



11262  
A  
37

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS,  
ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA  
"IGNACIO CHAVEZ"**

**EXPRESION DE 3 ISOFORMAS DE LA SINTASA DE OXIDO  
NITRICO EN ALOINJERTOS RENALES HUMANOS CON  
NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA A, RECHAZO  
AGUDO Y NEFROPATIA CRONICA DEL INJERTO.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**  
P R E S E N T A :  
**DR. FRANCISCO E. RODRIGUEZ CASTELLANOS**

ASESOR DE TESIS DR. JAIME HERRERA ACOSTA

MEXICO, D. F.

2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

B

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo rescaccional.

NOMBRE: Francisco Rodríguez Castellanos

FECHA: 29-ene-03

FIRMA: [Firma]

**Dr. Fause Attie**

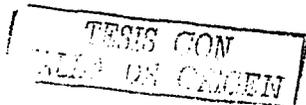
Director General  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

**Dr. José Fernando Guadalajara Boo**

Jefe del departamento de Enseñanza  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

**Dr. Jaime Herrera Acosta**

Jefe del departamento de Nefrología  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"  
Asesor de Tesis



My books are water;  
those of the great  
geniuses are wine...  
everybody drinks  
water.

**MARK TWAIN**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

***Expresión de 3 isoformas  
de la sintasa de óxido  
nítrico en aloinjertos  
renales humanos con  
nefrotoxicidad por  
ciclosporina A, rechazo  
agudo y nefropatía  
crónica del injerto.***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**\*RESUMEN**

El óxido nítrico (NO) es derivado de la L-arginina ejerce una variedad de efectos fisiológicos y fisiopatológicos tanto a nivel renal como sistémico. El NO es generado por 3 isoformas de la sintasa de óxido nítrico (NOS): dos isoformas constitutivas de respuesta aguda llamadas NOS neuronal o cerebral (nNOS) y NOS endotelial (eNOS), y una isoforma más persistente llamada inducible (iNOS). NO regula la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción intrarenal de renina. Mientras que el NO puede tener un papel beneficioso como modulador mensajero y de defensa del huésped, su producción excesiva puede ser citotóxica. La generación transitoria de NO característica de la activación de eNOS es crítica para la actividad de algunas enzimas así como para la mediación de vasodilatación, actividad anti-apoptótica y protección contra stress oxidativo. Por otra parte, la generación sostenida y de gran magnitud de NO por iNOS, dependiendo del contexto celular puede llevar a un amplio espectro de secuelas. La progresión del daño renal en el curso de nefropatías se asocia con cambios en el patrón de expresión de las sintasas, generalmente disminución de la eNOS y aumento de iNOS. En lo que se refiere a la patología del trasplante renal el NO ha sido implicado en la patogénesis del rechazo agudo y crónico del aljorjeto así como en la nefrotoxicidad por fármacos inmunosupresores, en particular la relacionada a ciclosporina A. Evaluando mediante RT-PCR e inmunohistoquímica la expresión de las 3 isoformas de NOS en especímenes de biopsia de aljorjeto renales en pacientes sometidos a biopsia del injerto en forma protocolaria o bien por disfunción aguda o crónica del injerto, nosotros encontramos que en el curso de 3 diferentes nefropatías, definidas histopatológicamente (nefrotóxica por ciclosporina, rechazo agudo y nefropatía crónica del injerto), el patrón de expresión de NOS se encuentra alterado. La administración de CsA no modificó significativamente los niveles de eNOS, sugiriendo que el OS producido por esta isoforma pudiera contrarrestar al menos en parte el efecto vasoconstrictor de este inmunosupresor, lo que se asocia además con una mayor expresión de la isoforma inducible. Los efectos protectores de NO tales como prevención de la activación de leucocitos y adhesión de plaquetas han sido atribuidos al NO generado por la sintasa endotelial, lo que apoyaría el potencial efecto beneficioso de la expresión genética sostenida de eNOS durante la administración crónica de CsA. En relación con el rechazo agudo, se observó una mayor expresión de los niveles de iNOS tanto a nivel genético como proteico, lo cual podría contribuir al daño vascular, glomerular y tubulointersticial observado en estos casos. Además en presencia de rechazo agudo la sobreexpresión de iNOS se ha asociado con infiltración celular. El papel y la fuente del NO en la nefropatía crónica del aljorjeto aún no son claros, sin embargo en este estudio se encontró un bajo nivel de expresión de las 3 isoformas de NOS en casos de nefropatía crónica del aljorjeto, tanto a nivel genético así como por inmunohistoquímica, probablemente debido a lo avanzado del daño tisular. Dicha disminución en la expresión de NOS en los casos de nefropatía crónica puede deberse también a un incremento en la concentración de inhibidores endógenos circulantes de NOS. Cuando las funciones de todas las isoformas de NOS son bloqueadas, los efectos deletéreos de la inhibición de eNOS invariablemente prevalecen sobre los posibles beneficios de la inhibición de iNOS.

TESIS CON  
FALLA DE CARGEN

## \*INTRODUCCION

### FISIOLOGIA DEL OXIDO NITRICO

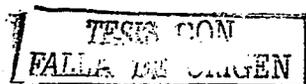
El hecho de que un gas nocivo y un contaminante ambiental como lo es el óxido nítrico (NO) juegue un papel tan importante en la fisiología y fisiopatología, fue una gran sorpresa para muchos investigadores. La multiplicidad de efectos de esta molécula, claramente apoya el hecho de que el NO fuera nombrado la molécula del año en 1992.

El descubrimiento de que NO causa relajación del músculo liso vascular fue hecho en 19 9<sup>11</sup>, lo cual fue previo al descubrimiento de la vasorelajación dependiente del endotelio y del factor relajante derivado del endotelio<sup>121</sup>. En 1980 Furchgott y Zawadzki descubrieron que en anillos aislados de aorta de conejo la relajación inducida por acetilcolina dependía de la presencia de una monocapa de células endoteliales. Ellos concluyeron que la activación de receptores muscarínicos en células endoteliales disparaba la generación de un factor difusible y transferible que relajaba el músculo liso vascular; a este factor le llamaron factor relajante derivado del endotelio (FRDE). Posteriormente encontraron que la relajación dependiente del endotelio era inhibida por proteínas heme las cuales se unen e inactivan al NO y que tanto el NO como el FRDE activaban guanilato ciclasa<sup>121</sup>. Lo anterior llevo a proponer a Furchgott e Ignarro que en realidad el FRDE correspondía al NO<sup>111</sup>. Estudios sobre el mecanismo de acción de nitroglicerina, isoamil nitrito y nitroprusiato de sodio revelaron que cada uno de estos nitro compuestos liberaban NO al contacto con el músculo liso vascular. Por lo tanto, el mecanismo de acción de estos nitrovasodilatadores se atribuyó a la generación de NO en el músculo liso vascular, donde el NO activa guanilato ciclasa y estimula la biosíntesis intracelular de GMPc.

Dada la gran reactividad y el rápido metabolismo de esta sustancia, los efectos biológicos predominantes del NO son ejercidos localmente y sus efectos específicos dependen de la cantidad de NO presente y así como del sitio de producción. Por ejemplo, el NO producido por macrófagos tiene un papel predominante en la citotoxicidad. El NO producido en la pared arterial lleva primariamente a vasodilatación. Debido a su rápida oxidación en el lumen arterial, la acción vasodilatadora del NO se ejerce en forma autocrina o parácrina. En el músculo liso vascular, el NO actúa como un segundo mensajero para inducir vasodilatación. Al unirse a la mitad del grupo heme de la forma soluble de la guanilato ciclasa, el NO activa esta enzima. La guanilato ciclasa cataliza la conversión de guanosin trifosfato (GTP) a GMPc, el cual a su vez activa una proteína quinasa dependiente de GMPc. Esta quinasa fosforila fosfolamban, una proteína reguladora para Ca-ATPasa en el retículo sarcoplásmico. La Ca-ATPasa disminuye la concentración de calcio intracelular, lo cual finalmente lleva a defosforilación de cadenas ligeras de miosina y por consecuencia a relajación de músculo liso.

La oxidación espontánea del NO para formar nitrito y nitrato es el principal modo de inactivación de NO. La producción de NO en sistemas biológicos puede ser cuantificada midiendo estos productos oxidativos en plasma y orina y por la medición de la excreción urinaria de GMPc<sup>121</sup>.

El óxido nítrico es una molécula involucrada en importantes procesos fisiológicos, incluyendo regulación del tono vascular, agregación plaquetaria, mecanismos de defensa, inflamación, neurotransmisión, aprendizaje y memoria, erección penil, vaciamiento gástrico, liberación de hormonas, diferenciación celular, migración celular y apoptosis.

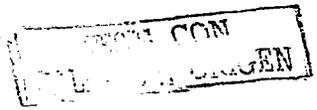


También se ha mostrado que participa en reacciones celulares fundamentales como la síntesis de RNA, respiración mitocondrial, glicólisis y metabolismo del hierro <sup>[4]</sup>. Estas acciones biológicas del NO resultan de modificación covalente de numerosas enzimas, receptores, proteínas estructurales y factores de transcripción. Si los efectos netos de NO sobre una célula dada son benéficos o deletéreos estará determinado por la concentración de NO obtenida, duración de la producción y composición del microambiente adyacente <sup>[5, 6]</sup>.

El NO es producido a partir de L-arginina, su síntesis es catalizada por la sintasa de óxido nítrico (NOS) de la cual se han identificado tres isoformas: NOS endotelial (eNOS), NOS cerebral o neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS) <sup>[7]</sup>. Estas enzimas son homodímeros cuyos monómeros son en sí mismos enzimas fusionadas, una citocromo reductasa y un citocromo que requiere 3 cosubstratos (L-arginina, NADPH y O<sub>2</sub>) y 5 cofactores o grupos prostéticos (FAD, FMN, calmodulina, tetrahidrobiopterina y heme) Cada isoforma es producto de un gen distinto. Hay dos formas constitutivas dependientes de Ca<sup>++</sup>/CaM, la nNOS (también designada NOS1) cuya actividad fue primero identificada en neuronas, mapea en el cromosoma 12q24.2 y la eNOS (también designada NOS3), primero identificada en células endoteliales, mapea en 7q35-36. La forma inducible, iNOS (también designada NOS2) es Ca<sup>++</sup> independiente, se expresa en un amplio rango de tipos celulares y mapea en 17cen-q12. Las formas constitutivas de NOS nNOS y eNOS están presentes en células endoteliales y neuronas mientras que iNOS esta presente en diferentes tipos de células incluyendo macrófagos, células endoteliales vasculares, células de músculo liso vascular, células epiteliales, neutrófilos y fibroblastos <sup>[8]</sup>. eNOS y nNOS generan pequeñas cantidades de NO, el cual es importante en la transducción de señales incluyendo la regulación del tono vascular, mientras que iNOS la cual puede ser inducida por citocinas y endotoxinas produce grandes cantidades de NO con efectos citotóxicos/citostáticos <sup>[9]</sup>. Dos reportes recientes han sugerido la posibilidad de que existan enzimas adicionales capaces de sintetizar NO con propiedades muy distintas de las isoformas NOS conocidas. Una actividad enzimática capaz de producir citrulina y nitrato fue identificada en el riñón de la rata <sup>[10]</sup>. En otro estudio una proteína purificada del cerebro de rata mostró convertir bradikina en NO <sup>[11]</sup>. La expresión de esta proteína en otros órganos no ha sido examinada y su estructura primaria no ha sido elucidada.

**OXIDO NITRICO Y RIÑON**

Las 3 isoformas caracterizadas de NOS estan presentes en el riñon y se expresan en una forma especifica para cada tipo celular. En la corteza renal nNOS exhibe una expresion celular principalmente en la macula densa, iNOS ha sido observada en celulas mesangiales y en celulas tubulares proximales, mientras que eNOS se expresa principalmente en celulas endoteliales de arteriola aferente y eferente y en capilares glomerulares y peritubulares. En la medula renal nNOS se expresa en tubulo colector medular interno, iNOS se detecta en la rama ascendente gruesa medular del asa de Henle y eNOS se localiza en la rama ascendente gruesa y en tubulo colector. NO producido por nNOS en celulas de la macula densa modula el tono vascular renal por relacion directa de la arteriola aferente, atenuando por lo tanto la vasoconstriccion mediada por la activacion del sistema retroalimentario tubulo-glomerular <sup>[12]</sup>.



Además el NO producido por células de la mácula densa aumenta la secreción de renina en células yuxtaglomerulares de la arteriola aferente, mientras que NO producido por eNOS contribuye al mantenimiento del tono vascular regulando el flujo plasmático glomerular a través de dilatación de la vasculatura glomerular [13].

La actividad endógena de NOS parece mediar efectos de transporte iónico en túbulo proximal, rama ascendente gruesa y túbulo colector cortical de la rata [16].

NO producido por iNOS en condiciones normales y durante estímulos inmunológicos, en células mesangiales puede también modular el tono vascular por un mecanismo indirecto debido a relajación de células mesangiales. Por lo tanto, la fuente de NO determina su efecto sobre la función glomerular en condiciones normales y patológicas.

