



EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) EN EL RIÑÓN DE RATONES ADULTOS

Adriana Laura García

Directora: Prof. Dra. Ana Lía Errecalde

Dedicado a quienes me brindan su amor, me contagian su fortaleza, comparten mis alegrías y sufren con mis tristezas...

A mis Padres

Agradecimientos

- *Al Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, Prof. Dr. Jorge Martínez, por permitirme utilizar las instalaciones de la Cátedra de Citología, Histología y Embriología “A”, para realizar mi trabajo de Tesis Doctoral.*
- *A mi directora, Ana Lía Errecalde por ayudarme y guiarme para poder alcanzar esta meta tan anhelada.*
- *A mi familia y amigos que siempre me contienen y escuchan.*
- *A mis compañeras y amigas: Ana María, Ayelén, Cecilia, Laura y Marcela... por compartir tantos buenos momentos y emociones de nuestras vidas.*
- *A Bárbara, Marcos y Rocío, por la charla distendida de los almuerzos.*
- *Al Dr. Carlos Martín, por su colaboración con las fotografías e interpretación de los preparados inmunohistoquímicos.*
- *A Pablo, por su asesoramiento profesional como Médico Urólogo.*
- *A Susana Formoso por su invaluable trabajo y dedicación.*
- *A Maite y a Javiera, por la realización de las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.*
- *A Mariela, por su ayuda en la edición de la tesis.*
- *A todos mis compañeros docentes y no docentes que de alguna u otra manera, aún sin saberlo, colaboraron conmigo.*
- *A Juan, por su amor... y por condimentar día a día con su sana locura, mi aburrida cordura.*

¡A todos, muchas gracias!

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
Ciclo celular.....	9
Crecimiento renal.....	13
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	16
Ritmos circadianos.....	19
Diferencias de sexo.....	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
Hipótesis.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Animales.....	28
Técnica de cirugía.....	28
Técnicas inmunohistoquímicas.....	29
Cuantificación de los resultados.....	32
Tratamiento estadístico.....	33
Diseño experimental.....	34
TABLAS Y RESULTADOS	36
Experimento I.....	37
Experimento II.....	46
Experimento III.....	55
Experimento IV.....	64
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	85
Conclusiones parciales.....	86
Conclusión general.....	87
BIBLIOGRAFÍA	88

RESUMEN

Bajo condiciones normales menos del 1 % de las células tubulares del riñón proliferan aunque sin embargo, en respuesta a una injuria, células normalmente quiescentes entran en el ciclo celular. En el modelo del riñón remanente en roedores, el número de nefronas es repentinamente reducido por ablación quirúrgica, lo que dispara eventos moleculares y celulares que promueven el crecimiento compensatorio. Históricamente han surgido controversias acerca de si dicho crecimiento renal resulta de hipertrofia o hiperplasia. Por otro lado, además de los cambios en las células epiteliales e intersticiales después de la reducción de la masa renal, la reparación capilar es un evento crucial en la recuperación del daño renal y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) juega un rol importante en la proliferación endotelial. En el riñón normal, el VEGF se expresa en los podocitos glomerulares y en las células tubulares, especialmente en la médula externa y rayos medulares, pero también ha sido demostrado que juega un rol mayor en la respuesta compensatoria renal después de la uninefrectomía. Si bien este factor es esencial para la normal nefrogénesis y la glomerulogénesis, también ha sido implicado en la patogénesis de la disfunción renal temprana y en la hipertrofia glomerular en la diabetes experimental.

Además, los cambios en los capilares peritubulares después de la reducción renal son modulados por distintas causas como, la especie y la edad de los animales bajo estudio, la extensión y el origen de la reducción néfrica, el tiempo posterior a la injuria y el grado de fibrosis y/o de proliferación tubular. Existen indicaciones de que las hormonas sexuales tienen distintos efectos según las regiones del riñón y posiblemente también durante el crecimiento compensatorio después de la uninefrectomía. Conjuntamente, durante algunos procesos regenerativos en ratas y ratones, la expresión de ARNm VEGF está temporal y espacialmente relacionada a la proliferación.

Con el objetivo de analizar y comparar la expresión del VEGF y la actividad proliferativa de las células tubulares del riñón, se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa C3HS, de 90 días de edad, endocriados y estandarizados para análisis de periodicidad, divididos en 4 grupos para la realización de los siguientes experimentos:

Experimento I: estudio de la expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de animales intactos, durante un período circadiano: se utilizaron 36 ratones machos y 36 hembras, divididos en grupos de 6 animales cada uno, respectivamente. Se sacrificaron por decapitación y sangría en los siguientes puntos horarios: 0:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica de inmunohistoquímica del VEGF.

Experimento II: estudio de la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de animales intactos, durante un período circadiano: se utilizaron 38 ratones machos y 38 hembras, divididos en grupos de 6/7 animales cada uno, respectivamente. Se sacrificaron por decapitación y sangría en los siguientes puntos horarios: 0:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas, previa inyección (1 hora antes) de 5- bromodeoxiuridina en dosis equivalente a 50 mg/Kg de peso corporal. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica de inmunohistoquímica de Brdu.

Experimento III: estudio de la expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón, a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía: se utilizaron 12 ratones machos y 12 hembras, los que se sometieron a una nefrectomía unilateral (Nx). Los animales, divididos en grupos de 6, se sacrificaron por decapitación y sangría a las 50 horas o a los 7 días posteriores a la cirugía. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica de inmunohistoquímica del VEGF.

Experimento IV: estudio de la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón, a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía: se utilizaron 14 ratones machos y 14 hembras, los que se sometieron a una nefrectomía unilateral (Nx). Los animales se sacrificaron por decapitación y sangría a las 50 horas o a los 7 días post cirugía, previa inyección (1 hora antes) de 5- bromodeoxiuridina en dosis equivalente a 50 mg/Kg de peso corporal. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica de inmunohistoquímica de Brdu.

Los resultados se expresan como $X \pm \text{ESM} (n)$, para cada grupo y se analizaron estadísticamente con el “**t-test**” de Student o con ANOVA y el post-test de comparaciones múltiples de **Tukey-Kramer**.

Los resultados de los experimentos I y II muestran que en los ratones machos intactos, los valores de las dos variables analizadas, tanto en las células tubulares de la corteza como de la médula externa del riñón, presentan un ritmo circadiano en el cual los valores máximos del VEGF, preceden a los de ADNs. En las hembras, los valores de estas variables no presentan un ritmo circadiano evidente, en ninguna de las dos zonas.

Los resultados de los experimentos III y IV muestran que la nefrectomía no desencadena cambios en los valores de ADNs de las células tubulares corticales ni medulares, en ninguno de los sexos. Sin embargo, induce un crecimiento compensatorio de tipo hipertrófico en el riñón contra lateral, que involucra un aumento en la expresión del VEGF, con marcadas diferencias sexuales a nivel del compartimento cortical.

INTRODUCCIÓN

Los riñones son órganos pares, ubicados a cada lado de la columna vertebral en la fosa lumbar del espacio retroperitoneal. Tienen por función la eliminación de sustancias tóxicas del plasma sanguíneo, contribuyen a la regulación de la presión arterial y al equilibrio ácido-base. Tienen además función endocrina.

En condiciones fisiológicas, la función de ambos riñones es suficiente para soportar la carga osmolar generada por determinados alimentos; sin embargo, cuando todo el trabajo recae sobre un único riñón, ya sea por agenesia, falla renal o nefrectomía, puede desarrollarse, por un mecanismo de hipertrofia, una nefromegalia compensadora o riñón vicariante (**Prassopoulos, et al. 1992**). Esta capacidad del riñón adulto de crecer para reemplazar la pérdida de tejido fue ya reconocida por Aristóteles (384-322 BC) quien observó que los animales nacidos con un solo riñón tenían un órgano más grande en comparación con los que tenían los 2 riñones (**Wolf, 1992**).

Históricamente han surgido controversias acerca de si el crecimiento compensatorio renal resulta de hipertrofia o hiperplasia. Inicialmente se pensó que el epitelio renal no podía ser estimulado para dividirse y que las nefronas podían incrementar su tamaño sólo como resultado de hipertrofia celular. Este concepto data de 1902, cuando Galeotti y Villa Santa no encontraron evidencia de que la hiperplasia jugara algún rol en el crecimiento del riñón adulto (**Galeotti and Villa-Santa, 1902**). Siguiendo esa línea, las investigaciones de Arataki y Moore demostraron que las nefronas maduras podían incrementarse en tamaño pero no en número, siendo el crecimiento compensatorio puramente hipertrófico (**Arataki, 1926**) (**Moore, 1929**). Saphir también atribuyó el agrandamiento renal completamente a la hipertrofia celular, debido a que no encontró figuras mitóticas en el epitelio tubular ni glomerular del riñón de conejos (**Saphir, 1927**). Esta opinión prevaleció hasta 1949 cuando Rollason observó, en los primeros días posteriores a la nefrectomía unilateral, un leve aumento de la actividad mitótica en ratas, principalmente en el epitelio de los túbulos contorneados. En adición a esta clara hiperplasia celular, demostró un incremento en el tamaño de las células epiteliales y concluyó que tanto la hipertrofia como la hiperplasia contribuían al crecimiento compensatorio renal (**Rollason, 1949**).

Descripciones más detalladas de este fenómeno fueron dadas por otros autores, quienes determinaron índices mitóticos en riñones de ratas maduras en distintos tiempos posteriores a la nefrectomía unilateral encontrando su máxima expresión a las 40-48 horas seguida por una rápida declinación (**Goss and Rankin, 1960**) (**Ogawa and Nowinski, 1958**) (**Rosen and Cole, 1960**) (**Williams, 1961**). Johnson y Roman por su parte, observaron que la nefrectomía era seguida de hipertrofia celular sin hiperplasia inmediata y argumentaron que, aparentemente los factores que controlan el crecimiento compensatorio en el riñón no actuarían primariamente regulando la síntesis de ADN, sino regulando la síntesis de ARN y proteínas. Esto implicaría que la proliferación celular sería secundaria a la hipertrofia celular y que la célula no se divide hasta que alcanza un cierto tamaño crítico o una cierta razón núcleo/citoplasma. Concluyeron que, aunque la hiperplasia renal comenzaba sólo después de cierto grado de hipertrofia celular, esto no significaba que la masa celular fuera necesariamente un disparador para la iniciación de la división celular (**Johnson and Roman, 1966**).

Bricker y colaboradores notaron también que la enfermedad renal es acompañada por mecanismos compensatorios incluyendo respuestas de crecimiento subsecuentes a la injuria aguda o crónica (**Bricker, et al., 1990**). La regeneración del epitelio tubular funcional, después de la necrosis tubular aguda es una típica respuesta proliferativa en la cual las células sobrevivientes sufren mitosis, migran a lo largo de la membrana basal intacta y finalmente se diferencian a células tubulares totalmente funcionales (**Scherberich and Wolf, 1994**) (**Toback, 1992**). En contraste, el agrandamiento renal compensatorio siguiente a la pérdida crónica de nefronas, independientemente de la causa de la injuria, es el clásico ejemplo de hipertrofia tubular (**Fine, 1986**) (**Wolf and Neilson, 1991**).

Mientras que la hipertrofia tubular inicialmente representa compensación para la pérdida de tejido renal funcional, la mala adaptación eventualmente sobreviene en atrofia tubular, fibrosis túbulointersticial y pérdida de la función, puntos finales comunes de muchas enfermedades renales de diversas etiologías (**Fine, 1986**) (**Hostetter, 1995**) (**Klahr, et al., 1988**) (**Rabkin and Fervenza, 1996**) (**Wolf, 1992**) (**Wolf, 1993**) (**Wolf, 1995**) (**Wolf and Neilson, 1991**).

El medioambiente túbulointersticial tiene una arquitectura muy compleja y está compuesto por numerosos tipos celulares que incluyen: células del epitelio de los túbulos, células intersticiales, endotelio vascular, macrófagos/monocitos y linfocitos en relativa proximidad, que pueden estar involucrados en la modulación del crecimiento a través de citoquinas en forma autocrina, paracrina y endocrina **(Kaissling and Le Hir, 1994) (Lemley and Kriz, 1991) (Wesson, 1989) (Wolf and Neilson, 1991)**. Tal es su importancia que un gran número de trabajos sugieren que cambios estructurales en su arquitectura son el mayor determinante en la progresión de la enfermedad renal. Risdon y colaboradores demostraron una correlación positiva entre la declinación de la función renal y la atrofia tubular **(Risdon, et al., 1968)**. Estudios subsecuentes de los grupos de Striker y de Bohle han revivido el concepto de una asociación cerrada entre la progresión de la enfermedad renal crónica y desarreglos estructurales del compartimiento túbulointersticial que pueden conducir a obstrucción mecánica de capilares postglomerulares adyacentes, con disminución del suministro de oxígeno a varias poblaciones celulares renales **(Bohle, et al., 1979) (Bohle, et al., 1990) (Schainuck, et al., 1970) (Striker, et al., 1970)**. Los túbulos hipertrofiados también tienen una tasa de transporte incrementada que aumenta el consumo de oxígeno y la atracción de macrófagos/monocitos, produciendo y liberando además diferentes citoquinas y factores de crecimiento **(Fine, 1986) (Kohan, 1991) (Nath, 1992) (Ong and Fine, 1994) (Toback, et al., 1990)**.

La declinación progresiva de la función renal en las enfermedades glomerulares y túbulointersticiales es debido a un incremento en las proteínas de la matriz extracelular, precedido por cambios en el número (alteraciones en el balance entre proliferación y apoptosis) y/o tamaño celular (hipertrofia). En varias formas de enfermedad renal estos eventos celulares tempranos están íntimamente ligados al ciclo celular por lo que se desarrollaron muchas estrategias terapéuticas con blanco en proteínas reguladoras específicas del mismo **(Shankland and Wolf, 2000)**.

Sin embargo, en pacientes con un riñón dañado en forma irreversible debido a infección crónica sintomática, obstrucción, enfermedad calculosa o lesión traumática severa, se indica una nefrectomía simple. También puede realizarse para tratar la hipertensión renovascular debida a una enfermedad de la arteria renal que no se puede

corregir o a un daño parenquimatoso unilateral severo por nefrosclerosis, pielonefritis, reflujo o displasia congénita. La nefrectomía radical es el tratamiento de elección para los pacientes con carcinoma de células renales localizado (Novick, 2007).

Probablemente las primeras nefrectomías se realizaron de modo accidental. Los primeros informes acerca de la extirpación de grandes tumores ováricos indican que el cirujano ocasionalmente se sorprendía por hallar el riñón incluido en la pieza quirúrgica. La nefrectomía programada se llevó a cabo por primera vez en 1869 por Gustav Simon, para el tratamiento de una fistula ureteral persistente. La operación fue precedida por numerosas investigaciones experimentales de uninefrectomía en perros, para demostrar que podían sobrevivir normalmente con un solo riñón. Esta aplicación de un modelo experimental a un problema clínico fue la predecesora del método por el cual se desarrollaron muchos procedimientos quirúrgicos (Novick and Campbell, 2005).

A partir de allí se han desarrollado varios modelos animales de crecimiento tubular, para investigar los mecanismos involucrados en la progresión de la enfermedad renal. El crecimiento en estos modelos puede ocurrir por hipertrofia como ocurre en la uninefrectomía de animales adultos, la alimentación con dietas altas en proteínas, diabetes mellitus insulino dependiente, obstrucción unilateral, el embarazo, la administración de testosterona en hembras, etc. En contraste, la regeneración del epitelio tubular después de necrosis inducida por isquemia o químicos nefrotóxicos, ha sido aplicada como modelo de hiperplasia. Otros modelos como la uninefrectomía en animales neonatales, la nefrectomía subtotal en animales adultos, la hipertensión por ligadura del riñón, etc., combinan mecanismos tanto de hipertrofia como de hiperplasia. (Fine, 1986) (Fine, et al., 1988) (Scherberich, et al., 1993) (Toback, 1992) (Wesson, 1989).

CICLO CELULAR

En los seres humanos, al igual que en todos los demás organismos multicelulares, debe mantenerse un equilibrio u homeostasis entre el ritmo de producción y el ritmo de muerte celular. Una anomalía en cualquiera de ellos puede causar trastornos por

acumulación celular (hiperplasia, neoplasias, enfermedades autoinmunes, etc.) o por pérdida celular (atrofia, enfermedades degenerativas, lesión isquémica, etc.).

En base a la frecuencia de proliferación, los distintos tejidos o poblaciones celulares del organismo adulto pueden clasificarse en:

- Poblaciones celulares estáticas: se componen de células que ya no se dividen (neuronas del SNC) o que se dividen solo rara vez (células musculares esqueléticas o cardíacas).
- Poblaciones celulares estables: células que se dividen de manera episódica y con lentitud para mantener la estructura normal de los tejidos y órganos. Pueden ser estimuladas por una agresión para tornarse mitóticamente más activas (células musculares lisas, endoteliales, hepatocitos, renocitos, fibroblastos, etc.).
- Poblaciones celulares renovables: son de renovación constante y actividad mitótica regular. Pueden ser de renovación lenta (células epiteliales del cristalino o fibroblastos de la pared uterina) o rápida (células sanguíneas o células epiteliales de la piel).

Por otro lado, la muerte celular puede producirse por *necrosis*, como resultado de una acción lesiva (traumatismo físico o químico, carencia de oxígeno o acción de toxinas) o por *apoptosis o muerte celular programada*, proceso del ciclo vital celular, controlado genéticamente (**Ross and Pawlina, 2007**).

Para las poblaciones celulares proliferantes, incluidas las células embrionarias, las células en los cultivos de tejidos y aún las células neoplásicas, el ciclo celular tiene dos fases principales: mitosis e interfase. Las células que proliferan entran en el ciclo en G1 seguido por la fase S donde ocurre la replicación. Luego progresan a través de G2 y entran en mitosis (fase M) la cual se subdivide en profase, metafase, anafase y telofase, seguidas de citocinesis (división celular) (**Ross and Pawlina, 2007**).

