



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

SIGNIFICANCIA MOLECULAR Y FISIOLÓGICA DE LA ALDOSTERONA EN LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA POR CICLOSPORINA

Tesis que presenta

M. en C. JAZMIN MARLEN PÉREZ ROJAS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Director de Tesis: Norma Araceli Bobadilla Sandoval

México, D.F.

2006



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.

El presente proyecto se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 40182/A1) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, IN 208602-3).

Mis estudios de doctorado fueron apoyados por becas otorgadas por CONACyT (No. de registro: 153268) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

La tarea no es ver lo que nadie ha visto, sino pensar lo que nadie ha pensado acerca de lo que todos han visto.

E. Schroedinger

El mejor placer de la vida, es hacer lo que la gente te dice que no puedes hacer.

Walter B. Gehot

Audaces fortuna jvant.

Virgilio

DEDICATORIAS

A mis padres:

Bertha y José Angel por todo su cariño y sus enseñanzas que han sido muy importantes en mi vida.

A mis hermanos:

Azucena, Menta y Flor, gracias por estar conmigo en todo momento.

A Jorge:

Gracias amor por tu paciencia y tu apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca-crédito (No. de registro: 153268) durante la realización de mis estudios de doctorado.

Gracias a la Dra Norma Bobadilla por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y apoyarme constantemente.

Al Dr. Gerardo Gamba por sus comentarios siempre tan acertados.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra María Eugenia Gonsebatt y al Dr Alí Halhali Badhdad, así como también a los miembros del jurado para la obtención de grado: Dr Pedraza Chaverri, Dr Hong Chong, Dr López Casillas, Dra Escobar Pérez, Dra. Gonsebatt Bonaparte y Dr Vaca Domínguez.

A la QFB Norma Vázquez por su afecto y su gran ayuda en el laboratorio.

A Jorge, Lilia, Stephanie y Tino por su cooperación en la realización de esta investigación.

A mis amigos Blanca, Poncho, Alex, Sonia y Carlos por su sincera amistad.

A Katy, Cesar, Mark, Diana, Manuel, Claudia, Toño, Aby, Tomas y Juan Manuel por el ambiente de trabajo y el compañerismo que me brindaron.

A Josefina Zuñiga por su amistad y asistencia secretarial.

Y a todas aquellas personas que me brindaron su AMISTAD.

INDICE

	Pág.
Lista de abreviaturas	V
Resumen	1
Abstract	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 Filtración glomerular	4
❖ Regulación de la Filtración glomerular	5
I.2 Función de los túbulos renales	6
❖ Túbulo Proximal	6
❖ Asa de Henle	6
❖ Túbulo Distal	6
❖ Túbulo Colector	7
II. ANTECEDENTES	8
II.1 Agentes inmunosupresores	8
II.2 Ciclosporina	9
❖ Estructura y propiedades físicas de la CsA	10
❖ Mecanismo de acción de la CsA	11
❖ Farmacocinética de la CsA	13
❖ Efectos secundarios de ciclosporina A	13
❖ Formas de nefrotoxicidad inducidas por CsA	14
❖ Mecanismos de nefrotoxicidad aguda inducida por CsA	15
❖ Nefrotoxicidad crónica	16
❖ Mecanismos de nefrotoxicidad crónica inducida por CsA	17
❖ Modelos experimentales de nefrotoxicidad por CsA	17
❖ Maniobras para reducir la Nefrotoxicidad por CsA	18

II.3 Sistema Mineralocorticoide	21
II.4 Aldosterona	22
❖ Acciones Genómicas y No Genómicas de Aldosterona	25
❖ Espironolactona: antagonista del receptor de mineralocorticoides	27
❖ Aldosterona en la progresión de enfermedades cardiovasculares y renales	29
❖ Aldosterona en la nefrotoxicidad inducida por CsA	31
II.5 Vías Vasoactivas en el Tejido Renal	32
❖ Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)	32
❖ Endotelina	35
❖ Prostaglandinas	36
❖ Adenosina	37
❖ Renina	40
❖ Receptor de Renina	40
III. OBJETIVOS GENERALES	43
III.1 Objetivos particulares	43
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	44
IV.1 Inclusión De Grupos Experimentales	44
IV.2 Estudios Fisiológicos	47
❖ Depuración de Creatinina	47
❖ Filtración Glomerular	47
❖ Flujo Sanguíneo Renal (FSR)	48
IV.3 Métodos Analíticos	48
❖ Determinación de inulina	48
❖ Creatinina	49
❖ Sodio y Potasio	49
❖ Concentración de CsA en sangre total	49
IV.4 Estudios Histológicos	50