Respecto al papel del NO en el riñón, estudios previos [8, 13] han mostrado que en condiciones fisiológicas, el NO se deriva principalmente de NOS constitutiva y contribuye a la regulación de la microcirculación glomerular y a la inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria. En contraste, en situaciones patológicas el NO es generado por NOS inducible como se ha demostrado en glomerulos nefríticos aislados en cuatro diferentes modelos murinos de glomerulonefritis por complejos inmunes [14, 15]. Sin embargo el papel del NO en enfermedades renales es aun controversial. La inhibición de la producción de NO in vivo en glomerulonefritis experimental ha producido resultados inconsistentes. En el modelo anti-Thy-1 y en ratones MRL-lpr/lpr, la inhibición de la producción de NO reduce el daño glomerular, mientras que el mismo tratamiento empeoró el grado de proteinuria en nefritis nefrotóxica [19, 21].

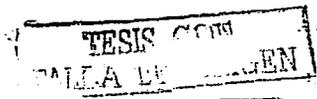
**EXPRESIÓN DE SINTASAS DE OXIDO NITRICO EN RIÑÓN NORMAL Y EN GLOMERULONEFRITIS**

El análisis de la actividad de NOS y la producción regional de NO ha encontrado que la médula renal es el sitio principal para la síntesis basal de NO en el riñón de rata [6]. McKee [18] observó que la médula renal normalmente expresa aproximadamente 3 veces más actividad de NOS que la corteza renal.

Lamas y cols mostraron que el mRNA de eNOS es sintetizado por células endoteliales glomerulares cultivadas [19]. En el riñón humano normal, usando inmunohistoquímica e hibridación in situ, Bachmann, Bosse y Mundel [20] identificaron la expresión de eNOS en células endoteliales glomerulares y arteriolas aferentes e eferentes, mientras que nNOS fue expresada en arteriolas eferentes, macula densa y capsula de Bowman.

Bosse reportó que el tratamiento con furosemide produjo un marcado incremento tanto en actividad de NOS como de los niveles de renina. La restricción de sal aumento los niveles de NOS. El tratamiento con L-NAME llevo a moderada reducción de la actividad de NOS. Estos cambios mostraron que la actividad de NOS y la expresión génica están inversamente relacionados a cambios crónicos en la perfusión renal, el balance de sal y el transporte de sal en el túbulo distal en paralelo con la respuesta conocida de la renina a estos cambios. La inhibición de NOS disminuye los niveles de renina en el aparato yuxtaglomerular lo cual apoya que el NO derivado de la macula densa participa en el control de la síntesis de renina [21].

Con respecto a la expresión de iNOS, Mohaupt [22] reportó que el RNAm de iNOS era producido por células mesangiales cultivadas estimuladas por factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y que glomerulos microdisecados de ratas normales y ratas tratadas con lipopolisacáridos también sintetizaban el RNAm.



Se sugirió que iNOS es sintetizada in vivo por células mesangiales, sin embargo en dos modelos experimentales de glomerulonefritis se demostró que leucocitos infiltrantes y no células mesangiales, expresaban iNOS. Usando inmunohistoquímica, Jansen et al mostraron que la mayoría de células que expresan iNOS en glomérulos de ratas con glomerulonefritis por complejos inmunes son macrófagos <sup>[21]</sup>.

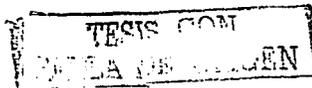
Estudios de biología molecular han identificado variantes por empalme alternativo de NOS 1 y NOS 2 que parecen estar sujetos a regulación única y pueden codificar proteínas funcionalmente distintas. La distribución renal de estas nuevas variantes no ha sido explorada en detalle. Además mecanismos de control transcripcional y post-transcripcional recientemente descubiertos, incluyendo el uso alternativo de promotores, interacciones proteína-proteína y eventos de fosforilación para las 3 isoformas mayores, aun esperan caracterización en células renales <sup>[6]</sup>.

Estos hallazgos sugieren el papel de NO en el desarrollo y progresión de glomerulonefritis humana.

Furusu y cols. <sup>[7]</sup> examinaron la expresión de 2 isoformas de NOS en especímenes de biopsia obtenidos de pacientes con varias formas de glomerulonefritis usando inmunohistoquímica y analizaron la correlación entre la expresión de cada NOS y el grado de daño glomerular. Estos autores encontraron eNOS en células endoteliales glomerulares y en el endotelio de arteriolas aferentes, eferentes y de vasos corticales en glomérulos normales y enfermos. En casos de nefropatía por IgA (IgAN) y nefritis lúpica (NL), se encontró expresión de la isoforma inducible en células mesangiales, células epiteliales glomerulares y células infiltrantes, se observó además un patrón de expresión recíproca de eNOS e iNOS en los glomérulos afectados. La expresión de eNOS correlacionó negativamente con el grado de daño glomerular, mientras que la expresión de iNOS correlacionó positivamente con el grado de daño glomerular. Los resultados de este estudio <sup>[7]</sup> junto con resultados de estudios previos sugieren que células endoteliales glomerulares participan en la síntesis del NO en glomérulos normales y enfermos a través de la expresión de eNOS. Por otra parte, es claro que mientras algunos macrófagos expresan iNOS <sup>[22]</sup>, la mayoría de células que contienen iNOS son células glomerulares intrínsecas tales como células mesangiales y células epiteliales glomerulares. Es posible que algunas citoquinas estén involucradas en la inducción de iNOS en glomérulos enfermos. De hecho se ha reportado la expresión de interleucina-1 beta (IL-1β) y TNF-α en glomérulos de pacientes con nefritis lúpica y nefropatía por IgA <sup>[23]</sup>.

La disminución en la expresión de eNOS en casos de NL e IgAN con lesión moderada a severa sugiere que esta alteración puede contribuir a la progresión de estas enfermedades renales. Es probable que la capacidad de expresión de eNOS en células endoteliales de glomérulos dañados disminuya durante la progresión de enfermedades renales <sup>[7]</sup>. Queda por determinar si la expresión reducida de eNOS con aumento en la expresión de iNOS es la causa o resultado del daño renal en IgAN y NL.

Furusu et al han postulado que la inducción de iNOS puede compensar la disminución en la producción de eNOS o que eNOS e iNOS pueden tener papeles diferentes en glomérulos enfermos. Puesto que la vida media de NO es muy corta, los efectos biológicos dependen tanto de la localización, del sitio de producción así como de la concentración local de NO. La cantidad de NO generada por eNOS es pequeña, en cantidades nmol, mientras que iNOS sintetiza NO en grandes cantidades (mmol) <sup>[1]</sup>.



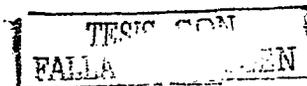
El hecho de que la expresión de eNOS disminuye con la progresión del daño glomerular, sugiere que los efectos fisiológicos de NO (modulación del tono arterial aferente y de células mesangiales así como el mantenimiento de las propiedades antitrombogénicas del endotelio) producido por eNOS, disminuyen en glomerulos severamente dañados, ocasionando alteraciones en la microcirculación. En contraste niveles elevados de NO derivados de iNOS son citotóxicos o citostáticos al menos in vitro<sup>[25]</sup>. Al reaccionar el NO con hierro de varias enzimas vitales de la cadena de transporte de electrones y el ciclo del ácido cítrico, puede alterarse la función celular. Además el NO puede también reaccionar con el anión superóxido producido localmente para generar peroxinitrito, el cual causa mayor daño tisular y peroxidación de lípidos<sup>[26]</sup>. Por otra parte, el NO puede tener también un efecto benéfico en glomerulos nefríticos. Trachtman et al<sup>[27]</sup> reportaron que NO inhibe la producción de proteínas de la matriz extracelular por las células mesangiales lo que atenuaría el desarrollo de esclerosis glomerular.

### OXIDO NITRICO Y TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal se considera actualmente la terapia de elección para la enfermedad renal en estadio terminal, sin embargo la falla del aloinjerto renal explica el 25-30% del total de pacientes que se encuentran en lista de espera para trasplante renal. De hecho aproximadamente el 20% de los trasplantes renales realizados en los Estados Unidos se hacen en pacientes quienes han tenido uno o más aloinjertos previos los cuales han fallado. A pesar de recientes avances en la terapia de inmunosupresión, la mejoría en la sobrevida del injerto a largo plazo no ha ido a la par con la sobrevida del injerto en el primer año por lo que es evidente que existe la necesidad de desarrollar estrategias mejores y más específicas para prevenir o interrumpir este deterioro crónico en la función de aloinjertos renales<sup>[28]</sup>.

Aunque clásicamente se ha considerado a la respuesta aloimmune como el principal e inicial insulto al aloinjerto, otras formas de daño pueden estar sobrepuestas. Se ha sugerido que factores dependientes e independientes de aloantígenos influyen en el desarrollo de la nefropatía del aloinjerto. Dentro de los factores dependientes de aloantígenos se encuentran episodios de rechazo agudo, inmunosupresión inadecuada y la incompatibilidad HLA. Causas de disfunción del aloinjerto independientes de antígenos incluyen la edad del donador, el periodo de isquemia y reperfusión, infección por citomegalovirus, dislipidemia, hipertensión arterial sistémica y el uso de algunos medicamentos inmunosupresores, particularmente ciclosporina A y tacrolimus<sup>[29]</sup>.

La ciclosporina A (CsA) es un potente agente inmunosupresor que ha mostrado eficacia en la prevención del rechazo en trasplante de órganos, sin embargo la nefrotoxicidad es una seria complicación de la terapia. Tres diferentes formas de nefrotoxicidad por ciclosporina pueden distinguirse: disfunción renal aguda reversible, síndrome hemolítico-urémico y nefrotoxicidad crónica la cual causa alteraciones morfológicas irreversibles<sup>[30]</sup>. En pacientes trasplantados después de 6 meses de terapia con ciclosporina pueden aparecer lesiones histológicas renales irreversibles que progresan aun después de reducción de la dosis<sup>[30]</sup>. Por lo anterior existen dudas sobre el uso continuo e indefinido de una droga cuya nefrotoxicidad es progresiva e irreversible<sup>[31]</sup>. Por otra parte, la suspensión de ciclosporina en pacientes con trasplante renal se ha asociado a una pequeña pero real incidencia de episodios de rechazo agudo lo cual ha propiciado el mantener la administración de ciclosporina en forma indefinida.



Muchos centros de trasplante favorecen actualmente el uso a largo plazo de ciclosporina con ajuste apropiado e individual del esquema de dosis basado en la medición de niveles séricos, sin embargo otros centros optan por el retiro temprano (6-12 meses post-trasplante) entre otras razones por factor económico dado que es un medicamento de costo elevado. En el departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" se ha establecido el retiro de ciclosporina 6 a 8 meses post trasplante una vez que se ha descartado mediante biopsia del injerto la presencia de rechazo.

Aunque la diferenciación histopatológica entre nefrototoxicidad por ciclosporina y rechazo crónico puede ser difícil e incluso ambas entidades pueden coexistir, se han descrito los siguientes hallazgos histopatológicos como característicos de nefrototoxicidad por ciclosporina. En casos de disfunción aguda: vacuolización de células tubulares proximales, microcalcificación en células tubulares, trombos capilares glomerulares, arteriopatía ocluyente de severidad variable y necrosis en parches, además de hialinosis de pared arteriolar y fibrosis intersticial difusa. En casos de disfunción renal crónica se describe fibrosis tubulointersticial en bandas, glomerulosclerosis así como hialinosis y esclerosis arteriolar.<sup>132</sup>

#### ***Papel del óxido nítrico en la nefrototoxicidad por ciclosporina A***

La nefrototoxicidad de la CsA se caracteriza por vasoconstricción renal que con frecuencia progresa a daño crónico con daño renal estructural irreversible. La vasoconstricción renal se atribuye a un desequilibrio en la liberación de sustancias vasoactivas. Por una parte el aumento en la liberación de factores vasoconstrictores tales como tromboxano, endotelina y angiotensina II y por otra, una disminución de factores vasodilatadores tales como prostaciclina y óxido nítrico.<sup>133,134</sup> Sin embargo, la participación del NO no ha sido bien definida. Algunos estudios sugieren que la CsA altera la producción de NO. Se ha demostrado que células endoteliales desarrollan daño estructural cuando son expuestas a CsA.<sup>134</sup>

En contraste estudios más recientes han mostrado que la síntesis de NO está bien preservada durante nefrototoxicidad por CsA.<sup>135</sup> Bobadilla y cols.<sup>136</sup> han mostrado que en ratas tratadas con CsA, a pesar de la vasoconstricción renal producida por CsA, la respuesta hemodinámica renal a la infusión aguda de arginina o a la inhibición de la síntesis de NO fue similar a la observada en ratas tratadas con vehículo, sugiriendo que la capacidad del endotelio renal para producir NO estaba conservada y parecía atenuar la vasoconstricción renal inducida por CsA. Lopez-Ongil y cols.<sup>138</sup> demostraron aumento en la producción de NO en presencia de CsA lo cual correlaciona con un aumento en el RNAm de eNOS.