Las células eucariotas normalmente se encuentran en un estado quiescente llamado G0. Para replicarse la célula se reincorpora a G1 y comienza a sintetizar los factores necesarios para la futura progresión a través del ciclo celular, así como a incrementar su masa en preparación para la subsecuente división. En G1 tardío hay un punto de restricción, “punto R”. Una vez que la célula atraviesa este punto, ya no es más responsable de señales extracelulares y completa el ciclo bajo el control de proteínas reguladoras específicas del ciclo celular (Qu, et al., 2003).

Durante el ciclo hay dos puntos de particular importancia, llamados puntos de control, uno antes de la transición G1/S y el otro antes de la transición G2/M. Estos puntos de control bloquean la entrada al siguiente estadio, en caso de que el paso previo no ha sido completado, o si la señal es insuficiente para progresar (Swat, et al., 2004).

La transición entre cada fase del ciclo celular es regulada secuencialmente, en un tiempo preciso y en un orden bien definido, por la actividad quinasa de una holoenzima compuesta por dos subunidades: ciclinas y ciclinas dependiente de quinasa (Cdk). Las ciclinas tienen una vida media corta de 30 a 60 minutos y sus niveles fluctúan a través del ciclo celular. En contraste, los niveles de las proteínas Cdk permanecen constantes. Las Cdk son activadas por la unión con las ciclinas. La entrada de las células quiescentes (G0) en G1 temprana, requiere ciclinas del tipo D (D1, D2, D3) cuyos niveles pueden ser incrementados por mitógenos específicos tales como los factores de crecimiento. Los niveles de ciclina D decrecen naturalmente al finalizar la mitosis o por efecto de inhibidores de crecimiento tales como el interferón y el TGF β . La ciclina D se asocia y activa a la Cdk4 y 6. En G1 tardía se incrementan los niveles de ciclina E que se asocia y activa a la Cdk2 jugando un rol pivotal en la transición G1-S. La inducción de la ciclina E es menos dependiente de los factores de crecimiento exógenos. Los niveles de ciclina A que activa Cdk2, esencial para la síntesis de ADN, aumentan en G1 tardío, son máximos durante la fase S y persisten durante G2. Para la mitosis se requiere la ciclina B, cuyos niveles fluctúan debido a su síntesis y degradación. La ciclina B-Cdk2 (o factor promotor de mitosis: FPM) fosforila sustratos como las histonas H1, laminina y nucleolina requeridas para la condensación de los cromosomas, ruptura de la envoltura nuclear y formación del huso mitótico. Después que se completa la mitosis, la

ciclina B es degradada lo que lleva a la inactivación del complejo y la Cdk2 es finalmente desfosforilada (**Shankland and Wolf, 2000**).

Como se describe, el avance del ciclo celular es regulado, en parte, por la desfosforilación y activación de ciclinas dependientes de kinasas. Estas reacciones son catalizadas por la familia de fosfatasas Cdc25. El genoma mamaliano codifica tres miembros de la familia: Cdc25A que está presente y es activa en todos los estados del ciclo celular y sus niveles hacen que la célula progrese desde la fase S a la mitosis, Cdc25B y Cdc25C (que regulan G2/M) (**Ferguson, et al. 2005**).

Los inhibidores del ciclo celular son moléculas relativamente pequeñas que se unen a complejos específicos de ciclina-Cdk inhibiendo su actividad, lo que resulta en un detenimiento del ciclo celular. Hay dos familias de inhibidores basados en la ciclina-Cdk blanco. La familia INK4 que solo inhibe los complejos ciclina D-Cdk y su expresión es requerida para mantener a las células en G0 y la familia Cip/Kip que inhibe Cdk 2, 4 y 6 e incluye al p21, p27 (cuyos niveles son críticos en la diferenciación celular renal, apoptosis, proliferación e hipertrofia) y al p57 (**Shankland and Wolf, 2000**) (**Swat, et al., 2004**).

Desde hace unos años existe la tendencia a utilizar modelos cuantitativos para examinar un número de subprocesos específicos del ciclo celular como localización de los puntos de control, apoptosis, sitios múltiples de fosforilación, control del crecimiento y el tamaño celular, etc. Novak y Tyson llegaron a la generalización de que el control molecular del ciclo celular es similar en todas las células eucariotas. También simularon la respuesta fisiológica de las células a la inhibición transitoria del crecimiento para examinar el control en los puntos de restricción (**Novak and Tyson, 2004**).

Otros autores han incluido en sus modelos la división celular, sosteniendo la idea de que la célula debe alcanzar un cierto tamaño para que ocurran algunos de los procesos regulatorios del ciclo celular (**Csikász-Nagy, et al., 2006**) (**Yang, et al., 2006**).

En el trabajo de Yang y colaboradores, el modelo comienza con una célula en estado estable (fase G0). La fase G1 se desencadena alrededor de 6 horas después de la imposición de mitógenos y factores de adhesión. El ciclo celular inicial después de G0, se prolonga mientras que la ARN polimerasa construye las cantidades apropiadas de ARNr, ARNt y ADN polimerasa. En los ciclos celulares subsecuentes gran cantidad de estas moléculas están disponibles, lo que resulta en un crecimiento más rápido y un tiempo del ciclo más corto. Así la duración del G1 inicial es de aproximadamente 24 horas, mientras que las fases G1 subsiguientes, duran aproximadamente 15 horas. A partir de las 6 horas, el número de proteínas se incrementa y a los 2 días sufre un abrupto declinamiento, cuando la célula se divide. La primera replicación de ADN abarca desde, aproximadamente, las 31.2 horas (G1/S) hasta aproximadamente, las 38,4 horas (S/G2) (Yang, et al., 2011).

CRECIMIENTO RENAL

Durante el desarrollo, el crecimiento del riñón se debe a un incremento en el número de células epiteliales tubulares y glomerulares, seguido de un aumento fisiológico en el tamaño celular. Así, el tamaño del riñón depende finalmente del número y del tamaño individual de las células (Conion and Raff, 1999). El número celular refleja el balance entre proliferación y apoptosis (Savill, 1997). En contraste con otros órganos como los del tracto gastrointestinal, en el riñón adulto bajo circunstancias fisiológicas normales hay muy poco recambio celular, pero en condiciones patológicas la proliferación glomerular y tubular puede incrementarse (Pabst and Sterzel, 1983) (Prescott, 1966) (Schmitt and Cantley, 2008).

El número y el tamaño de las células pueden variar después de varias formas de injuria renal patológica. Por ejemplo, la apoptosis se incrementa después de la obstrucción ureteral y la necrosis tubular aguda está asociada inicialmente con un decrecimiento en el número de células epiteliales (Lieberthal and Levine, 1996). Ciertas formas de injuria renal tales como la nefropatía diabética y la reducción del número de nefronas están asociadas con un incremento individual en el tamaño celular por hipertrofia (Hostetter, 1995) (Preisig and Franch, 1995). Dependiendo entonces

del tipo de injuria renal, la proliferación, hipertrofia y apoptosis pueden contribuir al desarrollo de la respuesta a las enfermedades glomerulares y tubulointersticiales. Estos procesos están regulados a nivel del ciclo celular (**Nasmyth, 1996**) (**Norbury and Nurse, 1992**).

La proliferación requiere de una progresión normal a través del ciclo celular. La transición desde G1 tardío a la fase S resulta en la síntesis de ADN. La detención en G1 resulta en quiescencia o hipertrofia. La hipertrofia es un proceso activo definido como agrandamiento celular debido a un incremento en el contenido de proteínas y ARN, sin duplicación de ADN. Requiere la entrada en el ciclo celular sin progresión a través de la fase S (**Fig. 1**), lo cual explica por qué la hipertrofia y la proliferación son excluyentes en la misma célula. Así, ciertos factores de crecimiento, hormonas, matriz extracelular, fuerzas mecánicas, hiperglucemia, etcétera, que inducen hipertrofia facilitan la entrada en el ciclo celular. La hipertrofia en las células epiteliales renales puede ocurrir por mecanismos dependientes o independientes del ciclo celular. La dependiente del ciclo celular involucra señales que causan que la célula entre en G1 pero que se detenga antes de dejar esta fase, mientras que la independiente probablemente involucra inhibición de algunas enzimas lisosomales, lo que conduce a un decrecimiento de la degradación de proteínas y consecuentemente a un incremento en su contenido.

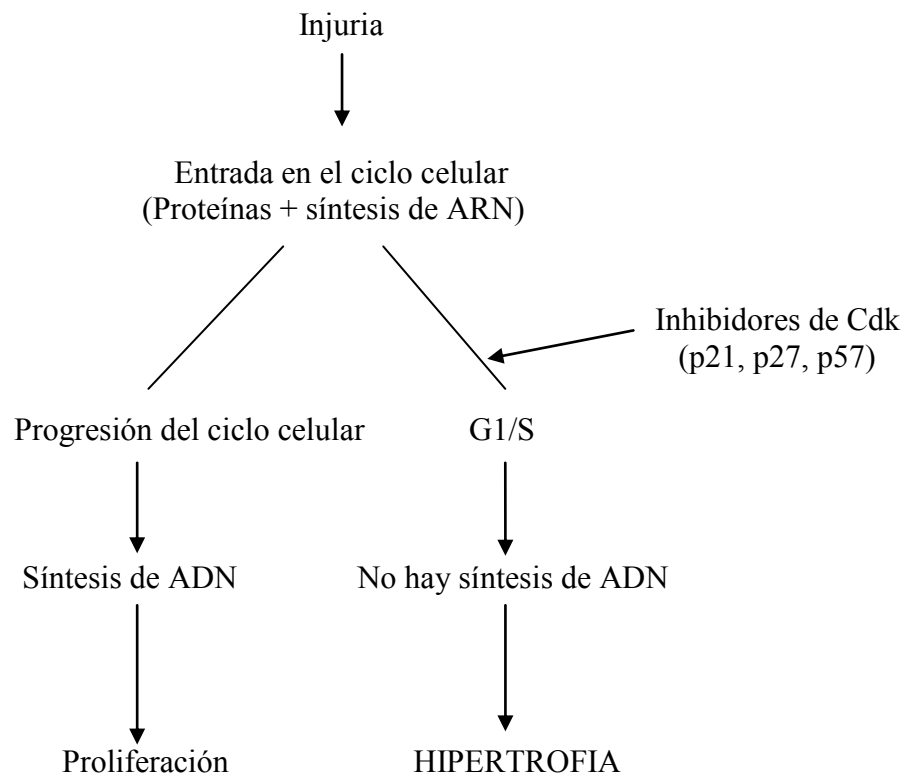


Fig. 1: La progresión a través del ciclo celular conduce a la síntesis de ADN y a la proliferación celular. Factores hipertróficos tales como ANG II, TGF β y glucosa, incrementan los niveles de los inhibidores Cdk, lo cual causa detenimiento del ciclo celular en G1, previniendo la síntesis de ADN. Esto está asociado con un incremento en el contenido de proteínas, ARN y del tamaño celular (hipertrofia) (modificado de Shankland and Wolf, 2000).

En contraste a los cambios relativamente bien establecidos en las células epiteliales e intersticiales después de la reducción de la masa renal, los cambios seriales que pueden ocurrir en los capilares renales, son menos conocidos. Pillebout y colaboradores demostraron que en ratones adultos hay un incremento de la red de capilares peritubulares después de la resección del 75 % del riñón, correlacionado con la tasa de proliferación celular y la severidad de las lesiones tubulares (**Pillebout, et al., 2001**). Varios autores han encontrado un aumento en la proliferación de las células endoteliales de los capilares peritubulares y glomerulares en el riñón remanente en las primeras semanas después de la nefrectomía, mientras que en las semanas subsiguientes se produjo una progresiva pérdida de capilares en estas dos zonas (**Bohle, et al., 1996**) (**Kang, Anderson, et al., 2001**) (**Kang, Joly, et al., 2001**) (**Ohashi, et al., 2000**) (**Thomas, et al., 1998**).

Las diferencias entre los resultados obtenidos por los distintos autores, pueden deberse a que los cambios en los capilares peritubulares después de la reducción renal son modulados por distintas causas como, la especie y la edad bajo estudio, la extensión y el origen de la reducción néfrica, el tiempo posterior a la injuria, el grado de fibrosis y/o de proliferación tubular (**Anderson, et al., 1985**) (**Griffin, et al., 1994**) (**Hostetter, et al., 1981**) (**Kim, et al., 2003**) (**Olivetti, et al., 1977**) (**Terzi, et al., 2000**) (**Waldherr and Gretz, 1988**) (**Yoshida, et al., 1989**).

FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

La reparación capilar es un evento crucial en la recuperación del daño renal y el VEGF juega un rol importante en la proliferación endotelial. También es conocido como factor regulador de la permeabilidad vascular, función que cobra importancia en la inflamación y otros procesos patológicos, como por ejemplo, la penetración de las células tumorales en la red vascular, lo que resulta en metástasis (**Karamysheva, 2008**) (**Masuda, et al., 2001**).

La familia del VEGF tiene siete miembros que ejercen su efecto biológico vía interacción con receptores localizados en las membranas de las células endoteliales. La neovascularización post natal o *angiogénesis*, ha sido previamente considerada el

resultado exclusivo de la proliferación, migración y remodelación de células endoteliales completamente diferenciadas, derivadas de vasos sanguíneos preexistentes, mientras que la *vasculogénesis* está restringida a la embriogénesis. La angiogénesis comienza con activación de las células endoteliales dentro del vaso, seguida por disrupción de la membrana basal y la subsiguiente migración de las células endoteliales dentro del espacio intersticial, en dirección a un estímulo isquémico. Concomitante y/o subsecuentemente a la proliferación endotelial aparece el lumen y el recubrimiento de pericitos. La formación de la membrana basal, completa la secuencia **(Losordo and Isner, 2001) (Ribatti and Crivellato, 2012)**.

El VEGF-A juega un rol principal tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis. Se une y activa al receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular tipo 1 (VEGFR1) y tipo 2 (VEGFR2). Los subtipos más importantes del VEGF- A en humanos son el de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos. El 165 es el subtipo dominante en términos de cantidad y actividad biológica. Ha sido demostrado que los ratones expresan VEGF 120. El VEGF-B y el PIGF (factor de crecimiento placentario) se unen y activan solo al VEGFR1 y su actividad angiogénica es alrededor de 10 veces más débil que la del VEGF-A. El VEGF-C y el VEGF-D se unen al VEGFR3 e inducen linfangiogénesis. El VEGF-E (también conocido como Orf VEGF) es codificado por el genoma del virus Orf. La t.f. (*Trimeresurus flavoviridis*) sv VEGF es una proteína semejante al VEGF purificada del veneno de la serpiente Habu que vive en el sur de Japón (“Habu-toxin”). Todos los miembros de la familia, excepto el VEGF-E y VEGF sv, son codificados por el genoma mamaliano **(Karamysheva, 2008) (Shibuya, 2008)**.

En el riñón normal, el VEGF se expresa en los podocitos glomerulares y en las células tubulares, especialmente en la médula externa y rayos medulares. Es esencial para la normal nefrogénesis y la glomerulogénesis, pero también ha sido implicado en la patogénesis de la disfunción renal temprana y en la hipertrofia glomerular en la diabetes experimental **(Berse, et al., 1992) (De Vriese, et al., 2001) (Kim, et al., 2000) (Kitamoto, et al., 1997) (Schrijvers, et al., 2002) (Simon, et al., 1995)**.

Aunque la mayoría de los estudios han encontrado receptores de VEGF exclusivamente expresados en las células endoteliales en el riñón adulto, algunos

reportes indican que las células mesangiales y tubulares pueden expresarlos bajo ciertas condiciones **(Kanellis, et al., 2000) (Simon, et al., 1995) (Thomas, et al., 2000)**.

El VEGF es estimulado por cambios hemodinámicos, incluyendo hipoxia, estrés e hipertensión. Además, algunos factores angiogénicos son sintetizados dentro del riñón y la expresión de varios de ellos como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la endotelina son sobre regulados en varias condiciones experimentales y nefropáticas humanas **(Ferrara, 1999 a) (Ferrara, 1999 b) (Pillebout, et al., 2001) (Pupilli, et al., 1999)**.

El mantenimiento de los capilares peritubulares es esencial para proveer oxígeno y nutrición a las células tubulares e intersticiales. Ha sido reportado que la pérdida de capilares que ocurre en la fase tardía de varios modelos de enfermedad renal conduce a hipoxia, lo que incrementa los niveles de transcripción de ARNm VEGF **(Bohle, et al., 1996) (Fine, et al., 2000) (Kang, Joly, et al., 2001) (Matsumoto, et al., 2003)**. La hipoxia puede inducir injuria celular tubular e intersticial, proliferación activa y generación de citoquinas **(Manotham, et al., 2004 a) (Norman, et al., 2000)**. La neoangiogénesis es una respuesta común a la hipoxia crónica ya que ésta puede estimular la proliferación endotelial de los capilares peritubulares **(Kang, Joly, et al., 2001) (Manotham, et al., 2004 b) (Rosenberger, et al., 2003)**. La región más susceptible a la hipoxia es la región yuxtamedular y la médula exterior. Los túbulos en esta región están normalmente en un estado cercano a la hipoxia, debido a la circulación en contracorriente y a una alta demanda de oxígeno de los túbulos ascendentes delgados de la médula y los segmentos S3 de los túbulos proximales **(Epstein, et al., 1994)**. Una modesta reducción en el flujo puede conducir a empeorar la hipoxia en esta región **(Saga, et al., 2001) (Zheng, et al., 1998)**.

Esta diferenciación zonal es debida a que las características ultra estructurales del túbulo proximal no son idénticas en todo su recorrido. El segmento S1 ocupa las porciones iniciales de la región contorneada, sus células son las más altas, presentan complicadas interdigitaciones y poseen más vacuolas y mitocondrias. El segmento S2 surge por transformación gradual del anterior y ocupa la parte distal de la porción contorneada y la inicial de la porción recta. Sus células son más bajas, con

interdigitaciones basolaterales menos desarrolladas, mitocondrias más pequeñas y en menor número. El segmento S3 abarca el resto de la porción recta y presenta células cuboides, con muy pocas interdigitaciones y mitocondrias, pero con las microvellosidades más largas **(Eynard, et al., 2008)**.