IV.5 Estudios Moleculares	51
❖ Extracción de RNA	51
❖ TR- transcripción reversa	51
❖ PCR semicuantitativa	52
❖ PCR en Tiempo Real (cuantitativa)	53
IV.6 Análisis Estadístico	54
V. RESULTADOS	56
V.1 Bloqueo de los Receptores de Aldosterona durante la Nefrotoxicidad Aguda inducida por Ciclosporina	56
V.2 Bloqueo de los receptores de Aldosterona en la Nefrotoxicidad Crónica inducida por Ciclosporina	59
❖ Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	61
❖ Vía de Endotelina	64
❖ Vía de Ciclooxygenasa-2	65
❖ Vía de Adenosina	66
V.3 La Vía Mineralocorticoide en la Nefrotoxicidad Crónica	68
V.4 Bloqueo de los receptores de Aldosterona en la Nefrotoxicidad Crónica por Ciclosporina ya establecida	69
❖ Estudios Funcionales	69
❖ Análisis Histopatológico	72
❖ Estudios Moleculares	78
VI. DISCUSIÓN	80
VI.1 Nefrotoxicidad aguda inducida por Ciclosporina	80
VI.2 Nefrotoxicidad crónica inducida por Ciclosporina	82
❖ Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	82
❖ Sistema de Endotelina	84
❖ Ciclooxygenasa 2	85
❖ Vía de Adenosina	86

VI.3 Nefrotoxicidad crónica inducida por Ciclosporina previamente establecida	87
VII. CONCLUSIONES	91
VII.1 Modelo de Nefrotoxicidad Aguda	91
VII.2 Modelo de Nefrotoxicidad Crónica por Ciclosporina	91
VII.3 Modelo de Nefrotoxicidad Crónica por Ciclosporina Previamente Establecida	92
VIII. PERSPECTIVAS	93
IX. BIBLIOGRAFÍA	94
X. ANEXOS	110
X.1 Artículos generados con la realización de esta tesis	110
X.2 Artículos generados en proyectos adicionales	168

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotropica
Ad1	Receptor de adenosina tipo 1
Ad2a	Receptor de adenosina tipo 2a
Ad2b	Receptor de adenosina tipo 2b
Ad3	Receptor de adenosina tipo 3
AT1A	Receptor de angiotensina II tipo 1A
AT1B	Receptor de angiotensina II tipo 1B
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2
CsA	Ciclosporina
CsA+Es	Ciclosporina mas espironolactona
Ct	Ciclo de umbral
Es	Espironolactona
ETA	Receptor de endotelina 1 tipo A
ETB	Receptor de endotelina 1 tipo B
ET-1	Endotelina 1
FG	Filtración glomerular
FSR	Flujo sanguíneo renal
IL-2	Interleucina 2
ig	vía de administración intragástrica
Kim-1	Molécula de daño renal tipo 1
NFAT	Factor de activación nuclear de las células T
PAI-1	Factor activador inhibidor del plaminógeno tipo 1
RCT	Receptores de membrana de células T
sc	vía de administración subcutánea
SNS	Sistema nervioso simpático
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TAM	Tensión arterial media
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
V	Vehículo
11βHSD2	11 β -deshidrogenasa hidroesteroidea tipo 2

RESUMEN

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que el bloqueo de los receptores de la aldosterona (Aldo) con la espironolactona (Es) no sólo reduce el daño estructural, sino también previene la caída de la función renal en la nefrotoxicidad (Nx) crónica inducida por la ciclosporina (CsA), lo que sugiere que la Aldo participa en la vasoconstricción renal inducida por la CsA. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar si la Es puede también prevenir la Nx aguda por la CsA en donde solo prevalece la vasoconstricción renal. 2) Determinar los niveles de RNA mensajero (RNAm) de las sustancias vasoactivas y sus receptores con el fin de empezar a entender como la Es previene la vasoconstricción renal en este tipo de nefropatía. 3) Estudiar si la Es puede ser útil para reducir la Nx por la CsA que fue previamente establecida. Para lograr estos objetivos se diseñaron tres protocolos diferentes.

En el modelo de Nx aguda, la Es evitó la caída de la función renal y del flujo sanguíneo renal. En la Nx crónica, la CsA modificó la expresión de la pro-renina, del angiotensinógeno, de los receptores de angiotensina II, de la ciclooxigenasa-2, de los receptores de adenosina y de la preproendotelina y su receptor ETB. La Es previno el aumento en la expresión de pro-renina y de ETA y aumentó la expresión de los receptores AT2 y ETB que median vasodilatación. En la Nx crónica por CsA que fue previamente establecida, el tratamiento con la Es previno la progresión del daño funcional y estructural del riñón, lo que se asoció con menor engrosamiento arteriolar y mayor diámetro glomerular, así como, con reducción significativa de los niveles del RNAm de TGF- β , estos efectos renoprotectores se evidenciaron por la reducción del RNAm de la molécula de daño renal 1 (Kim-1).