Para caracterizar la contribución del NO durante vasoconstricción renal inducida por la administración de ciclosporina en la rata, Bobadilla y cols.<sup>139</sup> evaluaron el efecto de la inhibición crónica de NO sobre la histología y hemodinámica renales en ratas uninefrectomizadas tratadas con ciclosporina, un modelo con cambios compensatorios hipertrofos y funcionales similar a aquellos observados en receptores de trasplante renal. Además, este grupo también determinó el nivel de expresión renal de RNAm de cada isoforma de NOS en ratas tratadas con ciclosporina. En dicho estudio se encontró que en ratas tratadas con CsA, la inhibición de la síntesis de NO produjo elevación de la presión arterial y mayor vasoconstricción en vasos preglomerulares. Este efecto único del inhibidor nitró-L-arginina metil ester (L-NAME), sugirió que en la nefrototoxicidad por ciclosporina, el NO juega un papel proporcionalmente mayor en el mantenimiento del tono vascular de vasos preglomerulares.

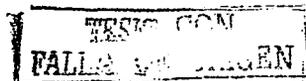
El estudio de microscopia de luz mostró que los cambios estructurales vasculares y la trombosis glomerular aumentaban con la inhibición de NO en ratas tratadas con CsA. La nefrotoxicidad por CsA se asoció también con leve disminución del coeficiente de ultrafiltración (Kf) el cual se redujo aun más con la inhibición de la síntesis de NO. Dichos hallazgos apoyaron el postulado de que la síntesis de NO está preservada y juega un papel importante en el mantenimiento del tono vascular y de la función renal durante la nefrotoxicidad por CsA. En dicho estudio se encontro que en corteza renal la expresión de RNAm de eNOS fue 2.7 veces mayor en ratas tratadas con CsA, sugiriendo un aumento en la síntesis de NO en células endoteliales, lo cual fue acorde con los resultados histológicos y hemodinámicos. Los niveles de RNAm de nNOS y de iNOS en la corteza renal no fueron diferentes en el grupo tratado con CsA comparado con el grupo control, sugiriendo que la producción de NO en corteza renal no fue suprimida por CsA. El aumento en la expresión de RNAm de eNOS puede deberse a un efecto indirecto o directo. La estimulación indirecta puede resultar de la vasoconstricción renal inducida por CsA, la cual disminuye el diámetro arteriolar a una tasa de flujo constante aumentando el stress de rozamiento de la capa de células endoteliales expuesta favoreciendo la expresión de eNOS. El efecto directo puede ocurrir a nivel transcripcional. Probablemente CsA por si misma puede estimular la expresión genica de eNOS.

En el estudio de Bobadilla<sup>139</sup> se encontro que la administración de CsA indujo cambios diferenciales en el patron de expresión de cada isoforma de NOS entre corteza y médula. A nivel cortical, RNAm de nNOS e iNOS no cambiaron, mientras que eNOS aumento significativamente. En contraste a nivel medular, la expresión de nNOS e iNOS disminuyeron con CsA, mientras que eNOS no mostro cambio.

Este patron de expresión de las isoformas de NOS observado en ratas tratadas con CsA puede resultar de varios factores tales como cambios vasculares y o daño tubular inducido por CsA. Dicho estudio apoya la noción de que la síntesis de NO está aumentada a nivel cortical durante nefrotoxicidad por CsA, atenuando la vasoconstricción por CsA y dicho incremento en la producción de NO puede ser secundario a un aumento en la expresión de RNAm de eNOS en la corteza renal. Además CsA no suprimió la expresión de nNOS e iNOS en la corteza renal, lo cual representa otra fuente de NO.

En un estudio reciente se encontro que en ratas tratadas con ciclosporina, la dexametasona previno la vasoconstricción renal restaurando la hemodinamica glomerular a valores control. Estos cambios se asociaron con mayor expresión de eNOS y restauración de la expresión medular de iNOS y nNOS. Lo anterior permitio concluir que la dexametasona previene la vasoconstricción renal inducida por CsA y que su efecto vasodilatador puede ser mediado por un aumento en la generación intrarenal de NO, secundario a aumento en la expresión de eNOS e iNOS.<sup>140</sup>

Otros estudios han encontrado patrones diferentes de expresión de NOS en casos de hipertensión inducida por ciclosporina. Vaziri<sup>141</sup> reporto que en ratas con hipertensión inducida por ciclosporina, hubo una marcada disminución en la excreción urinaria de nitratos y nitrógeno junto con marcada disminución de la expresión renal y vascular de iNOS pero no de eNOS lo que sugiere disminución en la producción de NO en animales tratados con ciclosporina. Wu ha reportado que ciclosporina inhibe la producción de NO en células cultivadas de la rama ascendente gruesa medular del asa de Henle las cuales expresan RNAm de iNOS.



El empleo de un estimulador de protein kinasa C (PKC) aumentó ligeramente la producción de NO bajo condiciones basales y previno la acción inhibitoria de CsA sobre la producción de NO, lo cual sugirió que el NO secretado por estas células cultivadas de ratón es dependiente de la vía de PKC <sup>[42]</sup>.

Se ha reportado también que en células cultivadas de músculo liso vascular y en una línea celular de macrófagos murinos, CsA inhibió significativamente la producción de nitritos inducida por interferón gamma murino recombinante y por interleucina-1 beta murina recombinante. Asimismo, CsA suprimió la expresión de RNAm para iNOS en una forma dependiente de concentración cuando las células fueron co-incubadas con lipopolisacáridos, lo que ha sugerido que CsA puede suprimir la transcripción de NOS2 <sup>[43]</sup>.

CsA puede inducir apoptosis en varias líneas celulares renales (mesangiales, tubulares, endoteliales) a través de un efecto mediado por la inducción de iNOS vía p53, lo cual podría contribuir a la fibrosis acelular característica de la nefrototoxicidad tardía por CsA <sup>[44]</sup>.

### **Papel del óxido nítrico en el rechazo agudo y crónico**

El rechazo agudo de aloinjertos renales continua teniendo un efecto negativo en la sobrevivencia del injerto a pesar de una mejor comprensión de las bases moleculares del rechazo del aloinjerto renal. Un episodio de rechazo agudo se caracteriza histológicamente por nefritis tubulointersticial con edema e infiltración cortical por células mononucleares y eosinófilos e invasión de la membrana basal tubular con necrosis tubular. El componente humoral se manifiesta por edema del endotelio del capilar glomerular, necrosis fibrinoide de arteriolas y trombos de fibrina con agregados plaquetarios en capilares glomerulares y peritubulares. Además durante rechazo agudo, una variedad de células, incluyendo linfocitos T, células "natural-killer", eosinófilos y macrófagos, infiltran el injerto.

Como se ha mencionado anteriormente, el NO tiene importantes funciones biológicas en mecanismos de defensa y daño celular y hay evidencia de que puede actuar como un inmunomodulador en el trasplante de aloinjertos jugando un papel importante en los mecanismos citotóxicos responsables del rechazo agudo de aloinjertos renales, donde los macrófagos pueden producir niveles elevados de iNOS. En 1996 el grupo de Dedeoglu en New York, encontro que en receptores pediátricos de trasplante renal, los niveles urinarios de metabolitos estables de NO disminuían significativamente durante episodios de rechazo agudo. Dichos metabolitos aumentaban en forma aguda después de un tratamiento exitoso de rechazo agudo con esteroides o con anticuerpos monoclonales (OKT-3), sugiriendo disminución en la síntesis de NO durante episodios de rechazo agudo <sup>[45]</sup>. Estudios previos habían demostrado aumento en la expresión genérica de iNOS en modelos murinos de rechazo agudo. Además la terapia con esteroides redujo la expresión de RNAm de iNOS y mejoró el rechazo. Jam y cols. estudiaron la expresión de iNOS en trasplantes renales humanos con rechazo agudo usando RT-PCR competitiva. Ellos no encontraron diferencia significativa en la expresión del RNAm de iNOS entre biopsias con y sin rechazo agudo <sup>[46]</sup>.

Dado que NO puede modular la respuesta inflamatoria del rechazo debido a su alta reactividad con superóxido con la consiguiente formación de peroxinitrito, Vos y colaboradores evaluaron los efectos de bloqueadores específicos de iNOS sobre función y morfología renales en aloinjertos renales en ratas con rechazo agudo que recibían dosis bajas de ciclosporina A. La adición de iminoetil-histina mejoró la hemodinámica renal. La adición de butilhexahidro-azepim-imina prácticamente restauró la tasa de filtración glomerular y la resistencia vascular renal a valores control.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

Los injertos tratados únicamente con ciclosporina mostraron lesiones vasculares, glomerulares y túbulo-intersticiales. El uso de iminoetil-lisina o butilhexahidro-azepin-imina no redujo significativamente el daño vascular y glomerular pero sí disminuyó el daño túbulo-intersticial así como la tinción para nitrotilosina en el epitelio tubular, lo cual sugirió que el bloqueo de iNOS mejora la función del aloinjerto y reduce las lesiones túbulo-intersticiales<sup>[47]</sup>. NO producido por iNOS puede iniciar apoptosis la cual contribuye a la necrosis tisular durante rechazo agudo<sup>[48]</sup>.

En casos de rechazo crónico todos los componentes del parénquima renal están involucrados, los glomérulos pueden encontrarse pequeños debido a isquemia crónica, puede haber engrosamiento de la membrana basal o aumento de la matriz mesangial, o los glomérulos pueden estar completamente hialinizados o esclerosados. Los cambios vasculares pueden incluir proliferación de la íntima con obliteración luminal y necrosis medial con cambios degenerativos de la lámina elástica interna. Puede haber además atrofia tubular y fibrosis intersticial<sup>[32]</sup>.

La fuente y el papel del NO en la nefropatía crónica del trasplante aun no son claros. Romagnani y cols. al evaluar exclusivamente la expresión de iNOS por inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en pacientes con nefropatía crónica del trasplante, localizaron la proteína de iNOS en células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) así como en estructuras vasculares, glomerulares y tubulares, encontrando además que células mesangiales y de músculo liso vascular también sintetizan iNOS. La expresión de iNOS por diferentes tipos de células sugiere que diferentes mecanismos regulan la activación de iNOS en la nefropatía crónica del aloinjerto y que el estímulo inmunológico puede no ser la única causa de su inducción. Otra posibilidad es que la producción de iNOS resulte de daño repetido y crónico de células endoteliales<sup>[49]</sup>.

Niveles aumentados de NO y superóxido han sido reportados durante rechazo crónico de aloinjertos renales. Por análisis inmunohistoquímico se ha demostrado aumento en la formación de nitrotilosina predominantemente en túbulos renales crónicamente rechazados. Estas modificaciones de tilosina pueden jugar un papel integral en la citotoxicidad relacionada al rechazo crónico y posiblemente sirvan como un importante marcador diagnóstico<sup>[50]</sup>. Por otra parte Shears y cols en un modelo de aloinjerto aórtico, demostraron que la sobreexpresión de iNOS tenía un efecto protector contra la arterioesclerosis del injerto. El tratamiento con un inhibidor selectivo de iNOS llevó a un significativo engrosamiento de la neointima y la transferencia del gen de iNOS al injerto disminuyó la hiperplasia íntima<sup>[51]</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **\*JUSTIFICACION**

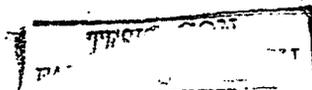
El descubrimiento del NO ha tenido gran impacto en la comprensión de la fisiología y fisiopatología renal, sin embargo su papel en algunas condiciones clínicas asociadas al trasplante renal aun no es claro. Identificar si existe un desequilibrio en la producción de NO en pacientes trasplantados con deterioro de la función del aloinjerto renal, podría permitir en un futuro el desarrollo de nuevos y más específicos medios para manipular este sistema, lo cual aportaría mejores tratamientos y más racionales para los pacientes con enfermedad renal.

### **\*HIPOTESIS**

1. La expresión predominante de eNOS así como una baja expresión de iNOS y nNOS son características del tejido renal normal.
2. La sobre expresión de eNOS, sin cambio en el patrón de expresión de iNOS y nNOS, es un hallazgo en presencia de nefrotoxicidad por ciclosporina A.
3. La sobre expresión de iNOS con disminución de la expresión de eNOS y nNOS son hallazgos en aloinjertos renales en casos de rechazo agudo o crónico.

### **\*OBJETIVOS**

1. Caracterizar la expresión de las 3 isoformas de NOS en tejido renal normal.
2. Caracterizar la expresión de las 3 isoformas de NOS en aloinjertos renales en pacientes con nefrotoxicidad por ciclosporina A, crisis de rechazo agudo y en casos de rechazo crónico.
3. Buscar asociación entre la expresión de cada isoforma de NOS con el grado de daño histológico glomerular.



