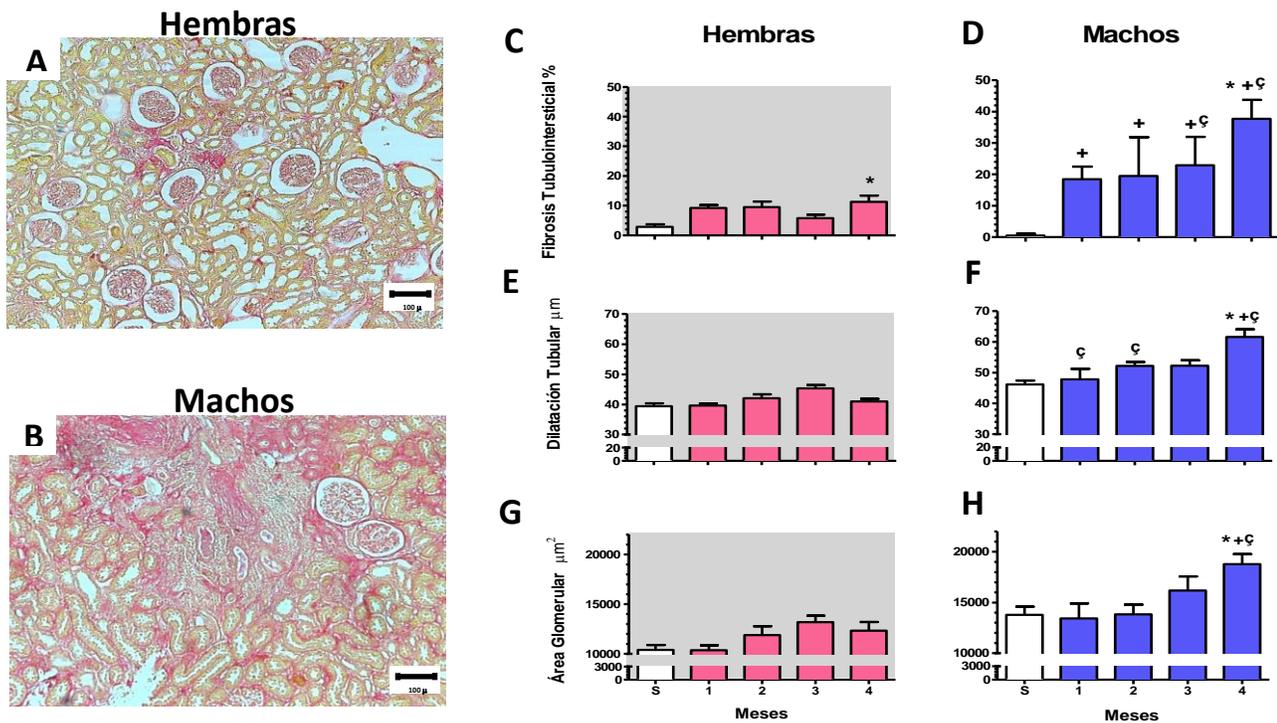
Estos datos indican que a pesar de que se indujo el mismo daño inicial, la progresión de la enfermedad fue más rápida en los machos con respecto a las hembras.



**Figura 3. La transición de LRA a ERC es prevenida en ratas hembra.** Medido mensualmente A) Excreción urinaria proteínas, B) Depuración de creatinina, C) Excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Triángulos blancos representan H n= 7; triángulos rosa representan H+IR n= 6-8; círculos blancos representan M n= 4-6 y círculos azules representan M+IR n= 4-6 D) Peso corporal, E) Tensión Arterial Media, y F) Flujo sanguíneo renal. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra blanca y el grupo H+IR está representado en barras rosa, seguido de los M en barras blancas y grupo de M+IR en barras azules. Grupos control n=4; IR hembras o machos n=4-6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*p<0.05 vs. H; +p<0.05 vs. M; çp<0.05 vs H+IR.

De acuerdo con nuestros hallazgos a nivel funcional, después del cuarto mes, el grupo H+IR no mostró casi ninguna alteración estructural renal en comparación con el grupo M+IR. La microfotografía representativa un riñón de rata del grupo H+IR (Fig. 4A) contrasta con una microfotografía del riñón de una rata del M+IR (Fig. 4B), donde se aprecia el área afectada por fibrosis tubulointersticial. El análisis morfométrico del curso temporal de la fibrosis tubulointersticial mostró que, 4 meses después de la isquemia, el

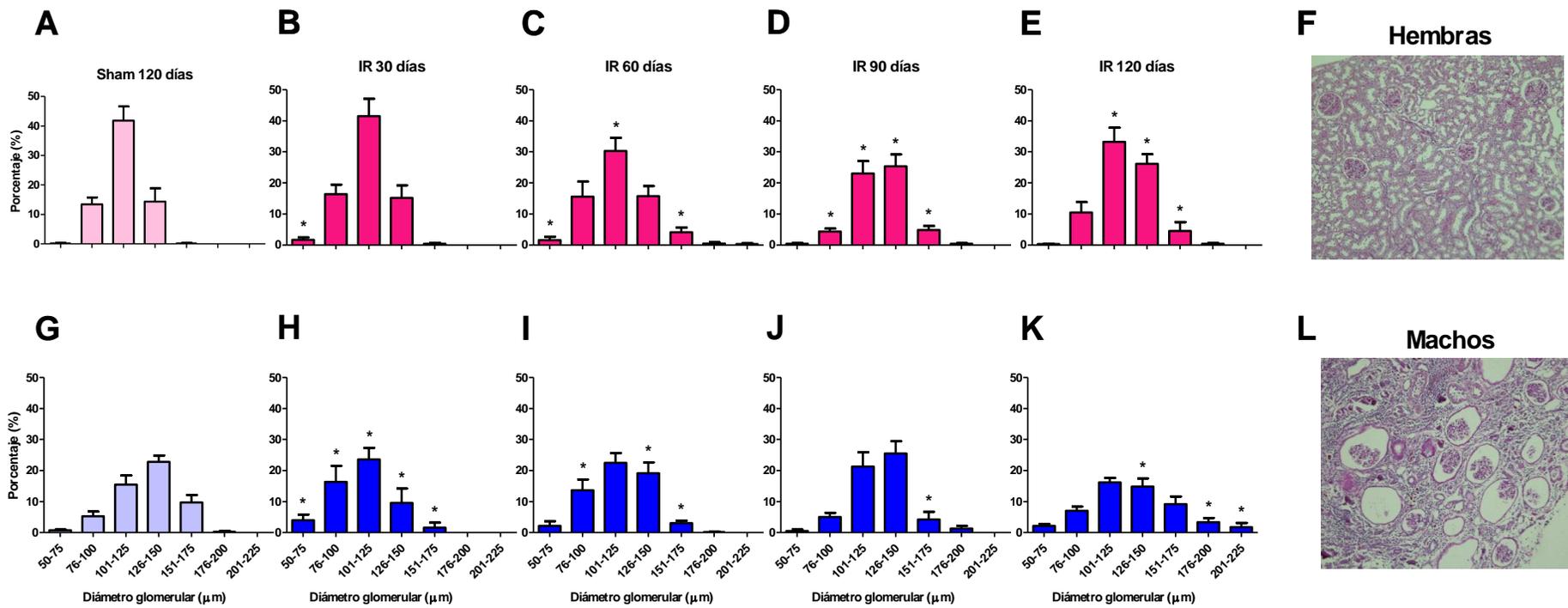
grupo H+IR (Fig. 4C) y el grupo M+IR (Fig. 4D) tuvieron un aumento significativo en la fibrosis comparado con sus propios controles, sin embargo, el grado el daño fue mucho mayor en los machos que en las hembras, 38% vs. 12%, respectivamente ( $p < 0.05$ ). No se observó dilatación tubular ni hipertrofia glomerular en el grupo H+IR (Fig. 4E y G, respectivamente), pero estas alteraciones si se presentaron en el grupo M+IR (Fig. 4F y H).



**Figura 4. La ERC inducida por un episodio de LRA se asoció con daño glomerular y túbulointerstial en los machos sometidos a IR pero fue prevenida en las ratas hembra.** Microfotografías representativas de cortes de riñón teñidas con rojo sirio de A) rata IR hembra y B) rata IR macho después de 4 meses de lesión por IR (aumento 100X). Evolución temporal de la fibrosis tubulointersticial en C) hembras y en D) machos. Curso temporal de dilatación tubular (µm) en E) hembras y en F) machos. Curso temporal del área glomerular (µm<sup>2</sup>) en G) hembras y en H) machos. Todos los parámetros se determinaron a los 1, 2, 3 y 4 meses en los grupos H+IR y M+IR y a los 4 meses en grupos H y M. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra blanca y el grupo H+IR está representado en barras rosa, seguido de

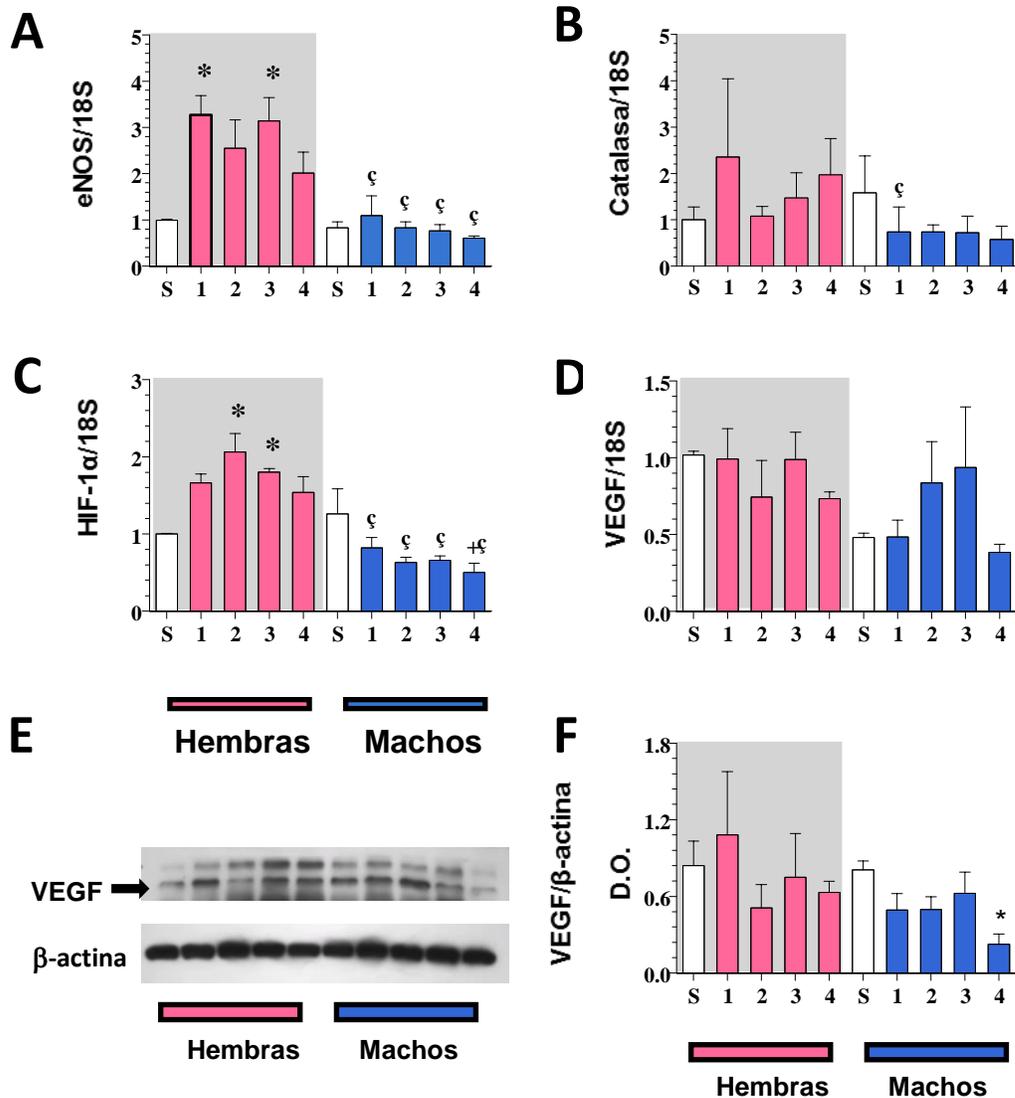
los M en barras blancas y grupo de M+IR en barras azules. Grupos control n=4; IR hembras o machos n=4-6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*p<0.05 vs. H; +p<0.05 vs. M; çp<0.05 vs H+IR.