Otro hecho a tener en cuenta es el grado de inflamación. Choi y colaboradores demostraron que la expresión del VEGF está inversamente relacionada con el grado de inflamación túbulointersticial, por ejemplo en la nefritis crónica humana, se mantiene en los túbulos hipertróficos pero desaparece en los atróficos **(Choi, et al., 2000)**. Como ocurre en el envejecimiento del riñón, en el riñón remanente y en el rechazo crónico de trasplante renal, la pérdida de la expresión tubular de VEGF se correlaciona con la severidad de la pérdida de los capilares peritubulares, paralela a una reducción de la proliferación de las células endoteliales. Se produce además una pérdida de VEGF relacionada con sitios de infiltración de macrófagos **(Gröne, et al., 1995) (Kang, Anderson, et al., 2001) (Kang, Joly, et al., 2001) (Shulman, et al., 1996)**.

La observación de que la enfermedad renal progresiva, tanto experimental como humana, está asociada con pérdida capilar y reducción de la expresión de VEGF, lleva a la posibilidad de que el reemplazo del VEGF pueda mantener la microvasculatura y por lo tanto disminuir la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, se observó que la administración del VEGF protegió a los animales de la pérdida capilar peritubular pero no se demostró ningún efecto sobre la expresión del VEGF endógeno en el riñón remanente, o en el riñón de ratas intactas **(Kang, Hughes, et al., 2001) (Kang, Joly, et al., 2001)**. También se demostró que el VEGF juega un rol mayor en la respuesta compensatoria renal después de la uninefrectomía, debido a que el tratamiento con VEGF-ab bloqueó parcialmente el crecimiento renal, sin afectar el peso corporal o el consumo de alimento **(Flyvbjerg, et al., 2002)**.

RITMOS CIRCADIANOS

Los sistemas biológicos cambian rítmicamente y el organismo es bioquímicamente diferente en cada tiempo de un período circadiano, en concordancia con cada fase del

ciclo celular. Consecuentemente, puede reaccionar al mismo estímulo en una forma diferente en cada tiempo del día. Diferentes autores han reportado ritmos circadianos de actividad mitótica y de la síntesis de ADN de diferentes poblaciones celulares **(Errecalde and Echave Llanos, 1993) (Ruby, et al., 1973) (Scheving, 1981) (Sigdestad, et al., 1969)**. Nuestro grupo de trabajo describió ritmos circadianos en la actividad mitótica de hepatocitos, enterocitos, sialocitos de la glándula submandibular, células epiteliales de la mucosa de la lengua y de los túbulos proximales y distales de la corteza renal de ratones, con valores máximos a las 12:00 horas y valores más bajos entre las 00:00 y 04:00 horas **(Echave Llanos, et al., 1971) (Errecalde, et al., 1995) (Inda, et al., 1997) (Inda, et al., 1999)**. Otros autores, al estudiar el crecimiento renal utilizando la síntesis de ADN como parámetro, han demostrado su valor máximo entre las 21:00 y las 04:00 horas **(Burns, et al., 1972) (Pardee, 1974) (Pilgrim, et al., 1963) (Sigdestad, et al., 1969)**.

La división celular en muchos tejidos de mamíferos está asociada a momentos específicos del día. Por ejemplo, en el hígado de ratón en regeneración, el reloj circadiano controla la expresión de genes relacionados al ciclo celular que modulan la expresión del regulador clave de la mitosis, el complejo ciclina B1- Cdk2 **(Matsuo, et al., 2003)**.

Las variaciones diarias en las funciones biológicas, tales como expresión génica y síntesis proteica, son factores importantes a tener en cuenta para aumentar los efectos de una droga administrándola en el momento del día en que va a ser más efectiva y/o mejor tolerada. En los mamíferos, el responsable de adaptar las funciones fisiológicas endógenas a los factores medioambientales cíclicos, como la luz, temperatura y comunicación social, es el núcleo supraquiasmático, ubicado en el hipotálamo anterior. **(Koyanagi, et al., 1997) (Koyanagi, et al., 2003) (Moore and Eichler, 1972) (Ohdo, et al., 2001)**.

Ha sido estudiado que la concentración plasmática del VEGF en humanos muestra fluctuaciones circadianas, con un pico a la noche y un decrecimiento durante el día. En roedores, con actividad nocturna, estos valores se incrementan durante el período de descanso **(Endo, et al., 2002)**. Se encontró que en células tumorales implantadas en

ratones, los niveles de ARNm VEGF exhiben una oscilación circadiana, subordinada a la dominancia ejercida por el reloj central del animal huésped (**Koyanagi, et al., 2003**) (**Pando, et al., 2002**).

Conjuntamente, durante algunos procesos regenerativos, por ejemplo después de la hepatectomía parcial en ratas y ratones, la expresión de ARNm VEGF está temporal y espacialmente relacionada a la proliferación (**Ferrara and Davis-Smith, 1997**). Nuestro grupo de trabajo observó que en el hígado remanente la expresión de VEGF de los hepatocitos perivenulares comienza a incrementarse a las 26 horas de la hepatectomía parcial, mientras que la síntesis de ADN y la actividad mitótica alcanzan su máximo nivel a las 42 y a las 50 horas pos hepatectomía, respectivamente (**Furnus, et al., 2003**).

DIFERENCIAS DE SEXO

Estudios en humanos reportan que los niveles de VEGF en el plasma varían a lo largo del ciclo menstrual en la mujer. De forma análoga, en el ciclo de fertilidad de ratones los niveles de VEGF en el tejido mamario normal son más elevados en el estro, mientras que en tumores mamaros fueron mayores durante el proestro (**Wood, et al., 2005**). El estro y los ciclos circadianos afectan el balance huésped-cáncer y están fisiológicamente ligados. Existe una coordinación circadiana de los eventos del ciclo estral, por ejemplo la ovulación se produce en el estado de actividad. Lesiones en el reloj circadiano de ratones, ratas y hámster hembras afectan el ciclo reproductivo (**Brown-Grant and Raisman, 1977**). Se ha demostrado que la remodelación de vasos, esencial para el crecimiento de las neoplasias, también es modulada sustancialmente por los ciclos circadianos y estrales (**Wood, et al., 2005**).

Estudios clínicos y modelos animales experimentales, sugieren que las hembras están relativamente protegidas de un número de nefropatías progresivas. La tasa de progresión de la enfermedad renal crónica es más rápida en hombres que en mujeres, independientemente de otros factores de riesgo, tales como presión sanguínea sistémica o niveles de lípidos en el suero (**Ishikawa, et al., 2000**) (**Neugarten, et al., 1999**) (**Neugarten, et al., 2000**) (**Seliger, et al., 2001**) (**Silbiger and Neugarten, 1995**). En

donantes para trasplante renal y en animales con un solo riñón, también se ha reportado que el sexo masculino tiene una mayor tasa de desarrollo de proteinuria y hematuria comparada con el femenino (Anderson, et al., 1985) (Baylis and Wilson, 1989) (Hakim, et al., 1984) (Liu, et al., 1992) (Miller, et al., 1985).

Los mecanismos potenciales para la protección relacionada al sexo femenino incluyen diferencias renales como, menor número y tamaño de los glomérulos y efectos de los estrógenos sobre la síntesis y liberación de sustancias vaso activas, factores de crecimiento y citoquinas (Dubey and Jackson, 2001) (Silbiger and Neugarten, 1995). Las hembras tienen riñones más pequeños que los machos, lo cual puede tener una relación directa entre el crecimiento del riñón y el riesgo de falla renal. Las diferencias sexuales secundarias son producidas por los esteroides gonadales y es posible que estas hormonas influyeran también al riñón. Ha sido sugerido que los andrógenos, conocidos por promover el agrandamiento renal, son determinantes en un número de condiciones clínicas y experimentales, como en el riñón remanente (Baylis, 1994) (Cohen and Rosenmann, 1984) (Muller, et al., 1999) (Reckelhoff, 2005) (Reckelhoff and Baylis, 1993) (Reckelhoff, et al., 1999) (Reckelhoff, et al., 2000) (Remuzzi, et al., 1988). No está claro si la presencia de testosterona, la ausencia de estrógenos o ambas situaciones se unen para producir las diferencias sexuales en la progresión de las enfermedades renales. Existen indicaciones de que las hormonas sexuales tienen distintos efectos según las regiones del riñón y posiblemente también durante el crecimiento compensatorio después de la uninefrectomía (Kwan, et al., 1996) (Oudar, et al., 1991).

Existe evidencia de que los estrógenos pueden jugar un rol beneficioso en enfermedades vasculares y en el riñón (Dubey and Jackson, 2001) (Kang, et al., 2004) (Reckelhoff, 2005) (Schnaper, 1999). El suministro de estradiol en el modelo del riñón remanente de rata hembra reduce la proteinuria y disminuye la injuria tubulointersticial y glomerular (Antus, et al., 2003). El estradiol induce la proliferación y migración endotelial mediada por el receptor de estrógeno expresado por las células endoteliales (Kim-Schulze, et al., 1996) (Losordo and Isner, 2001) (Morales, et al., 1995) (Venkov, et al., 1996). Ha sido demostrado que, mas allá del eje neuroendocrino del tracto reproductivo, el riñón es el órgano más regulado por el receptor de estrógenos tipo α en el ratón (Jelinsky, et al., 2003). La falta de receptor de estrógenos tipo α en

hembras está asociada con un reducido crecimiento renal compensatorio, probablemente vía supresión de la proliferación tubular **(Sun, et al., 2006)**. Los estrógenos además, podrían regular la expresión de VEGF en las células tubulares renales, preservando la microvasculatura e inhibiendo la remodelación macro vascular patológica en ratas hembras **(Losordo and Isner, 2001)**.

Otro mecanismo indirecto para explicar la mayor expresión del VEGF en hembras, está relacionado a la pérdida de infiltración macrofágica en estos animales. Se ha reportado que la pérdida de expresión del VEGF por los podocitos y células tubulares, en modelos de enfermedad renal progresiva, está fuertemente relacionada con la infiltración macrofágica. In vitro, las citoquinas asociadas con los macrófagos inhiben la expresión de ARNm VEGF y la secreción de proteínas por las células tubulares renales. Por lo tanto, la menor infiltración macrofágica puede explicar la mayor preservación de la expresión tubular del VEGF en ratas hembras **(Kang, Joly, et al., 2001)**.

Otro hallazgo fue que el estradiol incrementa la síntesis y expresión del VEGFR2 responsable de la proliferación y migración de las células endoteliales microvasculares, mediada por VEGF **(Suzuma, et al., 1999) (Zeng, et al., 2001)**. En conclusión, los cambios vasculares intra renales con expresión diferencial del VEGF y sus receptores pueden ser uno de los mecanismos de mejor pronóstico renal en ratas hembras. Estos efectos pueden ser mediados directa o indirectamente por el estradiol **(Kang, et al., 2004)**.

En el modelo del riñón remanente en roedores, el número de nefronas es repentinamente reducido por ablación quirúrgica, lo que dispara eventos moleculares y celulares que promueven el crecimiento compensatorio de las nefronas remanentes. Durante el crecimiento renal compensatorio después de una nefrectomía unilateral, ocurre una proliferación transitoria en las células tubulares y endoteliales peritubulares, generalmente asociada con degeneración a largo término del riñón remanente. **(Flyvbjerg, et al., 1988) (Flyvbjerg, et al., 1999) (Schmitz, et al., 1989) (Seyer-Hansen, 1978)**.

Hay diferentes mecanismos que inician el crecimiento compensatorio renal temprano, dependiendo de la edad y del sexo (**Mulroney, et al., 1991**) (**Mulroney, et al., 1996**). La función renal y el crecimiento compensatorio en ratas hembras son bien preservados después de la nefrectomía unilateral, pero hay una mayor incidencia de gloméruloesclerosis a una edad joven, posiblemente debido a una mayor tasa de crecimiento del riñón remanente, comparado con el de los adultos (**Mulroney, et al., 1999**) (**Nagata, et al., 1992**) (**Okuda, et al., 1988**).

Así, precisar la distribución del VEGF y la proliferación celular en los compartimientos tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón adulto normal y después de la nefrectomía unilateral, teniendo en cuenta las potenciales diferencias sexuales y circadianas podría ayudar a dilucidar los mecanismos por los cuales ocurren los daños funcionales y del parénquima en la enfermedad renal y en los trasplantes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Durante el crecimiento compensatorio renal temprano, siguiente a la nefrectomía unilateral en ratones adultos, la expresión de VEGF y la proliferación de las células tubulares aumentan y presentan diferencias zonales, sexuales y temporales.

OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estudiar la expresión del VEGF y la síntesis de ADN en las células epiteliales tubulares del riñón de ratones adultos después de una nefrectomía unilateral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Establecer el grado de correlación temporal entre la expresión de VEGF y la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de ratones machos y hembras intactos, durante un período circadiano.
- ✓ Analizar y comparar la expresión del VEGF y la síntesis de ADN de las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de ratones machos y hembras, en distintos tiempos posteriores a una nefrectomía unilateral.

**MATERIAL
Y
MÉTODOS**

ANIMALES

Se utilizaron ratones machos y hembras, de la cepa C3HS, de 90 días de edad, endocriados y estandarizados para



análisis de periodicidad. Al cumplir los 75 días de edad los machos y las



hembras se colocaron en cuartos de ritmos separados, en cajas individuales, con agua y comida ad libitum (dieta balanceada con 25 % de proteínas), bajo un régimen de iluminación con luz fluorescente de 40 W (de 06:00 a 18:00 horas, alternando con 12 horas de oscuridad), a una temperatura de 22 ± 2 °C (Halberg, et al., 1958) (Vilchez and Echave Llanos, 1971). De esta manera se estableció un ritmo alternado de oscuridad-actividad e iluminación-reposo y se sincronizaron las variables bajo estudio.

TÉCNICA DE CIRUGÍA

La nefrectomía unilateral izquierda se realizó a las 10:00 horas, bajo anestesia con Ketamina (0,06 mg/25 g de peso corporal) y Diazepán (0,03 mg/25 g de peso corporal), vía intraperitoneal. Se colocó el animal en decúbito dorsal y se realizó una incisión en la región subcostal izquierda de 1,5 a 2 cm. Se separó el riñón del resto de los órganos y se ligó el uréter, junto con el paquete vasculo-nervioso. Se cortó el





pedículo renal por encima de la ligadura y se extirpó el riñón. Finalmente se suturó con hilo de algodón. Luego se les inyectó Tramadol Clorhidrato (0,03 mg/25 g de peso corporal) como analgésico y se colocaron sobre una almohadilla térmica hasta su recuperación, momento en el cual fueron trasladados nuevamente al cuarto de ritmos donde se mantuvieron en cajas

individuales, bajo condiciones de estandarización para análisis de periodicidad, hasta el momento del sacrificio.

TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Los riñones derechos extraídos después del sacrificio, seccionados en forma longitudinal, se fijaron en formol tamponado durante 24 horas. Luego se deshidrataron mediante un tren de alcoholes de concentración creciente, se aclararon con xilol y se incluyeron en parafina. Se cortaron con micrótomo de deslizamiento (aproximadamente 5 μ m de espesor) y se montaron sobre portaobjetos silanizados (Silane, Sigma) (**Fig 2**).

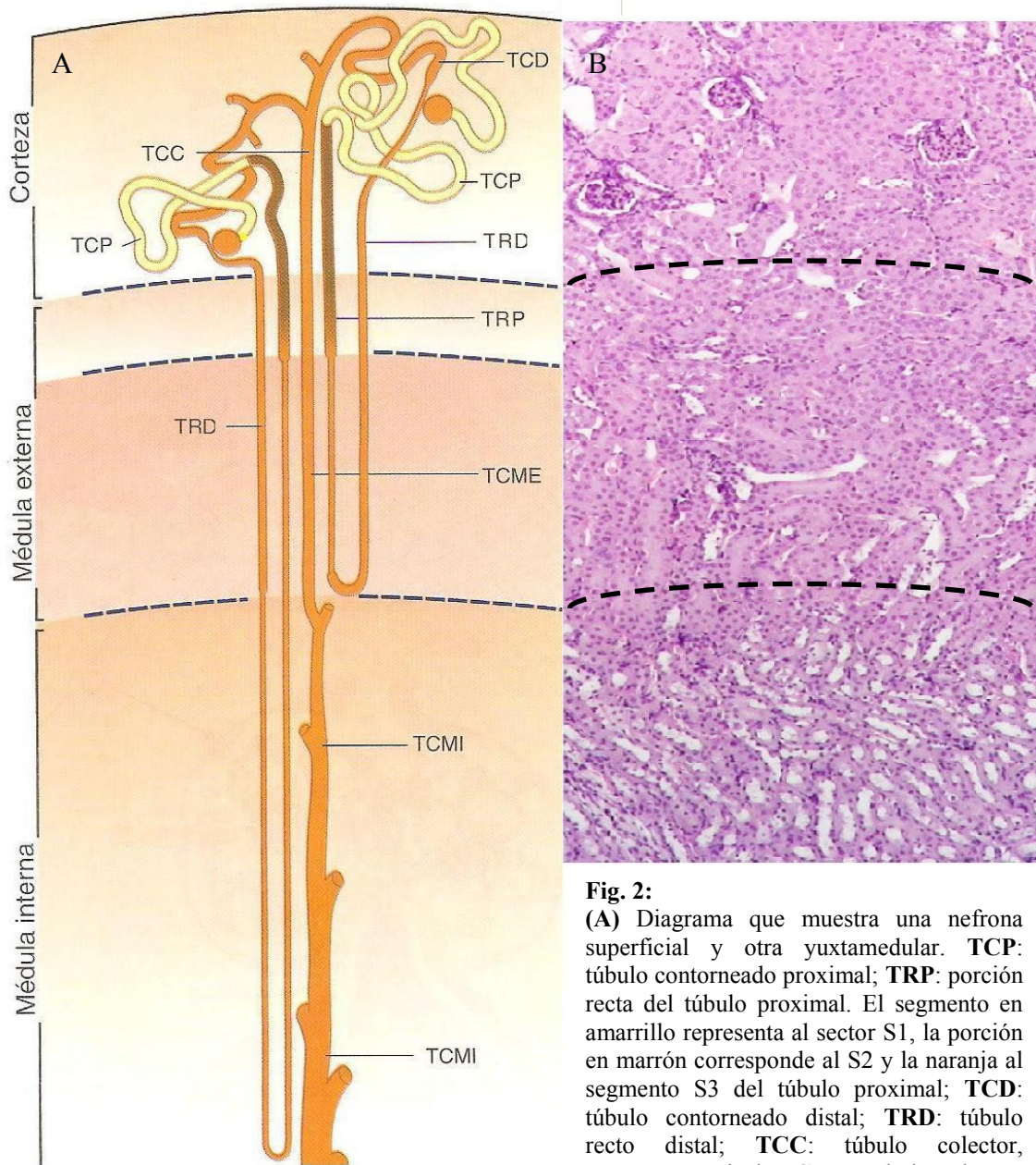


Fig. 2:
(A) Diagrama que muestra una nefrona superficial y otra yuxtamedular. **TCP:** túbulo contorneado proximal; **TRP:** porción recta del túbulo proximal. El segmento en amarillo representa al sector S1, la porción en marrón corresponde al S2 y la naranja al segmento S3 del túbulo proximal; **TCD:** túbulo contorneado distal; **TRD:** túbulo recto distal; **TCC:** túbulo colector, segmento cortical; **TCME:** túbulo colector, segmento medular externo; **TCMI:** túbulo colector segmento medular interno **(modificado de Eynard, et al., 2008).**
(B) Foto del corte longitudinal de un riñón de ratón (10 X H & E)

- Técnica para la inmunomarcación del VEGF

Los cortes histológicos obtenidos se sumergieron en xilol para su desparafinado, se rehidrataron con alcoholes de concentración decreciente y se lavaron con Tris buffer (TBS) a pH 7.4. Luego del bloqueo de la peroxidasa endógena, se recuperó el epítipo mediante calor (**Cattoretti, et al., 1993**) (**Shi, et al., 1991**). Los cortes se lavaron nuevamente con TBS y se colocaron en cajas plásticas conteniendo 250 ml. de buffer citrato de 0.01 M, pH 6, dentro de un horno a microondas, con plato giratorio, a 750 W durante 10 minutos (2 x 5 minutos). Las cajas se rellenaron con agua destilada luego de cada ciclo, para mantener la concentración del buffer. Luego de la exposición al microondas, los preparados se enfriaron en la misma solución durante 20 minutos (**Battifora, et al., 1995**), se lavaron con TBS y se incubaron con el anticuerpo primario VEGF (C-1): sc-7269, monoclonal de ratón IgG2a (Santa Cruz Biotechnology, California USA) recomendado para la detección de las variantes 189, 165 y 121 aminoácidos de origen humano de rata y ratón, a una dilución de 1/40 en una cámara húmeda durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se utilizó el Sistema Envision (DAKO, Carpintería, California, USA) como sistema de detección. La reacción se reveló con 3´3-diaminobenzidina (Sigma). Los cortes se contrastaron con Hematoxilina de Meyer y se montaron con un cubreobjetos.