## \*MATERIAL Y METODOS

### PACIENTES

#### *Criterios de inclusión*

Se incluyeron pacientes de la consulta externa de trasplantes del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" que cumplieran con alguno de los siguientes criterios:

1. Pacientes con aloinjertos renales de donador cadavérico, vivo no relacionado o vivo relacionado hospitalizados para biopsia percutánea del injerto en forma protocolaria para valorar retiro de ciclosporina A.
2. Pacientes con aloinjertos renales con deterioro agudo o crónico de la función renal que ingresen para la realización de biopsia del injerto ante la sospecha de rechazo agudo, rechazo crónico o nefrotoxicidad por ciclosporina A.

#### *Criterios de exclusión*

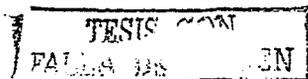
1. Hipertensión arterial sistémica severa descontrolada
2. Infección de vías urinarias activa
3. Nefropatía obstructiva del injerto
4. Enfermedad hemorrágica
5. Recurrencia de enfermedad renal original corroborada por biopsia
6. Glomerulonefritis de novo confirmada por estudio de microscopía óptica, inmunofluorescencia y/o ultraestructural.

#### *Controles:*

Especímenes de biopsia de aloinjertos renales obtenidos durante la cirugía del trasplante en el momento de la procuración.

### BIOPSIA

Se efectuó biopsia renal percutánea del injerto con aguja Tru-cut o con dispositivo automatizado (Pistola BARD) bajo guía ultrasonográfica dirigiéndose al polo superior del injerto.



## PARAMETROS DE LABORATORIO Y GABINETE

A todos los pacientes se les tomó muestra de sangre y orina a su ingreso para realizar los siguientes exámenes de laboratorio:

- Biometría hemática completa
- Pruebas de coagulación (TP, TTP)
- Química sanguínea de 12 elementos
- Electrolitos séricos
- Examen general de orina
- Urocultivo
- Cuantificación de proteínas en orina de 24 horas
- Niveles séricos de ciclosporina A
- A todos los pacientes se les efectúa un estudio ultrasonográfico del injerto renal previo a la realización de la biopsia

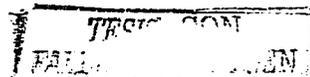
## ESTUDIO HISTOPATOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICA

Los estudios de histopatología e inmunohistoquímica se llevaron a cabo en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" siguiendo los pasos descritos en los apéndices 1 y 2.

Para el estudio de inmunohistoquímica se emplearon como anticuerpos primarios o específicos anticuerpos policlonales de conejo IgG dirigidos contra un epítipo correspondiente a una secuencia de aminoácidos que mapea al extremo amino terminal de eNOS, iNOS y nNOS de origen humano.

### Valoración semicuantitativa de daño glomerular y expresión de NOS

El examen histológico y la evaluación de la expresión de las isoformas de NOS en cada biopsia fueron realizados por un observador independiente perteneciente al mismo departamento de Patología, sin conocimiento previo de los datos clínicos y de laboratorio. Para la graduación histológica semicuantitativa de los glomerulos, posterior a la inmunohistoquímica, las muestras fueron teñidas con la reacción del ácido periódico de Schiff (PAS), lo cual permitió la identificación de cambios histológicos tales como expansión mesangial y la localización exacta de aquellas células positivas para las isoformas de NOS en relación con la membrana basal glomerular y al área mesangial. Puesto que el grado de daño glomerular es heterogéneo entre los glomerulos durante la progresión de la lesión, es posible que el nivel de expresión de las isoformas de NOS pueda relacionarse con el grado de daño en cada glomerulo. Por lo tanto, se evaluó el grado de daño glomerular así como la expresión de cada isoforma de NOS en cada glomerulo más que promediar el daño en cada muestra. Cinco a siete glomerulos fueron analizados por biopsia.



Los cambios glomerulares se graduaron en 4 clases que van de 0 a 3+ (mínimo, leve, moderado y severo) de acuerdo a la proporción de la región involucrada en las áreas de corte de cada glomérulo, basándose en el método descrito por Okada y cols.<sup>[52]</sup> El grado 0 representa daño que involucra menos del 10% de los glomérulos, grado 1 entre 10 y 30%, grado 2 entre 31 y 60% y grado 3 involucro mayor del 60%.

Después de determinar el grado de daño glomerular, en los mismos glomérulos se evaluó en forma semicuantitativa la expresión de cada isoforma de NOS de acuerdo al método de Roy-Chaudhury<sup>[53]</sup>, el cual emplea una escala de 0 a 3 como sigue: 0 = sin tinción específica, 0.5 = posiblemente positiva, 1+ = débilmente positiva, 2+ = moderadamente positiva, 3+ = fuertemente positiva. La calificación estuvo influenciada por la extensión más que por la intensidad de la tinción analizada mediante microscopía de luz.

Se consideró un caso de nefrototoxicidad por ciclosporina A, rechazo agudo o rechazo crónico en presencia de los siguientes hallazgos histopatológicos:

**NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA:** fibrosis en bandas, vacuolación isométrica del epitelio tubular, depósitos hialinos en arteriolas, microangiopatía trombotica y/o hipoperfusión glomerular.

**RECHAZO AGUDO:** edema intersticial, infiltración celular intersticial, tubulitis y/o necrosis vascular.

**RECHAZO CRÓNICO (Nefropatía crónica del injerto):** fibrosis intersticial, atrofia tubular, esclerosis vascular (arteriopatía inespecífica), infiltrado intersticial sin tubulitis y/o esclerosis glomerular.

## ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Los estudios de Biología Molecular se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular perteneciente al departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Una vez obtenido el espécimen de biopsia se congeló de inmediato en nitrógeno líquido y se mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los niveles de RNAm de cada una de las 3 isoformas de la sintasa de óxido nítrico se evaluaron mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa semicuantitativa previa obtención del DNAc por medio de transcripción reversa (RT-PCR), para lo que se requiere como etapa inicial la extracción del RNA total del tejido renal obtenido de cada biopsia (Apéndice 3).

### - Cuantificación de RNA

Una vez obtenido el RNA total se determinó si la extracción fue adecuada para lo cual se midió su concentración en un espectrofotómetro con una lectura a 260-280 nm y se corrió un gel de agarosa desnaturante (Apéndice 4).

### - Integridad del RNA

Para evaluar la integridad del RNA total se sometieron a electroforesis 2 µg del RNA extraído, en un gel de agarosa desnaturante como se detalla en el Apéndice 5.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ➤ **Análisis de la expresión de las sintasas de óxido nítrico**

### **1. Obtención de DNAc (TR)**

La reacción con transcriptasa reversa se llevó a cabo usando 5 µg de RNA, el cual se llevó a un volumen de 11 µl. La TR se efectuó a 37°C por 60 minutos en un volumen total de 20 µl usando transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (Apéndice 6).

La contaminación con DNA genómico se identificó mediante la amplificación por PCR del RNA total sin agregar transcriptasa reversa.

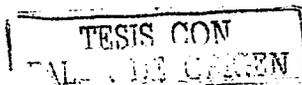
### **2. Amplificación de las isoformas de NOS y gen control (β-actina)**

Se utilizó una décima parte de la TR de cada muestra para la amplificación de las isoformas de NOS y β-actina en reacciones con un volumen final de 20 µl empleando primers específicos (Apéndice 7). El gen control se co-amplificó simultáneamente en cada reacción en un tubo separado. Para definir el perfil de amplificación de cada isoforma de NOS y del gen control (β-actina) se creó previamente una curva de la cinética de amplificación de cada producto buscando el número de ciclos adecuado en base a la fase exponencial de cada curva.

La secuencia de los primers empleados se muestra en el apéndice 8.

### **3. Análisis de los productos de PCR**

Para analizar los productos de PCR, la mitad de cada reacción se analizó electroforéticamente en un gel de acrilamida al 5%. Las bandas se tiñeron con bromuro de Etidio, se visualizaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta, se cortaron y suspendieron en líquido de centelleo. El producto de PCR se midió en un contador gamma. La cantidad de radioactividad recuperada de las bandas en c.p.m. se dividió entre las c.p.m. obtenidas del gen control. De tal forma que los niveles de RNAm de cada sintasa se expresaron como una relación entre cada isoforma y el gen control.



## \*ESTADISTICA

### ➤ CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

La estimación del tamaño de muestra se hizo con la fórmula para respuestas binarias agrupadas (clusters) ajustada a 3 grupos de acuerdo a la siguiente fórmula (I.ee. *Stat Med* 13:1241,1994):

$$N = \left[ \frac{\sigma (Z_{\alpha} - Z_{1-\beta})}{p_1 - p_0} \right]^2$$

Ajustada para 3 grupos:

$$N = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) \times (Z_{\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

Donde  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  representan las varianzas del grupo control y experimental.  $Z_{\alpha}$  es la probabilidad de error tipo I.  $Z_{1-\beta}$  es el poder y  $p_1$  y  $p_2$  corresponden a las tasas de éxito por grupo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como variables independientes se tuvieron las siguientes: nefrototoxicidad por ciclosporina, rechazo agudo y rechazo crónico. La variable dependiente o de respuesta fue la expresión de cada isoforma de NOS. Los resultados para la variable dependiente (expresión de NOS por inmunohistoquímica y PCR) se midieron en una escala ordinal ya que tuvieron un orden intrínseco para sus valores y las cifras empleadas eran arbitrarias. Las variables independientes se consideraron nominales.

Dado que interesa conocer si existía diferencia en el patrón de expresión de cada isoforma de NOS entre los 3 grupos, que se tenían 2 o más variables dependientes de tipo ordinal y que se trataba de 3 grupos independientes, se empleó como prueba estadística el análisis de varianza de 2 vías o la prueba de Kruskal-Wallis para un factor por rangos para decidir si las muestras independientes eran de poblaciones diferentes, dependiendo de si las variables seguían o no una distribución normal (ANVA con distribución normal o KW con distribución no normal).

En lo que se refiere a resultados de inmunohistoquímica, los datos se expresaron como promedios  $\pm$  DS.

Para los estudios de biología molecular el nivel de expresión de cada isoforma de NOS se presentó como la relación entre el producto de PCR de NOS/gen control ( $\beta$ -actina) expresada como promedio  $\pm$  DS.

Se definió como significancia estadística una  $p < 0.05$ .

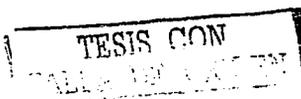
Como prueba de asociación entre el grado de daño glomerular y la expresión de cada isoforma de NOS se empleó la prueba de correlación por rangos de Spearman. Dicha prueba es una medida de asociación la cual requiere que ambas variables sean medidas en una escala ordinal de manera que los objetos en estudio puedan colocarse en dos series ordenadas.

Se usó como medida de reproducibilidad intra observador la prueba de correlación por rangos de Spearman ya que por tener dos series de datos asimétricas no fue posible emplear la prueba estadística Kappa simple en lo que al análisis de inmunohistoquímica se refiere.

## CONSIDERACIONES ETICAS

Los pacientes participantes firmaron una hoja de consentimiento para la realización de la biopsia del injerto renal y se les explicó las características y objetivos del procedimiento. El estudio fue autorizado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

La biopsia fue efectuada por uno de los Nefrólogos o Cirujanos adscritos al departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", bajo indicación precisa de los mismos médicos.



## \*RESULTADOS

Entre 1999 y 2001 se estudiaron un total de 70 casos del registro de trasplante renal del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", correspondiendo cada caso a un espécimen de biopsia. Las muestras se dividieron de la siguiente manera: 22 muestras control, 19 especímenes en el grupo con nefrotoxicidad por ciclosporina, 10 en el grupo con rechazo agudo y 19 en el grupo con nefropatía crónica del injerto. Las muestras control se obtuvieron de riñones normales de individuos sanos sometidos a uninefrectomía para donación. La **tabla 1** muestra los diferentes datos clínicos y bioquímicos evaluados. El grupo control incluyó en total 22 donadores, 12 hombres y 10 mujeres con una edad promedio de  $40 \pm 7$  años. En el grupo con nefrotoxicidad por CsA se incluyeron 14 hombres y 5 mujeres con un promedio de edad de  $29 \pm 12$  años. El grupo con rechazo agudo comprendió 7 hombres y 3 mujeres con un promedio de edad de  $23 \pm 5$  años. El grupo con nefropatía crónica del injerto incluyó 13 hombres y 6 mujeres con un promedio de edad de  $32 \pm 11$  años. Si bien no se encontró diferencia estadísticamente significativa en los diferentes parámetros evaluados al comparar los 3 grupos con patología, sí se encontró diferencia significativa en la edad, nitrógeno ureico sanguíneo, creatinina sérica y ácido úrico sérico al comparar cada uno de los grupos con patología con el grupo control. Como se describió previamente la definición de un caso con patología se basó en las características histopatológicas analizadas mediante microscopía de luz. Dentro del grupo con nefrotoxicidad por ciclosporina, cada caso tuvo al menos una de las siguientes lesiones histológicas: fibrosis intersticial en bandas, vacuolación isométrica del epitelio tubular, depósitos hialinos en arteriolas, o bien datos compatibles con microangiopatía trombótica y/o hipoperfusión glomerular (**Figura 1**). En el grupo de rechazo agudo cada caso se definió en presencia de al menos uno de los siguientes hallazgos histológicos: edema intersticial, infiltración celular intersticial, tubulitis y/o necrosis vascular (**Figura 2**), y finalmente, en el grupo de nefropatía crónica del injerto cada caso se definió basándose en la presencia de al menos una de las siguientes lesiones histológicas: fibrosis intersticial, atrofia tubular, esclerosis vascular (arteriopatía inespecífica), infiltrado intersticial sin tubulitis y/o esclerosis glomerular (**Figura 3**).