En la Figura 5 se muestra el curso temporal de la distribución de los diámetros glomerulares en los grupos de las hembras (Fig. 5A-E) y los grupos de machos (Fig. 5G-K). Al cuarto mes, el grupo control M mostró una distribución normal tipo campana, en la que se encontró aproximadamente el 50% de los glomérulos en el rango de tamaño de 126-150  $\mu$ m (Fig. 5G). En el grupo M+IR al cuarto mes, hubo un aumento significativo en la proporción de glomérulos en rangos más altos (176-200 y 201-225  $\mu$ m) (Fig. 5K). En contraste, el grupo H+IR tuvo un patrón de distribución como el del grupo control. Los resultados presentados en las Figuras 3, 4 y 5 muestran claramente que el grupo M+IR desarrolló una ERC progresiva, esta complicación no se observó en el grupo H+IR, a pesar del mismo grado de LRA inducido al comienzo del estudio.



**Figura 5. Se observó hipertrofia glomerular en machos, pero se previno en las hembras.** A) Porcentaje de glomérulos en el grupo H, B-E) Porcentaje de glomérulos en los grupos H+IR de 1 a 4 meses, F) Microfotografía representativa de cortes de riñón teñidas con PAS de una rata H+IR (aumento 100X), G) Porcentaje de glomérulos en el grupo M, H-K) Porcentaje de glomérulos en los grupos M+IR de 1 a 4 meses, F) Microfotografía representativa de cortes de riñón teñidas con PAS de una rata M+IR (aumento 100X). H barras rosa claro, H+IR barras rosa, M barras celeste y el grupo M+IR barras azules (n= 4-6). Los parámetros se analizaron contando al menos 100 glomérulos por rata, y los datos se muestran como media  $\pm$  SE. \* =  $p < 0,05$  vs. H o M, respectivamente.

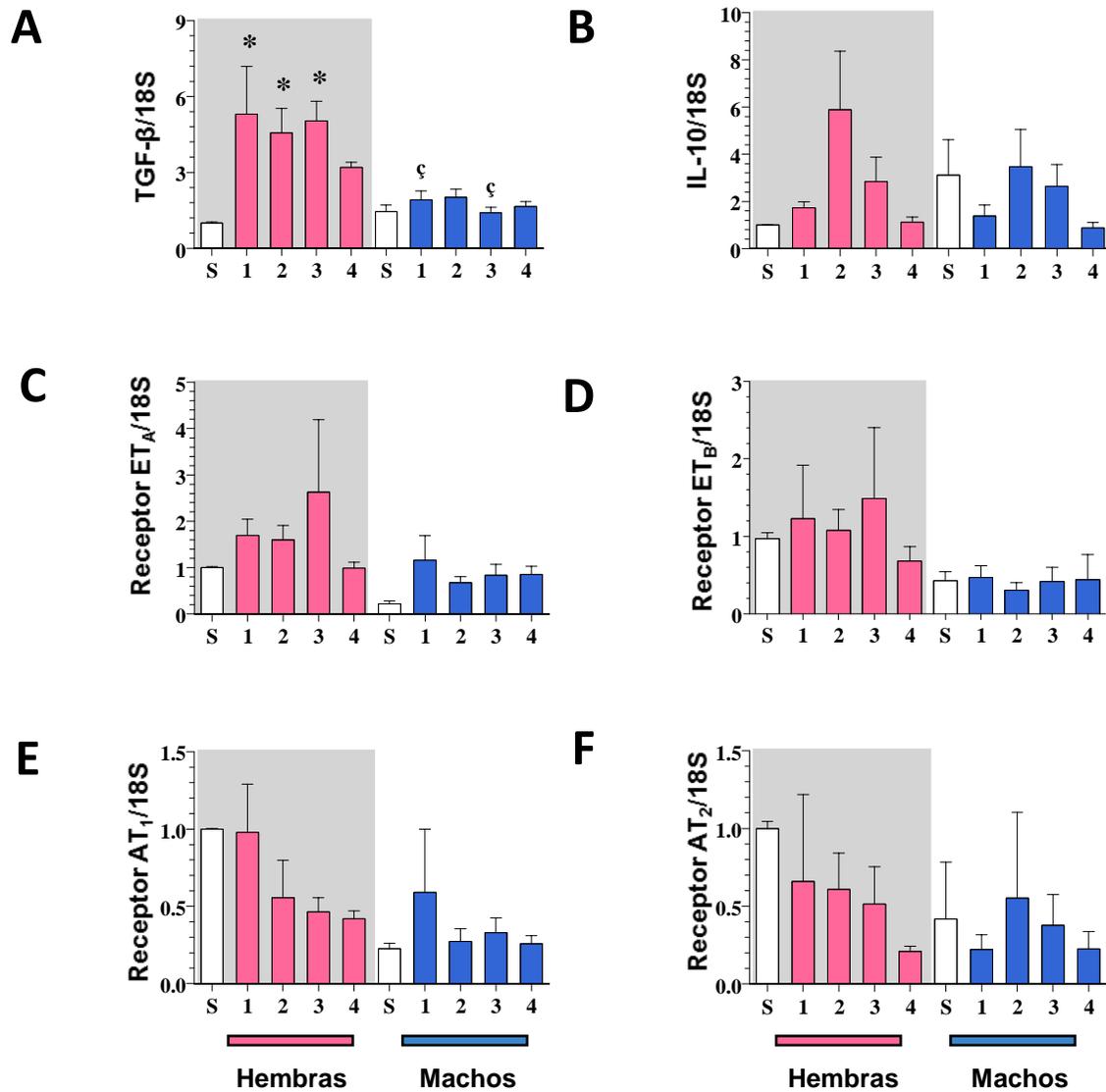
Después de determinar que la progresión de ERC es diferente en las hembras con respecto a los machos, nos dimos a la tarea de evaluar algunos de los posibles mecanismos involucrados en la renoprotección que muestran las hembras sometidas a un episodio de LRA. Para conocer los mecanismos responsables en la renoprotección observada en ratas hembras, evaluamos los niveles de RNAm de varias vías de señal involucradas en la fisiopatología de la ERC. Los niveles de RNAm de eNOS aumentaron significativamente en el grupo H+IR al primer y tercer mes después de la IR en comparación con el grupo control. En contraste, los niveles de RNAm de eNOS permanecieron inalterados en los grupos M+IR, pero fueron significativamente menores a los observados en los grupos H+IR (Fig. 6A). No hubo cambios en los niveles de RNAm de catalasa entre los grupos, excepto en el primer mes del grupo M+IR, en el que se observó una reducción significativa en comparación con el grupo H+IR (Fig. 6B). También encontramos un aumento significativo en los niveles de RNAm de HIF1 $\alpha$  en el grupo H+IR en el segundo y tercer mes post-isquemia, lo que contrasta con el comportamiento en el grupo M+IR que fue significativamente menor que los correspondientes grupos H+IR y diferente del grupo control M a los 4 meses (Fig. 6C). Aunque los niveles de RNAm de VEGF fueron similares durante el transcurso del tiempo del estudio en los grupos H+IR y M+IR (Fig. 6D), los niveles de proteína de VEGF tendieron a ser más bajos en el grupo M+IR durante el seguimiento, pero solo se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el cuarto mes (Fig. 6E-F).



**Figura 6. Respuesta dimórfica de algunos mediadores involucrados en la transición de LRA a ERC.** A) Niveles de RNAm de eNOS, B) Niveles de RNAm de Catalasa, C) Niveles de RNAm HIF-1 $\alpha$ , D) Niveles de RNAm de VEGF, E) Western blot representativo de VEGF y  $\beta$ -actina, y F) Niveles de proteína de VEGF. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra blanca y el grupo H+IR está representado en barras rosa, seguido de los M en barras blancas y grupo de M+IR en barras azules. Grupos control n=4; IR hembras o machos n=4-6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*p<0.05 vs. H; +p<0.05 vs. M;  $\zeta$ p<0.05 vs H+IR.

Finalmente, se evaluaron los niveles de RNAm de citocinas antiinflamatorias y receptores vasoactivos. Hubo un aumento significativo en los niveles de RNAm de TGF- $\beta$

en el grupo H+IR, desde el primer mes posterior a la isquemia y este efecto no se observó en los grupos M+IR (Fig. 7A). De manera similar, hubo una tendencia al aumento de los niveles de RNAm de IL-10 en los grupos H+IR (Fig. 7B).



**Figura 7. Respuesta dimórfica de algunos mediadores involucrados en la transición de LRA a ERC. A)** Niveles de RNAm de TGF-β, **B)** Niveles de RNAm de IL-10, **C)** Niveles de RNAm del receptor ET<sub>A</sub>, **D)** Niveles de RNAm del receptor ET<sub>B</sub>, **E)** Niveles de RNAm del receptor AT<sub>1</sub>, y **F)** Niveles de RNAm del receptor AT<sub>2</sub>. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra

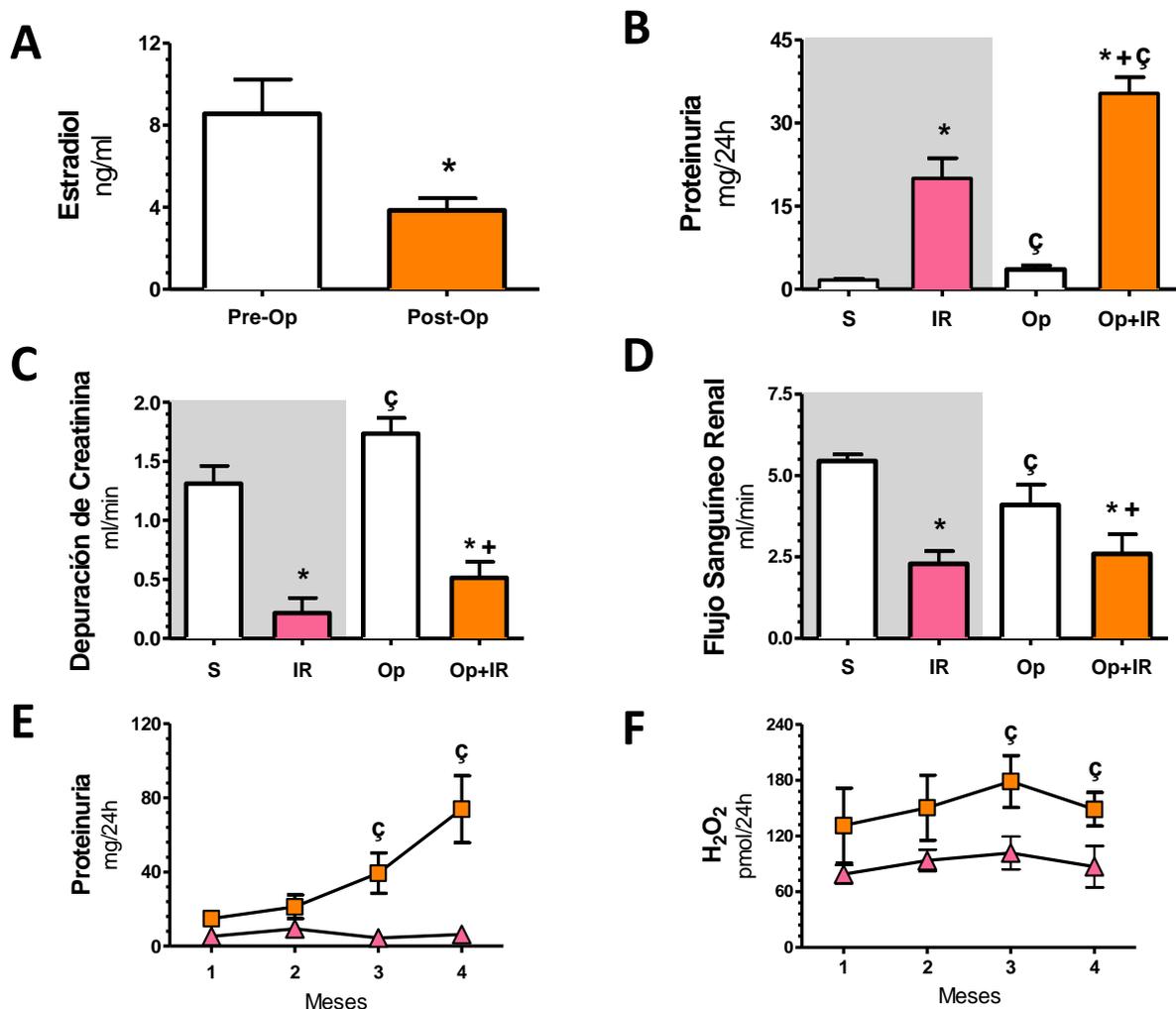
blanca y el grupo H+IR está representado en barras rosa, seguido de los M en barras blancas y grupo de M+IR en barras azules. Grupos control n=4; IR hembras o machos n=4-6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$  vs. H; + $p < 0.05$  vs. M;  $\zeta p < 0.05$  vs H+IR.

No se encontraron diferencias en los niveles de RNAm de los factores vasoactivos (Fig. 7C, E y F), excepto en el receptor ETB en el que los valores tienden a ser menores en los grupos de ratas macho, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 7D).

### ***Efecto de la reducción de estrógenos en la transición de la LRA a ERC***

Para analizar el papel de las hormonas sexuales femeninas en la renoprotección observada a largo plazo, se ooforectomizaron ratas hembra. La figura 8 A muestra que los niveles de estradiol se redujeron en un 55% en ratas ooforectomizadas (Oof), un mes después de la cirugía, en comparación con el grupo control y este grupo de ratas ganó más peso corporal que las ratas control hembra (dato no mostrado). Aunque la depuración de creatinina fue mayor en el grupo Oof que en el grupo H, la diferencia no fue significativa (ANOVA) (Fig. 8C) y cuando la depuración de creatinina se corrigió por el peso corporal, se observaron resultados similares ( $0.53 \pm 0.07$  vs.  $0.66 \pm 0.08$  ml/min/100 g de peso,  $p = \text{NS}$ ). Un mes después, la mitad de las ratas ooforectomizadas se sometieron a IR renal y el resto a cirugía sham. Después de 24 h, la proteinuria fue mucho mayor en el grupo Oof+IR que en el grupo H+IR (Fig. 8B). La LRA también se evidenció por la reducción de la depuración de creatinina y del flujo sanguíneo renal en ambos grupos (Fig. 8C y D, respectivamente). Luego, se analizó el curso temporal de la LRA a ERC. La excreción urinaria de proteínas aumentó progresivamente en el grupo Oof+IR desde el tercer mes

posterior a la isquemia (Fig. 8E), siendo bastante similar al comportamiento del grupo M+IR (figura 3A).



**Figura 8. La disminución de los niveles de estrógenos se asocia con la transición de LRA a ERC en las ratas hembra.** A) Niveles estradiol antes de la ooforectomía (barra blanca n= 24) y un mes después de la ooforectomía (barras naranja n= 24) Luego, las ratas oof se sometieron a cirugía sham o IR de 45 min y se estudiaron de 24 horas o de 1 a 4 meses. B) Niveles de proteinuria, C) depuración de creatinina, D) FSR 24-h post IR. Los grupos de las hembras tienen un fondo gris en el cual H están representadas por una barra blanca y el grupo H+IR está representado en barras rosa, seguido de las Oof en barras blancas y grupo de Oof+IR en barras naranja. Grupos control n=4; IR hembras u Oof n=4-6. E) excreción de proteína urinaria, y F) excreción urinaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midieron cada 30 días durante el seguimiento. Los triángulos rosa representan

H+IR (n = 6-8), los cuadrados naranja representan IR + Oof (n = 4-8). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \* p <0,05 vs. H, + p <0,05 vs. Oof,  $\varphi$  p <0,05 vs. H+IR.

Como podemos observar en la figura 8A, los niveles de estradiol no disminuyen completamente por la ooforectomía, sino que disminuyen a la mitad, aproximadamente, este hecho podría darse debido a que existe aromatización periférica; así mismo, la presencia de niveles no tan bajos de estradiol en los animales ooforectomizados podría explicar el hecho de que los niveles de proteinuria que se observan en las ratas Oof+IR son menores a los observados en las ratas M+IR. De manera similar, el estrés oxidativo en el grupo Oof+IR fue mayor que el grupo H+IR desde el segundo mes (p=0.05), alcanzando una diferencia estadísticamente significativa en el tercer y cuarto mes (Fig. 8F). Estos resultados sugieren que las hormonas sexuales femeninas desempeñan un papel crucial para evitar la transición de la LRA a ERC

### **Los resultados de esta primera parte del estudio fueron publicados en el 2017:**

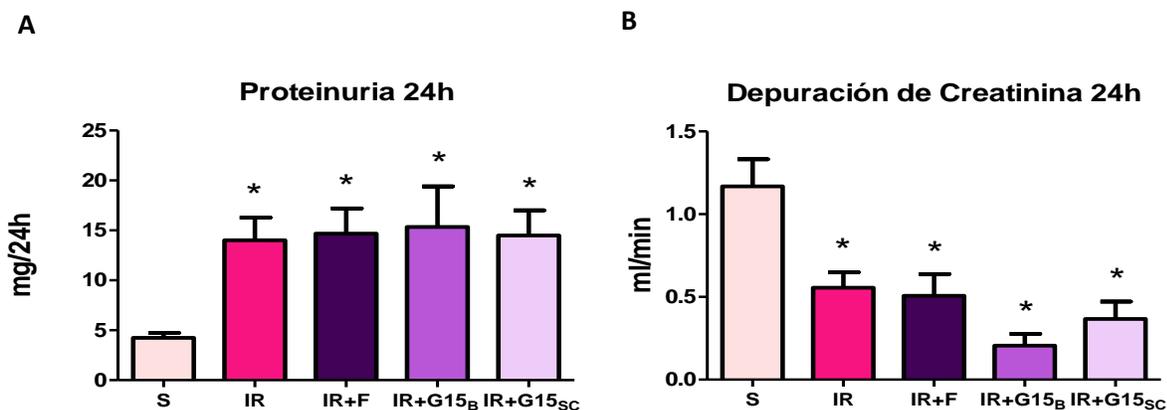
*Lima-Posada I, Portas-Cortés C, Pérez-Villalva R, et al. Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. Scientific Reports. 2017;7:12270. doi:10.1038/s41598-017-09630-2.*

### ***Efecto del bloqueo de la vía genómica y no genómica de los receptores de estrógenos.***

Para diseccionar la participación de los estrógenos en la transición de la LRA a ERC, se utilizaron ratas hembra aleatorizadas en: 1) cirugía falsa, 2) IR y 3) IR más el bloqueo de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos con Fulvestrant y 4) IR más el antagonismo del GPER con G-15. Los animales se estudiaron a los 5 meses. En la figura 9 se muestran la proteinuria y la depuración de creatinina de las ratas a las que se

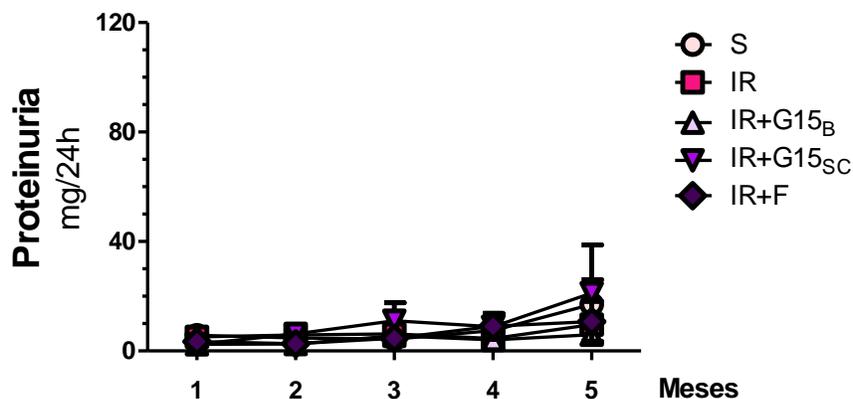
les bloquearon los RE 24 h posteriores a la IR. Como era de esperarse, los animales sometidos a IR presentaron una elevación significativa de la proteinuria (Fig. 9A). La IR también produjo la disfunción renal característica (Fig. 9B). Cabe resaltar que no hubo diferencias entre los grupos sometidos a IR, es decir, el bloqueo de los receptores de estrógenos no modificó la magnitud del daño renal agudo inducido por IR.

Los animales se siguieron por 5 meses, en la Figura 10 se muestra la proteinuria de los cinco grupos estudiados, en donde se aprecia que no hubo elevación progresiva de las proteínas en la orina en los grupos de las ratas tratadas con Fulvestrant o G-15, es decir no desarrollaron ERC. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la presión arterial, flujo sanguíneo renal, peso renal o peso corporal en los animales al quinto mes post-isquemia (datos no mostrados). Esto sugiere que el efecto dimórfico de la transición de la LRA a ERC no es mediado por los receptores intracelulares de estrógenos o el receptor GPER de la vía no genómica de los estrógenos. Con base en estos resultados podemos concluir que la renoprotección observada en las hembras no parece ser mediada por la acción de los estrógenos sobre un tipo específico de receptor.



**Figura 9. El bloqueo de los receptores de estrógenos no influyó en el efecto de la isquemia-reperfusión sobre los niveles de proteinuria y depuración de creatinina. A) Niveles de proteinuria, B) Niveles de**

depuración de creatinina. (n=5-8 por grupo). El grupo S se representa en barras rosa claro, el grupo IR se representa en barras rosa, el grupo IR+F se representa en barras moradas, el grupo IR+G-15 (administrado con bombas miliosmóticas) se representan en barras lila y el grupo IR+G-15 (administrado subcutáneamente) se representan en barras lila claro. \*  $p < 0.05$  vs. S.