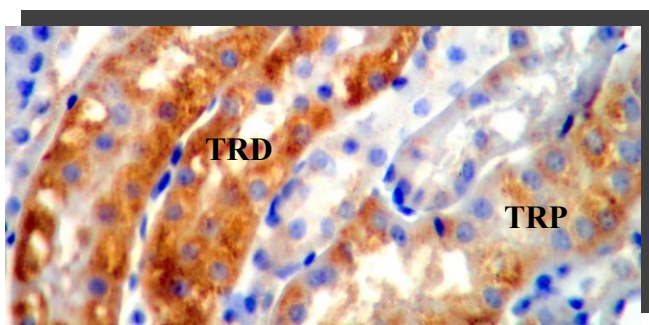
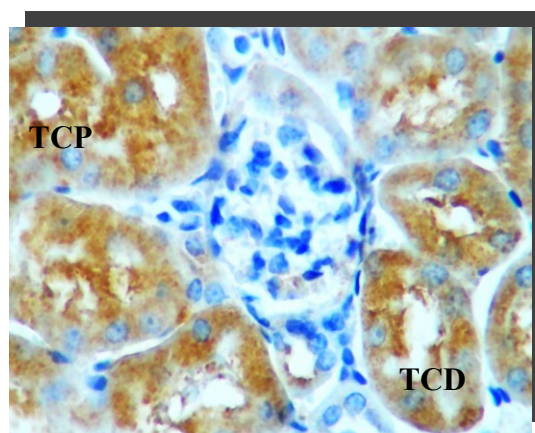
- Técnica inmunohistoquímica de Bromodeoxiuridina:

A cada animal se le inyectó, intraperitonealmente, una solución de 5-bromodeoxiuridina (Sigma) en dosis equivalente a 50 mg/Kg de peso corporal, 1 hora antes del sacrificio. A los cortes obtenidos se les realizó el desparafinado mediante la inmersión de los portaobjetos en xilol y luego se hidrataron utilizando un tren de alcoholes de concentración decreciente. Los cortes hidratados se sometieron al tratamiento en microondas (2 x 5 minutos, 750 W) en buffer citrato, pH 6, para la recuperación antigénica. Una vez enfriados se lavaron en Tris y se sumergieron en una solución de agua oxigenada (20 vol.) al 3 % para bloquear la peroxidasa endógena y así evitar la marcación inespecífica. Se incubaron con el anticuerpo primario (Bu 20a, 1/100, Dako) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Terminada la

incubación se volvieron a lavar en Tris y se utilizó el Sistema Envision (Dako) como sistema de detección, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se lavaron con Tris y se realizó el revelado con 3'3-diaminobencidina (Sigma). Por último se les realizó una coloración suave de contraste con Hematoxilina de Meyer para facilitar la observación de los núcleos y se los montó con un cubreobjetos.

CUANTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

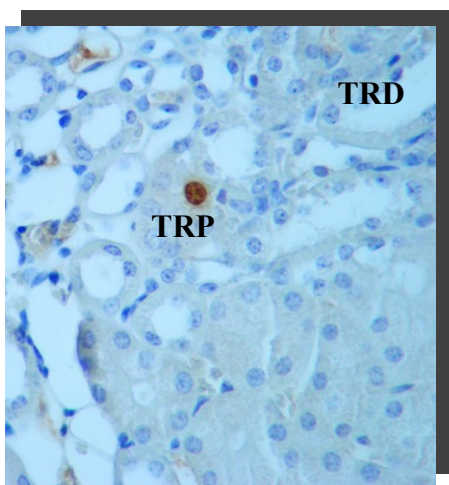
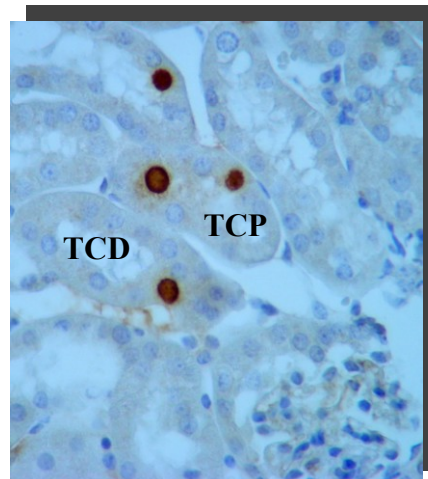
Para establecer el índice de expresión del VEGF en la corteza de cada preparado histológico se controlaron 50 campos, aproximadamente 4000 células epiteliales de los túbulos contorneados proximales (**TCP**) y distales (**TCD**), con 1000 aumentos. En cada campo se registraron las células marcadas y cada 10 campos, las células totales. Mediante la fórmula: *células marcadas x 100 / células totales* se calculó el porcentaje de células marcadas. Los resultados se expresan como $X \pm \text{ESM} (n)$, para cada grupo.



Para establecer el índice de expresión del VEGF en la médula externa, de cada preparado histológico se controlaron 50 campos, aproximadamente 4000 células epiteliales de la porción

recta de los túbulos proximales (**TRP**) y distales (**TRD**) con 1000 aumentos. En cada campo se registraron las células marcadas y cada 10 campos, las células totales. Mediante la fórmula: *células marcadas x 100 / células totales* se calculó el porcentaje de células marcadas. Los resultados se expresan como $X \pm \text{ESM} (n)$, para cada grupo.

Para establecer el índice de ADN, en cada preparado histológico, se analizaron 50 campos de la corteza, aproximadamente 4000 núcleos de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y distales (TCP y TCD) y 50 en la médula externa, aproximadamente 4000 núcleos de las células epiteliales de la porción recta de los túbulos proximales y distales (TRP y TRD) con 1000 aumentos.



En cada campo se registraron los núcleos marcados y cada 10 campos, los núcleos totales. Mediante la fórmula: $\text{núcleos marcados} \times 100 / \text{núcleos totales}$ se calculó el porcentaje de núcleos marcados. Los resultados se expresan como $X \pm \text{ESM (n)}$, para cada grupo.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron:

- ❖ **“t-test” de Student:** para comparar las medias entre dos grupos.
- ❖ **ANOVA (análisis de la variancia):** para comparar más de 2 medias. Cuando de la aplicación de este test resultó que la variación entre las medias era significativamente mayor que la esperada por el azar, utilizamos el post-test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer (García Torrecillas, et al., 2008) (Rodríguez del Águila and Fernández Sierra, 1998).

En todos los casos se consideran significativas las diferencias de $p < 0,05$.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento I: estudio de la expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de animales intactos, durante un período circadiano.

Se utilizaron 36 ratones machos y 36 hembras, divididos en grupos de 6 animales cada uno, respectivamente. Se sacrificaron por decapitación y sangría en los siguientes puntos horarios: 0:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica inmunohistoquímica del VEGF.

Experimento II: estudio de la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de animales intactos, durante un período circadiano.

Se utilizaron 38 ratones machos y 38 hembras, divididos en grupos de 6 animales cada uno, respectivamente. Se sacrificaron por decapitación y sangría en los siguientes puntos horarios: 0:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas, previa inyección 1 hora antes, de 5- bromodeoxiuridina en dosis equivalente a 50 mg/Kg de peso corporal. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica inmunohistoquímica de Brdu.

Experimento III: estudio de la expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón, a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía.

Se utilizaron 12 ratones machos (con un peso promedio de 26 gramos) y 12 hembras (con un peso promedio de 22,2 gramos), los que se sometieron a una nefrectomía unilateral (Nx). Los animales, divididos en grupos de 6, se sacrificaron por decapitación y sangría a las 50 horas o a los 7 días posteriores a la cirugía. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica inmunohistoquímica del VEGF.

Experimento IV: estudio de la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón, a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía.

Se utilizaron 14 ratones machos (con un peso promedio de 28,6 gramos) y 14 hembras (con un peso promedio de 23 gramos) los que se sometieron a una nefrectomía unilateral (Nx). Los animales se sacrificaron por decapitación y sangría a las 50 horas o a los 7 días post cirugía, previa inyección intraperitoneal (1 hora antes) de una solución de 5- bromodeoxiuridina, en dosis equivalente a 50 mg/Kg de peso corporal. En cada animal se extrajo el riñón derecho que fue procesado para la técnica inmunohistoquímica de Brdu.

**TABLAS
Y
RESULTADOS**

EXPERIMENTO I

Estudio de la expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de animales intactos, durante un período circadiano.

TABLA 1
Valores de expresión del VEGF en las células tubulares del riñón de ratones machos intactos, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>"t-test" de Student</i>
00:00	0.7 ± 0.1 (6)	0.2 ± 0.2 (6)	*
04:00	1.6 ± 1.0 (6)	0.5 ± 0.2 (6)	ns
08:00	1.0 ± 1.0 (6)	0.9 ± 0.6 (6)	ns
12:00	0.7 ± 0.7 (6)	0.4 ± 0.4 (6)	ns
16:00	1.3 ± 0.8 (6)	2.3 ± 1.5 (6)	ns
20:00	3.5 ± 0.2 (6)	4.9 ± 1.4 (6)	ns
ANOVA	*	*	

* : diferencias significativas
 ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 1

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF con el “**t-test**” de **Student** entre las dos zonas, en el mismo punto horario, se observa que a las 00:00 horas, los valores de la corteza son significativamente mayores que los de la médula ($p < 0,05$).
- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF con **ANOVA** se observan diferencias significativas entre los valores de los distintos puntos horarios, en las dos zonas. De la aplicación del post test de Tukey-Kramer resulta que:
 - A nivel de la corteza, el valor de las 20:00 horas es significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de las 00:00 horas.
 - A nivel de la médula, el valor de las 20:00 horas es significativamente mayor que el de las 0:00 ($p < 0,05$), 04:00 ($p < 0,05$) y que el de las 12:00 ($p < 0,05$) horas.

TABLA 2
Valores de expresión del VEGF en las células tubulares del riñón de ratones hembras intactas, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	2.0 ± 1.9 (6)	9.9 ± 6.0 (6)	ns
04:00	1.6 ± 0.7 (6)	8.6 ± 4.1 (6)	ns
08:00	5.5 ± 1.8 (6)	8.9 ± 4.9 (6)	ns
12:00	2.3 ± 1.5 (6)	12.8 ± 5.1 (6)	ns
16:00	5.2 ± 3.7 (6)	10.5 ± 4.0 (6)	ns
20:00	8.0 ± 5.0 (6)	1.2 ± 0.5 (6)	ns
ANOVA	ns	ns	

ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 2

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF con el “**t-test**” de **Student** entre las dos zonas, en el mismo punto horario, no se observan diferencias significativas.
- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF con **ANOVA** no se observan diferencias significativas entre los valores de los distintos puntos horarios, en ninguna de las dos zonas.

TABLA 3
Comparación de los valores de expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza, entre ratones machos y hembras intactos, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	0.7 ± 0.1 (6)	2.0 ± 1.9 (6)	ns
04:00	1.6 ± 1.0 (6)	1.6 ± 0.7 (6)	ns
08:00	1.0 ± 1.0 (6)	5.5 ± 1.8 (6)	ns
12:00	0.7 ± 0.7 (6)	2.3 ± 1.5 (6)	ns
16:00	1.3 ± 0.8 (6)	5.2 ± 3.7 (6)	ns
20:00	3.5 ± 0.2 (6)	8.0 ± 5.0 (6)	ns

ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 3

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF de las células tubulares de la corteza correspondientes a los machos y a las hembras, no se observan diferencias significativas entre los mismos, en ninguno de los puntos horarios analizados.

TABLA 4
Comparación de los valores de expresión del VEGF en las células tubulares de la médula, entre ratones machos y hembras intactos, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	0.2 ± 0.2 (6)	9.9 ± 6.0 (6)	ns
04:00	0.5 ± 0.2 (6)	8.6 ± 4.1 (6)	ns
08:00	0.9 ± 0.6 (6)	8.9 ± 4.9 (6)	ns
12:00	0.4 ± 0.4 (6)	12.8 ± 5.1 (6)	*
16:00	2.3 ± 1.5 (6)	10.5 ± 4.0 (6)	ns
20:00	4.9 ± 1.4 (6)	1.2 ± 0.5 (6)	ns

* : diferencias significativas
ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 4

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF de las células tubulares de la médula entre ambos sexos, observamos que a las 12:00 horas, los valores correspondientes a las hembras son significativamente mayores que los de los machos ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO II

Estudio de la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón de animales intactos, durante un período circadiano.

TABLA 5
Valores de ADNs en las células tubulares del riñón de ratones machos intactos, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	1.04 ± 0.1 (6)	0.24 ± 0.02 (6)	**
04:00	0.07 ± 0.02 (7)	0.01 ± 0.003 (6)	*
08:00	0.13 ± 0.05 (6)	0.1 ± 0.07 (6)	ns
12:00	0.18 ± 0.06 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	*
16:00	0.07 ± 0.01 (6)	0.04 ± 0.007 (6)	*
20:00	0.28 ± 0.19 (7)	0.02 ± 0.01 (6)	ns
ANOVA	**	**	

* : diferencias significativas
 **: diferencias altamente significativas
 ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 5

- ❖ Cuando comparamos la ADNs correspondiente a las células tubulares de las dos zonas, con el “**t-test**” de Student, se observa que los valores de la corteza son significativamente mayores que los de la médula a las 0:00 ($p < 0,001$), 04:00 ($p < 0,01$), 12:00 ($p < 0,05$) y 16:00 ($p < 0,05$) horas.
- ❖ Cuando comparamos la ADNs con ANOVA, se observan diferencias altamente significativas entre los valores de los distintos puntos horarios, en las dos zonas. De la aplicación del post test de Tukey-Kramer resulta que:
 - A nivel de la corteza, los valores de las 00:00 horas son significativamente mayores ($p < 0,001$) que los de las 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 y 20:00 horas.
 - A nivel de la médula, los valores de las 00:00 horas son significativamente mayores que los de las 04:00 ($p < 0,001$), 08:00 ($p < 0,05$), 12:00 ($p < 0,001$), 16:00 ($p < 0,01$) y 20:00 ($p < 0,001$) horas.

TABLA 6
Valores de ADNs en las células tubulares del riñón de ratones hembras intactas, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	0.15 ± 0.06 (6)	0.01 ± 0.01 (6)	ns
04:00	0.13 ± 0.03 (7)	0.01 ± 0.01 (6)	*
08:00	0.05 ± 0.02 (7)	0.01 ± 0.01 (7)	*
12:00	0.07 ± 0.01 (6)	0.03 ± 0.03 (6)	ns
16:00	0.04 ± 0.01 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	ns
20:00	0.7 ± 0.5 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	ns
<i>ANOVA</i>	ns	ns	

***** : diferencias significativas
ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 6

- ❖ Cuando se compara la ADNs entre las dos zonas, con el “**t-test**” de **Student**, se observa que los valores correspondientes a la corteza son significativamente mayores que los de la médula, a las 04:00 ($p < 0,005$) y 08:00 ($p < 0,05$) horas.
- ❖ Cuando comparamos la ADNs con **ANOVA**, no se observan diferencias significativas entre los valores de los distintos puntos horarios, en ninguna de las dos zonas.

TABLA 7
Comparación de los valores de ADNn en las células tubulares de la corteza, entre ratones machos y hembras intactos, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	1.04 ± 0.11 (6)	0.15 ± 0.06 (6)	**
04:00	0.07 ± 0.02 (7)	0.13 ± 0.03 (7)	ns
08:00	0.13 ± 0.05 (6)	0.05 ± 0.01 (7)	ns
12:00	0.18 ± 0.06 (6)	0.07 ± 0.01 (6)	ns
16:00	0.07 ± 0.01 (6)	0.04 ± 0.01 (6)	ns
20:00	0.28 ± 0.19 (7)	0.7 ± 0.5 (6)	ns

******: diferencias altamente significativas
ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 7

- ❖ Cuando comparamos la ADNs de las células tubulares de la corteza, entre ambos sexos, observamos que los valores correspondientes a los machos son significativamente mayores ($p < 0,001$) que los de las hembras a las 00:00 horas.