TESIS CON  
TALLA DE ORIGEN

**T. BLA 1. DATOS CLINICOS Y DE LABORATORIO**

|                          | <b>Control</b> | <b>NxCsA</b> | <b>Rechazo agudo</b> | <b>Nefropatía crónica</b> |
|--------------------------|----------------|--------------|----------------------|---------------------------|
| Número (h / m)           | 22 (12 / 10)   | 19 (14 / 5)  | 10 (7 / 3)           | 19 (13 / 6)               |
| Edad (años)              | 40 ± 7         | 29 ± 12*     | 23 ± 5*              | 32 ± 11*                  |
| Leucocitos (x 1000)      | 6.6 ± 0.9      | 7.5 ± 2.1    | 8.2 ± 2.3*           | 7.4 ± 2.7                 |
| Hemoglobina (g/l)        | 14.4 ± 0.4     | 14.3 ± 2.2   | 12.2 ± 1.3*          | 13.4 ± 2.2                |
| Nitrógeno ureico (mg/dl) | 17 ± 2         | 25 ± 11*     | 40 ± 18*             | 39 ± 19*                  |
| Creatinina (mg/dl)       | 0.9 ± 0.1      | 1.8 ± 0.6*   | 3.1 ± 1.9*           | 2.5 ± 1*                  |
| Colesterol (mg/dl)       | 189 ± 16       | 204 ± 42     | 198 ± 28             | 200 ± 50                  |
| Triglicéridos (mg/dl)    | 164 ± 18       | 198 ± 90     | 163 ± 51             | 198 ± 77                  |
| Acido úrico (mg/dl)      | 5.1 ± 0.8      | 8.2 ± 1.7*   | 6.9 ± 0.9*           | 8 ± 2.2*                  |

\*P &lt; 0.05 vs control

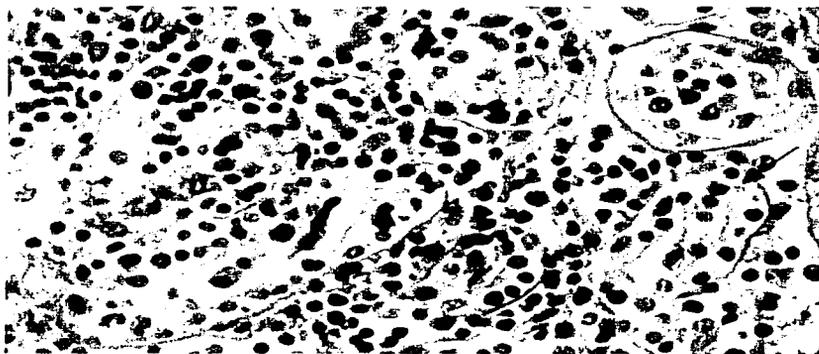
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig. 1. Estudio histopatológico con microscopia de luz (H y E) en un caso de nefrotoxicidad por CsA destacando la fibrosis intersticial**



TESIS CON  
FALLA DE LIBRO

**Fig. 2. Estudio histopatológico con microscopia de luz (H y E) en un caso de rechazo agudo destacando el infiltrado celular intersticial**



TESIS GEN  
FACULTAD DE CIENCIAS

**Fig. 3. Estudio histopatológico con microscopía de luz (H y E) en un caso de nefropatía crónica destacando la fibrosis intersticial, la atrofia tubular y la glomeruloesclerosis**



TESIS CON  
CALIFICACIÓN

El mayor grado de daño glomerular se encontró en el grupo con NCI el cual tuvo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ( $0.42 \pm 0.14$  vs.  $0.12 \pm 0.18$ ,  $p < 0.05$ ). El grupo con nefrotoxicidad por ciclosporina tuvo un score de daño glomerular de  $0.32 \pm 0.14$  ( $p = \text{NS}$  vs control) y el grupo con rehazo agudo tuvo un score de daño glomerular de  $0.19 \pm 0.16$  ( $p = \text{NS}$  vs control).

Dentro del análisis de expresión génica, como paso inicial se construyeron las curvas de las cinéticas de amplificación de cada isoforma de NOS y del gen control a partir de RNA total de riñón normal empleando  $5 \mu\text{g}$  de RNA total.

Como se muestra en las gráficas 1 a 4 cada curva describe la relación entre el producto de PCR expresado en cuentas por minuto y el número de ciclos. Asimismo cada curva consta de dos fases, una fase inicial de ascenso conocida como fase exponencial y una segunda fase conocida como de meseta en la cual se observa un producto de PCR prácticamente sin cambios a pesar de aumento en el número de ciclos. En base a la fase exponencial se determinó el número de ciclos a los cuales se amplificaría cada producto habiéndose decidido amplificar  $\beta$ -actina a 21 ciclos, eNOS a 31 ciclos, iNOS a 32 ciclos y nNOS a 31 ciclos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 1. Cinética de amplificación a partir de RNA total de riñón normal  $\beta$ -actina (5 mcg de RNA total)

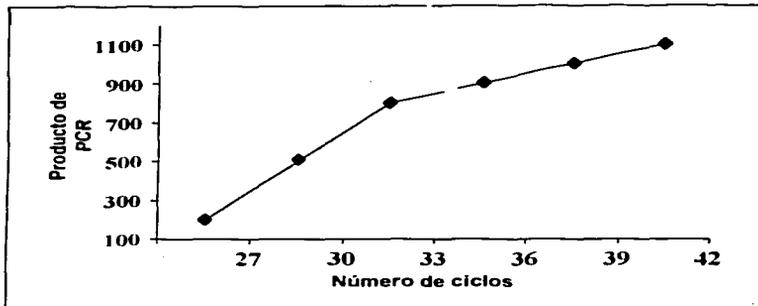


Gráfica 2. Cinética de amplificación a partir de RNA total de riñón normal eNOS (5 mcg de RNA total)

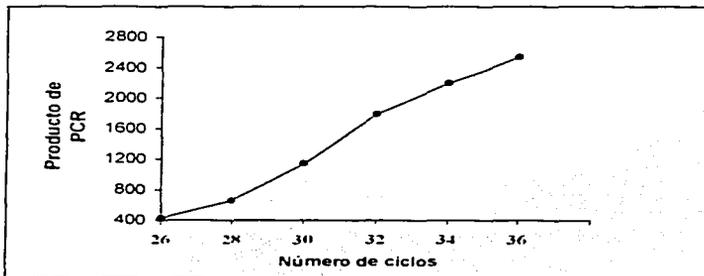


TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

**Gráfica 3. Cinética de amplificación a partir de RNA total de riñón normal  
iNOS (5 mcg de RNA total)**



**Gráfica 4. Cinética de amplificación a partir de RNA total de riñón normal  
nNOS (5 mcg de RNA total)**



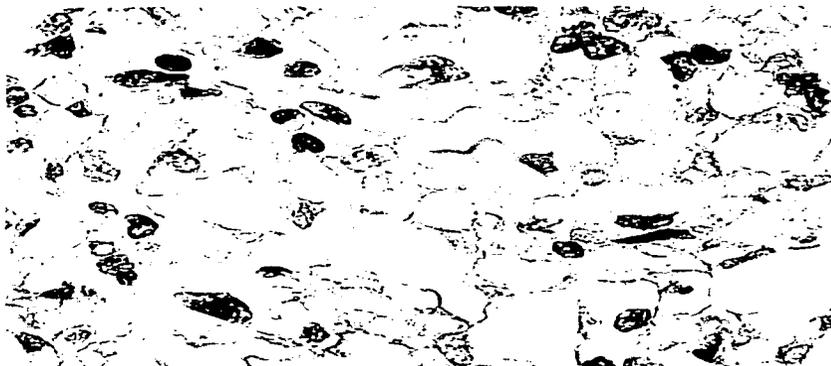
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para el análisis inmunohistoquímico se emplearon anticuerpos específicos policlonales de conejo IgG dirigidos contra un epítopo correspondiente a una secuencia de aminoácidos que mapea al extremo amino terminal de eNOS, iNOS y nNOS de origen humano.

Para la graduación histológica semicuantitativa de los glomérulos, posterior a la inmunohistoquímica, las muestras fueron teñidas con la reacción del ácido periódico de Schiff (PAS), lo cual permitió la identificación de cambios histológicos tales como expansión mesangial y la localización exacta de aquellas células positivas para las isoformas de NOS en relación con la membrana basal glomerular y al área mesangial. Se evaluó el grado de daño glomerular así como la expresión de cada isoforma de NOS en cinco a siete glomérulos por biopsia empleando las escalas semicuantitativas previamente descritas. Las figuras 4, 5 y 6 muestran las imágenes de inmunohistoquímica más representativas para cada isoforma de NOS.

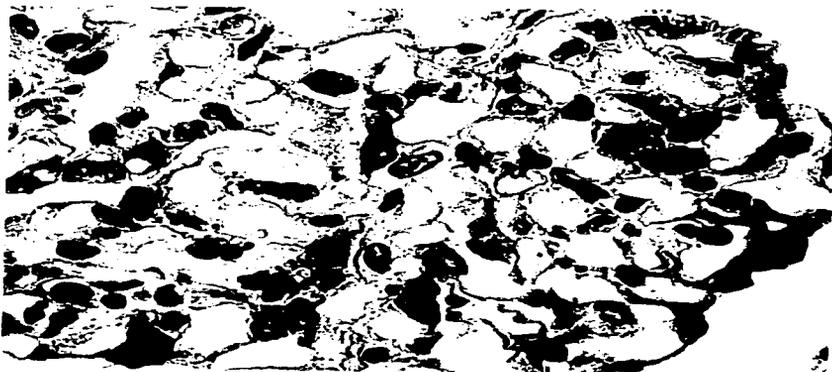
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig. 4. Inmunohistoquímica para nNOS en un caso de rechazo agudo**



TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

**Fig. 5. Inmunohistoquímica para iNOS en un caso de rechazo agudo**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fig. 6. Inmunohistoquímica para eNOS en un caso de nefrototoxicidad por CsA**



TRIS CON  
CALIFICACION

Las gráficas 5, 6 y 7 muestran los resultados de expresión génica e inmunohistoquímica para cada una de las isoformas en los 3 grupos comparadas con el grupo control.

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DS para la relación en c.p.m. entre el producto de PCR de NOS/gen control ( $\beta$ -actina) para el caso de la expresión génica y como promedio  $\pm$  DS para el score de inmunohistoquímica.

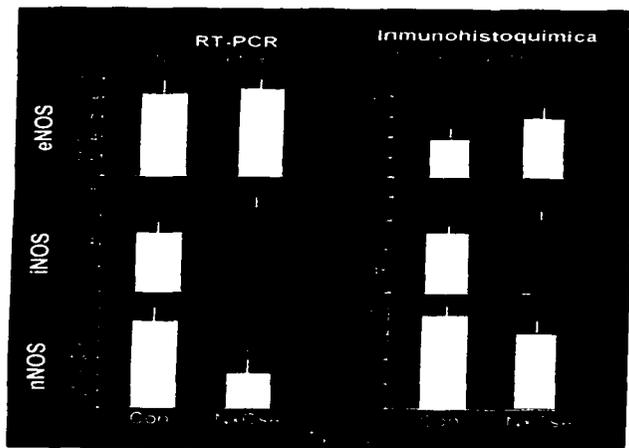
Como puede observarse, la nefrototoxicidad por CsA no modificó la expresión génica de eNOS y de iNOS, en cambio produjo una disminución significativa de nNOS. Cambios similares se observaron en la expresión de la proteína evaluada por inmunohistoquímica, eNOS e iNOS no se modificaron y la expresión de nNOS tendió a disminuir aunque el cambio no fue significativo.

En los casos de RA, el patrón de expresión fue diferente, la expresión génica de eNOS disminuyó significativamente, sin embargo se observó mayor expresión de su proteína, mientras que los niveles de iNOS a nivel génico y proteico aumentaron claramente con respecto al grupo control, habiéndose encontrado una diferencia estadísticamente significativa únicamente en la expresión génica al compararse con el grupo control. En este grupo se observó además una disminución significativa en la expresión génica de nNOS mientras que la expresión de nNOS por IHQ no se modificó respecto al valor control.