Nuestros resultados sugieren que la Aldo juega un papel importante en el desarrollo de la Nx aguda y crónica inducidas por la CsA. La Aldo participa en el efecto vasoconstrictor de la CsA probablemente al inducir cambios en la expresión de sustancias vasoactivas y/o sus receptores, aunque no podemos excluir que la Aldo modifique en forma directa el tono vascular renal. La reducción del engrosamiento arteriolar y el mayor diámetro glomerular observados en los animales tratados con la Es en el modelo de la Nx por la CsA que fue previamente establecida, sugiere que ésta promueve mejor perfusión renal lo que se tradujo en menor daño funcional y estructural. La administración temprana de Es confiere mayor renoprotección. Estos resultados señalan a la Es como un fármaco potencialmente útil para reducir la toxicidad inducida por la CsA en aquellos pacientes que reciben tratamiento con este inmunosupresor.

Abstract

Previously, we showed that aldosterone receptor blockade with spironolactone (Sp) reduces structural damage and prevents renal dysfunction in chronic cyclosporine (CsA) nephrotoxicity (Nx), these findings suggest that aldosterone (Aldo) modulates renal vasoconstriction induced by CsA. Based on these findings, the aims of this study were: 1) To evaluate if Sp can prevent the fall in renal function during acute CsA Nx. 2) To determine renocortical mRNA levels of vasoactive substances and their receptors, with the purpose of beginning to understand how Sp may prevent renal vasoconstriction in this type of nephropathy. 3) To study if Sp can reduce preexisting chronic CsA Nx. Three experiments protocols were designed to evaluate these aims.

In the acute CsA Nx model, Sp prevented the fall of renal function and renal blood flow induced by CsA. In chronic Nx, CsA modulated the mRNA levels of pro-renin, angiotensinogen, angiotensin receptors, ciclooxiganase, adenosine receptors, preproendothelin and ETB receptor. Sp prevented the overexpression of pro-renin and ETA mRNA levels, and increased the mRNA levels of AT2 and ETB receptors, that are known to mediate vasodilation. In preexisting chronic CsA Nx, Sp prevented the progression of renal injury that was associated with a decrease of arteriolar thickening and TGF- β mRNA level and an increase of the glomerular diameter. These renoprotective effects were confirmed by the reduction of the kidney injury molecule 1 (Kim-1) mRNA levels.

Our results suggest that Aldo plays an important role in chronic and acute CsA Nx. Aldo participates in the vasoconstrictor effect produced by CsA probably through modifying the expression of vasoactive substances and/or their receptors, although we can not exclude that Aldo could modify directly renal vascular tone. The reduction of arteriolar thickening and the increase of glomerular diameter caused by Sp treatment in preexisting chronic CsA Nx suggest that this drug maintains better renal perfusion reducing structural and functional damage. Furthermore, early administration of Sp confers greater renoprotection. These results indicate that Sp is a potential treatment to prevent or reduce toxicity induced by CsA in patients that receive this immunosuppressive therapy.

I. INTRODUCCIÓN

The kidney presents in the highest degree the phenomenon of sensibility, the power of reacting to various stimuli in a direction which is appropriate for the survival of the organism; a power of adaptation which almost gives one the idea that its component parts must be endowed with intelligence.
E. Starling, 1909

El riñón es un órgano par, endocrino, localizado detrás del peritoneo, en la parte posterior del abdomen, dentro de sus principales funciones se encuentran:

- a) Excreción de productos de desecho y de sustancias exógenas
- b) Regulación del balance de agua y electrolitos
- c) Mantenimiento del equilibrio ácido-base
- d) Regulación de la presión arterial
- e) Gluconeogénesis
- f) Producción de algunas hormonas

El tamaño del riñón varía dependiendo de la especie, en el humano pesa aproximadamente 150 g y mide 12x6x3 cm. Mediante corte sagital claramente se pueden distinguir dos secciones: la corteza y la médula.

El riego sanguíneo de ambos riñones constituye normalmente el 21% del gasto cardiaco (aproximadamente 1,200 ml/min). La circulación renal se caracteriza por tener dos lechos capilares muy importantes: el glomerular y el peritubular, lo que permite regular la presión hidrostática.

La unidad funcional del riñón es la nefrona, aproximadamente existen dos millones de nefronas las cuales no se pueden regenerar una vez que son dañadas. La nefrona se divide en:

- a) Corpúsculo renal: glomérulo renal y cápsula de Bowman
- b) Túbulo renal: túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector.

Las nefronas son las responsables de la formación de la orina a través de la:

- Filtración de agua, sales y sustancias de desecho por parte del glomérulo
- Reabsorción de aminoácidos, glucosa y secreción de diversas sustancias en los túbulos