TABLA 8
Comparación de los valores de ADNs en las células tubulares de la médula, entre ratones machos y hembras intactos, a lo largo de un período circadiano

<i>Hora del día</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
00:00	0.24 ± 0.02 (6)	0.01 ± 0.01 (6)	**
04:00	0.01 ± 0.003 (6)	0.01 ± 0.01 (6)	ns
08:00	0.1 ± 0.06 (6)	0.01 ± 0.01 (7)	ns
12:00	0.02 ± 0.01 (6)	0.03 ± 0.02 (6)	ns
16:00	0.04 ± 0.007 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	ns
20:00	0.02 ± 0.01 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	ns

******: diferencias altamente significativas
ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 8

- ❖ Cuando comparamos la ADNs de las células tubulares de la médula, entre ambos sexos, observamos que los valores correspondientes a los machos son significativamente mayores ($p < 0,001$) que los de las hembras a las 00:00 horas.

EXPERIMENTO III

Estudio de la expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón, a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía.

TABLA 9
Expresión del VEGF en las células tubulares del riñón de ratones machos intactos y nefrectomizados (Nx), sacrificados a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.7 ± 0.7 (6)	0.4 ± 0.4 (6)	ns
50 hs. Nx	30.1 ± 5.6 (6)	46.2 ± 11.4 (6)	ns
7 días Nx	14.4 ± 4.1 (6)	24.9 ± 13.3 (6)	ns
ANOVA	**	*	

* : diferencias significativas
 ** : diferencias altamente significativas
 ns : diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 9

- ❖ Cuando se comparan los valores de expresión del VEGF correspondientes a las dos zonas, con el “**t-test**” de Student, no observamos diferencias significativas en ninguno de los puntos horarios estudiados.
- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF con ANOVA, se observan diferencias significativas entre los correspondientes a las dos zonas, en los distintos puntos horarios estudiados. De la aplicación del post test de Tukey-Kramer resulta que:
 - Los valores de expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza, a las 50 horas de la nefrectomía, son significativamente mayores que los de los intactos ($p < 0,001$) y que los de los animales sacrificados a los 7 días post nefrectomía ($p < 0,05$)
 - Los valores de expresión del VEGF en las células tubulares de la médula a las 50 horas de la nefrectomía son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de los intactos.

TABLA 10
Expresión del VEGF en las células tubulares del riñón de ratones hembras intactas y nefrectomizadas (Nx), sacrificadas a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	2.3 ± 1.5 (6)	12.8 ± 5.1 (6)	ns
50 hs. Nx	4.4 ± 1.8 (6)	62.7 ± 3.4 (6)	**
7 días Nx	3.9 ± 1.0 (6)	58.3 ± 2.6 (6)	**
ANOVA	ns	**	

******: diferencias altamente significativas
ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 10

- ❖ Cuando se comparan los valores de expresión del VEGF correspondientes a las dos zonas, con el “**t-test**” de **Student**, observamos que, tanto a las 50 horas como a los 7 días posteriores a la nefrectomía, los valores de la médula son significativamente mayores ($p < 0,001$) que los de la corteza.

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF con **ANOVA**, observamos que:
 - En la corteza no existen diferencias significativas entre los distintos puntos horarios estudiados.

 - En la médula se observan diferencias altamente significativas. De la aplicación del post test de Tukey-Kramer resulta que, los valores de VEGF a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía, son significativamente mayores ($p < 0,001$) que los de los intactos.

TABLA 11
Comparación entre los valores del VEGF en la corteza del riñón de ratones machos y hembras intactos y nefrectomizados (Nx), sacrificados a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.7 ± 0.7 (6)	2.3 ± 1.5 (6)	ns
50 hs. Nx	30.1 ± 5.6 (6)	4.4 ± 1.8 (6)	**
7 días Nx	14.4 ± 4.1 (6)	3.9 ± 1.0 (6)	*

* : diferencias significativas
 **: diferencias altamente significativas
 ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 11

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF de las células tubulares de la corteza correspondientes a los machos y a las hembras, observamos que:
 - A las 50 horas de la nefrectomía los valores de los ratones machos son significativamente mayores que los de las hembras ($p < 0,001$).
 - A los 7 días de la nefrectomía los valores de los ratones machos son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de las hembras.

TABLA 12
Comparación entre los valores del VEGF en la médula del riñón de ratones machos y hembras intactos y nefrectomizados (Nx), sacrificados a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.4 ± 0.4 (6)	12.8 ± 5.1 (6)	*
50 hs. Nx	46.2 ± 11.4 (6)	62.7 ± 3.4 (6)	ns
7 días Nx	24.9 ± 13.3 (6)	58.3 ± 2.6 (6)	*

* : diferencias significativas
 ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 12

- ❖ Cuando comparamos los valores de expresión del VEGF de las células tubulares de la médula correspondientes a los machos y a las hembras, observamos que:
 - Los valores en la médula de las hembras intactas, son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de los machos.
 - A los 7 días de la nefrectomía, los valores en la médula de las hembras son significativamente mayores que los de los machos ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO IV

Estudio de la síntesis de ADN en las células tubulares de la corteza y de la médula externa del riñón, a las 50 horas y a los 7 días posteriores a la nefrectomía.

TABLA 13
Valores de ADNs en las células tubulares del riñón de ratones machos intactos y nefrectomizados (Nx), sacrificados a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.18 ± 0.06 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	*
50 hs. Nx	0.53 ± 0.2 (7)	0.06 ± 0.03 (6)	*
7 días Nx	0.35 ± 0.06 (7)	0.04 ± 0.02 (6)	*
ANOVA	ns	ns	

* : diferencias significativas
 ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 13

- ❖ Cuando se comparan los resultados de ADNs entre las dos zonas, con el “**t-test**” de Student, observamos que:
 - En los animales intactos, los valores de las células tubulares de la corteza, son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de la médula.
 - A las 50 horas de la nefrectomía, los valores de las células tubulares de la corteza son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de la médula.
 - A los 7 días de la cirugía los valores de la corteza son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de la médula.

TABLA 14
Valores de ADNs en las células tubulares del riñón de ratones hembras intactas y nefrectomizadas (Nx), sacrificadas a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Corteza</i>	<i>Médula</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.07 ± 0.01 (6)	0.03 ± 0.03 (6)	ns
50 hs. Nx	0.49 ± 0.15 (7)	0.02 ± 0.01 (6)	*
7 días Nx	0.35 ± 0.12 (7)	0.05 ± 0.02 (7)	*
ANOVA	ns	ns	

* : diferencias significativas
ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 14

- ❖ Cuando se comparan los resultados de las dos zonas, correspondientes a las hembras con el “**t-test**” de **Student**, observamos que:
 - A las 50 horas de la nefrectomía los valores de ADNs en la corteza son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de la médula.
 - A los 7 días de la nefrectomía los valores de ADNs en la corteza son significativamente mayores ($p < 0,05$) que los de la médula.

TABLA 15
Comparación entre los valores de ADNs en la corteza del riñón de ratones machos y hembras intactos y nefrectomizados (Nx), sacrificados a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.18 ± 0.06 (6)	0.07 ± 0.01 (6)	ns
50 hs. Nx	0.53 ± 0.2 (7)	0.49 ± 0.15 (7)	ns
7 días Nx	0.35 ± 0.06 (7)	0.35 ± 0.12 (7)	ns

ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 15

- ❖ No se observan diferencias significativas entre los valores de ADNs de las células tubulares de la corteza correspondientes a los ratones machos y hembras.

TABLA 16
Comparación entre los valores de ADNs en la médula del riñón de ratones machos y hembras intactos y nefrectomizados (Nx), sacrificados a las 50 horas o a los 7 días post-cirugía

<i>Tratamiento</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>	<i>“t-test” de Student</i>
Intactos	0.02 ± 0.01 (6)	0.03 ± 0.03 (6)	ns
50 hs. Nx	0.06 ± 0.03 (6)	0.02 ± 0.01 (6)	ns
7 días Nx	0.04 ± 0.02 (6)	0.05 ± 0.02 (7)	ns

ns: diferencias no significativas

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA 16

❖ No se observan diferencias significativas entre los valores de ADNs, de las células de la médula, correspondientes a los ratones machos y hembras en ninguno de los puntos horarios estudiados.

DISCUSIÓN

En el riñón normal, el VEGF es constitutivamente expresado en las células de los túbulos proximales (segmento S3) y en las células de la región yuxtamedular, existiendo en el estado de salud un fino balance en su nivel de expresión, debido a la regulación de sus isoformas funcionalmente diferentes y a la co-expresión de sus inhibidores (**Advani, et. al., 2007**). Esta situación se ve reflejada en el presente trabajo ya que nuestros resultados muestran que las células tubulares del riñón de ratones adultos intactos presentan inmunomarcación positiva para el VEGF.

En estudios realizados en riñones normales de pacientes con nefroureterectomía se demostró una expresión del VEGF en las células epiteliales de los túbulos, con mayor intensidad en los colectores y distales y más débil o moderada en los proximales, mientras que no se observó en las células del asa de Henle, resultando la expresión del VEGF significativamente mayor en la corteza renal que en la médula externa e interna (**Baderca, et. al., 2006**) (**Schrijvers, et. al., 2004**). Nosotros observamos que en los ratones machos intactos no existen diferencias zonales en la expresión del VEGF excepto a las 00:00 hs, momento en el cual los valores de las células de los túbulos correspondientes a la corteza son mayores que los de la médula externa.

Por otro lado, se han reportado fluctuaciones circadianas en las concentraciones plasmáticas de VEGF en las distintas especies. Por ejemplo, en roedores que son activos nocturnamente, las concentraciones plasmáticas del VEGF se incrementan durante el día (período de descanso) mientras que en humanos que son activos diurnamente, el pico se produce a la noche (período de descanso) y el valle durante el día (**Endo, et al., 2002**) (**Koyanagai, et al., 2003**).

Estos resultados podrían estar en concordancia con los nuestros ya que observamos que, tanto en las células epiteliales tubulares de la corteza como en las de la médula en los ratones machos intactos, los valores de expresión de VEGF presentan un pico a las 20:00 horas, durante el período de actividad de los animales, lo que podría traducirse en un aumento de su concentración plasmática en el período de descanso siguiente.

En las hembras, si bien no observamos la existencia de un ritmo circadiano en la expresión del VEGF en ninguna de las dos zonas, en la corteza aunque los resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas, los valores más altos se observan a las 20:00 horas (de manera similar a lo que ocurre en los machos) y en la médula, a las 12:00 hs. En este caso la falta de evidencia de un ritmo circadiano podría equipararse a lo observado en estudios realizados en mujeres cuyos niveles del VEGF en el plasma no presentan ritmo circadiano pero sí variación a lo largo del ciclo menstrual, del mismo modo que en el útero de rata, en los que la progesterona y los estrógenos regulan los niveles del VEGF y del VEGF ARNm (**Heer, et al., 1998**) (**Wood, et al., 2005**).

Coincidentemente con estos resultados, en trabajos previos demostramos que los hepatocitos del hígado de ratones adultos expresan VEGF con un ritmo circadiano definido, independientemente del sexo, cuyo pico se produce a las 20:00 horas y el valle a las 04:00 horas. Si lo relacionamos con los eventos del ciclo celular, el pico de expresión del VEGF, al igual que en el presente trabajo, ocurre en la fase G1 (**Fernández Blanco, et al., 2011**).

Cuando comparamos los resultados entre machos y hembras, a nivel del compartimiento cortical o medular en general, no observamos diferencias entre los valores de expresión del VEGF, por lo que podríamos afirmar que en ambos sexos se expresa con similar distribución e intensidad dentro del parénquima renal.

Respecto de la actividad proliferativa de las células tubulares renales, la síntesis de ADN (ADNs) en los ratones machos también muestra un evidente ritmo circadiano, tanto en la corteza como en la médula, con un pico a las 00:00 y valores más bajos a las 04:00 horas. Estos resultados coinciden con los del grupo de Burns quienes hallaron un pico de captación de timidina tritiada en el riñón de ratones, entre las 21:00 y las 04:00 horas (precediendo en 8 a 12 horas a la mitosis). De estos datos se desprende que las células sintetizan su ADN durante el período de actividad (oscuridad) y se dividen durante el momento de reposo (período de luz) (**Burns, et al., 1972**). Del mismo modo, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la existencia de ritmos circadianos en la actividad mitótica de hepatocitos, enterocitos, sialocitos acinares, renocitos y queratinocitos linguales y epidérmicos de ratones machos. En estas poblaciones

celulares el pico de actividad mitótica se encontró coincidentemente, en el momento de reposo de los animales y el valle en el momento de actividad. Por otro lado, cuando estudiamos las células de los túbulos contorneados proximales y distales de la corteza del riñón de ratones jóvenes, la actividad mitótica presentó su valor más alto a las 08:00 y el más bajo a las 04:00 horas (**Errecalde, 1994**) (**García, et al., 1997**) (**Inda, et al., 1999**).

En el presente trabajo, en los ratones hembra, a diferencia de los machos, no observamos un ritmo circadiano evidente en la ADNs. Si bien encontramos valores más altos a las 20:00 horas en la corteza y a las 12:00 horas en la médula, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este hecho podría ser consecuencia de que los esteroides sexuales que actúan sobre el hipotálamo para regular la liberación de la hormona del crecimiento (GH) desde la hipófisis a la sangre, lo hacen con una periodicidad de 30 minutos en las hembras, en contraste a la periodicidad de 4 horas de los machos (**Gerhold, et al., 2007**).

Al mismo tiempo, nosotros observamos que en ambos sexos existen diferencias en la distribución de la ADNs en las células tubulares renales, ya que los valores de la corteza son mayores que los de la médula, en casi todos los puntos horarios estudiados. Sin embargo, cuando comparamos los valores de ADNs entre los sexos, dentro de la misma zona, en general, no observamos diferencias significativas.

Por otro lado, ha sido comprobado que una reducción en la masa renal lleva a una serie de eventos biológicos que conducen a un incremento compensatorio en masa y función. Por ejemplo, en las primeras horas después de una nefrectomía se produce un incremento significativo de factores positivos (c-jun, ciclina C, ciclina E, etc.) y de factores negativos (p53, Rb, gas-2, etc.) en el tejido remanente. Así la nefrectomía unilateral induce estímulos que promueven el crecimiento en paralelo con señales que lo inhiben. El entendimiento de los mecanismos que subyacen en el crecimiento compensatorio del riñón remanente, puede ayudar a esclarecer la progresión de las enfermedades renales e identificar potenciales blancos para la intervención terapéutica (**Sinuani, et al., 2010**).

Varios factores han sido implicados en las diferentes formas de crecimiento compensatorio renal (CCR) entre los que podemos mencionar a la GH, al IGF-1, al TGF- β y al VEGF **(Yildiz, et al., 2008)**.

Después de una injuria renal, la progresión a través del ciclo celular puede conducir a la ADNs y a la mitosis pero, factores hipertróficos tales como la angiotensina II (ANG II), el TGF β y la glucosa, incrementan los niveles de los inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas (cdk), lo cual causa detenimiento del ciclo celular en G1. Este hecho, asociado con un incremento en el contenido de proteínas y ARN pero sin aumento de la ADNs, lleva a la hipertrofia celular **(Shankland and Wolf, 2000)**. Aunque los mecanismos del CCR todavía permanecen oscuros, se ha propuesto que la hipertrofia puede ser un requisito previo para la progresión del daño renal que se presenta en diversas formas de insuficiencia renal crónica **(Yildiz, et al., 2008)**.

En organismos adultos el crecimiento compensatorio del riñón remanente ocurre, principalmente, a través de la hipertrofia de las células tubulares, proceso mediado por un mecanismo dependiente del ciclo celular. El TGF- β es uno de los principales factores causantes de hipertrofia tubular y se considera que juega un rol fundamental en el CCR. Este factor de crecimiento interviene en diversas funciones celulares normales y en muchos de los cambios patológicos asociados con una variedad de enfermedades renales. Sus funciones incluyen la regulación de la proliferación celular, la acumulación de matriz extracelular, la fibrosis glomerular e intersticial y la progresión de glomeruloesclerosis. La producción de TGF- β por las células mesangiales es regulada por otros factores como la ANG II, el IGF-I, el HGF, el FGF b, el TNF- α , el EGF, el PDGF y la IL-10 **(Liu, 2005) (Liu and Preisig, 2002) (Sinuani, et al., 2010)**.

Las células de los túbulos proximales sobrevivientes a una injuria se desdiferencian, proliferan y luego se rediferencian para regenerar la masa celular perdida. Las señales del TGF- β autocrino fluctúan, controlando el estado de crecimiento y diferenciación y en forma independiente pero, sinérgicamente con la hipoxia, regulan la expresión del VEGF en las células de los túbulos proximales del riñón **(Geng, et al., 2009) (Nakagawa, et al., 2004)**.

El grupo de trabajo de Kang ha sugerido que en el modelo de nefrectomía parcial, se produce pérdida de endotelio que podría estar mediada por un decrecimiento en la expresión del VEGF constitutivo de los podocitos glomerulares y de las células tubulares, proceso que estaría ligado a proteinuria e infiltración de macrófagos y citoquinas asociadas (IL 1- β , IL 6 y TNF) que inhiben la expresión de ARNm del VEGF. Este hecho fue corroborado en experimentos posteriores donde se observó que a las cuatro semanas del tratamiento con VEGF 121 en ratas machos, se produjo un incremento en la proliferación y preservación del endotelio de los capilares peritubulares **(Kang, Hughes, et al., 2001) (Kang, Joly, et al., 2001) (Kang, et al., 2002)**.

Los hallazgos de otros autores indican que el VEGF también juega un rol importante en la respuesta compensatoria renal después de la uninefrectomía, ya que es requerido para el crecimiento y la proliferación de las células endoteliales glomerulares y peritubulares que se producen en respuesta a la reducción nefronal **(Baderca, et al., 2006) (Flyvbjerg, et al., 2002) (Manotham, et al., 2004 a) (Schrijvers, et al., 2004)**.