En la NCI, como puede observarse, la expresión génica de las 3 isoformas disminuyó de manera no significativa en comparación con el grupo control. Asimismo el análisis inmunohistoquímico mostró disminución no significativa de la expresión de eNOS, iNOS y nNOS en comparación con el tejido control.

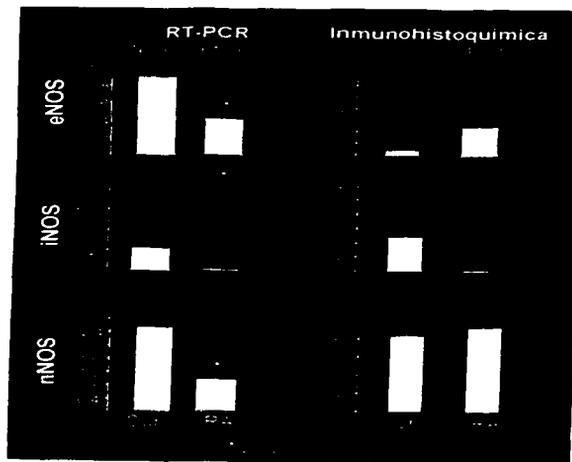
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Gráfica 5. Expresión génica e inmunohistoquímica de las 3 isoformas de NOS en casos de nefrotoxicidad por CsA**



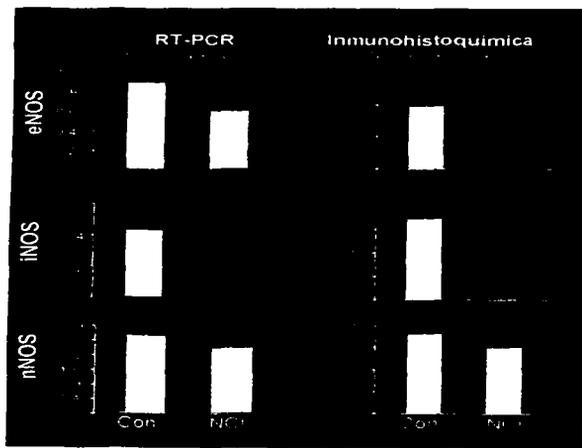
Trabaja CON  
FALLA DE ORIGEN

**Gráfica 6. Expresión génica e inmunohistoquímica de las 3 isoformas de NOS en casos de rechazo agudo**



TESIS CON  
CARTA DE ORIGEN

**Gráfica 7. Expresión génica e inmunohistoquímica de las 3 isoformas de NOS en casos de nefropatía crónica del injerto**



TESIS CON  
ORIGEN

Al buscar asociación entre el grado de daño glomerular y la expresión de NOS en las 3 patologías, se encontró que desde el punto de vista de expresión génica hubo correlación significativa negativa entre grado de daño glomerular y la expresión de iNOS en casos de nefrotoxicidad por CsA ( $r = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ) y de nefropatía crónica del injerto ( $r = -0.76$ ,  $p < 0.05$ ) y en lo que se refiere al análisis inmunohistoquímico, encontramos únicamente una correlación directa significativa en casos de rechazo agudo con nNOS e iNOS ( $r = 0.64$  y  $0.73$  respectivamente,  $p < 0.05$ ). (Cuadros 1 y 2).

La expresión de NOS por PCR e IHQ no mostró correlación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 1. Correlación entre expresión génica de NOS y grado de daño glomerular**

|      | Daño glomerular |       |         |
|------|-----------------|-------|---------|
|      | NxGSA           | RA    | NCI     |
| nNOS | 0.083           | 0.407 | 0.311   |
| eNOS | 0.197           | 0.050 | 0.304   |
| iNOS | -0.534*         | 0.272 | -0.760* |

\*Los valores expresados en este cuadro indican la correlación de Spearman.

**Cuadro 2. Correlación entre expresión de NOS por IHQ y grado de daño glomerular**

|      | Daño glomerular |        |       |
|------|-----------------|--------|-------|
|      | NxGSA           | RA     | NCI   |
| nNOS | 0.200           | 0.643* | 0.131 |
| eNOS | 0.435           | 0.6    | 0.131 |
| iNOS | 0.174           | 0.734* | 0.224 |

\*Los valores expresados en este cuadro indican la correlación de Spearman.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### ➤ **CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL Y PODER POST-HOC**

De acuerdo a la fórmula antes descrita se calculó el tamaño de muestra para cada isoforma de NOS considerando la mínima diferencia entre grupos, el cual corresponde a 35 casos para eNOS, 30 casos para iNOS y 142 casos para nNOS. Sin embargo dada la poca factibilidad de reunir tal cantidad de muestras así como por las dificultades y limitaciones técnicas que implica trabajar con un gran número de muestras, se decidió calcular el poder post-hoc tomando en cuenta las mínimas diferencias entre grupos. Dicho cálculo de poder es de 50%.

#### ➤ **MEDIDA DE CONCORDANCIA INTRA-OBSERVADOR**

Dado que se cuenta con tablas de valores asimétricas en lo que se refiere al score de daño glomerular y al score de inmunohistoquímica para cada isoforma de NOS, no es posible utilizar la prueba estadística Kappa como prueba de concordancia intra observador, por lo que se ha recurrido a obtener una prueba de correlación por rangos de Spearman la cual ha mostrado los siguientes coeficientes:

Score de daño glomerular: 0.74 (p = 0.000)

Score nNOS: 0.77 (p = 0.000)

Score iNOS: 0.62 (p = 0.017)

Score eNOS: 0.70 (p = 0.000)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## \*DISCUSIÓN

Los efectos de NO pueden ser heterogéneos y dependen del sitio de producción, tanto dentro de la célula como dentro de la nefrona, de la duración de su efecto y de la presencia concomitante de intermediarios reactivos de oxígeno. La generación transitoria de NO característica de la activación de eNOS es crítica para la actividad de algunas enzimas, para la mediación de vasorelajación, la actividad anti-apoptótica y la protección contra stress oxidativo. Por otra parte, la generación sostenida y de gran magnitud de NO por iNOS, puede llevar a un amplio espectro de secuelas que van desde la acción anti-apoptótica, la peroxidación de lípidos y daño al DNA hasta efectos pro-apoptóticos<sup>154</sup>. Recientemente se ha sugerido que las secuelas citotóxicas de la producción de NO dependen del estado redox de la célula y de su capacidad para generar el anión peroxinitrito<sup>155</sup>.

En lo que se refiere a la patología del trasplante renal NO ha sido implicado en la patogénesis del rechazo agudo y crónico del aloinjerto<sup>141</sup> así como en la nefrototoxicidad por fármacos inmunosupresores, en particular la relacionada a ciclosporina A<sup>156</sup>.

En este estudio encontramos que en pacientes con nefrototoxicidad por ciclosporina documentada desde el punto de vista histopatológico, basándose en la presencia de fibrosis intersticial en bandas, vacuolación isométrica del epitelio tubular, depósitos hialinos en arteriolas o hipoperfusión glomerular, la administración de dicho fármaco no se asoció con disminución en la expresión génica ni inmunohistoquímica de eNOS y iNOS, contrariamente a la sugerencia de que la nefrototoxicidad por ciclosporina resulta de una deficiencia de NO y que esta podría participar en la fisiopatología de la vasoconstricción renal inducida por CsA<sup>156</sup>. Los hallazgos de este estudio sugieren que en casos de nefrototoxicidad por ciclosporina la síntesis de óxido nítrico se encuentra conservada y contribuye a atenuar la vasoconstricción producida por la ciclosporina tal como se ha demostrado en modelos experimentales<sup>156</sup>. Los efectos protectores de NO tales como prevención de la activación de leucocitos y adhesión de plaquetas han sido atribuidos al NO generado por la síntesis endotelial, lo que apoyaría el potencial efecto benéfico de la expresión génica sostenida de eNOS durante la administración crónica de CsA. Asimismo la progresión del daño renal en modelos experimentales de lesión renal se ve accentuada en forma importante en ratones con ausencia de un gen funcional de eNOS lo que ha sugerido un papel protector del NO derivado de eNOS. Se sabe además que los radicales de NO generados por eNOS juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis vascular induciendo vasorelajación e inhibiendo la adhesión y agregación plaquetarias al endotelio<sup>157</sup>. Otros estudios han demostrado que el NO derivado de eNOS es un modulador crítico de las interacciones entre leucocitos y células endoteliales<sup>158</sup>. Finalmente cabe señalar que si bien en modelos experimentales de nefrototoxicidad por ciclosporina, la mayor expresión de eNOS se ha encontrado en corteza<sup>159</sup>, no fue posible en este estudio identificar por separado el patrón de expresión de cada isoforma de NOS tanto a nivel de corteza como de médula, dado el reducido tamaño del espécimen de biopsia, sin embargo es muy probable que se hubiese identificado predominantemente la expresión cortical ya que el sitio de punción se dirige habitualmente a dicha zona del injerto.

Una posible explicación para la menor expresión de nNOS encontrada en nuestro estudio, en particular en casos de nefrotoxicidad por CsA, sería la presencia de la proteína inhibidora de nNOS (PIN) la cual pudiera estar sobre expresada por el efecto nefrotóxico de CsA [59].

Es probable entonces que en casos de nefrotoxicidad por CsA, la expresión sostenida de eNOS favorezca un efecto protector mediado por el NO producido por esta isoforma y que otros mediadores tales como endotelina, sistema renina-angiotensina-aldosterona, la sobreactividad simpática o el stress oxidativo participen en el desarrollo de la nefrotoxicidad por esta droga.

En los casos de rechazo agudo la alteración histológica predominante fue la infiltración inflamatoria túbulo-intersticial. La presencia de estas células inflamatorias activadas en el tejido renal se asocio con sobreexpresión del RNAm de iNOS y una tendencia a mayores niveles de proteína, lo que es consistente con otros estudios que han reportado incremento en la expresión de iNOS durante episodios de rechazo agudo tanto a nivel intersticial como glomerular [46, 60], si bien los reportes de una mayor expresión de iNOS en casos de rechazo agudo en humanos, son escasos. El aumento en la expresión de iNOS se ha asociado además con disminución de la expresión glomerular de eNOS [60], hallazgo también encontrado en el presente trabajo, pues se observó una disminución significativa en la expresión genica de eNOS. Numerosas observaciones apoyan un desequilibrio de la función de NOS en daño renal agudo, con supresión de la actividad de eNOS y aumento en la actividad del sistema de alta producción mediado por iNOS [54]. Dicho desequilibrio podría aportar las bases para terapias futuras. En casos de rechazo agudo de aloinjertos renales la sobre expresión de iNOS se ha asociado con infiltración celular. TNF- $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  pueden estimular la expresión genica de iNOS activando el factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [52]. Es además bien conocido que el NF- $\kappa$ B es activado por radicales de oxígeno [61], los cuales pueden ser formados en el riñón tanto por células inflamatorias como no inflamatorias. Otra posibilidad es que iNOS sea la fuente de O $_2^{\cdot -}$  y en estas situaciones iNOS se convertirá en una enzima deletérea [54].

En un modelo experimental de rechazo agudo de aloinjertos renales, la inhibición selectiva de iNOS produjo mejoría hemodinámica así como reducción del daño y el infiltrado tubulointersticial, apoyando el concepto de un papel deletéreo de iNOS derivada a partir de células inflamatorias en el rechazo de aloinjertos [52].

Lo anterior puede ayudar a explicar porque en situaciones como el rechazo agudo del aloinjerto renal el cual se acompaña de un intenso stress por radicales de oxígeno debido a isquemia-reperfusion e inflamación, iNOS actúa como una enzima deletérea.

En lo que se refiere a la participación del NO en la nefropatía crónica del injerto, la información existente es escasa, y básicamente se ha enfocado a la expresión de iNOS. Se ha reportado localización de la proteína de iNOS en células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) así como en estructuras vasculares, glomerulares, tubulares, células mesangiales y de músculo liso vascular, lo que sugiere que diferentes mecanismos regulan la activación de iNOS en la nefropatía crónica del aloinjerto y que el estímulo inmunológico puede no ser la única causa de su inducción [60].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se ha descrito también que en modelos murinos de rechazo crónico la expresión génica de iNOS aumenta en conjunto con otros mediadores inflamatorios en la corteza renal, sugiriendo que la producción de NO por iNOS puede estar aumentada como un mecanismo compensador<sup>[62]</sup>.

Contrariamente a lo antes expuesto, nosotros hemos encontrado en este estudio un bajo nivel de expresión de las 3 isoformas de NOS en casos de nefropatía crónica del aloinjerto, tanto a nivel génico así como por inmunohistoquímica, probablemente debido a lo avanzado del daño tisular, lo cual se ve apoyado también por la baja expresión del gen control, pues como se describió previamente, el mayor grado de daño glomerular se encontró en el grupo con NCI, el cual tuvo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ( $0.42 \pm 0.14$  vs  $0.12 \pm 0.18$ ,  $p < 0.05$ ). Además, cabe señalar que a diferencia de los casos de rechazo agudo, en los pacientes con nefropatía crónica del injerto el tipo de daño histológico es diferente, pues no se encuentran células inflamatorias activadas que estimularían la expresión de iNOS, por el contrario, lo que se encuentra es predominantemente fibrosis intersticial y atrofia tubular, es decir existe una disminución en el número de células con capacidad de producir NO.