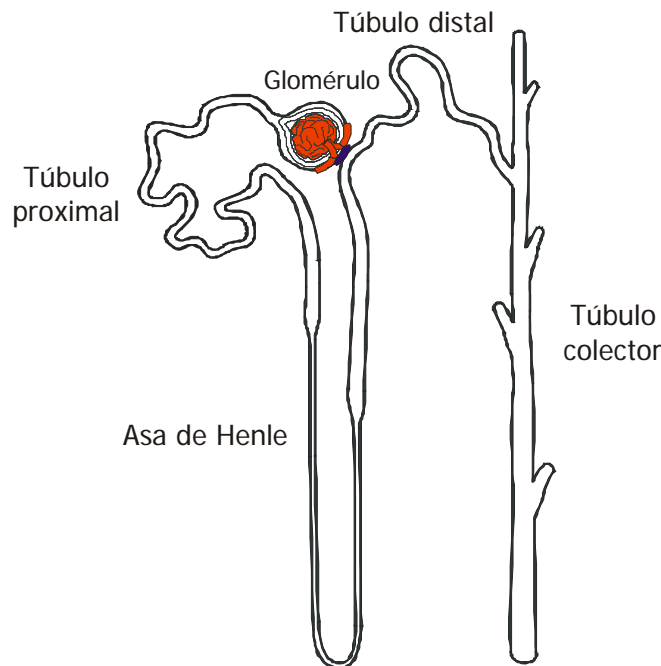


Figura 1. Esquema de una nefrona renal.

I.1 Filtración glomerular

Una de las funciones primarias del riñón es “limpiar o depurar” la sangre de las sustancias que el organismo no necesita excretándolas en la orina. Por lo que la depuración se define como el volumen del plasma en el cual cierta cantidad de sustancia ha sido removida y excretada dentro de la orina por unidad de tiempo. El concepto de depuración es importante porque puede ser usado para medir la tasa de filtración glomerular (TFG) y el flujo plasmático renal (FPR). La TFG es un parámetro que nos permite conocer la función renal en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, es por ello que se utiliza como índice de la función renal. En

pacientes con daño renal, la disminución de la TFG se traduce en empeoramiento, mientras que el aumento, a menudo sugiere recuperación de la función renal [1;4;5].

Regulación de la filtración glomerular

La TFG esta influenciada por varios factores del sistema nervioso simpático: hormonas y autacoides, los cuales se les conoce como sustancias vasoactivas, sustancias que tienen la propiedad de producir vasoconstricción y/o vasorelajación dependiendo del receptor al que se unan como muestra en la tabla 1. Las sustancias vasoactivas se liberan en la circulación sistémica aunque varias de ellas también se producen en forma local (epinefrina, norepinefrina, endotelina, angiotensina II, óxido nítrico, prostaglandinas, etc.). Estas sustancias y sus receptores regulan la TFG a través de modificar las resistencias vasculares o el coeficiente de ultrafiltración [4].

Tabla 1.- Principales hormonas que influyen en la TFG.

Estimulo		Efecto sobre la TFG
Vasoconstrictores		
Nervios simpáticos	Isquemia cerebral, hemorragia severa	↓
Angiotensina II	↑ Presión de perfusión renal, renina	
Endotelina	↑ Estrés, Ang II, epinefrina	
Vasodilatadores		
Prostaglandinas (PGI ₂ , PGE ₂)	↑ Estrés, Ang II	↑
Óxido nítrico	↑ Estrés, Ach, His	

Ang II= angiotensina II, Ach= acetilcolina, His= histamina, PG= prostaglandinas.

I.2 Función de los túbulos renales

La mayor parte del filtrado glomerular es reabsorbido por los túbulos renales, que son muy selectivos a la sustancia o al ión que se reabsorbe.

Túbulo proximal

La concentración de diversos iones y moléculas a lo largo de este túbulo cambia en relación con la reabsorción de agua, esto depende de su reabsorción o su secreción:

- La concentración de Na^+ no varía a lo largo del túbulo porque su reabsorción se lleva a la par con la del agua.
- La concentración de Cl^- aumenta un poco y la de urea y creatinina se incrementa de manera considerable debido a que estas moléculas no son reabsorbidas en el túbulo proximal.
- La concentración de HCO_3^- disminuye hasta un 50%.
- La glucosa y aminoácidos desaparecen por completo, porque son reabsorbidos completamente en este segmento de la nefrona.

Asa de Henle

Esta porción tubular se encarga de reabsorber del 15 al 20% del filtrado glomerular. Esta es una estructura fundamental para la concentración o dilución de la orina.

- **Asa delgada:** En esta porción se expresan los canales de agua acuaporina-1, lo que permite una intensa reabsorción de agua.
- **Asa ascendente gruesa:** Esta porción es impermeable al agua y es fundamental para la reabsorción de sal a través del cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ (esta proteína es blanco de ciertos diuréticos como furosemida y bumetanida).

Túbulo distal

Esta porción se encarga de la reabsorción del 5 al 10% del filtrado glomerular. Este túbulo es la parte de la nefrona con mayor actividad de la $\text{ATPasa Na}^+\text{K}^+$. Se

continúa reabsorbiendo sal a través del cotransportador Na^+Cl^- , el cual es blanco de diferentes diuréticos tipo tiazida.