Coincidentemente con estos autores, en nuestro trabajo observamos que en los riñones de los ratones machos, los valores de expresión del VEGF en las células tubulares de la corteza y de la médula aumentan a las 50 horas de la nefrectomía. Por otro lado, a los 7 días posteriores a la cirugía estos valores disminuyen significativamente, pero sólo en el compartimiento cortical. Este aumento en la expresión del VEGF no va acompañado por un aumento en la ADNs, por lo que podría considerarse como resultante de una hipertrofia. De ser así, concordaríamos con los resultados de Liu y Preisig quienes demostraron que el CCR siguiente a la uninefrectomía, tanto en ratas como en ratones machos, involucra hipertrofia de las células de los túbulos proximales, mediante un mecanismo dependiente del ciclo celular, con activación de Cdk 4 / ciclina D y falla en la activación de Cdk 2 / ciclina E suficiente para entrar en la fase S, mecanismo equivalente al responsable de la hipertrofia de los túbulos proximales en la diabetes mellitus **(Liu and Preisig, 2002)**.

Manothan y colaboradores notaron que en la corteza de ratas machos, a los 4 y a los 7 días después de la nefrectomía parcial (5/6), existen gran cantidad de túbulos

hipertróficos y en condiciones de hipoxia. Observaron además, un aumento en la proliferación de las células endoteliales en el área hipóxica, sugiriendo que ésta puede ser una de las vías de neoangiogénesis, con un incremento en los niveles del ARNm de varios genes, incluyendo el del VEGF **(Manotham, et al., 2004 a) (Manotham, et al., 2004 b)**.

Del mismo modo, el grupo de trabajo de Kang observó que en los túbulos corticales de ratas hembras, después de la nefrectomía parcial, el porcentaje del área positiva para la expresión del VEGF en correlación con la densidad capilar peritubular se incrementó, en comparación con la de los machos, demostrando que la remodelación vascular renal favorable y la neoangiogénesis, con incremento de la expresión de VEGF es más prominente en ratas hembras **(Kang, Anderson, et al., 2001) (Kang, et al., 2002) (Kang, et al., 2004)**.

En oposición con estos autores nuestros resultados muestran que en las células tubulares de la corteza de las hembras, en contraste con lo que ocurre en los ratones machos, no hay diferencias entre los valores de expresión del VEGF de los animales intactos y los nefrectomizados, en ninguno de los tiempos post-cirugía estudiados. Sin embargo en la médula, como sucede en los machos, estos valores aumentan a las 50 horas y se mantienen altos a los 7 días posteriores a la nefrectomía. Las discrepancias entre nuestros resultados y los de otros grupos de trabajo podrían deberse a las distintas especies utilizadas y/o a la extensión de la ablación renal.

En nuestro modelo experimental es clara la evidencia de una diferencia en el comportamiento entre machos y hembras ya que, mientras que en los machos los valores del VEGF de las células tubulares de las dos zonas son similares, en las hembras nefrectomizadas, los valores de expresión del VEGF de las células tubulares de la médula son mayores que los de la corteza. A su vez, cuando realizamos la comparación a nivel zonal, apreciamos que en la corteza, los valores de VEGF de los machos son mayores que los de las hembras, en los dos tiempos post-nefrectomía considerados. Mientras tanto, en la médula de las hembras intactas y en las sacrificadas a los 7 días de la nefrectomía, estos valores son mayores que los de los machos. Estos resultados

sustentan el concepto de la existencia de diferencias sexuales y zonales en el CCR inicial.

Numerosos estudios indican que los esteroides gonadales causan dimorfismo sexual en una variedad de propiedades morfológicas y/o funcionales en los riñones de los mamíferos. Por ejemplo, los andrógenos incrementan la reabsorción de sodio y la presión intraglomerular por la modulación del tono de las arteriolas aferentes y eferentes vía ANG II, endotelina y estrés oxidativo. En contraste, las hormonas sexuales femeninas llevan a una vasodilatación renal y a un decrecimiento de la fracción de filtración (**Garibotto, et al., 2007**). Además, estas hormonas a través de su interacción con el sistema renina-angiotensina (RAS) inducen hipoxia renal vía mecanismos hemodinámicos y no hemodinámicos (**Gandolfo, et al., 2004**) (**Nangaku and Fujita, 2008**). En las enfermedades renales en humanos y en modelos animales, el receptor de estrógenos (ER) media los eventos que modulan las diferencias sexuales observadas. Así, ratones hembras carentes de ER α tienen un crecimiento renal reducido después de las 2 semanas de la inducción de diabetes mellitus y durante el crecimiento compensatorio, a las 48 horas de la uninefrectomía (**Funahashi, et al., 2009**).

Las diferencias sexuales en la masa renal fueron primero descritas en ratones y ratas y posteriormente se comprobaron en riñones humanos. La causa del mayor tamaño de este órgano en los machos no es debida a la diferencia en el número de nefronas (el número de glomérulos por riñón en machos y en hembras es similar) sino a la acción anabólica de los andrógenos, que afectan el crecimiento por hipertrofia de las células de los túbulos localizados en la corteza (**Garibotto, et al., 2007**), al igual que lo observado en el presente trabajo.

Por otro lado, en ratas machos el incremento de la GH durante el CCR posterior a la nefrectomía está dissociado del IGF-I por lo que ha sido postulado que esta hormona actúa directamente sobre el riñón, o a través de otro factor; un candidato potencial es la ANG II. La GH circulante incrementa la ANG II en el plasma y viceversa, indicando que los mecanismos que gobiernan su regulación están interrelacionados. En el riñón, la mayoría de las acciones de la ANG II son mediadas a través de los receptores de angiotensina (AT1Rs), que regulan la expresión de genes involucrados en funciones

cruciales como crecimiento, diferenciación y desarrollo y activan señales asociadas a la proliferación e hipertrofia, en una gran variedad de células. Estos datos sugieren que la GH circulante media el crecimiento del riñón remanente in vivo, por la modulación de los AT1Rs. Los mecanismos de esta inducción podrían tener importancia para el crecimiento normal y la homeostasis de fluidos y electrolitos y también en condiciones patológicas tales como, la nefropatía diabética e hipertensión. Conjuntamente, ha sido señalado que la ANG II induce la expresión del TGF- β en cultivos de células mesangiales y subsecuentemente, aumenta la deposición de matriz, un paso integral para el desarrollo y progresión de la enfermedad renal **(Madsen, et al., 2010) (Mok, et al., 2003) (Rogers, et al., 2007)**.

Hallazgos recientes sugieren que existen diferencias sexuales en la regulación de los AT1Rs, por ejemplo, la nefrectomía estimula un incremento rápido en la expresión del AT1R glomerular en ratas machos adultas pero no en el riñón remanente de las hembras. Se planteó que hay una correlación inversa entre la expresión del ER α y el AT1R glomerular y que la renoprotección observada en las hembras ocurre, en parte, por la atenuación de la actividad de los AT1R, mediada por E2. La activación del RAS endógeno en las células epiteliales de los túbulos proximales lleva al incremento en la síntesis de ANG II **(Feliers and Kasinath, 2010) (Rogers, et al., 2007)**. Al mismo tiempo, existen evidencias que la ANG II incrementa rápidamente la expresión del VEGF en las células de los túbulos proximales. Este efecto comienza a los 5 minutos del tratamiento con ANG II y retorna a los niveles basales dentro de los 45 minutos. Una exposición de mayor duración a la ANG II estaría asociada con una regulación transcripcional del VEGF. La ANG II y el VEGF también están implicados en la hipertrofia renal que se produce en la diabetes, donde la hiperglucemia puede provocar un incremento en la producción local de ANG II en los túbulos proximales que, a su vez, puede estimular la síntesis rápida del VEGF para regular procesos celulares importantes tales como la síntesis de proteínas **(Feliers, et al., 2005)**.

Por otra parte y sosteniendo el concepto de que el crecimiento capilar es mediado por un balance complejo entre factores solubles positivos y negativos, en adición a interacciones célula-célula o célula-matriz, algunos estudios han reportado que existe una relación entre el VEGF y el IGF-1 **(Carmeliet, 2000) (Kitamoto, et al., 1997)**.

El grupo de trabajo de Mulroney señaló que tanto en ratas hembras adultas como en ratas machos jóvenes, el CCR después de la uninefrectomía tiene un componente hiperplásico significativo, asociado con un incremento en la expresión del IGF-I. Al mismo tiempo proponen que el incremento de la testosterona durante la pubertad en el macho, provee un disparo que altera el mecanismo desde una hiperplasia significativa a una hipertrofia predominante. La testosterona regula la secreción de la GH que alcanza los niveles más altos durante y al final de la pubertad. Se supone que los efectos promotores de la GH son mediados por la liberación del IGF-I a la circulación y posterior unión a los receptores o por acción directa de la GH sobre un órgano, estimulando al IGF-I. Este mecanismo es consistente con el conocimiento de que los esteroides gonadales juegan un rol en los mecanismos alternativos observados con la edad en el macho y entre los sexos en adultos. Todos estos resultados parecen correlacionarse bien con hallazgos en humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que los donantes masculinos o pacientes con un solo riñón, presentan proteinuria significativa, glomeruloesclerosis focal e hipertensión incrementada, mientras que los donantes femeninos no. Aunque es sabido que la GH y el IGF-I actúan independientemente uno de otro en ciertos procesos metabólicos como gluconeogénesis y transporte de fosfato renal, pueden estar ligados en la estimulación del crecimiento. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones en el desarrollo de daño renal después de la uninefrectomía **(Mulroney and Pesce, 2000) (Mulroney, et al., 1991) (Mulroney, et al., 1999)**.

La hibridización in situ demostró que el ARNm del IGF-I tubular se localiza predominantemente en los túbulos colectores, tanto en la región cortical como medular. También se encontraron sitios múltiples de unión para el IGF-I dentro del riñón y el ARNm del receptor está ampliamente distribuido en las células de los túbulos contorneados proximales y distales, túbulos colectores y en las células mesangiales. El ARNm del receptor de la hormona del crecimiento (GHR) se expresa en los túbulos proximales, en la rama descendente delgada, en la rama ascendente gruesa y en el sistema de conductos colectores en el riñón de rata **(Dimke, et al., 2007)**.

Durante el CCR en ratones machos adultos intervienen tanto mecanismos de hiperplasia como de hipertrofia. Dentro de la hora siguiente a la nefrectomía la síntesis de ARN se duplica en el riñón remanente y permanece estable por 48 horas. La síntesis

de ADN comienza a aumentar después de las 10 horas y alcanza el máximo a las 48 horas. Estos valores vuelven a los niveles basales aproximadamente a los 5 días después de la cirugía (**Liu and Preisig, 2002**).

Los grupos de trabajo de Sun y de Maga notaron que en ratones de ambos sexos, después de la nefrectomía, hay un período inicial de 48 horas de crecimiento hiperplásico en el compartimiento cortical (**Maga and Hubscher, 2003**) (**Sun, et al., 2006**). Por el contrario, nosotros observamos que tanto a las 50 horas como a los 7 días posteriores a la cirugía, los valores de ADNs en las células tubulares corticales y medulares de los animales nefrectomizados de ambos sexos, se mantuvieron en valores normales. Tampoco observamos diferencias significativas cuando comparamos los valores de ADNs entre los sexos, dentro de la misma zona. Esto podría estar explicado por los resultados obtenidos por el grupo de trabajo de Sinuani, que señalan que la nefrectomía inicia procesos proliferativos en el riñón remanente, con un máximo a las 24 horas posteriores a la cirugía. Esta proliferación transitoria, que disminuye dentro de los días siguientes, es acompañada por la aparición de hipertrofia. Esto coincide con niveles bajos del TGF- β en las células tubulares del tejido renal remanente y en el plasma, durante el primer día siguiente a la nefrectomía. A las 48 horas se produce un incremento en la expresión de este factor, con un pico a la semana y un retorno a sus niveles basales a las 2 - 4 semanas de la cirugía. También refieren que el grado de proliferación inicial, predice el grado de hipertrofia en el riñón remanente “in vivo” (**Sinuani, et al., 2006**) (**Sinuani, et al., 2009**).

Wolf, por su parte, ha indicado que la ANG II, por un lado estimula la expresión del TGF- β a través de los receptores AT1 y por otro la expresión del VEGF. Este factor, a su vez sobre regula el receptor tipo II del TGF- β , induciendo la hipertrofia de las células tubulares a través de mecanismos que involucran la entrada de las células a la fase G1 pero, detienen su progresión a través del ciclo celular antes del punto de restricción G1-S. Por lo tanto, los estímulos promitogénicos de factores tales como el EGF, IGF-I, FGF, IL-10 y HGF, que inducen a las células desde G0 a G1, son eventos necesarios que luego son convertidos a hipertrofia por efectos antiproliferativos del TGF- β en G1 tardío (**Sinuani, et al., 2009**) (**Wolf, 2006**).

Es bien conocido que después de una injuria la generación de células nuevas es un pre-requisito para restablecer la función normal del órgano injuriado. Bajo condiciones normales menos del 1 % de las células tubulares del riñón proliferan pero, en respuesta a una injuria muchas células normalmente quiescentes, entran en el ciclo celular con aumento en la síntesis de ADN e inducción de genes como c-fos, c-jun y egr-1. Estos eventos ocurren por estrés o muerte celular, pero no está claro en qué medida contribuyen con la injuria o con la protección y recuperación (**Price, et al., 2009**) (**Schmitt and Cantley, 2008**).

Al respecto, algunos estudios han mostrado que las células nuevas derivan de divisiones de células diferenciadas y otros han sugerido que una subpoblación del epitelio tubular renal funciona como células progenitoras. Estudios previos revelaron que la proliferación celular tubular en ratas sanas recae sobre la división de células diferenciadas (**Maeshima, et al., 2003**) (**Vogetseder, et al., 2005**). También ha sido señalado que el comportamiento cíclico es cuantitativamente diferente en el laberinto cortical, que comprende los segmentos S1 y S2 de los túbulos proximales, comparados con el S3. El período de tiempo para pasar a través de la fase G1 es 2 veces más largo en S1 y S2 que en S3. En el segmento S3 alrededor del 40 % de las células están en G1. Esto implica un potente control de la progresión G1-S. El inhibidor de la ciclina dependiente de kinasa p27, que bloquea la progresión del ciclo a este nivel es abundante en todos los núcleos de S3 en ratas adultas. La injuria de esta región es seguida por una alta actividad proliferativa para reemplazar la pérdida celular. También durante el crecimiento renal en ratas juveniles este segmento despliega la mayor capacidad proliferativa de todos los segmentos del nefrón (**Vogetseder, et al., 2007**) (**Vogetseder, et al., 2008**).

Análogamente, nosotros demostramos una diferencia zonal en la actividad proliferativa en ambos sexos, solo que en nuestros resultados tanto a las 50 horas como a los 7 días posteriores a la nefrectomía, los valores de síntesis de ADN son mayores en la corteza con respecto de la médula.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES PARCIALES

- En los ratones machos intactos los valores de expresión del VEGF de las células epiteliales tubulares, tanto de la corteza como de la médula externa, presentan un ritmo circadiano con un pico a las 20:00 horas. A las 50 horas de la nefrectomía la expresión de este factor aumenta en las dos zonas y a los 7 días disminuye, solo en el compartimento cortical.
- En las hembras intactas los valores de expresión del VEGF no presentan un ritmo circadiano evidente. A las 50 horas de la nefrectomía aumentan pero, solo en las células tubulares de la médula, donde se mantienen altos hasta los 7 días post cirugía.
- En los ratones intactos no se observan diferencias sexuales, ni zonales, entre los valores de expresión del VEGF. En los ratones machos nefrectomizados, tampoco se observan diferencias zonales entre los valores de expresión de este factor; mientras que en las hembras, los valores de la médula son mayores que los de la corteza, a las 50 hs y a los 7 días post cirugía.
- En los ratones machos intactos, los valores de ADNs de las células tubulares de ambas zonas presentan un ritmo circadiano, con un pico a las 00:00 hs.; situación que no se produce en las hembras. No se observan diferencias significativas entre los valores de ADNs de los ratones de ambos sexos intactos y nefrectomizados, en ninguna de las zonas y tiempos post cirugía analizados.
- En los ratones intactos de ambos sexos, los valores de ADNs de las células tubulares de la corteza son más altos que los de la médula, al igual que en los dos tiempos post nefrectomía analizados.

CONCLUSION GENERAL

En ratones adultos intactos la nefrectomía induce un crecimiento compensatorio de tipo hipertrófico en el riñón contra lateral que involucra un aumento en la expresión del VEGF, con marcadas diferencias sexuales a nivel del compartimento cortical.

BIBLIOGRAFÍA

Advani, A.; Kelly, D.J.; Advani, S.L.; Cox, A.J.; Thai, K.; Zhang, Y.; White, K.E.; Gow, R.M.; Marshall, S.M.; Steer, B.M.; Marsden, P.A.; Rakoczy, P.E. and Gilbert, R.E. (2007). Role of VEGF in maintaining renal structure and function under normotensive and hypertensive conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 4,104 (36):14448-14453.

Anderson, C.F.; Velosa, J.A.; Frohnert, P.P.; Torres, V.E.; Offord, K.P.; Vogel, J.P.; Donadio, J.V. and Wilson, D.M. (1985). The risks of unilateral nephrectomy: Status of kidney donors 10 - 20 years postoperatively. *Mayo Clinic Proc*, 60: 367-374.

Antus, B.; Hamar, P.; Kokeny, G.; Szollosi, Z.; Mucsi, I.; Nemes, Z. and Rosivall, L. (2003). Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 18: 54-61.

Arataki, M. (1926). Experimental researches on the compensatory enlargement of the surviving kidney after unilateral nephrectomy (Albino rat). *Amer J Anat*, 36: 437-450.

Baderca, F.; Lighezan, R.; Dema, A.; Alexa, A. and Raica, M. (2006). Immunohistochemical expression of VEGF in normal human renal parenchyma. *Rom J Morphol Embryol*, 47 (4): 315-322.

Battifora, H.; Alsabeh, R. and Jenkins, K.A. (1995). Epitope retrieval (unmasking) in immunohistochemistry. *Adv Pathol Lab Med*, 8: 101-118.