Se ha descrito también una disminución en la producción de NO así como una menor expresión intrarenal de eNOS e iNOS en insuficiencia renal crónica, lo que puede deberse a un incremento en la concentración de inhibidores endógenos circulantes de NOS<sup>[63, 64]</sup>. Por análisis inmunohistoquímico se ha demostrado también aumento en la formación de nitrorosina predominantemente en tubulos renales crónicamente rechazados. Estas específicas modificaciones de nitrosina pueden jugar un papel integral en la citotoxicidad relacionada al rechazo crónico y posiblemente sirvan como un importante marcador diagnóstico<sup>[64]</sup>. En este estudio no se buscó la presencia de nitrorosina particularmente a nivel tubular, lo cual sería interesante identificar en un estudio ulterior.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## \*CONCLUSIONES

En el curso de 3 diferentes nefropatías, el patrón de expresión de eNOS, iNOS y nNOS se encuentra alterado.

La administración de CsA no modificó significativamente los niveles de eNOS, sugiriendo que el ON producido por esta isoforma pudiera contrarrestar al menos en parte el efecto vasoconstrictor de este inmunosupresor, lo que se asoció además con una mayor expresión de la isoforma inducible. Los efectos protectores de NO tales como prevención de la activación de leucocitos y adhesión de plaquetas han sido atribuidos al NO generado por la sintasa endotelial, lo que apoyaría el potencial efecto benéfico de la expresión génica sostenida de eNOS durante la administración crónica de CsA.

En relación con el rechazo agudo, se observó una mayor expresión de los niveles de iNOS tanto a nivel génico como proteico, lo cual podría contribuir al daño vascular, glomerular y túbulointersticial observado en estos casos. Además en presencia de rechazo agudo de aloinjertos renales la sobre expresión de iNOS se ha asociado con infiltración celular.

El papel y la fuente del NO en la nefropatía crónica del aloinjerto aun no son claros. En este estudio se encontró un bajo nivel de expresión de las 3 isoformas de NOS en casos de nefropatía crónica del aloinjerto, tanto a nivel genico así como por inmunohistoquímica, probablemente debido a lo avanzado del daño tisular, lo cual se ve apoyado también por la baja expresión del gen control ( $\beta$ -actina)

Como Goligorsky y Noiri recientemente han establecido: **"Cuando las funciones de todas las isoformas de NOS son bloqueadas, los efectos deletéreos de la inhibición de eNOS invariablemente prevalecen sobre los posibles beneficios de la inhibición de iNOS"**<sup>165</sup>.

TESIS COM  
FALLA EN EN

## \*LIMITANTES DEL ESTUDIO

1. No se han considerado factores externos que pudieran modificar la expresión de NOS en aloinjertos renales, tales como: tiempo de isquemia, variabilidad individual, presencia de dislipidemia, la dosis de nefronas que el donador aporta al receptor, el grado y tiempo de evolución de hipertensión arterial sistémica post-trasplante así como cambios en la expresión influenciados por género y edad, sin embargo llevar a cabo un análisis estratificado tomando en cuenta dichas covariables considerando el tamaño muestral alcanzado sería prácticamente imposible.

2. Como ya se ha señalado el tamaño de muestra no fue el ideal según lo calculado con la fórmula ya descrita y considerando las mínimas diferencias, sin embargo alcanzar dicho tamaño muestral implicaría prolongar el estudio por mucho tiempo además de las serias limitaciones que se tendrían para el manejo de un gran número de muestras, tanto desde el punto de vista de reactivos (enzimas, nucleótidos, radiotrazador) así como del equipo específico como cámaras de electroforesis y termocicladores.

3. Finalmente es importante señalar que si bien en modelos experimentales de enfermedad renal se ha podido identificar por separado el patrón de expresión de cada isoforma de NOS tanto a nivel de corteza como de médula renal, en este estudio no fue posible dado el reducido tamaño del espécimen de biopsia, sin embargo es muy probable que se hubiese identificado predominantemente la expresión cortical ya que el sitio de punción se dirige habitualmente a dicha zona del injerto.

TESIS CON  
FALLA DE URGEN

**\*REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Ignarro LJ: **Physiology and pathophysiology of nitric oxide.** *Kidney Int* 49:S2, 1996.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* 288:373, 1980.
3. Sanders PW: **L-Arginine and Nitric Oxide in the regulation of blood pressure.** In Laragh JH and Brenner BM (eds): *Hypertension, 2d ed.* Raven Press, New York, 1995, p. 1097.
4. Kone BC: **Nitric oxide in renal health and disease.** *Am J Kidney Dis* 30:311, 1997.
5. Raji L, Baylis C: **Glomerular actions of nitric oxide.** *Kidney Int* 48:20-32, 1995.
6. Kone BC: **Localization and regulation of Nitric Oxide Synthase isoforms in the Kidney.** *Sem Nephrol* 19:230, 1999.
7. Furusu A et al: **Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis.** *Kidney Int* 53:1760-1768, 1998.
8. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: **Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology.** *Pharm Rev* 43:109-142, 1991.
9. Singh R, Pervin S, Rogers NE, et al: **Evidence for the presence of an unusual nitric oxide- and citrulline-producing enzyme in rat kidney.** *Biochem Biophys Res Commun* 232:672, 1997.
10. Chen Y, Rosazza JP: **Oligopeptides as substrates and inhibitors for a new constitutive nitric oxide synthase from rat cerebellum.** *Biochem Biophys Res Commun* 224:303, 1996.
11. Thorup C, Persson EG: **Macula densa derived nitric oxide in regulation of glomerular capillary pressure.** *Kidney Int* 49:430-436, 1996.
12. Zatz R, De Nucci G: **Effect of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation.** *Am J Physiol* 261 (Renal Fluid Electrolyte Physiol) 301:F360-F363, 1991.
13. Pfeilschifter J, Kunz D, Muhl H: **Nitric oxide: An inflammatory mediator of glomerular mesangial cells.** *Nephron* 64:518-525, 1993.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

14. Catell V, Largen P, De Heer E, Cook T: **Glomeruli synthesize nitrite in active Heymann nephritis: The source is infiltrating macrophages.** *Kidney Int* 40:847-851, 1991.
15. Catell V, Cook T, Moncada S: **Glomeruli synthesize nitrite in experimental nephrotoxic nephritis.** *Kidney Int* 38:1056-1060, 1990.
16. Narita I, Border WA, Keneler M, Noble NA: **Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis.** *Lab Invest* 72:17-24, 1995.
17. Ferrario R, Takahashi K, Fogo A, Badr KF, Munger KA: **Consequences of acute nitric oxide synthesis inhibition in experimental glomerulonephritis.** *J Am Soc Nephrol* 4:1847-1854, 1994.
18. McKee M, Scavone C, Nathanson JA: **Nitric oxide, cGMP and hormone regulation of active sodium transport.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12056, 1994.
19. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T: **Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform.** *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6348-6352, 1992.
20. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P: **Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney.** *Am J Physiol* 268:F885-F897, 1995.
21. Bose HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S: **Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli.** *Am J Physiol* 269(6 Pt 2):F793, 1995.
22. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS: **Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney.** *Kidney Int* 46:653-665, 1994.
23. Jansen A, Cook T, Michael T, Largen P: **Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis.** *Kidney Int* 45:1213-1219, 1994.
24. Yoshioka K, Matsushima K, Maki S: **In situ expression of cytokines in IgA nephritis.** *Kidney Int* 44:823-833, 1993.
25. Catell V: **Nitric oxide-potential mediator in glomerulonephritis?** *Nephrol Dial Transplant* 10:759-774, 1995.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

26. Ignarro LJ: **Physiology and pathophysiology of nitric oxide.** *Kidney Int* 49(Suppl 55): S2-S5, 1996.
27. Trachtman H, Futterweit S, Singhal P: **Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 207:120-125, 1995.
28. Womer KL, Vella JP, Sayegh MH: **Chronic allograft dysfunction: Mechanisms and new approaches to therapy.** *Sem Nephrol* 20:126, 2000.
29. Vercauteren SB, Bosmans JL, Elseviers M, Verpooten GA, De Broe ME: **A meta-analysis and morphological review of cyclosporin-induced nephrotoxicity in autoimmune diseases.** *Kidney Int* 54:536-545, 1998.
30. Ruiz P, Kolbeck PC, Scroggs MW, Sanfilippo F: **Associations between cyclosporin therapy and interstitial fibrosis in renal allograft biopsies.** *Transplantation* 45:91-95, 1988.
31. Allen R, Chapman JR: **A manual of renal transplantation, 1<sup>st</sup> ed.** Little Brown Co., Boston, 1994.
32. Ramos EL: **Clinical aspects of renal transplantation.** In Brenner BM, Rector FC Jr (eds): *The Kidney, 4<sup>th</sup> ed.* W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1991, p.2361.
33. Kon V, Sugiura T, Inagami BR, Harvie I, Ichikawa RL: **Role of endothelin in cyclosporin-induced glomerular dysfunction.** *Kidney Int* 37:1487-1491, 1990.
34. Diederich D, Yang Z, Luscher TF: **Chronic cyclosporin therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat.** *J Am Soc Nephrol* 2:1291-1297, 1992.
35. Zoja C, Furei L, Ghilardi P, Zilio A: **Cyclosporin-induced endothelial cell injury.** *Lab Invest* 55:455-462, 1986.
36. Stroes SG, Luscher TF, De Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ: **Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo.** *Hypertension* 29:570-575, 1997.
37. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, Lopez P, Mendoza S, Garcia-Torres R, Alvarado JA, Herrera-Acosta J: **Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity.** *Kidney Int* 46:773-779, 1994.
38. Lopez-Ongil S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Lamas S: **Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells.** *Am J Physiol* 271(Heart Circ Physiol) 40: H1072-H1078, 1996.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

39. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, López P, Herrera-Acosta J: **Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression.** *Am J Physiol* 274 (Renal Physiol 43): F791-F798, 1998.
40. Bobadilla NA, Tapia E, Jimenez F, Sánchez LG, et al: **Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin.** *Am J Physiol* 277 (Renal Physiol 46): F464, 1999.
41. Vaziri ND, Zhenmin N, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y: **Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporin-induced hypertension.** *Kidney Int* 54:482-491, 1998.
42. Wu MS, Yang CW, Bens M, et al: **Cyclosporin inhibits nitric oxide production in medullary ascending limb cultured cells.** *Nephrol Dial Transplant* 13:2814, 1998.
43. Dusting GJ, Akita K, Hickey H, et al: **Cyclosporin A and tacrolimus suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms.** *Br J Pharmacol* 128:337, 1999.
44. Amore A, Emancipator S, Cirina P, et al: **Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells.** *Kidney Int* 57:1549, 2000.
45. Dedeoglu IO, Feld LG: **Decreased urinary excretion of nitric oxide in acute rejection episodes in pediatric renal allograft recipients.** *Transplantation* 62:1936, 1996.
46. Jani A, Chang E, Scandling J, Pavlakis M: **Expression of iNOS in acute human renal allograft rejection.** *In press.*
47. Vos IH, Joles JA, Schurink M, et al: **Inhibition of inducible nitric oxide synthase improves graft function and reduces tubulointerstitial injury in renal allograft rejection.** *Eur J Pharmacol* 391:31, 2000.
48. Szaboles MJ, Ravalli S, Minanov O, et al: **Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection.** *Transplantation* 65:804, 1998.
49. Romagnani P, Pupilli C, Lasagni L: **Inducible nitric oxide synthase expression in vascular and glomerular structures of human chronic allograft nephropathy.** *J Pathol* 187:345, 1999.
50. MacMillan-Crow LA, Kerby JD, Gibbs CL, Young C, Thompson JA: **Peroxynitrite-mediated modifications of specific kidney proteins in human chronic renal allograft rejection.** *In press.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

51. Shears LL, Kawaharada N, Tzeng E, et al: **Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis.** *J Clin Invest* 100:2035, 1997.
52. Okada H, Suzuki H, Konishi K, et al: **Histological alterations in renal specimens as indicators of prognosis of IgA nephropathy.** *Clin Nephrol* 37:223, 1992.
53. Roy-Chaudhury P, Wu B, King G, et al: **Adhesion molecule interactions in human glomerulonephritis: Importance of the tubulointerstitium.** *Kidney Int* 49:127, 1996.
54. Goligorsky M, Brodsky S, Noiri E: **Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS.** *Kidney Int* 61:855, 2002.
55. Joles J, Vos I, Gröne H, Rabelink T: **Inducible nitric oxide synthase in renal transplantation.** *Kidney Int* 61:872, 2002.
56. Gossmann J, Radounikli A, Bernemann A, Schellinski O, Raab HP, Bickeboller R, Scheuermann EH: **Pathophysiology of cyclosporine-induced nephrotoxicity in humans: a role for nitric oxide?** *Kidney Blood Press Res* 24:111, 2001.
57. Haeringa P, Steenbergen E, Van Goor H: **A protective role for endothelial nitric oxide synthase in glomerulonephritis.** *Kidney Int* 61:822, 2002.
58. Lefler AM: **Nitric oxide: Nature's naturally occurring leukocyte inhibitor.** *Circulation* 95:553, 1997.
59. Rocznik A, Levine D, Burns K: **Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney.** *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F702, 2000.
60. Albrecht EW, van Goor H, Tiebosch AT, Moshage H, Tegzess AM, Stegeman CA: **Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection.** *Transpl Int* 13 Suppl 1:S413, 2000.
61. Gruending K, Sorescu D, Lassegue B, et al: **Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2175, 2000.
62. Ziai F, Nagano H, Kusaka M, et al: **Renal allograft protection with losartan in Fisher→Lewis rats: Hemodynamics, macrophages and cytokines.** *Kidney Int* 57:2618, 2000.
63. Vazin N, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ: **Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH.** *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F642, 1998.