Túbulo colector

El túbulo colector es la última región de la nefrona en la que se pueden reabsorber iones, moléculas o agua, antes de drenar la orina final a las vías urinarias. A diferencia de otras regiones de la nefrona, este túbulo recibe la afluencia de túbulos distales de varias nefronas. Presenta dos tipos de células:

- **Células principales:** son las más abundantes y se encargan de la reabsorción de sodio a través del canal epitelial de Na^+ regulado por aldosterona. Este canal también es una proteína blanco para diuréticos ahorradores de potasio como el amiloride y la espironolactona.
- **Células intercaladas:** son menos abundantes y se encuentran intercaladas entre las principales. Estas células se encargan de secretar H^+ , por lo que son fundamentales en el metabolismo ácido-básico.

En la médula renal, el túbulo colector también se encarga de la reabsorción de agua mediante la acuaporina-2 y la reabsorción de urea [47;109].

En esta tesis se discutirá la importancia de la aldosterona en la fisiopatología renal inducida por la administración de la ciclosporina. Hasta hace algunos años se conocía que esta hormona esteroidea estaba implicada en mantener la homeostasis de electrolitos, sin embargo estudios recientes han mostrado que la aldosterona participa en procesos fisiopatológicos cardiovasculares y renales. Por lo tanto, en la primera parte de este trabajo se describe la participación de la aldosterona en diferentes patologías y el porque se decidió estudiar el papel de la aldosterona en la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina. Y en la segunda parte se muestran y se discuten los resultados obtenidos.

II. ANTECEDENTES

En México la cuarta causa de muerte es ocupada por la insuficiencia renal. En la actualidad hay un gran número de pacientes que se encuentran en diálisis peritoneal o hemodiálisis en las instituciones del sistema público de salud de México, este tipo de terapia además de ser inconveniente para los pacientes, tiene un costo muy elevado. En la insuficiencia renal crónica, el trasplante debe ser el tratamiento de elección, lo que mejora la calidad de vida de los pacientes [185]. Aunado al trasplante, la terapia inmunosupresora de por vida es de vital importancia para evitar el rechazo del órgano trasplantado. Desafortunadamente los medicamentos inmunosupresores son costosos y producen efectos secundarios adversos. La ciclosporina (CsA) es el medicamento inmunosupresor más utilizado en nuestro país, debido a su bajo costo y su potente acción inmunosupresora.

II.1 Agentes inmunosupresores

Los agentes inmunosupresores utilizados en la clínica son la azatrioprina, la prednisona, la metilprednisolona y la CsA. Entre los nuevos agentes inmunosupresores se encuentran la rapamicina [12], el micofenolato de mofetilo (MMF) [89] y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-2. Sin embargo estos agentes son más costosos que el tratamiento con CsA y también producen efectos secundarios. La rapamicina ó sirolimus muestran una potencia inmunosupresora similar a la que tiene CsA, pero a corto plazo produce hiperlipidemia, lo que trae consigo complicaciones cardiovasculares. En cambio el MMF, no presenta el mismo poder inmunosupresor que la CsA y además produce problemas gastrointestinales, por esta razón en algunos pacientes es necesario cambiar de inmunosupresor. Finalmente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-2, son la terapia más

costosa y pueden presentar reacciones de hipersensibilidad tan severas que pueden terminar en un choque anafiláctico.

En la clínica se utilizan esquemas de inmunosupresión de tres fármacos en los cuales se combinan los diferentes inmunosupresores. Es importante señalar que el esquema que incluye CsA es el que ha mostrado menor rechazo por parte del injerto [43].

II.2 CICLOSPORINA

El uso de agentes inmunosupresores durante los últimos 20 años ha mejorado la sobrevida del injerto y de los pacientes trasplantados. Indudablemente el principal impacto se dio con la introducción de la CsA al mercado alrededor de 1984 [34] revolucionando el tratamiento del rechazo en el transplante de órganos [24].

En 1971 Borel y Stähelin observaron que un extracto del hongo filamentoso *Tolypocladium inflatum* tenía actividad inmunosupresora [57]. En 1976 se describió a la ciclosporina como el primer agente inmunosupresor con actividad específica anti-linfocitos T [21]. Pero fue hasta noviembre de 1983, cuando la CsA fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) como fármaco para el tratamiento y/o prevención del rechazo de los tejidos trasplantados, así como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como psoriasis, dermatitis atípica, artritis reumatoide, entre otras [76].

La introducción de la CsA como agente inmunosupresor aumentó en forma considerable la sobrevida tanto de los pacientes trasplantados como la del injerto. En un estudio comparativo en humanos donde se evaluó la terapia con la CsA y la terapia convencional (azatioprina-prednisona-metilprednisolona) se encontró que después de 5 años la sobrevida del injerto de los pacientes tratados con la CsA fue del 88% comparado con el 60% en la terapia convencional (Figura 2A). Las diferencias fueron mas evidentes en la sobrevida del injerto de los pacientes tratados con CsA, siendo del 95% para el primer año y del 83% en el quinto año. Mientras

que para los pacientes que recibieron terapia convencional, la sobrevida fue del 80% y 60% respectivamente (Figura 2B) [3;100].