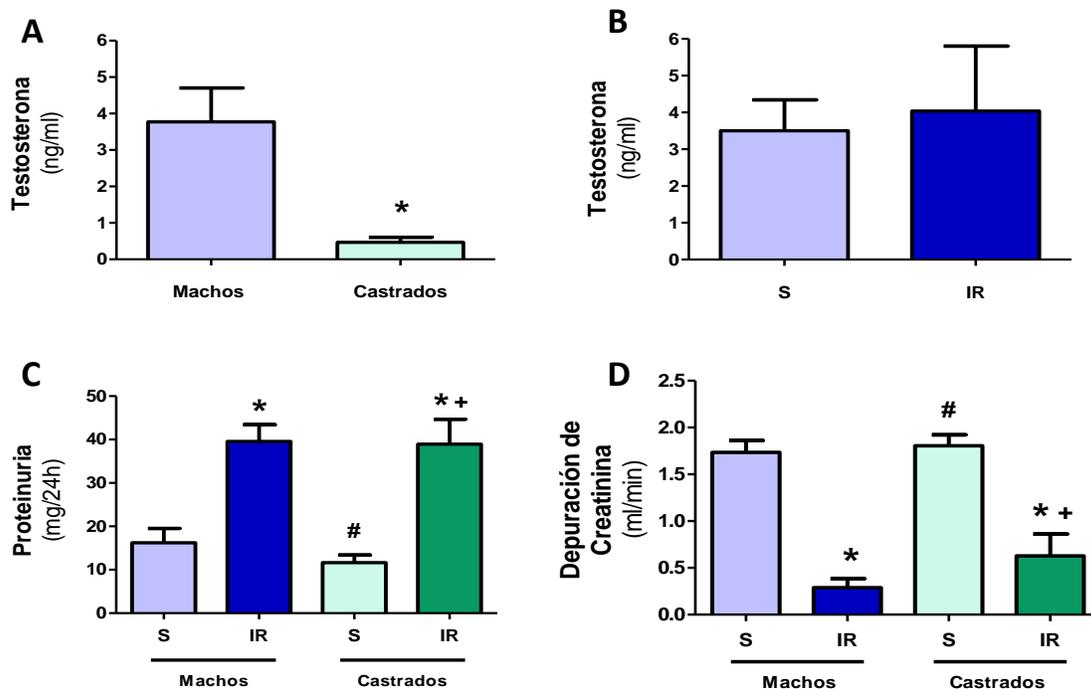
**Figura 10. Efecto del bloqueo de los receptores de estrógenos en las hembras en el seguimiento de la proteinuria por 5 meses.** A) Niveles de proteinuria. (n= 5-8 por grupo). El grupo S se representa en círculos rosa claro, el grupo IR se representa en círculos rosa, el grupo IR+F se representa en diamantes morados, el grupo IR+G-15 (administración subcutánea) se representa en triángulos hacia arriba color lila claro y el grupo IR+G-15 (administración con bombas miliosmóticas) se representa en triángulos hacia abajo color lila.

### ***Reducción de la testosterona en la transición de la LRA a ERC***

Con el fin de dilucidar si la testosterona juega un papel deletéreo en la transición de LRA a ERC observada en los machos, se estudiaron 2 grupos de animales: 1) machos intactos (sometidos a cirugía falsa o IR de 45 min), 2) machos castrados, (sometidos a cirugía falsa o IR de 45 min). Los animales se estudiaron 24 h post cirugía y se determinó

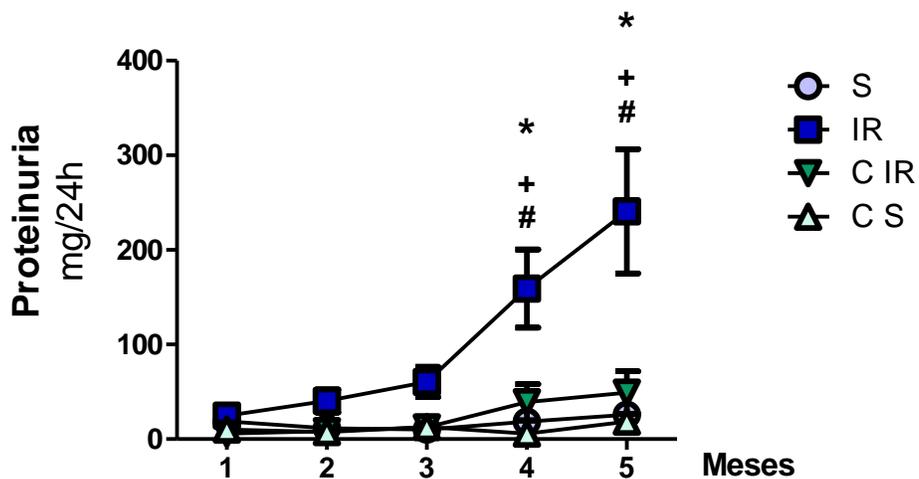
mensualmente la proteinuria, siendo sacrificados y estudiados a las 24h, 48 h, 7 días y 5 meses.

En la Figura 11A se muestran los niveles de testosterona en los machos intactos y los machos que fueron castrados, medidos un mes después de la castración; como se puede observar, los machos que fueron castrados tienen muy bajos los niveles de testosterona. También analizamos si los niveles de testosterona se veían afectados ante un episodio de LRA, por lo cual fueron analizados en los S e IR, como se puede observar en la Figura 11B, la IR no alteró los niveles de testosterona. En la Figura 11C y 11D se observa 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 IR presentaron una elevación significativa de la proteinuria, siendo la magnitud del incremento similar en los machos castrados y machos intactos (Fig. 11C). La IR también produjo disfunción renal que se caracterizó por la reducción significativa de la depuración de creatinina (Fig. 11D). Posteriormente estos animales se dejaron evolucionar durante 5 meses y se midió la proteinuria mensual, en la Figura 12 podemos observar la evolución de la proteinuria durante los 5 meses de seguimiento. De manera muy interesante encontramos que los machos castrados sometidos a IR no desarrollaron proteinuria durante los 5 meses de seguimiento, mientras que, como habíamos reportado previamente, los machos sometidos a IR presentaron una elevación progresiva de la proteinuria.



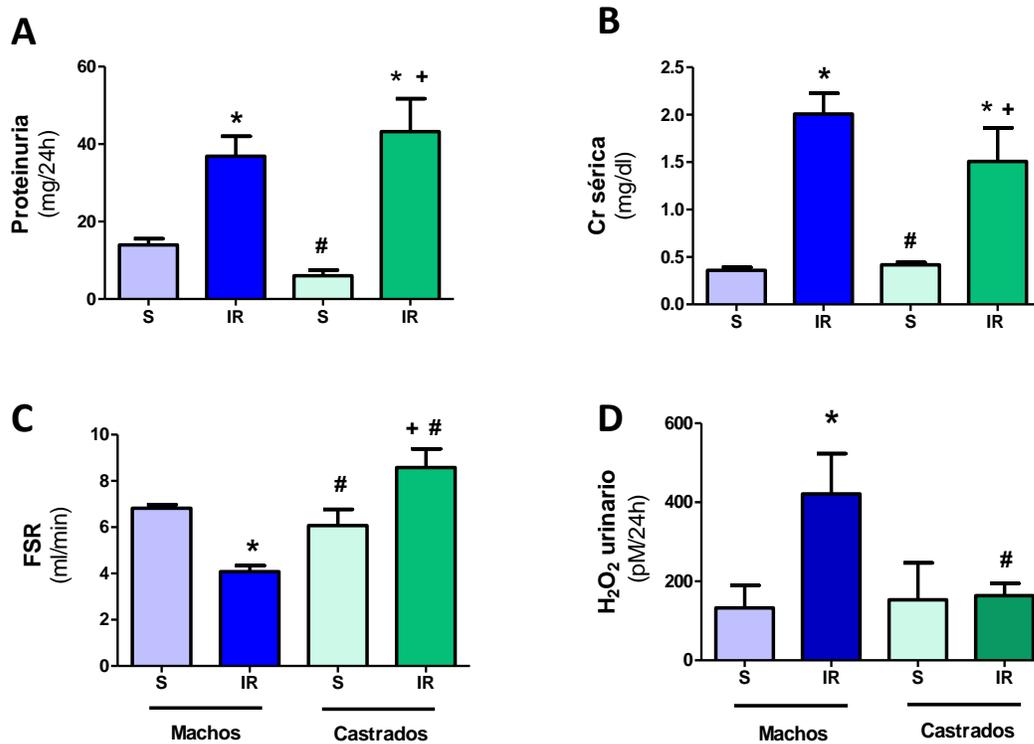
**Figura 11. La disminución de los niveles de testosterona no impactó en los niveles de proteinuria y depuración de creatinina en la isquemia-reperfusión.** A) Niveles de testosterona, B) Niveles de testosterona, C) Niveles de proteinuria, y D) depuración de creatinina. El grupo de S está representado por una barra azul celeste, el grupo IR está representado en barras azules, seguido de las S Castrado en barras verde claro y grupo Castrado +IR en barras verdes (n= 7-8 por grupo). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$  vs. Sham. \*  $p < 0.05$  vs. Sham machos intactos; + $p < 0.5$  vs. Sh castrados; #  $p < 0.05$  vs. IR machos intactos.

Con base en estos resultados, decidimos estudiar los mecanismos agudos que instalan las ratas macho castradas, que pudieran estar previniendo la progresión a ERC. Para esto estudiamos a los animales en etapas tempranas posteriores a la inducción de LRA, es decir 24 h, 48 h y 7 días post-IR.



**Figura 12. La castración previno el incremento de la proteinuria en los animales sometidos a IR.** Niveles de proteinuria medidos mensualmente del mes 1 al 5. El grupo de S está representado por círculos azul celeste, el grupo IR está representado por cuadrados azules, el grupo S castrado en triángulos verde claro y grupo castrado +IR en triángulos verdes (n= 7-8 por grupo). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$  vs. Sham. \*  $p < 0.05$  vs. Sham machos intactos; + $p < 0.5$  vs. Sh castrados; #  $p < 0.05$  vs. IR machos castrados.

Como habíamos observado anteriormente al inducir un episodio de LRA, 24 h después hay un incremento en la proteinuria y disminución en la depuración de creatinina en los grupos IR comparados con su grupo control respectivo (Fig. 13A y 13B). El FSR tuvo un comportamiento interesante, en el grupo de los machos sometidos a IR se observó hipoperfusión renal a las 24 h post- IR, como hemos reportado anteriormente, mientras que, el grupo de machos castrados sometidos a IR no mostró la hipoperfusión característica, sino que incluso se observó un aumento significativo del FSR comparado con los machos IR y su propio control (Fig. 13C). Anteriormente habíamos reportado que la excreción urinaria de  $H_2O_2$  incrementa a las 24 h en los machos IR, de manera interesante podemos observar que en los machos IR este incremento se previno, comportamiento que es similar al observado en las hembras (Fig. 13D). No se observaron cambios en la tensión arterial media.