Baylis, C. (1994). Age-dependent glomerular damage in the rat: Dissociation between glomerular injury and both glomerular hypertension and hypertrophy. Male gender as a primary risk. *J Clin Invest*, 94: 1823-1829.

Baylis, C. and Wilson, C.B. (1989). Sex and the single kidney. *Am J Kidney Dis*, 10: 290- 298.

Berse, B.; Brown, L.F.; Van Der Water, L.; Dvorak, H.F. and Senger, D.R. (1992). Vascular permeability factor (VEGF) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, 3: 211-220.

Bohle, A.; Christ, H.; Gruñid, K.E. and Mackensen, A. (1979). The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol*, 16: 109-114.

Bohle, A.; Mackensen-Haen, S.; Gise, H.; Gruñid, K.E.; Wehrmann, M.; Batz, C.; Bogenschutz, O.; Schmitt, H.; Nagy, J.; Muller, C. and Muller, G.A. (1990). The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerulopathies. *Pathol Res Pract*, 186: 135-144.

Bohle, A.; Mackensen-Haen, S. and Wehrmann, M. (1996). Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res*, 19: 191-195.

Bricker, N.S.; Sanclemente, E.; Shankel, S. and Shapiro, M.S. (1990). The evolution of the science of pathologic physiology. *Am J Kidney Dis*, 16: 541-547.

Brown-Grant, K. and Raisman, G. (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lon B Biol Sci*, 198: 279-296.

Burns, R.; Scheving, L.E. and Tsai, T.H. (1972). Circadian rhythm in uptake thymidine by kidney, parotid and duodenum of isoproterenol-treated mice. *Science*, 175: 71-72.

Carmeliet, P. (2000). Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6: 389-395.

Cattoretti, G.; Pileri, S. and Parravicini, C. (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*, 171: 83-98.

Choi, Y.J.; Chakraborty, S.; Nguyen, V.; Nguyen, C.; Kim, B.K.; Shim, S.I.; Suki, W.N. and Truong, L.D. (2000). Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: Altered expresión of vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol*, 31: 1491-1497.

Cohen, A. and Rosenmann, E. (1984). Male sex hormone and nephropathy in Cohen diabetic rat (Genetically selected sucrose fed). *Diabetes Metab*, 10: 199-205.

Conion, I. and Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell*, 96: 235-244.

Csikasz-Nagy, A.; Battogtokh, D.; Chen, K.C.; Novák, B. and Tyson, J.J. (2006). Analysis of a generic model of eukaryotic cell cycle regulation. *Biophysical Journal*, 90: 4361-4379.

De Vriese, A.S.; Tilton, R.G.; Elger, M.; Stephan, C.C.; Kriz, W. and Lameire, N.H. (2001). Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 12: 993-1000.

Dimke, H.; Flyvbjerg, A.; Bourgeois, S.; Thomsen, K.; Frøkiaer, J.; Houillier, P.; Nielsen, S. and Frische, S. (2007). Acute growth hormone administration induces antidiuretic and antinatriuretic effects and increases phosphorylation of NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292 (2): F723-F735.

Dubey, R.K. and Jackson, E.K. (2001). Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280: F365-F388.

Echave Llanos, J.M.; Aloisso, M.D.; Souto, M. and Surur, J.M. (1971). Circadian variations of DNA síntesis, mitotic activity and cell size of hepatocyte population in young immature male mouse growing liver. *Virchows Arch (Cell Pathol)*, 8: 309-317.

Endo, I.; Mitsui, T.; Nishino, M.; Oshima, Y. and Matsumoto, T. (2002). Diurnal fluctuation of edema synchronized with plasma VEGF concentration in a patient with POEMS syndrome. *Intern Med*, 41: 1196-1198.

Epstein, F.; Agmon, Y. and Brezis, M. (1994). Physiology of renal hypoxia. *Ann NY Acad Sci*, 718: 72-81.

Errecalde, A.L. (1994). Especificidad de población celular de las variaciones de la actividad mitótica ante la acción de factores tisulares y plasmáticos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.

Errecalde, A.L. and Echave Llanos, J.M. (1993). Effect of ES2 tumor extract and plasma of tumor bearing animals on the mitotic activity of enterocytes of young mice. *J Exp Clin Cancer Res*, 12: 75-79.

Errecalde, A.L.; Inda, A.M. and García, A.L. (1995). Ritmos circadianos en la proliferación celular. *Ciencias Morfológicas*, 1: 33-39.

Eynard, A.R.; Valentich, M.A. y Rovasio, R.A. (2008). *Histología y Embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares*. 4a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Feliers, D. and Kasinath, B.S. (2010). Mechanism of VEGF expression by high glucose in proximal tubule epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*, 314 (1): 136-142.

Feliers, D.; Duraisamy, S.; Barnes, J.L.; Ghos-Choudhury, G. and Kasinath, B.S. (2005). Translational regulation of vascular endothelial growth factor expression in renal epithelial cells by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288: F521-F529.

Ferguson, A.M.; White, L.S.; Donovan, P.J. and Piwnica-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 7: 2853-2860.

Fernández Blanco, A.; García, A.L.; Inda, A.M. and Errecalde, A.L. (2011). Vascular endothelial growth factor in expression along a circadian time span in intact adult mice liver. *Biol Rhythm Res*, 42 (2): 141-146.

Ferrara, N. (1999 a). Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*, 56: 794-814.

Ferrara, N. (1999 b). Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237: 1-30.

Ferrara, N. and Davis-Smith, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18: 4-25.

Fine, L.G. (1986). The biology of renal hypertrophy. *Kidney Int*, 29: 619-634.

Fine, L.G.; Bandyopadhyay, D. and Norman, J.T. (2000). Is there a common mechanism for the progression of different types of renal disease other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int*, 57: S22-S26.

Fine, L.G.; Nord, E.P.; Danavitch, G.M.; Kurtz, I. and Bacallao, R. (1988). Pathophysiology and nephron adaptation in chronic renal failure, in *Diseases of the Kidney*. Schrier, R.W. and Gottschalk, C.W. (eds): ed 4. Boston, Little, Brown, pp: 2985-3018.

Flyvbjerg, A.; Bennett, W.F.; Rasch, R.; Van Neck, J.W.; Groffen, C.A.; Kopchick, J.J. and Scarlett, J.A. (1999). Compensatory renal growth in uninephrectomized adult mice is growth hormone dependent. *Kidney Int*, 56: 2048-2054.

Flyvbjerg, A.; Schrijvers, B.F.; De Vriese, A.S.; Tilton, R.G. and Rasch, R. (2002). Compensatory glomerular growth after unilateral nephrectomy is VEGF dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E362-E366.

Flyvbjerg, A.; Thorlacius-Ussing, O.; Naeraa, R.; Ingerslev, J. and Ørskov, H. (1988). Kidney tissue somatomedin C and initial renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetologia*, 31: 310-314.

Funahashi, Y.; Hattori, R.; Yamamoto, T.; Kamihira, O.; Moriya, Y. and Gotoh, M. (2009). Change in contralateral renal parenchymal volume 1 week after unilateral nephrectomy. *Urology*, 74 (3): 708-712.

Furnus, C.C.; Inda, A.M.; Andrini, L.B.; García, M.N.; García, A.L.; Badrán, A.F. and Errecalde, A.L. (2003). Chronobiology of the proliferative events related to angiogenesis in mice liver regeneration after parcial hepatectomy. *Cell Biology International*, 27: 383-386.

Galeotti, G. and Villa-Santa, G. (1902). Ueber die compensatorische hypertrophie der nieren. *Zeigler's Beitr Path Anat Allg Path*, 31: 121-142.

Gandolfo, M.T.; Verzola, D.; Salvatore, F.; Gianiorio, G.; Procopio, V.; Romagnoli, A.; Giannoni, M. and Garibotto, G. (2004). Gender and progresión of chronic renal diseases: does apoptosis make the difference? *Minerva Urol Nefrol*, 56 (1): 1-14.

García, A.L.; Inda, A.M.; Errecalde, A.L. and Badrán, A.F. (1997). An initial characterization of a mitostatic activity for hepatocytes and renocytes in extract from adult mouse liver. *Cell Mol Biol*, 43 (8): 1161-1164.

García Torrecillas, J.M.; Moreno Martos, H. and Lea Pereira, M. del C. (2008). Test no paramétricos para datos biosanitarios con SPSS. *Informática Médica, Formación en ciencias de la salud, Bioestadística. Estadística Médica.*

Garibotto, G.; Verzola, D.; Tosetti, F. and Gandolfo, M.T. (2007). Gender and progression of chronic kidney diseases: insights from cellular studies. *CIN 2007*. <http://www.uninet.edu/cin2007/>.

Geng, H.; Lan, R.; Wang, G.; Siddiqi, A.R.; Naski, M.C.; Brooks, A.I.; Barnes, J.L.; Saikumar, P.; Weinberg, J.M. and Venkatachalam, M.A. (2009). Inhibition of autoregulated TGF β signaling simultaneously enhances proliferation and differentiation of kidney epithelium and promotes repair following renal ischemia. *Am J Pathol*, 174, 4: 1291-1308.

Gerhold, D.; Bagchi, A.; Lu, M.; Figueroa, D.; Keenan, K.; Holder, D.; Wang, Y.; Jin, H.; Connolly, B.; Austin, C. and Alonso-Galicia, M. (2007). Androgens drive divergent responses to salt stress in male versus female rat kidneys. *Genomics*, 89: 731-744.

Goss, R.J. and Rankin, M. (1960). Physiological factors affecting compensatory renal hyperplasia in the rat. *J Exp Zool*, 145: 209-216.

Griffin, K.A.; Picken, M. and Bidani, A.K. (1994). Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*, 4, 12: 2023-2031.

Gröne, H.J.; Simon, M. and Gröne, E.F. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. *J Pathol*, 177: 259-267.

Hakim, R.M.; Goldszer, R.C. and Brenner, B.M. (1984). Hypertension and proteinuria: long-term sequelae of uninephrectomy in humans. *Kidney Int*, 25: 930-936.

Halberg, F.; Barnum, C.P.; Silber, R.H. and Bittner, J.J. (1958). 24 hour rhythms at several levels of integration in mice of different lighting regimens. *Proc Soc Exp Biol*, 97: 897-900.

Heer, K.; Kumar, H.; Speirs, V.; Greenman, J.; Drew, P.J.; Fox, J.N.; Carleton, P.J.; Monson, J.R. and Kerin, M.J. (1998). Vascular endothelial growth factor in premenopausal women-indicator of the best time for breast cancer surgery? *Br J Cancer*, 78, 9: 1203-1207.

Hostetter, T.H. (1995). Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 57: 263-278.

Hostetter, T.H.; Olson, J.L.; Rennke, H.G.; Venkatachalam, M.A. and Brenner, B.M. (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol*, 241: F85-F93.

Inda, A.M.; García, A.L.; Errecalde, A.L. and Badrán, A.F. (1997). Effect of tissue and plasma factors on kidney proliferation. *Biocell*, 21 (1): 13-18.

Inda, A.M.; García, A.L.; Errecalde, A.L. and Badrán, A.F. (1999). Effect of normal and tumor factors on different phases of cell populations cycle. *J Exp Clin Cancer Res*, 18, 4: 559-563.

Ishikawa, I.; Maeda, K.; Nakai, S. and Kawaguchi, Y. (2000). Gender difference in the mean age at the induction of hemodialysis in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*, 35: 1072-1075.

Jelinsky, S.A.; Harris, H.A.; Brown, E.L.; Flanagan, K.; Zhang, X.; Tunkey, C.; Lai, K.; Lane, M.V.; Simcoe, D.K. and Evans, M.J. (2003). Global transcription profiling of estrogen activity: Estrogen receptor regulated gene expression in the kidney. *Endocrinology*, 144: 701-710.

Johnson, H.A. and Roman, J.M.V. (1966). Compensatory renal enlargement. Hypertrophy versus hyperplasia. *The American Journal of Pathology*, 49: 1-13.

Kaissling, B. and Le Hir, M. (1994). Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int*, 45, 3: 709-720.

Kanellis, J.; Fraser, S.; Katerelos, M. and Power, D.A. (2000). Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol*, 278: F905-F915.

Kang, D.H.; Anderson, S.; Kim, Y.G.; Mazzali, M.; Suga, S.; Jefferson, J.A.; Gordon, K.L.; Oyama, T.T.; Hughes, J.; Hugo, C.; Kerjaschki, D.; Schreiner, G.F. and Jonson, R.J. (2001). Impaired angiogenesis in the aging kidney: Potential role of VEGF and TSP-1 in the renal disease. *Am. J Kid Dis*, 37: 601-611.

Kang, D.H.; Hughes, J.; Mazzali, M.; Schreiner, G.F. and Johnson, R.J. (2001). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am. Soc Nephrol*, 12: 1448-1457.

Kang, D.H.; Joly, A.H.; Oh, S.W.; Hugo, C.; Kerjaschki, D.; Gordon, K.L.; Mazzali, M.; Jefferson, J.A.; Hughes, J.; Madsen, K.M.; Schreiner, G.F. and Johnson, R.J. (2001). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol*, 12: 1434-1447.

Kang, D.H.; Kanellis, J.; Hugo, C.; Truong, L.; Anderson, S.; Kerjaschki, D.; Schreiner, G.F. and Johnson, R.J. (2002). Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 13: 806-816.

Kang, D.H.; Yu, E.S.; Yoon, K. and Johnson, R. (2004). The impact of gender on progression of renal disease. Potential role of estrogen-mediated vascular endothelial growth factor regulation and vascular protection. *Am J Pathol*, 164: 679-688.

Karamysheva, A.F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry*, 73 (7): 751-762.

Kim, K.H.; Kim, Y.; Park, H.W.; Jeong, H.J. and Mauer, M. (2003). A reevaluation of the renal ablation model of progressive renal disease in rats. *J Nephrol*, 16: 196-202.

Kim, Y.G.; Suga, S.; Kang, D.H.; Jefferson, J.A.; Mazzali, M.; Gordon, K.L.; Matsui, K.; Breiteneder-Geleff, S.; Shankland, S.J.; Huges, J.; Kerjaschki, D.;

Schreiner, G.F. and Jonson, R.J. (2000). Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney Int*, 58: 2390-2399.

Kim-Schulze, S.; McGowan, K.A.; Hubchak, S.C.; Cid, M.C.; Martin, M.B.; Kleinman, H.K.; Greene, G.J. and Schnaper, H.W. (1996) Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation*, 94: 1402-1407.

Kitamoto, Y.; Tokunaga, H. and Tomita, K. (1997). Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest*, 99: 2351-2357.

Klahr, S.; Schreiner, G. and Ichikawa, I. (1988). Progression in renal disease. *N Engl J Med*, 318: 1657-1666.

Kohan, D.E. (1991). Endothelin síntesis by rabbit renal tubule cells. *Am J Physiol*, 26: F221-F226.

Koyanagi, S.; Kuramoto, Y.; Nakagawa, H.; Aramaki, H.; Ohdo, S.; Soeda, S. and Shimeno, H. (2003). A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Research* 63, 7277-7283.

Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Yukawa, E. and Higuchi, S. (1997). Chronopharmacological study of interferon alpha in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 283: 259-264.

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

Lemley, K.V. and Kriz, W. (1991). Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int*, 39: 370-382.

Lieberthal, W. and Levine, JS. (1996). Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 271: F477–F488.

Liu, B. and Preisig, P.A. (2002). Compensatory renal hypertrophy is mediated by a cell cycle-dependent mechanism. *Kidney Int*, 62: 1650-1658.

Liu, P.L.; Gallery, E.D.; Grigg, R.; Mahoney, J.F. and Gyory, A.Z. (1992). Renal function in unilateral nephrectomy subjects. *J Urol*, 147: 337-339.

Liu, Y. (2005). Renal fibrosis: new insights into de patogénesis and therapeutics. *Kidney Int*, 69: 213-217.

Losordo, D.W. and Isner, J.M. (2001). Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 6-12.

Madsen, K.; Marcussen, N.; Pedersen, M.; Kjærsgaard, G.; Facemire, C.; Coffman, T.M. and Jensen, B.L. (2010). Angiotensin II promotes development of the renal microcirculation through AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol*, 21 (3): 448-459.

Maeshima, A.; Yamashita, S. and Nojima, Y. (2003). Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 14: 3138-3146.

Maga, G. and Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 116: 3051-3060.

Manotham, K.; Tanaka, T.; Matsumoto, M.; Ohse, T.; Inagi, R.; Miyata, T.; Kurokawa, K.; Fujita, T.; Ingelfinger, J.R. and Nangaku, M. (2004 a). Transdifferentiation of cultured tubular cell induced by hypoxia. *Kidney Int*, 65: 871-880.

Manotham, K.; Tanaka, T.; Matsumoto, M.; Ohse, T.; Miyata, T.; Inagi, R.; Kurokawa, K.; Fujita, T.; Ingelfinger, J.R. and Nangaku, M. (2004 b). Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1277-1288.

Masuda, Y.; Shimizu, A.; Mori, T.; Ishiwata, T.; Kitamura, H.; Ohashi, R.; Ishizaki, M.; Asano, G.; Sugisaki, Y. and Yamanaka, N. (2001). Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 159, (2): 599-608.

Matsumoto, M.; Makino, Y.; Tanaka, T.; Tanaka, H.; Ishizaka, N.; Noiri, E.; Fujita, T. and Nangaku, M. (2003). Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorate ischemic injury of the kidney in rats. *J Am Soc Nephrol*, 14: 1825-1832.

Matsuo, T.; Yamaguchi, S.; Mitsui, S.; Emi, A.; Shimoda, F. and Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302: 255-259.

Miller, I.J.; Suthanthiran, M.; Riggio, R.R.; Williams, J.J.; Riehle, R.A.; Vaughan, E.D.; Stubenbord, W.T.; Mouradian, J.; Cheigh, J.S. and Stenzel, K.H. (1985). Impact of renal donation. Long-term clinical and biochemical follow-up of living donors in a single center. *Am J Med*, 79: 201-208.

Mok, K.Y.; Sandberg, K.; Sweeny, J.M.; Zheng, W.; Lee, S. and Mulroney, S.E. (2003). Growth hormone regulation of glomerular AT1 angiotensin receptors in adult uninephrectomized male rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: F1085-F1091.

Moore, R.A. (1929). The number of glomeruli in the kidney of the adult white rat unilaterally nephrectomized in early life. *J Exp Med*, 50: 709-712.