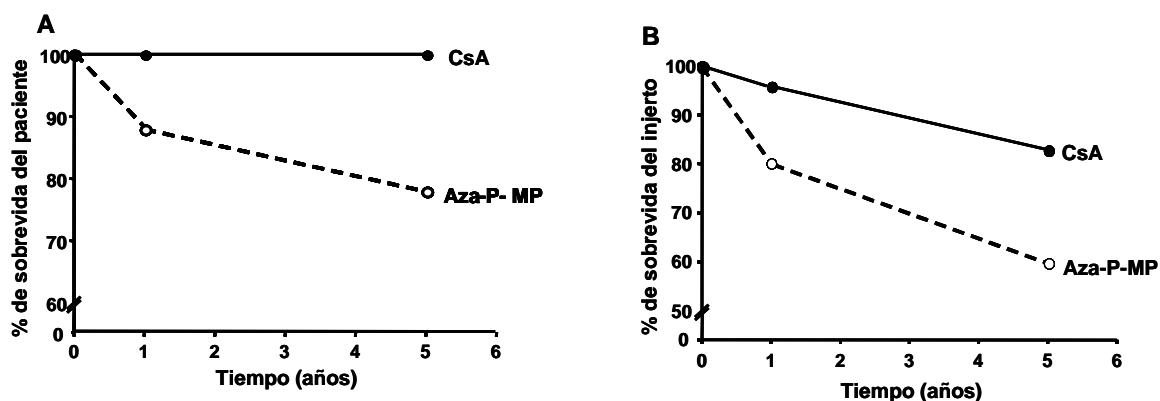


Figura 2. Efecto de la introducción de ciclosporina (CsA) sobre la sobrevida del paciente (A) y del injerto (B) con trasplante renal comparada con la terapia convencional azatioprina, prednisona y metilprednisolona (Aza-P-M).

Estructura y propiedades físicas de la CsA

La Ciclosporina A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) es un péptido hidrofóbico cíclico que consta de 11 aminoácidos: el aminoácido N-metil-(4R)-4-butenil-4-metiltreonina en la posición 1, así como dos aminoácidos inusuales como la sarcosina en la posición 3 y D-alanina en la posición 8. Siete aminoácidos son N-metilados, lo cual explica su resistencia a la inactivación en el tracto gastrointestinal (Figura 3). Tiene forma de agujas cuando se cristaliza, es poco soluble en agua e hidrocarburos saturados, pero soluble en lípidos y solventes orgánicos [76].

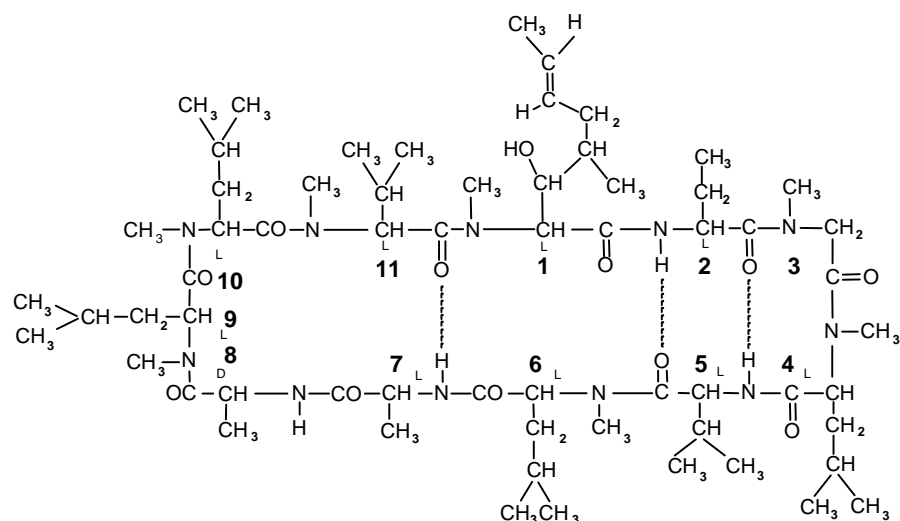


Figura 3. Estructura química de la ciclosporina

Mecanismo de acción de la CsA

Los linfocitos T son glóbulos blancos que se producen o maduran en diferentes tejidos linfoides y se encargan de eliminar antígenos de superficie (como toxinas, bacterias, virus, etc). Durante la activación de las células T, los antígenos se unen a los receptores de membrana de las células T (RCT), esto aumenta el calcio intracelular, el cual se une la proteína calmodulina, con la cual forma un complejo que activa a la enzima fosfatasa de calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio. La fosfatasa de calcineurina activada es capaz de defosforilar al factor de activación nuclear de las células T (NFAT) facilitando su entrada en el núcleo, una vez en el núcleo, el NFAT se une al DNA en regiones promotoras de la síntesis de los genes de citocinas como la interleucina-2 (IL-2) la cual es la proteína encargada del crecimiento y proliferación de células T (Figura 4A).