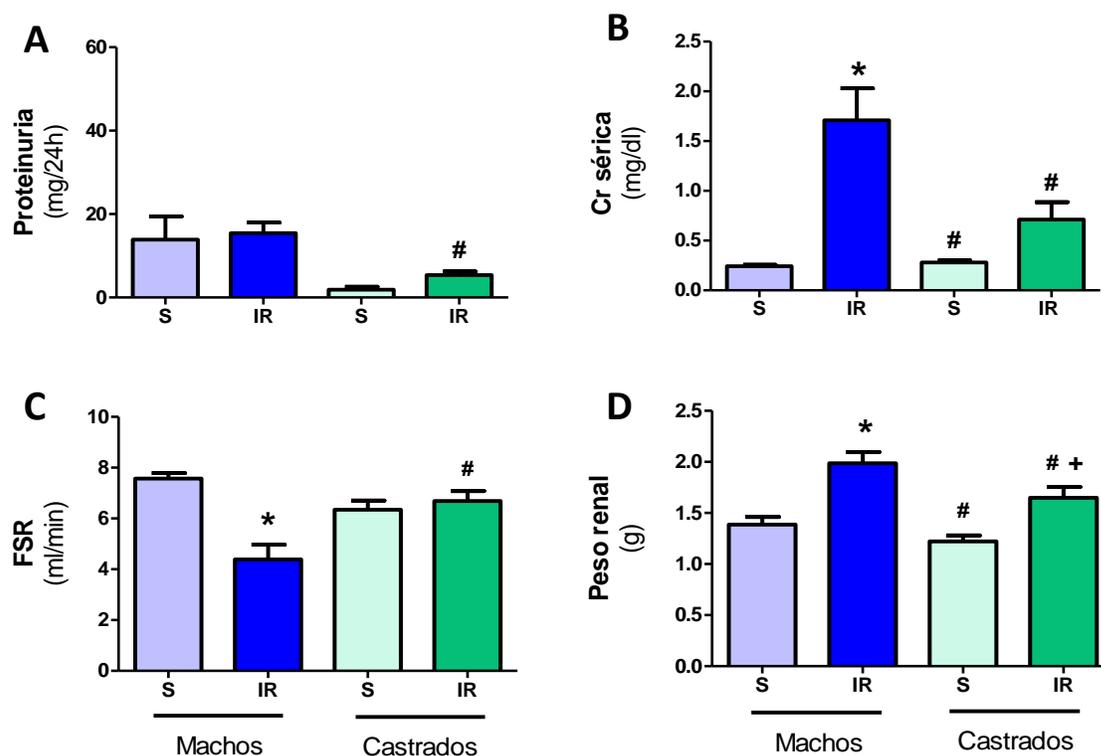


**Figura 13.** La castración previno la disminución del FSR y el incremento en la excreción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en orina en los animales sometidos a IR a las 24 h de reperusión. A) Proteinuria, B) Creatinina sérica, C) FSR, y D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> urinario. El grupo de S está representado por una barra azul celeste, el grupo IR está representado en barras azules, seguido de las S Castrado en barras verde claro y grupo Castrado +IR en barras verdes (Grupos control n= 4, grupos IR n= 6). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \* p< 0.05 vs. Sham. \* p< 0.05 vs. Sham machos intactos; +p<0.5 vs. Sh castrados; # p< 0.05 vs. IR machos intactos.

Después de 48 h de reperusión, las ratas sometidas a IR volvieron a valores normales de proteinuria (Fig. 14A). Las ratas IR mantuvieron niveles elevados de creatinina sérica e hipoperfusión renal, mientras que las ratas Castradas +IR, presentaron recuperación de la función renal, como se aprecia los niveles de creatinina sérica y del FSR se encontraron en un rango normal como el grupo control (Fig. 14 B y C). Así mismo, hubo un aumento significativo en el peso renal en ambos grupos sometidos a IR, aunque fue

estadísticamente mayor en las ratas intactas, comparadas con las ratas castradas (Fig. 14 D).

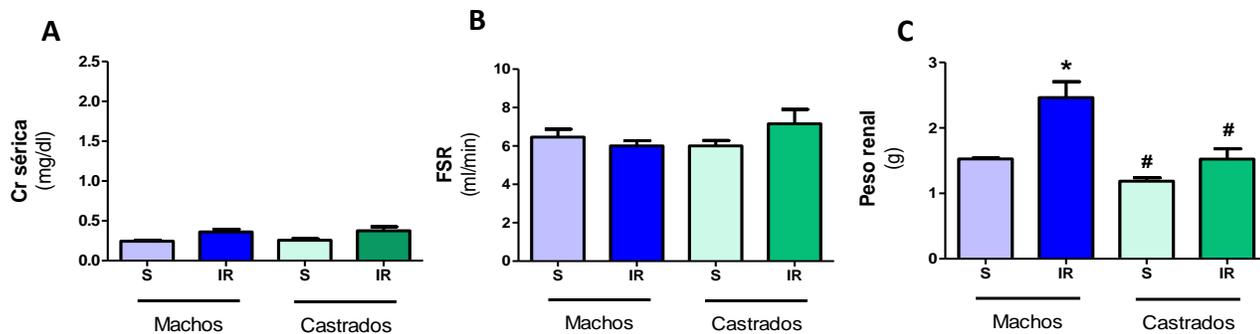
No se observaron cambios en la tensión arterial media.



**Figura 14. La castración previno la disminución del FSR, el aumento de la creatinina sérica y la inflamación, de manera parcial, en los animales sometidos a IR a las 48 h de reperusión.** A) Proteinuria, B) Creatinina sérica, C) FSR, y D) Peso renal. El grupo de S está representado por una barra azul celeste, el grupo IR está representado en barras azules, seguido de las S Castrado en barras verde claro y grupo Castrado +IR en barras verdes (Grupos control n= 4, grupos IR n= 6). Los datos se muestran como promedio ± SE. \* p< 0.05 vs. Sham. \* p< 0.05 vs. Sham machos intactos; +p<0.5 vs. Sh castrados; # p< 0.05 vs. IR machos intactos.

Siete días después de la IR, los valores de creatinina sérica se encontraron normales en todos los grupos (Fig. 15 A), no hubo cambios en la TAM y el FSR se recuperó en el grupo IR (Fig. 15 B). De manera interesante observamos un aumento del peso renal en el grupo de machos sometidos a IR, efecto que se previno en el grupo de castrados con IR

(Fig. 15 C). Estos resultados muestran el efecto deletéreo de la testosterona en la etapa aguda de la transición de la LRA a ERC.

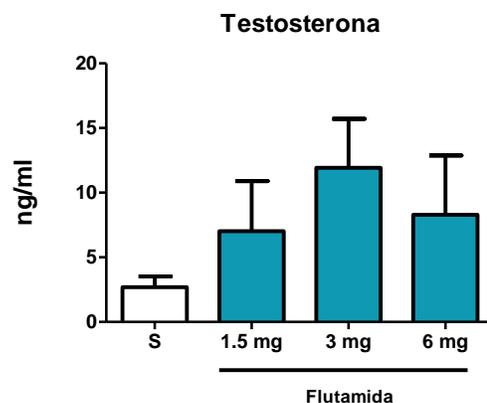


**Figura 15. La castración previno la inflamación en los animales sometidos a IR a los 7 días de reperusión.** A) Creatinina sérica, B) FSR, y C) Peso renales. El grupo de S está representado por una barra azul celeste, el grupo IR está representado en barras azules, seguido de las S castrado en barras verde claro y grupo Castrado +IR en barras verdes (Grupos control n= 4, grupos IR n= 6). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$  vs. Sham. \*  $p < 0.05$  vs. Sham machos intactos; #  $p < 0.05$  vs. IR machos intactos.

### ***Efecto del bloqueo de los receptores de andrógenos en la transición de la LRA a ERC***

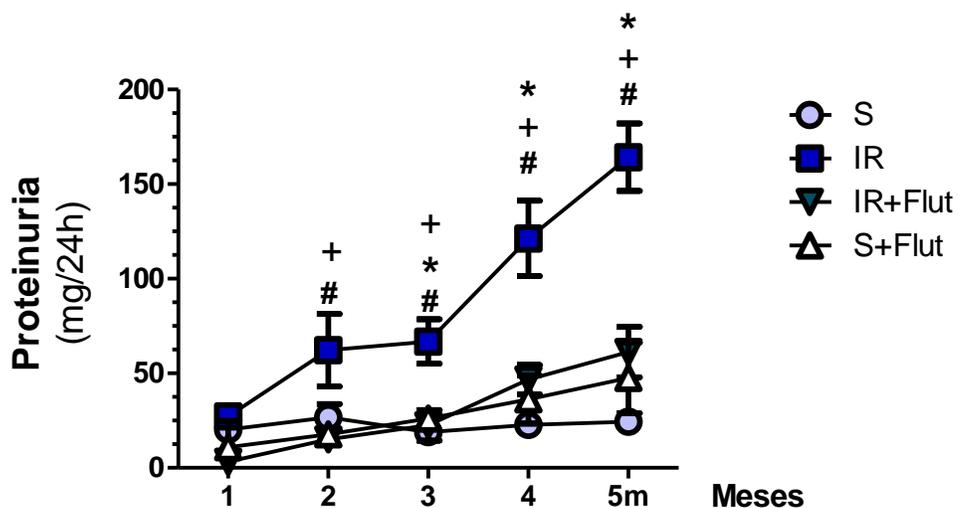
Para demostrar que la testosterona es responsable de estos efectos, decidimos bloquear los receptores de andrógenos con un antagonista competitivo: la Flutamida. Para esto realizamos una prueba piloto en la que decidimos estudiar tres grupos de ratas administradas con una dosis baja, intermedia o alta (1.5, 3, ó 6 mg/rata/día, respectivamente), con el fin de determinar la dosis adecuada para llevar a cabo los experimentos. Los animales recibieron flutamida siete días antes y 7 días después de la cirugía falsa o la IR. Al día 7 posterior a la primera administración se midieron los niveles de testosterona, lo cual nos puede indicar de manera indirecta el bloqueo de los receptores. Con base en este resultado determinamos usar la dosis intermedia, ya que fue suficiente

para llevar a cabo el bloqueo de los receptores de andrógenos, como se demuestra por la elevación de los niveles de testosterona en plasma (fig. 16).



**Figura 16.** Niveles de Testosterona después de 7 días de administración de flutamida. (n= 3 ratas por grupo).

Posteriormente llevamos a cabo el experimento con los animales tratados con flutamida y seguimiento crónico. En la Figura 17 se muestra la progresión de la proteinuria, en la cual podemos ver que los machos sometidos a IR presentan aumento significativo de la proteinuria desde el segundo mes post IR, similar a los resultados anteriores, el cual es prevenido por la administración de flutamida, comportamiento que se mantuvo hasta el quinto mes de seguimiento. Estos resultados indican que el bloqueo de los receptores de andrógenos por la flutamida, previene el incremento de la proteinuria inducida por IR, uno de los marcadores de ERC.



**Figura 17. La IR indujo aumento progresivo en los niveles de proteinuria el cual fue prevenido por la flutamida.** Niveles de proteinuria medidos mensualmente del mes 1 al 5. El grupo de S está representado por círculos azul celeste, el grupo IR está representado por cuadrados azules, el grupo S+Flut en triángulos grises y grupo IR+Flu en triángulos blancos (n= 6-8 por grupo). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$  vs. M, + $p < 0.05$  vs. M+Flut, #  $p < 0.05$  vs. IR+Flut.