TEGGIN GROSS  
FALLA DE LAUREN

64. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: **Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure.** *Lancet* 339:572, 1992.

65. Goligorsky MS, Noiri E: **Duality of nitric oxide in acute renal injury.** *Semin Nephrol* 19:263, 1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## \*APENDICES

### APENDICE 1

#### Estudio Histopatológico

1. Una vez efectuada la biopsia en la habitación del paciente, se traslada el espécimen en solución isotónica de cloruro de sodio 0.9% a temperatura ambiente al departamento de Patología.
2. El espécimen es fijado en una solución de formol al 10% con PBS (buffer de fosfato con pH de 7.2-7.5) por un periodo de 24h
3. El tejido es lavado con solución isotónica de cloruro de sodio 0.9% y posteriormente deshidratado con alcohol a concentraciones progresivamente mayores iniciando con alcohol al 50% hasta llegar al alcohol absoluto
4. El tejido es aclarado con una solución de xilol y posteriormente embebido en parafina con un punto de fusión de 57-58°C.
5. Una vez hecho el bloque de parafina se hacen cortes de 2-4µ los cuales se emplean para el estudio de microscopia de luz previa realización de las siguientes tinciones: Hematoxilina y eosina, PAS, tricromico de Masson y metenamina de plata.

### APENDICE 2

#### Inmunohistoquímica

1. Se desparafinan los fragmentos obtenidos del bloque de parafina calentándolos a 57-60°C
2. Los cortes desparafinados son incluidos en xilol y posteriormente en alcohol a concentraciones progresivamente menores, iniciando con alcohol absoluto hasta llegar a alcohol al 50%
3. Previo lavado con agua corriente se efectúa la recuperación de antígenos con proteinasa K durante 5 minutos y posteriormente se lava con agua destilada
4. Se efectúa bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto
5. Se lava con PBS 10 mM con pH de 7.2-7.5
6. Se agrega el anticuerpo primario (específico) a una dilución de 1:200 y se deja por 30 minutos
7. Posterior a lavado se agrega el anticuerpo secundario obtenido de cabra unido a biotina y se deja 30 minutos
8. Se agrega el conjugado estreptavidina - peroxidasa por 30 minutos y se lava
9. Se agrega el sustrato de peroxidasa (3,3' diaminobencidina) por 10 minutos y se lava
10. Se lleva a cabo la contratinción con hematoxilina y finalmente se monta en resina. Se usa como control negativo un fragmento de tejido renal sano empleando solución PBS en lugar del anticuerpo primario y como control positivo tejido renal sano teñido de la forma antes descrita

TESIS NO SALE  
 TESIS CON  
 FALSA DE  
 BIBLIOTECA

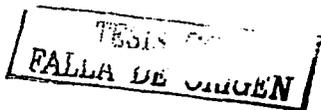
**APENDICE 3****Aislamiento de RNA**

La extracción de RNA total se lleva a cabo utilizando el kit comercial de Boehringer conocido como Tripure, el cual se basa de un solo paso y emplea extracciones en cloroformo, isopropanol y etanol frío al 75%, como se detalla a continuación:

1. Se homogeneiza el tejido con 0.5 ml de Trizol en un tubo NUNC.
2. Se transfiere el homogeneizado a tubos eppendorf de 1.5 ml estériles.
3. Se agrega a cada uno 100 µl de cloroformo y se agitan 15 seg en el vortex.
4. Se incuban 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se centrifugan a 11900 g durante 15 minutos a 4°C.
6. Se separa la fase acuosa y se coloca en un tubo nuevo.
7. Se agregan 250 µl de isopropanol.
8. Se incuban 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifugan a 11900 g durante 10 minutos a 4°C.
10. Se tira el sobrenadante y se agregan 0.5 ml de etanol frío al 75%.
11. Se agita en vortex hasta desprender el boton.
12. Se centrifugan a 7500 g durante 5 minutos a 4°C.
13. Se tira el sobrenadante y se centrifugan nuevamente 1 minuto a 4°C.
14. Se quita todo el sobrenadante con una punta estéril.
15. Se colocan los tubos abiertos en la centrifuga de vacío (speed vac) y se centrifugan aproximadamente 5 minutos.
16. Se resuspende el boton con 50 µl de agua grado Biología Molecular.

**APENDICE 4****Cuantificación del RNA**

Se diluyen 2µl de RNA en 48 µl de agua destilada y se registra la absorbancia en luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La concentración total de RNA en µg se obtiene directamente de la lectura registrada a 260 nm. Para obtener la cantidad total de RNA extrayendo se multiplica la concentración en µg al por el volumen total de agua que se utilizó para resuspender el RNA al final de la extracción.



**APENDICE 5****Gel de agarosa para RNA (minigel)**

En un matraz Erlenmeyer para cada 10 ml de gel se mezcla:

- Agarosa 0.1 g
- Agua destilada 8.5 ml
- Se disuelve por calentamiento (horno de microondas 45")
- Se deja enfriar a 50°C y se agrega para cada 10 ml de gel:  
1 ml MOPS 10x  
0.5 ml Formaldehido

Se vacia sobre la caja del gel y se deja solidificar cuando menos por 30 minutos antes de usarlo

Para correr el RNA se prepara la siguiente mezcla para cada muestra:

- 5 µl Formamida
- 1 µl de MOPS 10x
- 2 µl de Formaldehido
- 1 µl de Gel loading
- 0.16 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)
- Se mezclan 8 µl con 1 o 1.5 µl de RNA
- Se calienta 10 minutos a 65°C
- Se enfría rápido en hielo y se deja a temperatura ambiente
- Se vacian las muestras en el gel sumergido en MOPS 1x
- Se corre el gel a 75 V durante 1.5 h
- Para desteñir el gel se sumerge en agua durante 10 minutos 3 veces

**MOPS 10x 1L**

- 41.86 g MOPS
- 6.80 g de Acetato de sodio
- 20 ml de EDTA 0.5 M
- pH = 7.0 con NaOH 10 N
- Esterilizar por filtración

**GEL LOADING (Para 2 ml)**

- 1 ml de glicerol (50%)
- 40 µl EDTA 0.5 M pH 8 (10mM)

TESIS CON  
FALLA DE CARRERIN

## APENDICE 6

### ➤ Obtención de cDNA (TR)

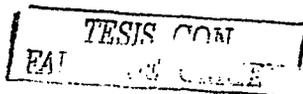
La reacción con transcriptasa reversa se lleva a cabo usando 5 µg de RNA, el cual se lleva a un volumen de 11 µl y se calienta a 65°C por 10 min. La TR se efectúa a 37°C por 60 minutos en un volumen total de 20 µl usando: 1 µl de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (MMLV, Gibco), 1 µl de hexámeros, 1 µl de una mezcla de deoxinucleótidos [dATP, dGTP, dTTP, dCTP (dNTPs)], 2 µl de ditiotretol 10 mM y 4 µl de buffer para TR (75 mM KCl, 50 mM tris-HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3).

Al final las muestras se calientan a 95°C por 5 minutos para inactivar la TR y se diluyen a 40 µl de agua grado PCR.

## APENDICE 7

### ➤ Amplificación de las isoformas de NOS y gen control (β-actina)

Se utiliza una décima parte de la TR de cada muestra para la amplificación de las isoformas de NOS y β-actina en reacciones con un volumen final de 20 µl, que incluyen 2 µl de buffer PCR (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8.3), 0.2 µl de dNTPs, 0.2 µl de [α-<sup>32</sup>P] dCTP (250 µCi), 2 µl de cada iniciador (sentido y antisentido) y una unidad de Taq DNA polimerasa. Las muestras son cubiertas con 20 µl de aceite mineral y la PCR se efectúa en un termociclador con el siguiente perfil: desnaturalización 1 minuto a 94 °C, alineación 1 minuto a 59 °C y un minuto de extensión a 72°C. El último ciclo es seguido de un último paso de extensión de 5 minutos a 72 °C. El gen control es co-amplificado simultáneamente en cada reacción en un tubo separado.



### APENDICE 8

#### ➤ Primers usados para amplificación en PCR

| BLANCO   | PRIMERS                                    | PRODUCTO(bp) |
|----------|--|--------------|
| nNOS     | (-) 5' - AAAGCGAGTCTCAGCTGC - 3'           | 232          |
|          | (-) 5' - CAGCAGTTCCTCACTTTCAC - 3'         |              |
| iNOS     | (-) 5' - TCTTGGTCAAAGCTGTGCTC - 3'         | 237          |
|          | (-) 5' - CATTGCCAAACGTACTGGTC - 3'         |              |
| eNOS     | (-) 5' - GAAGAGGAAGGAGTCCAGTAACACAGAC - 3' | 438          |
|          | (-) 5' - GGACTTGCTGCTTTGCAGGTTTTTC - 3'    |              |
| β-Actina | (-) 5' - CCAGAGCAAGAGAGGCATCC - 3'         | 436          |
|          | (-) 5' - CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG - 3'         |              |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## \*INDICE

|   |    |
|---|----|
| I. Resumen  | 2  |
| II. Introducción  | 3  |
| 1. Fisiología del NO  | 4  |
| 2. NO y riñón   | 5  |
| 3. Expresión de NOS en riñón normal y en glomerulonefritis        | 6  |
| 4. NO y trasplante renal  | 7  |
| 5. Papel del NO en la nefrotoxicidad por CsA                      | 8  |
| 6. Papel del NO en el rechazo agudo y crónico                     | 10 |
| III. Justificación  | 12 |
| IV. Hipótesis   | 12 |
| V. Objetivos  | 12 |
| VI. Material y Métodos  | 13 |
| 1. Pacientes  | 13 |
| 2. Biotips  | 13 |
| 3. Parámetros de laboratorio y gabinete                           | 14 |
| 4. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico                   | 14 |
| 4.1. Valoración semicuantitativa de daño renal y expresión de NOS | 14 |
| 5. Estudios de Biología molecular                                 | 15 |
| 5.1. Cuantificación de RNA  | 15 |
| 5.2. Integridad del RNA   | 15 |
| 5.3. Análisis de la expresión de DNAc                             | 16 |
| 5.3.1. Obtención de DNAc  | 16 |
| 5.3.2. Amplificación de NOS y gen control                         | 16 |
| 5.3.3. Análisis de los productos de PCR                           | 16 |
| VII. Estadística  | 17 |
| 1. Cálculo del tamaño de muestra                                  | 17 |
| 2. Análisis estadístico   | 18 |
| VIII. Consideraciones éticas                                      | 18 |
| IX. Resultados  | 19 |
| 1. Tabla 1  | 20 |
| 2. Figura 1   | 21 |
| 3. Figura 2   | 22 |
| 4. Figura 3   | 23 |
| 5. Gráfica 1  | 25 |
| 6. Gráfica 2  | 25 |
| 7. Gráfica 3  | 26 |
| 8. Gráfica 4  | 26 |
| 9. Figura 4   | 28 |
| 10. Figura 5  | 29 |
| 11. Figura 6  | 30 |
| 12. Gráfica 5   | 32 |
| 13. Gráfica 6   | 33 |
| 14. Gráfica 7   | 34 |
| 15. Cuadro 1  | 36 |
| 16. Cuadro 2  | 36 |
| X. Tamaño de muestra y poder post-hoc                             | 37 |
| XI. Medida de concordancia intraobservador                        | 37 |
| XII. Discusión  | 38 |
| XIII. Conclusiones  | 41 |
| XIV. Limitantes del estudio                                       | 42 |
| XV. Referencias bibliográficas                                    | 43 |
| XVI. Apéndice   | 43 |
| 1. Apéndice 1   | 49 |
| 2. Apéndice 2   | 49 |
| 3. Apéndice 3   | 50 |
| 4. Apéndice 4   | 50 |
| 5. Apéndice 5   | 51 |
| 6. Apéndice 6   | 52 |
| 7. Apéndice 7   | 52 |
| 8. Apéndice 8   | 53 |
| XVII. Índice  | 54 |

THE  
FALLA DE SANGRE