Dada las propiedades lipofílicas de la CsA, esta difunde fácilmente al interior de la célula, se une con la proteína ciclofilina y forma el complejo CsA-ciclofilina. El complejo CsA-ciclofilina se une a la subunidad catalítica de la calcineurina la cual va a inhibir la actividad fosfatasa de calcineurina, esto evitando la defosforilación del NFAT

y su consecuente translocación al núcleo (Figura 4B)[34]. Por lo tanto, el efecto inmunosupresor de CsA consiste en disminuir la producción de IL-2 y mantener a los linfocitos T en la fase G₀ o G₁ del ciclo celular.

Aunque CsA es un inmunosupresor eficaz, sus efectos adversos en el tejido renal han provocado que su uso se reduzca, lo que también ha conducido al desarrollo de nuevos agentes inmunosupresores.

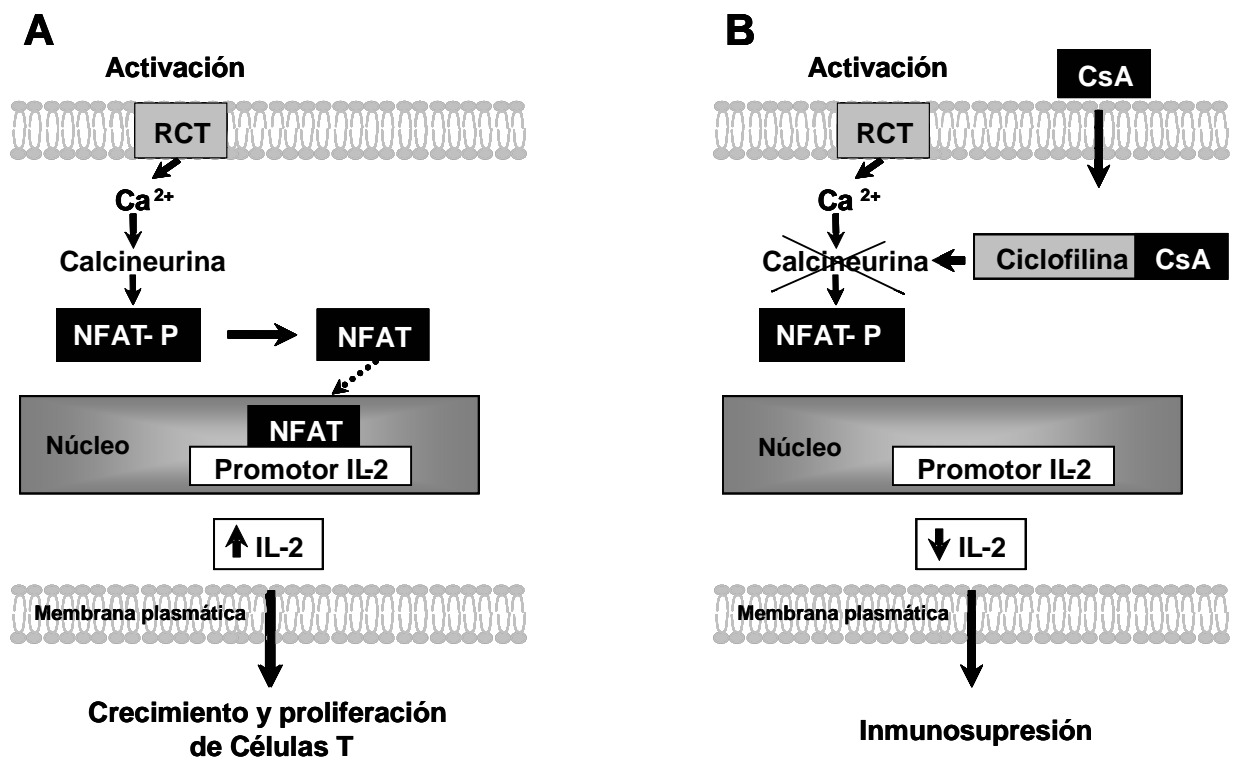


Figura 4. Mecanismo de acción de la ciclosporina. **A)** Mecanismo de la inmunosupresión. **B)** Mecanismo de acción de la CsA para producir la inmunosupresión. Receptor de células T (RCT), Factor de activación nuclear de las células T defosforilado (NFAT) y fosforilado (NFAT-P), Interleucina 2 (IL-2).

Farmacocinética de la CsA

La introducción de la CsA en la clínica se vio ensombrecida debido a su variable biodisponibilidad; ya que sus propiedades farmacocinéticas son influenciadas por la edad [30], la raza [134] y la ingesta de ciertos alimentos, bebidas (como el jugo de toronja) y medicamentos que son metabolizados por el citocromo P450 [85]. En la primera formulación basada en aceite (Sandimmun), la absorción intestinal fue muy variada, presentó una biodisponibilidad del 1 al 89% con una media de 30% [108]. Posteriormente, se desarrolló la microemulsión (Neoral), lo cual aumentó su biodisponibilidad e independencia de la secreción biliar.