## DISCUSIÓN

Estudios epidemiológicos han mostrado que la LRA es un factor de riesgo para ERC; además existe dimorfismo sexual en la progresión de diversas enfermedades renales. En este estudio, mostramos que después de 24 horas de inducir isquemia renal bilateral de 45 minutos, las ratas hembra y macho mostraron una extensión similar de daño renal, pero después de 4 meses del daño inicial, el grupo M+IR, pero no el grupo H+IR, mostró signos claros de ERC, caracterizados por proteinuria, aumento del estrés oxidativo y daño estructural (hipertrofia glomerular y fibrosis tubulointersticial). Estos hallazgos demuestran que las hembras son menos susceptibles a desarrollar ERC después de un episodio de IR a pesar haber tenido un grado similar de LRA inicial (fig. 1). Además, cuando las ratas hembra fueron ooforectomizadas, este grupo exhibió proteinuria y estrés oxidativo como el grupo M+IR. Estos resultados indican que el dimorfismo sexual observado se puede atribuir a las hormonas sexuales, ya que, la ooforectomía generó un comportamiento similar de la transición de LRA a ERC en ratas hembra a la observada en ratas macho. Varios estudios han demostrado que la respuesta renal a diferentes procesos patológicos es diferente entre machos y hembras, lo cual también se ha observado en humanos. Específicamente, se ha reportado que la enfermedad renal en los hombres se asocia con una progresión más rápida independientemente de las diferencias en la presión arterial<sup>46,49,50,86-89</sup>. En IR los resultados no son tan consistentes. Los estudios realizados en ratas Wistar han mostrado que las lesiones funcionales y estructurales inducidas por isquemia/reperfusión son más severas en machos<sup>90-92</sup>, similares entre hembras y machos<sup>93,94</sup>, o incluso se agravan en ratas hembra comparado con los machos<sup>95</sup>, y estos resultados difieren a lo que ocurre en ratones, en los que las hembras son más resistentes a las lesiones por IR<sup>49</sup>. Usando

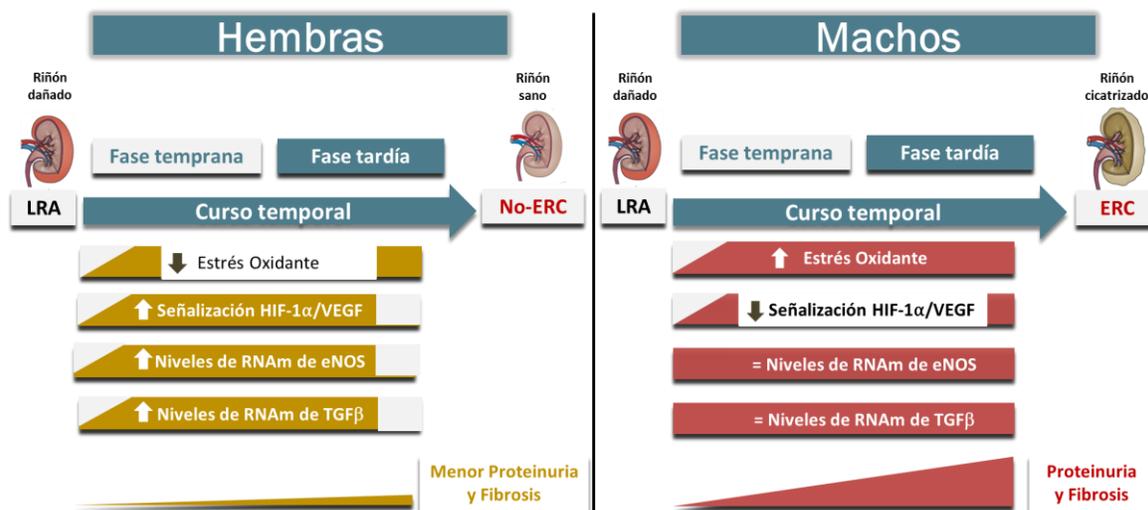
marcadores de la función renal (depuración de creatinina y flujo sanguíneo renal), y de lesión tubular (proteinuria, % de los túbulos lesionados y excreción urinaria de Hsp72), encontramos que, después de 24 h de isquemia renal bilateral, las ratas hembra y macho mostraron la misma magnitud de daño. Por lo tanto, no se observó dimorfismo sexual en el daño por IR después de 24 h, excepto en el estrés oxidativo, pues el grupo H+IR no exhibió elevación de  $U_{H_2O_2V}$ , como se observó en el grupo M+IR (Fig. 1D). Este hallazgo sobre el estrés oxidativo se exploró más a fondo en el tejido renal mediante la medición del contenido renal de GSH. El grupo M+IR de hecho mostró una reducción significativa en la relación GSH/GSSG tanto en la corteza renal como en la médula, un efecto que no se observó en el grupo H+IR (Fig. 1 A-B), a pesar de la extensa lesión proximal tubular (Fig. 1). Estos resultados indican que las hormonas femeninas parecen mantener el contenido de GSH en condiciones extremas y también son capaces de proteger gracias a su poderosa actividad antioxidante, que ha sido previamente demostrada<sup>96</sup>. Aunque las hembras exhibieron un estrés oxidativo menor que las ratas macho, no fue suficiente para reducir la lesión por IR, ya que varios mecanismos tienen lugar en la fisiopatología de la LRA, principalmente: 1) incremento de la vasoconstricción, debido a un desequilibrio en la liberación de factores vasoconstrictores y vasodilatadores; 2) lesión endotelial, que promueve la activación y transmigración de leucocitos capaces de producir citocinas y un estado proinflamatorio; y 3) la lesión de las células epiteliales al contribuir también a la inflamación a través de la liberación de citocinas quimiotácticas, y por la pérdida de la integridad tubular que provoca una reducción en la activación de las vías de supervivencia<sup>51</sup>. La progresión de la ERC después del daño por IR se observó en el grupo M+IR de acuerdo con nuestros estudios previos<sup>83-85</sup>, pero curiosamente, las ratas hembra

no desarrollaron ERC. Entre los mecanismos potenciales regulados por las hormonas sexuales se encuentran: cambios en la hemodinámica renal y liberación de factores vasoactivos alterados, factores de transcripción, citocinas pro-fibróticas y pro-inflamatorias<sup>97</sup>. Además, las hormonas femeninas pueden influir en la defensa en respuesta a eventos fisiopatológicos por su propiedad antioxidante<sup>95</sup>. El efecto antioxidante del estrógeno está mediado por el grupo hidroxilo en la posición C3 del anillo A de la molécula esteroide, se ha reportado que la ouabaina, un inhibidor de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa bloquea estos efectos protectores, lo que sugiere que el efecto antioxidante ayuda a mantener la función de esta bomba y reduce la acumulación de sodio intracelular<sup>98</sup>. De hecho, en el estudio del curso temporal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en orina durante la transición de LRA a ERC, observamos que el estrés oxidativo fue mayor en el grupo M+IR que en el grupo H+IR, un efecto que se observó en una fase muy temprana después de isquemia y se mantuvo a lo largo del estudio (Fig. 1D, 2 y 3C). El menor estrés oxidativo en ratas hembras expuestas a daño por IR no se observó cuando las ratas fueron ooforectomizadas (Fig. 8F). La disfunción endotelial es causada por niveles reducidos de óxido nítrico (NO) derivado del endotelio. Se ha reportado que las enfermedades renales se asocian con una síntesis reducida de NO provocada por la reducción de la expresión o actividad de eNOS<sup>99</sup>. Encontramos que durante la transición de LRA a ERC, el grupo M+IR presentó niveles similares de RNAm de eNOS durante todo el estudio. En contraste, estos niveles aumentaron significativamente en el grupo H+IR muy temprano después del daño. Estos resultados indican que las ratas hembras, además de tener una mejor respuesta antioxidante, también pueden generar más NO, que se asoció con la prevención de la enfermedad. En condiciones de baja tensión de oxígeno, HIF1 $\alpha$  desempeña un papel esencial en la regulación de varios de sus genes

blanco. Media acciones sobre: proliferación celular, angiogénesis, apoptosis, etc.<sup>100</sup>. HIF1 $\alpha$  regula la angiogénesis al aumentar la expresión de VEGF. Durante la transición de LRA a ERC hay una hipoxia crónica y una reducción de los capilares peritubulares<sup>101</sup>. Estos hallazgos sugieren que la señalización HIF1 $\alpha$  puede verse afectada durante esta transición. De hecho, observamos que el mayor daño en el grupo M+IR se asoció con una reducción significativa en los niveles de RNAm de HIF1 $\alpha$  y la proteína de VEGF al cuarto mes. Mientras que se observó una respuesta dimórfica en el grupo H+IR, porque los niveles de RNAm de HIF1 $\alpha$  aumentaron después del daño por IR desde el primer mes, alcanzando una diferencia estadística por ANOVA después del segundo mes. Estos resultados sugieren que otro mecanismo por el cual las ratas no progresaron a la ERC está mediado por su capacidad para aumentar el HIF1 $\alpha$  desde las primeras etapas después del daño por IR, que a su vez podría ayudar a prevenir la rarefacción vascular, la hipoxia crónica y la fibrosis renal. Además de esto, se ha observado que los estrógenos tienen propiedades antifibróticas y antiapoptóticas en los cardiomiocitos<sup>102</sup>. También se ha reportado que la administración de 17-beta estradiol a ratas hipertensas ooforectomizadas atenúa la glomeruloesclerosis y la fibrosis tubulointersticial<sup>103</sup>, mientras que en ratas con diabetes tipo II, esta hormona protege los podocitos al aumentar el RE  $\beta$ <sup>88</sup>. Este efecto sobre los podocitos, parece ser mediado por la estabilización del citoesqueleto<sup>104</sup>. Por el contrario, se ha postulado que la testosterona tiene propiedades fibróticas y apoptóticas mediante el aumento de la señalización de TNF $\alpha$ <sup>89</sup>. De acuerdo con esta evidencia, el grupo M+IR desarrolló hipertrofia glomerular y fibrosis túbulointersticial después del daño por IR, pero estas alteraciones se previnieron en las ratas hembra. De manera sorprendentemente, el curso temporal de los niveles de RNAm de TGF- $\beta$  después del insulto isquémico mostró una

respuesta claramente dimórfica. En el grupo H+IR, los niveles de RNAm de TGF- $\beta$  aumentaron significativamente desde el primer mes y se mantuvieron elevados a lo largo del estudio, mientras que en el grupo M+IR no se produjo esta respuesta antiinflamatoria. De manera similar, la interleucina 10 solo tiende a aumentar en los grupos H+IR. Aunque varios estudios describen el papel fundamental del TGF- $\beta$  en la fibrosis renal<sup>105</sup>, también se ha observado que el uso de anticuerpos contra el TGF- $\beta$  en modelos de nefropatía diabética<sup>106</sup> o en nefropatía inducida por el aminonucleósido puromicina<sup>107</sup> empeora la proteinuria. De hecho, Wang W *et al.* mostraron que el TGF- $\beta$  puede reducir la inflamación a través de Smad7<sup>108</sup>. Dada la significativa fibrosis tubulointersticial en ratas macho en comparación con las hembras, creemos que la elevación temprana de esta citocina en ratas hembra podría estar ejerciendo un efecto renoprotector. En apoyo a esto, Klempt et al. reportaron que TGF- $\beta$  se induce después de la isquemia cerebral y este aumento se asoció con la reparación post-axial<sup>109</sup>. Además, se ha reportado que las propiedades antiinflamatorias de TGF- $\beta$  están mediadas a través de promover la polarización de los macrófagos Th2 antiinflamatorios en malaria cerebral<sup>110</sup>. Por lo tanto, el incremento en los niveles de RNAm de TGF- $\beta$  en las etapas iniciales después de la isquemia observada en el grupo H+IR es otro mecanismo benéfico que las hembras instalan después del daño por IR. En resumen, hay un dimorfismo sexual en la transición de LRA a la ERC y la renoprotección observada en el grupo H+IR se perdió con la ooforectomía: estos resultados sugieren que las hormonas sexuales femeninas son responsables de la renoprotección observada. Dentro de los mecanismos renoprotectores que instalaron hembras después del daño renal por IR se encuentran: una mejor defensa antioxidante y antiinflamatoria, así

como los niveles más altos de RNAm de HIF1 $\alpha$  y eNOS<sup>111</sup>, como se resume en la Figura 18.