Moore, R.Y. and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42: 201-206.

Morales, D.E.; McGowan, K.A.; Grant, D.S.; Maheshwari, S.; Bhartiya, D.; Cid, M.C.; Kleinman, H.K. and Schnaper, H.W. (1995). Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*, 91: 755-763.

Muller, V.; Szabo, A.; Viklicky, O.; Gaul, I.; Portl, S.; Phillipp, T. and Heemann, U.W. (1999). Sex hormones and gender-related differences: their influence on chronic renal allograft rejection. *Kidney Int*, 55: 2011-2020.

Mulroney, S.E. and Pesce, C. (2000). Early hyperplastic renal growth after uninephrectomy in adult female rats. *Endocrinology*, 141: 932-937.

Mulroney, S.E.; Csikos, T.; Koenig, J.I.; Pesce, C.; Striker, L.; Leroith, D. and Haramati, A. (1996). Temporal increases in renal IGF-I, c-fos, and c-jun gene expression during hyperplastic kidney growth in weanling rats. *Endocrinology*, 137: 839-845.

Mulroney, S.E.; Haramati, A.; Roberts, C.T. and LeRoith, D. (1991). Renal IGF-1 mRNA levels are enhanced following unilateral nephrectomy in immature but not adult rats. *Endocrinology*, 128: 2660-2662.

Mulroney, S.E.; Woda, C.; Johnson, M. and Pesce, C. (1999). Gender-differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int*, 56: 944-953.

Nagata, M.; Scharer, K. and Kriz, W. (1992). Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. I. Hypertrophy and distorsion of capillary architecture. *Kidney Int*, 42: 136-147.

Nakagawa, T.; Lan, H.Y.; Zhu, H.J.; Kang, D-H.; Schreiner, G.F. and Jonson, R.J. (2004). Differential regulation of VEGF by TGF β and hypoxia in rat proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F658-F664.

Nangaku, M. and Fujita, T. (2008). Activation of the rennin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens Res*, 31 (2): 175-184.

Nasmyth, K. (1996). Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 274: 1643-1645.

Nath, K.A. (1992). Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progresión of renal damage. *Am J Kidney Dis*, 20: 1-17.

Neugarten, J.; Acharya, A. and Silbiger, S.R. (2000). Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 11: 319-329.

Neugarten, J.; Gallo, G.; Silbiger, S.R. and Kasiske, B. (1999). Glomerulosclerosis in aging humans is not influenced by gender. *Am J Kidney Dis*, 34: 884-888.

Norbury, C. and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, 61: 441-471.

Norman, J.T.; Clark, I.M. and Garcia, P. (2000). Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblast. *Kidney Int*, 58: 2351-2366.

Novak, B. and Tyson, J.J. (2004). A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J Theor Biol*, 230: 563-579.

Novick, A.C. (2007). Open surgery of the kidney. In: Wein AJ, ed. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier: chap 50.

Novick, A.C. and Campbell, S.C. (2005). Oncología. Tumores renales. En: *Campbell-Walsh Urologia*. 8a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. Tomo 4: 2912.

Ogawa, K. and Nowinski, W.W. (1958). Mitosis stimulating factor in serum of unilaterally nephrectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 99: 350-354.

Ohashi, R.; Kitamura, H. and Yamanaka, N. (2000). Peritubular capillary injury during the progresión of experimental glomerulonephritis in rats. *J Am Soc Nephrol*, 11: 47-56.

Ohdo, S.; Koyanagi, S.; Suyama, H.; Higuchi, S. and Aramaki, H. (2001). Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med*, 7: 356-360.

Okuda, S.; Motomura, K.; Sanai, T.; Onoyama, K. and Fujishima, M. (1988). High incidence of glomerular sclerosis in rats subjected to uninephrectomy at young age. *Nephron*, 49: 240-244.

Olivetti, G.; Anversa, P.; Rigamonti, W.; Vitali-Mazza, L. and Loud, A.V. (1977). Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy; a light microscope study. *Cell Biol*, 75: 573-585.

Ong, A.C.M. and Fine, L.G. (1994). Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis: Cause or effect? *Kidney Int*, 45: 345-351.

Oudar, O.; Elger, M.; Bankir, L.; Ganten, D.; Ganten, U. and Kriz, W. (1991). Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Ren Physiol Biochem*, 14: 92-102.

Pabst, R. and Sterzel, B. (1983). Cell renewal of glomerular cell types in normal rats R. An autoradiographic analysis. *Kidney Int*, 24: 626-631.

Pando, M.P.; Morse, D.; Cermakian, N. and Sassone-Corsi, P. (2002). Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, 110: 107-117.

Pardee, A.B. (1974). Restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Pro Natl Acad Sci*, 71: 1286-1290.

Pilgrim, C.; Erb, W. and Maurer, W. (1963). Diurnal fluctuations in the number of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. *Nature*, 31, 199: 863.

Pillebout, E.; Burtin, M.; Yuan, H.T.; Briand, P.; Woolf, A.S.; Friedlander, G. and Terzi, F. (2001). Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions. *Am J Pathol*, 159: 547-560.

Prassopoulos, P.; Gourtasyiannis, N.; Cavourus, D. and Pantelidis, N. (1992). CT evaluation of compensatory renal growth in relation to posnephrectomy time. *Acta Radiol*, 33: 566-568.

Preisig, P.A. and Franch, H.A. (1995). Renal epithelial hyperplasia and hypertrophy. *Semin Nephrol*, 15: 327-340.

Prescott, L.F. (1966). The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leukocytes, and red blood cells. *Clin Sci*, 31: 425-435.

Price, P.M.; Safirstein, R.L. and Megyesi, J. (2009). The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int*, 76 (6): 604-613.

Pupilli, C.; Lasagni, L.; Romagnani, P.; Bellini, F.; Mannelli, M.; Misciglia, N.; Mavilia, C.; Villari, D. and Serio, M. (1999). Angiotensin II stimulates the síntesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endotelial growth factor in human mesangial cells. *Am J Soc Nephrol*, 10: 254-255.

Qu, Z.; MacLellan, W.R. and Weiss, J.N. (2003). Dynamics of the cell cycle: checkpoints, sizers, and timers. *Biophysical Journal*, 85: 3600-3611.

Rabkin, R. and Fervenza, F.C. (1996). Renal hypertrophy and kidney disease in diabetes. *Diabetes Metab Rev*, 12: 217-241.

Reckelhoff, J.F. (2005). Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension. *Hypertension*, 45: 170-174.

Reckelhoff, J.F. and Baylis, C. (1993). Glomerular metalloprotease activity in the aging rat kidney: inverse correlation with injury. *J Am Soc Nephrol*, 3: 1835-1838.

Reckelhoff, J.F.; Zhang, H. and Srivastava, K. (2000). Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 35: 480-483.

Reckelhoff, J.F.; Zhang, H.; Srivastava, K. and Granger, J.P. (1999). Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats. Role of androgens and androgen receptor. *Hypertension*, 34: 920-923.

Remuzzi, A.; Puntorieri, S.; Mazzoleni, A. and Remuzzi, G. (1988). Sex related differences in glomerular ultrafiltration and proteinuria in Munich-Wistar rats. *Kidney Int*, 34: 481-486.

Ribatti, D. and Crivellato, E. (2012). Sprouting angiogenesis, a reappraisal. *Developmental Biology* 372: 157-165

Risdon, R.A.; Sloper, J.C. and De Wardener, H.E. (1968). Relationship between renal function and histological changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis. *Lancet*, 17, 2: 363-366.

Rodríguez del Águila, M. del M. and Fernández Sierra, M.A. (1998). Síntesis de las principales técnicas estadísticas aplicadas en la investigación sanitaria. *JANO*, 55, 1265: 48.

Rogers, J.L.; Mitchell, A.R.; Maric, C.; Sandberg, K.; Myers, A. and Mulrone, S.E. (2007). Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1 receptors in female and male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: R794-R799.

Rollason, H.D. (1949). Compensatory hypertrophy of the kidney of the young rat with special emphasis on the role of cellular hyperplasia. *Anat Rec*, 104: 263-285.

Rosen, V.J. Jr. and Cole, L.J. (1960). Radiosensitivity of mouse kidney undergoing compensatory hypertrophy. *Nature*, 187: 612-614.

Rosenberger, C.; Griethe, W.; Gruber, G.; Wiesener, M.; Frei, U.; Bachmann, S. and Eckardt, K.U. (2003). Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int*, 64: 874-886.

Ross, M.H. and Pawlina, W. (2007). *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. Quinta edición.

Ruby, J.R.; Scheving, L.E.; Gray, S.B. and White, K. (1973). Circadian rhythm of nuclear DNA in adult rat liver. *Exptl Cell Res*, 76: 136-142.

Saga, S.I.; Phillips, M.I.; Ray, P.E.; Raleigh, J.A.; Vio, C.P.; Kim, Y.G.; Mazzali, M.; Gordon, K.L.; Hughes, J. and Johnson, R.J. (2001). Hypokalemia induces renal injury and alterations in vasoactive mediators that favor salt sensitivity. *Am J Physiol*, 281: F620-F629.

Saphir, O. (1927). The state of the glomerulus in experimental hypertrophy of the kidneys of rabbits. *Amer J Pathol*, 3: 329-342.

Savill, J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*, 61: 375-380.

Schainuck, L.I.; Strker, G.E.; Luther, R.E. and Benditt, E.P. (1970). Structural-functional correlations in renal disease II. The correlations. *Hum. Pathol*, 1: 631-641.

Scherberich, J.E. and Wolf, G. (1994). Disintegration and recovery of kidney membrane proteins as a consequence of acute and chronic renal failure. *Kidney Int*, 46 (47): 552-557.

Scherberich, J.E.; Wolf, G. and Schoeppe, W. (1993). Shedding and repair of renal cell membranes following drug-induced nephrotoxicity in humans. *Eur J Clin Pharmacol*, 44, 1: S33-S38.

Scheving, L.E. (1981). Circadian rhythms in cell proliferation their importance when investigating the basic mechanism of normal versus abnormal growth. *Prog Clin Biol Res*, 59: 39-79.

Schmitt, R. and Cantley, L.G. (2008). The impact of aging on kidney repair. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294. F1265-F1272.

Schmitz, A.; Christensen, C.K.; Christensen, T. and Solling, K. (1989). No microalbuminuria or other adverse effects of long-standing hyperfiltration in humans with one kidney. *Am J Kidney Dis*, 13: 131-136.

Schnaper, H.W. (1999). Estrogen: it's not just for reproduction any more. *Kidney Int*, 55: 1577-1579.

Schrijvers, B.F.; Flyvbjerg, A. and De Vriese, A.S. (2004). The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int*, 65 (6): 2003-2017.

Schrijvers, B.F.; Rasch, R.; Tilton, R.G. and Flyvbjerg, A. (2002). High protein induced glomerular hypertrophy is VEGF dependent. *Kidney Int*, 61: 1600-1604.

Seliger, S.L.; David, C. and Stehman-Breen, C. (2001). Gender and the progression of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10: 219-225.

Seyer-Hansen, K. (1978). Renal hypertrophy in experimental diabetes: a comparison to compensatory hypertrophy. *Diabetologia*, 14: 325-328.

Shankland, S.J. and Wolf, G. (2000). Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278: F515-F529.

Shi, S.R.; Key, M.E. and Kalkra, K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 39: 741-748.

Shibuya, M. (2008). Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis. *BMB Reports*, 41 (4): 278- 286.

Shulman, K.; Rosen, S.; Tognazzi, K.; Manseau, E.J. and Brown, L.F. (1996). Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*, 7: 661-666.

Sigdestad, C.P.; Bauman, J. and Leshner, S.W. (1969). Diurnal fluctuations in the number of cells in mitosis and DNA síntesis in the jejunum of the mouse. *Exp Cell Res*, 58: 159-162.

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

Simon, M.; Grone, H.J.; Jöhren, O.; Kullmer, J.; Plate, K.H.; Risau, W. and Fuchs, E. (1995). Expresión of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol*, 268: F240-F250.

Sinuani, I.; Averbukh, Z.; Gitelman, I.; Rapoport, M.J.; Sandbank, J.; Albeck, M.; Sredni, B. and Weissgarten, J. (2006). Mesangial cells initiate compensatory renal tubular hypertrophy via IL-10-induced TGF-beta secretion: effect of the

immunomodulator AS101 on this process. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(2): F384-394.

Sinuani, I.; Beberashvili, I.; Averbukh, Z.; Cohn, M.; Gitelman, I. and Weissgarten, J. (2010). Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy. *Am J Nephrol*, 31: 326-331.

Sinuani, I.; Weissgarten, J.; Beberashvili, I.; Rapoport, M.J.; Sandbank, J.; Feldman, L.; Albeck, M.; Averbukh, Z. and Sredni, B. (2009). The cyclin kinase inhibitor p57kip2 regulates TGF- β -induced compensatory tubular hypertrophy: effect of the immunomodulator AS101. *Nephrol Dial Transplant*, 24: 2328-2338.

Striker, G.E.; Schainuck, L.I.; Cutler, R.E. and Benditt, E.P. (1970). Structural-functional correlations in renal disease I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease. *Hum Pathol*, 1: 615-630.

Sun, J.; Langer, W.J.; Devish, K. and Lane, P.H. (2006). Compensatory kidney growth in estrogen receptor- α null mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F319-F323.

Suzuma, I.; Mandai, M.; Takagi, H.; Suzuma, K.; Otani, A.; Oh, H.; Kobayashi, K. and Honda, Y. (1999). 17 Beta-estradiol increases VEGF receptor-2 and promotes DNA synthesis in retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40: 2122-2129.

Swat, M.; Kel, A. and Herzog, H. (2004). Bifurcation analysis of the regulatory modules of the mammalian G1/S transition. *Bioinformatics*, 20, 10: 1506-1511.

Terzi, F.; Burtin, M.; Hekmati, M.; Jouanneau, C.; Beaufils, H. and Friedlander, G. (2000). Sodium restriction decreases AP-1 activation after nephron reduction in the rat: role in the progression of renal lesions. *Exp Nephrol*, 8: 104-114.

Thomas, S.; Anderson, S.; Gordon, K.L.; Oyama, T.T.; Shankland, S.J. and Jonson, R.J. (1998). Tubulointerstitial disease in aging: Evidence for peritubular capillary damage. A potential role for renal ischemia. *J Am Soc Nephrol*, 9: 231-242.

Thomas, S.; Vanuystel, J.; Gruden, G.; Rodriguez, V.; Burt, D.; Gnudi, L.; Hartley, B. and Viberti, G. (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in human mesangium *in vitro* and in glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 11: 1236-1243.

Toback, F.G. (1992). Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int*, 41: 226-246.

Toback, F.G.; Walsh-Reitz, M.M.; Mendley, S.R. and Kartha, S. (1990). Kidney epithelial cells release growth factors in response to extracellular signals. *Pediatr Nephrol*, 4: 363-371

Venkov, C.D.; Rankin, A.B. and Vaughan, D.E. (1996). Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. *Circulation*, 94: 727-733.

Vilchez, C.A. and Echave Llanos, J.M. (1971). Circadian rhythm in the feeding activity of *Oxymycterus rutilans*. Role played by light and food availability. *J Interdiscipl Cycle Res*, 2: 73-77.

Vogetseder, A.; Karadeniz, A.; Kaissling, B. and Le Hir, M. (2005). Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochem Cell Biol*, 124: 97-104.

Vogetseder, A.; Palan, T.; Bacic, D.; Kaissling, B. and Le Hir, M. (2007). Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: C807-C813.

Vogetseder, A.; Picard, N.; Gaspert, A.; Walch, M.; Kaissling, B. and Le Hir, M. (2008). Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294: C22-C28.

Waldherr, R. and Gretz, N. (1988). Natural course of the development of histological lesions after 5/6 nephrectomy. *Contrib Nephrol*, 60: 64-72.

Wesson, L.G. (1989). Compensatory growth and other growth responses of the kidney. *Nephron*, 51: 149-184.

Williams, G.E.G. (1961). Some aspects of compensatory hyperplasia of the kidney. *Brit J Exp Path*, 42: 386-396.

Wolf, G. (1992). Changing concepts of compensatory renal growth: from humoral pathology to molecular biology. *Am J Nephrol*, 12: 369-373.

Wolf, G. (1993). Regulating factors of renal tubular hypertrophy. *Clin Invest*, 71: 867-870.

Wolf, G. (1995). Cellular mechanisms of tubule hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab*, 21: 303-316.

Wolf, G. (2006). Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor- β pathway. *Kidney International*, 70: 1914-1919.

Wolf, G. and Neilson, E.G. (1991). Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia. *Kidney Int*, 39: 401-420.

Wood, P.A.; Bove, K.; You, S.; Chambers, A. and Hrushesky, W.J.M. (2005). Cancer growth and spread are saltatory and phase-locked to the reproductive cycle through mediators of angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 4 (7): 1065-1075.

Yang, J.; Dungrawala, H.; Hua, H.; Manukyan, A.; Abraham, L.; Lane, W.; Mead, H.; Wright, J. and Schneider, B.L. (2011). Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle*, 10, 1: 144-155.

Yang, L.; Han, Z.; Robb MacLellan, W.; Weiss, J.N. and Qu, Z. (2006). Linking cell division to cell growth in a spatiotemporal model of the cell cycle. *J Theor Biol*, 241(1): 120-133.

Yildiz, B.; Kural, N.; Omer, C.; Ak, I. and Akcar, N. (2008). IGF-1, IGFBP-3, VEGF and MMP-9 levels and their potential relationship with renal functions in patients with compensatory renal growth. *Clin Physiol Funct Imaging*, 28: 107-112.

Yoshida, Y.; Fogo, A. and Ichikawa, I. (1989). Glomerular hemodynamic changes vs. hypertrophy in experimental glomerular sclerosis. *Kidney Int*, 35: 654-660.

Zeng, H.; Dvorak, H. and Mukhopadhyay, D. (2001). Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*, 276: 26969-26979.

Zheng, Z.; Arteel, G.E.; Connor, H.D.; Yin, M.; Frankenberg, M.V.; Stachlewitz, R.F.; Raleigh, J.A.; Mason, R.P. and Thurman, R.G. (1998). Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: Prevention by dietary glycine. *Am J Physiol*, 275: F595-F604.