**Figura 18. Dimorfismo sexual en la transición de lesión renal aguda enfermedad renal crónica.** Después de un episodio de LRA, las hembras no progresan a ERC a través de menores niveles de estrés oxidante, aumento de la señalización de HIF-1 $\alpha$ /VEGF, niveles más altos de RNAm de eNOS y TGF- $\beta$ , que generan menos fibrosis y proteinuria. Mientras que los machos progresan a ERC, ya que promueven niveles más altos de estrés oxidante y disminuyen la señalización HIF-1 $\alpha$ /VEGF.

Con base en los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo y publicados en *Scientific Reports* en el 2017, decidimos diseccionar la participación de los estrógenos en el proceso de transición de LRA a ERC. Para esto decidimos usar antagonistas de los receptores de estrógenos. Utilizamos el fulvestrant, ya que es un potente antagonista de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ <sup>112</sup>, con la finalidad de diseccionar el papel de la vía genómica de esta hormona en el efecto dimórfico en la transición de la LRA a ERC que observamos en la primera parte de este estudio. Ya que la inhibición de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  no indujo progresión a ERC en estos animales, concluimos que la renoprotección observada en las hembras, no está mediada por

los estrógenos a través de estos receptores. Resultados similares fueron descritos previamente en un modelo de daño renal por arresto cardiaco seguido de resucitación cardiopulmonar en ratones C57BL/6. En estos animales que tenían deletados los REs, se observó que las hembras sometidas al arresto cardiaco y resucitación, no presentaron daño renal, de igual forma la administración del antagonista ICI 182. 780 (Fulvestrant) de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos, no altero la renoprotección en las hembras<sup>113</sup>. Ya que los estrógenos median tanto actividades clásicas, es decir, de la vía genómica, como no clásicas a través de la vía no genómica<sup>114,115</sup>. También decidimos bloquear el receptor de la vía no genómica GPER con el antagonista G-15<sup>116</sup>. Sorprendentemente, el bloqueo de la vía genómica en las ratas hembra tampoco indujo transición de LRA a ERC. También se había observado en un modelo de daño renal en ratones que la delección del receptor GPER, no alteró la renoprotección mediada por estrógenos en las hembras<sup>117</sup>. De manera interesante y contrario a lo que esperábamos, los resultados observados en las ratas a las que se les bloqueó la señalización de la vía genómica y no genómica, de manera separada, muestran que no hubo progresión a ERC por el daño renal por IR, como se observa en la figura 10. Esto nos lleva a concluir que el posible efecto protector de los estrógenos, no es mediado sobre sólo un tipo específico de receptor, por los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , o por las acciones no genómicas de los receptores a través del GPER, al menos no de manera individual, pues no se bloquearon las vías en conjunto. Se necesitan más estudios para diseccionar el rol protector de los estrógenos en la transición de la LRA a ERC.

Con base en los resultados anteriores decidimos explorar el papel de la testosterona en la transición de la LRA a ERC. Los datos arrojados por el experimento de los animales macho castrados y sometidos a IR sugieren que la testosterona podría tener un papel

deletéreo en la progresión de la ERC por un episodio de LRA, ya que los animales castrados no desarrollan proteinuria al quinto mes de evolución (fig. 12). Por lo tanto decidimos estudiar estos animales en las etapas tempranas posteriores a un episodio de LRA y encontramos varias observaciones muy interesantes. Los animales castrados sometidos a IR recuperan el FSR de manera más eficaz comparados con los machos sin castrar. Como reportamos en la primera parte de nuestro trabajo, los machos tienen menores niveles de RNAm de eNOS<sup>111</sup> y de hecho se ha reportado también en otros estudios que los machos tienen menor expresión de eNOS<sup>53</sup>, y menor producción de NO<sup>54</sup>, pero la castración aumenta la producción de NO<sup>87</sup>. Además los machos también tienen mayor densidad de receptores ETa en comparación con ETb<sup>118</sup>, y se ha reportado que ante fenómenos de IR los machos tienen mayores niveles de pre-proendotelina<sup>50</sup>. Por lo tanto, la castración podría estar actuando a través de moléculas vasoactivas en las que se ha observado dimorfismo sexual, de manera que la ausencia de testosterona permita recuperar de manera más eficaz el FSR. Otro de los mecanismos interesantes en el que observamos dimorfismo sexual fue en el estrés oxidante, ya que los machos intactos presentaron elevación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> urinario, como habíamos reportado anteriormente<sup>111</sup>, que se previno en el grupo C+IR. Al respecto se ha reportado en modelos animales dimorfismo sexual en la producción de ERO<sup>78</sup>. Y en un modelo de isquemia reperusión se observó que la castración activa la SOD (superóxido dismutasa), indicando que la testosterona ejerce una regulación sobre la producción de ERO<sup>80</sup>. Así mismo, los machos castrados tienen una mejor respuesta al proceso inflamatorio, comparados con los machos sin castrar, ya que observamos que en etapas agudas posteriores al daño renal por IR, los machos mantienen un estado de inflamación, ya que hasta el séptimo día de reperusión se observó un aumento

en el peso renal, el cual se previno en los machos castrados. De hecho se ha reportado que la expresión de citocinas proinflamatorias es mayor en ratones macho comparado con las hembras sometidos a isquemia reperfusión renal<sup>64</sup> y en modelos de nefrotoxicidad<sup>65</sup>. Por lo tanto, la depleción de testosterona podría estar cambiando el perfil de citocinas proinflamatorias.

Con el fin de llevar a cabo una maniobra terapéutica que nos permitiera incidir en el bloqueo de los efectos de la testosterona específicamente, decidimos bloquear los receptores de andrógenos con el antagonista flutamida, que es un potente inhibidor de los receptores de andrógenos<sup>119-121</sup>. Los resultados observados en los animales a los que se les bloquearon los receptores de andrógenos (figura 17), muestran que no se produce un incremento progresivo en la excreción urinaria de proteínas en el grupo M+Flut, como si se observa en el grupo M+IR, como reportamos anteriormente<sup>111</sup>. Por lo tanto concluimos que la flutamida es eficaz en el antagonismo de los efectos deletéreos de la testosterona, ya que mitigó el desarrollo de proteinuria y el antagonismo de los receptores de andrógenos es un posible blanco terapéutico para la prevención del desarrollo de ERC.

Todos estos resultados indican que las hormonas juegan un papel primordial en la transición de la LRA a ERC, ya que la manipulación tanto por castración, como por ooforectomía, modifican el curso temporal de la enfermedad. Además la testosterona juega un papel importante en la fisiopatología de la LRA y en la transición a ERC, ya que el bloqueo de sus efectos mediante castración o farmacológicamente, tiene efectos benéficos en la progresión de LRA a ERC.

## 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, 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 transición de la LRA a ERC está influenciada por las hormonas sexuales, ya que se modificó por la ooforectomía y la castración. 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- $\beta$  y HIF-1 $\alpha$  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. Además la testosterona parece tener un efecto deletéreo en la transición de la ERC, ya que maniobras de castración o farmacológicas, modifican el patrón de daño generado de manera aguda, mediante una recuperación del FSR de manera más eficaz y una mejor respuesta al proceso inflamatorio, comparados con los machos intactos; lo que previene la progresión a ERC. Estos resultados nos llevan a concluir que sí existe un efecto

del dimorfismo sexual en la transición de LRA a ERC y está influenciado por las hormonas sexuales.

### **PERSPECTIVAS**

- Diseñar otros mecanismos moleculares específicos de renoprotección en las ratas hembra.
- Evaluar otros mecanismos de renoprotección en las ratas macho castradas, en la transición de la LRA a ERC.
- Evaluar otros mecanismos de renoprotección en los animales a los que se les bloquearon los receptores de andrógenos con el antagonista Flutamida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez Maldonado M. *Tratado de nefrología. Editorial Norma. Pág: 1-2. España.* (1993).
2. Heinz Valtin, M. D. *Renal Function. Editorial L. Company. Pág: 1-8. USA.* (1983).
3. Ifeanyichukwu Ogobuiro, F. T. *Physiology, Renal. StatPearls. Treasure Isl. StatPearls Publ.* (2019).
4. 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).
5. Dressler, G. R. The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 509–29 (2006).
6. Ülger, F. *et al.* Evaluation of acute kidney injury (AKI) with RIFLE, AKIN, CK, and KDIGO in critically ill trauma patients. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* **44**, 597–605 (2018).
7. 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
8. Basile, D., Anderson, M. & Sutton, T. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr. Physiol.* **2**, 1303–1353 (2012).
9. Ferenbach, D. A. & Bonventre, J. V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 264–276 (2015).
10. Li, P. K., Burdmann, E. A. & Mehta, R. L. Acute kidney injury: global health alert. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **24**, 345–350 (2013).
11. Miyahira Arakaki, J. M. Insuficiencia renal aguda. *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.* **58**, 365–374 (2011).
12. Malek, M. & Nematbakhsh, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from

- pathophysiology to treatment. *J. Ren. Inj. Prev.* **4**, 20–7 (2015).
13. 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).
  14. 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).
  15. Romo, R. R. & Sandoval, N. A. B. Fisiopatología del Daño Renal Agudo en Isquemia y Toxicidad : Implicación de la aldosterona. (2013).
  16. 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).
  17. Mezzano A., S. & Aros E., C. Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev. Med. Chil.* **133**, 338–348 (2005).
  18. Manuel Gorostidi, Rafael Santamaría, R. A. *et al.* Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrología* **34**, 302–16 (2014).
  19. Heinzl, A. *et al.* Molecular disease presentation in diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, iv17–iv25 (2015).
  20. Zoja, C., Zanchi, C. & Benigni, A. Key pathways in renal disease progression of experimental diabetes: Figure 1: *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, iv54–iv59 (2015).
  21. Shah, S. V., Baliga, R., Rajapurkar, M. & Fonseca, V. A. Oxidants in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 16–28 (2007).
  22. Boubred, F. *et al.* Developmental origins of chronic renal disease: an integrative hypothesis. *Int J Nephrol* **2013**, 346067 (2013).
  23. 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).

24. 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
25. Kovesdy, C. P. & Kalantar-Zadeh, K. *Inflammation in Chronic Kidney Disease. Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation* **6**, (Elsevier Inc., 2010).
26. Schnaper, H. W. Remnant nephron physiology and the progression of chronic kidney disease. **29**, 1–17 (2015).
27. 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).
28. Taal, M. W. & Brenner, B. M. Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int.* **57**, 1803–17 (2000).
29. Quaggin, S. E. & Kapus, A. Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition. *Kidney Int.* **80**, 41–50 (2011).
30. 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).
31. Souma, T. *et al.* Luminal alkalinization attenuates proteinuria-induced oxidative damage in proximal tubular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 635–48 (2011).
32. Wolf, G. Role of reactive oxygen species in angiotensin II-mediated renal growth, differentiation, and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1337–45 (2005).
33. Sun, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition. *Kidney Int.* **75**, 1278–87 (2009).
34. Piccoli, G. B. *et al.* Women and Kidney Diseases: Questions Unanswered and Answers Unquestioned. *Kidney Int. Reports* 225–235 (2018). doi:10.1016/j.ekir.2018.01.001
35. Ricardo, A. C. *et al.* Sex-Related Disparities in CKD Progression. *J. Am. Soc.*

*Nephrol.* ASN.2018030296 (2018). doi:10.1681/ASN.2018030296

36. Carrero, J. J., Hecking, M., Chesnaye, N. C. & Jager, K. J. Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease. *Nat. Publ. Gr.* (2018). doi:10.1038/nrneph.2017.181
37. Clotet, S., Riera, M., Pascual, J. & Soler, M. J. RAS and sex differences in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Physiol.* **310**, F945–F957 (2016).
38. Riispere, Ž. *et al.* IgA nephropathy clinicopathologic study following the Oxford classification: Progression peculiarities and gender-related differences. *Med.* **52**, 340–348 (2016).
39. Cattran, D. C. *et al.* The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 2247–2253 (2008).
40. Scott Reule, MD1, Donal J. Sexton, MB2, Craig A. Solid, PhD1, Shu-Cheng Chen, MS, M. & Allan J. Collins, MD1, 2, and Robert N. Foley, M. End-Stage Renal Disease From Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in the United States, 2001–2010. **64**, 592–599 (2015).
41. Lim, S. S. & Drenkard, C. Epidemiology of lupus: An update. *Curr. Opin. Rheumatol.* **27**, 427–432 (2015).
42. Gangula, P. R. *et al.* Protective cardiovascular and renal actions of vitamin D and estrogen. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **5**, 134–48 (2013).
43. 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).
44. 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).
45. 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).

46. 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).
47. 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).
48. Halbesma, N. *et al.* Gender differences in predictors of the decline of renal function in the general population. *Kidney Int.* **74**, 505–12 (2008).
49. 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).
50. Müller, V. *et al.* Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin. *Kidney Int.* **62**, 1364–1371 (2002).
51. Bonventre, J. V., Yang, L., Bonventre, J. V & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Sci. Med.* **121**, 4210–4221 (2011).
52. Janell Thompson, R. A. K. BRIEF REVIEW GENDER DIFFERENCES IN THE REGULATION OF VASCULAR TONE. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1–15 (2003).
53. Reckelhoff, J. F., Hennington, B. S., Glover Moore, A., Blanchard, E. J. & Cameron, J. Gender differences in the renal nitric oxide (NO) system. *Am. J. Hypertens.* **11**, 97–104 (1998).
54. Neugarten, J. *et al.* Sex Hormones and Renal Nitric Oxide Synthases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 21240–1246 (1997).
55. 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).
56. Bilsel AS1, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kaynak B, O. A. 17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovasc Res.* **46**, 579–584 (2000).

57. Fischer, M., Baessler, A. & Schunkert, H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. **53**, 672–677 (2002).
58. Sandberg, K. & Ji, H. Sex differences in primary hypertension. 1–21 (2012).
59. Zimmerman, M. A. & Sullivan, J. C. Hypertension : What ' s Sex Got to do With It ? 234–244 (2019). doi:10.1152/physiol.00013.2013
60. Bubb, K. J., Khambata, R. S. & Ahluwalia, A. Sexual dimorphism in rodent models of hypertension and atherosclerosis. (2012). doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02036.x
61. Squadrito, F. *et al.* 17 $\beta$ -Oestradiol Reduces Cardiac Leukocyte Accumulation in Myocardial Ischaemia Reperfusion Injury in Rat. *Eur. J. Pharmacol.* **335**, 185–192 (1997).
62. Shen, S. Q., Zhang, Y. & Xiong, C. L. The Protective Effects of 17 $\beta$ -Estradiol on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Model, Associated with Regulation of Heat-Shock Protein Expression. *J. Surg. Res.* **140**, 67–76 (2007).
63. Yong, Y. *et al.* 17 $\beta$ -Estradiol Potentiates Ischemia-Reperfusion Injury in Diabetic Ovariectomized Female Rats. *Brain Res.* **1054**, 192–199 (2005).
64. Kang, K. P. *et al.* Effect of gender differences on the regulation of renal ischemia-reperfusion-induced inflammation in mice. *Mol. Med. Rep.* **9**, 2061–2068 (2014).
65. El-Bassossy, H. M. & Eid, B. G. Cyclosporine A exhibits gender-specific nephrotoxicity in rats: Effect on renal tissue inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 468–472 (2018).
66. Fernandes, R. *et al.* Sex Differences in Renal Inflammation and Injury in High-Fat Diet-Fed Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **72**, e43–e52 (2018).
67. Kathryn Sandberg<sup>1</sup>, Hong Ji<sup>1</sup>, and M. H. Sex-specific Immune Modulation of Primary Hypertension Kathryn. **294**, 95–101 (2015).
68. Dario A. A. Vignali, Lauren W. Collison, and C. J. W. How regulatory T cells work.

*Nat Rev Immunol.* **8**, 523–532 (2008).

69. Scotland, R. S., Stables, M. J., Madalli, S., Watson, P. & Gilroy, D. W. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood* **118**, 5918–5927 (2011).
70. 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).
71. Boland, R., Vasconsuelo, A., Milanesi, L., Ronda, A. C. & de Boland, A. R. 17 $\beta$ -Estradiol signaling in skeletal muscle cells and its relationship to apoptosis. *Steroids* **73**, 859–863 (2008).
72. Gong, W. *et al.* Estrogen-related receptor (ERR)  $\gamma$  protects against puromycin aminonucleoside-induced podocyte apoptosis by targeting PI3K/Akt signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **78**, 75–86 (2016).
73. Hodeify, R. *et al.* Gender differences control the susceptibility to ER stress-induced acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**, F875–82 (2013).
74. Kummer, S. *et al.* Estrogen receptor alpha expression in podocytes mediates protection against apoptosis in-vitro and in-vivo. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
75. di Mari, J. F., Davis, R. & Safirstein, R. L. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am. J. Physiol. Physiol.* **277**, F195–F203 (1999).
76. Verzola, D. *et al.* Androgen-mediated apoptosis of kidney tubule cells: Role of c-Jun amino terminal kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 531–536 (2009).
77. Verzola, D. *et al.* Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney Int* **65**, 1252–1261 (2004).
78. Rodriguez, F. *et al.* Sex differences in nitrosative stress during renal ischemia. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R1387–R1395 (2010).
79. Pollock, D. M., Pollock, J. S., Sullivan, J. C., Boesen, E. I. & Semprun-Prieto, L.

Sex and sex hormones influence the development of albuminuria and renal macrophage infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R1573–R1579 (2007).

80. 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).
81. Silver, S. A., Cardinal, H., Colwell, K., Burger, D. & Dickhout, J. G. Acute kidney injury: Preclinical innovations, challenges, and opportunities for translation. *Can. J. Kidney Heal. Dis.* **2**, 1–11 (2015).
82. Barrera-Chimal, J. *et al.* Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol. Med.* **3**, 5–20 (2011).
83. Rodríguez-Romo, R. *et al.* AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney Int.* **89**, 363–373 (2016).
84. Barrera-Chimal, J. *et al.* Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **83**, 93–103 (2012).
85. Barrera-Chimal, J. *et al.* Mild ischemic Injury Leads to Long-Term Alterations in the Kidney: Amelioration by Spironolactone Administration. *Int. J. Biol. Sci.* **11**, 892–900 (2015).
86. Cattran, D. C. *et al.* The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 2247–2253 (2008).
87. Verhagen, A. M., Attia, D. M., Koomans, H. A. & Joles, J. A. Male gender increases sensitivity to proteinuria induced by mild NOS inhibition in rats: role of sex hormones. *Am.J.Physiol Ren. Physiol* **279**, F664–F670 (2000).
88. 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).
89. 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).
90. Fekete, A. *et al.* Sex differences in the alterations of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase following ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J. Physiol.* **555**, 471–480 (2004).
  91. Fekete, A., Rusai, K., Mu, V., Tulassay, T. & Szabo, A. J. Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury. 806–811 (2006). doi:10.1152/ajprenal.00080.2006.
  92. Ramtin, S. *et al.* Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on kidney ischemia/reperfusion; a gender-related difference. *J. Ren. Inj. Prev.* **5**, 140–143 (2016).
  93. Takayama, J. *et al.* Actinonin, a meprin inhibitor, protects ischemic acute kidney injury in male but not in female rats. *Eur. J. Pharmacol.* **581**, 157–163 (2008).
  94. Afyouni, N. E. *et al.* Preventive role of Endothelin antagonist on kidney ischemia: Reperfusion injury in male and female rats. *Int. J. Prev. Med.* **2015**, (2015).
  95. Iran-Nejad, A., Nematbakhsh, M., Eshraghi-Jazi, F. & Talebi, A. Preventive role of estradiol on kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion in male and female rats. *Int. J. Prev. Med.* **2015-March**, 18–23 (2015).
  96. Giergiel M1, Lopucki M, Stachowicz N, K. M. The influence of age and gender on antioxidant enzyme activities in humans and laboratory animals. *Aging Clin Exp Res.* **24**, 561–9 (2012).
  97. Silbiger SR, N. J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* **25**, 515–533 (1995).
  98. Sugishita, K., Li, F., Su, Z. & Barry, W. H. Anti-oxidant effects of estrogen reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during metabolic inhibition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 331–6 (2003).
  99. 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).
  100. Shoji K, Tanaka T, N. M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **23**, 161–168 (2014).

101. Basile, D. P. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: A potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**, 1–7 (2004).
102. Fliegner, D. et al. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, 1597–1606 (2009AD).
103. 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).
104. Catanuto, P. et al. In vivo 17β-estradiol treatment contributes to podocyte actin stabilization in female db/db mice. *Endocrinology* **153**, 5888–95 (2012).
105. Paterson, D. J. & Lan, H. Y. Meng, X. M., Nikolic- TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* **12**, 325–338 (2016).
106. Ziyadeh, F. N. et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8015–8020 (2000).
107. Ma, L.-J. et al. Divergent effects of low versus high dose anti-TGF- $\hat{I}^2$  antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Kidney Int.* **65**, 06–115 (2004).
108. Wang, W. Signaling Mechanism of TGF- 1 in Prevention of Renal Inflammation: Role of Smad7. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1371–1383 (2005).
109. 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).
110. Hunt, N. H. & Grau, G. E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* **24**, 491–9 (2003).
111. Lima-Posada, I. et al. Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).

112. Osborne, C. K., Wakeling, A. & Nicholson, R. I. Fulvestrant: An oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br. J. Cancer* **90**, S2–S6 (2004).
113. Hutchens, M. P. *et al.* Estrogen is renoprotective via a nonreceptor-dependent mechanism after cardiac arrest in vivo. *Anesthesiology* **112**, 395–405 (2010).
114. Wideman, T. H., Zautra, A. J. & Edwards, R. R. Epigenetic Reactivation of Estrogen Receptor: Promising Tools. *Mol Cell Pharmacol* . **154**, 2262–2265 (2014).
115. Dean, B. *et al.* A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, 1–16 (2015).
116. Brailoiu, E. *et al.* In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 421–427 (2009).
117. Hutchens, M. P. *et al.* Estrogen-mediated renoprotection following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation is robust to GPR30 gene deletion. *PLoS One* **9**, (2014).
118. Reckelhoff, J. F. *et al.* Ovarian hormones modulate endothelin-1 receptor responses in young women. *Microcirculation* **11**, 0–3 (2017).
119. Noda, M. *et al.* Optimal Starting Time for Flutamide to Prevent Disease Flare in Prostate Cancer Patients Treated with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist. *Urol. Int.* **66**, 135–139 (2003).
120. Flutamide, F. Single and Multiple Dose Pharmacokinetic Evaluation of Flutamide in Normal Geriatric Volunteers. 725–726 (2006).
121. Hejmej, A. & Bilinska, B. The effects of flutamide on cell-cell junctions in the testis, epididymis, and prostate. *Reprod. Toxicol.* **81**, 1–16 (2018).