La ciclosporina se distribuye ampliamente en el organismo: del 33 al 47% se encuentra en el plasma, del 4 al 9% en los linfocitos, del 5 al 12% en los granulocitos y del 41 al 58% en los eritrocitos, se une fuertemente a proteínas, principalmente a lipoproteínas.

La CsA se metaboliza a nivel hepático por el sistema enzimático del citocromo P450, el CYP3A4 [50], que la transforman en al menos 30 metabolitos derivados de hidroxilación, demetilación, sulfonación y ciclización en la posición 1 sin alterar su estructura cíclica [28]. Todos los metabolitos muestran un mínimo o casi nada de actividad inmunosupresora [128]. La vida media de la ciclosporina es de 19 horas y es excretada principalmente en la bilis (> 90%), siendo el resto eliminada por vía urinaria, sólo el 0.1% se excreta en la orina en forma de fármaco inalterado. También cruza la barrera placentaria y es excretada en la leche materna [93].

Efectos secundarios de la ciclosporina A

Aunque los beneficios de la CsA han sido evidentes, su uso a largo plazo se encuentra limitado por sus efectos adversos como: disfunción renal aguda y crónica, hipertensión, trastornos electrolíticos (hipercalcemia, hipomagnesemia e hipocalcemia), acidosis tubular, síndrome urémico hemolítico e incapacidad para concentrar la orina. Sin embargo, la nefrotoxicidad es el efecto secundario más

frecuente y con mayor relevancia desde el punto de vista clínico [81]; de hecho un estudio realizado por Nankivell y colaboradores [102] demostraron que después de 10 años de tratamiento con inhibidores de calcineurina, el 100% de los pacientes trasplantados desarrollaron nefrotoxicidad.

A pesar de su efecto nefrotóxico, la ciclosporina continúa siendo el fármaco de elección en nuestro país dada su eficacia y su bajo costo con respecto a los nuevos tratamientos inmunosupresores.

Formas de nefrotoxicidad inducida por CsA

En el humano se han descrito dos formas de nefrotoxicidad: la aguda o moderada y la crónica o severa, las cuales dependen del tiempo de administración del fármaco, así como de la dosis utilizada.

La nefrotoxicidad aguda se caracteriza por disminución en la tasa de filtración glomerular y en el flujo plasmático renal, debido a efectos directos de la CsA sobre la vasculatura renal, principalmente la vasoconstricción de la arteriola aferente [40;74;80;81;98;115;174]. Esta forma de nefrotoxicidad es reversible al disminuir o suspender el fármaco, sin embargo, esto puede conducir al rechazo del injerto.

En estudios en los que se ha determinado la hemodinámica glomerular en forma experimental por medio de estudios de micropunción renal, se ha observado que la CsA produce vasoconstricción tanto en la arteriola aferente como en la eferente, siendo más importante la constricción preglomerular, lo que provoca disminución del flujo plasmático renal. También se ha demostrado disminución en el coeficiente de ultrafiltración. La reducción de estos dos parámetros hemodinámicos da como resultado la disminución significativa de la filtración glomerular por nefrona la cual se refleja en la filtración glomerular total [13;18;153].

La nefrotoxicidad aguda se observa de manera temprana después del inicio de la terapia con CsA y se presenta clínicamente con una elevación transitoria de

creatinina sérica e hipertensión arterial en la mayoría de los casos; los cuales son normalizados al reducir o suspender el medicamento [97].

Mecanismos de nefrotoxicidad aguda inducida por CsA

Factores vasoactivos. El equilibrio en la liberación de factores vasoconstrictores y vasorelajantes es de suma importancia para mantener la función renal normal. Se ha reportado que la vasoconstricción renal inducida por la CsA parece ser el resultado de un desequilibrio en la liberación de factores vasoactivos, por una parte la CsA induce aumento de factores vasoconstrictores como la endotelina (Kon et al, 1990), el tromboxano [113], la angiotensina II [113;152], así como la disminución de factores vasodilatadores como la prostaciclina [114] y el óxido nítrico, aunque existe controversia con este último [36;159]. Estudios recientes han demostrado que la CsA aumenta los niveles del RNA mensajero de la sintasa de óxido nítrico endotelial y que la inhibición de la síntesis del óxido nítrico en ratas con nefrotoxicidad aguda produce mayores alteraciones funcionales y estructurales como la trombosis, lo que sugiere que la producción de óxido nítrico contrarresta la vasoconstricción renal observada en este tipo de nefrotoxicidad [16;18;88].

Formación de Radicales libres. En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la nefrotoxicidad inducida por CsA. Se ha reportado aumento en la formación de radicales libres de oxígeno debido a un incremento en la actividad del citocromo P-450 [138] y a la hipoxia renal que se presenta como consecuencia de la vasoconstricción renal inducida por la CsA. Además, Tariq y colaboradores [149] han demostrado que la CsA disminuye el contenido renal de glutatión, esta molécula participa en la protección de las células contra el daño producido por la formación de radicales. También mostraron que el uso de antioxidantes restableció la cantidad de glutatión, lo que sugiere que la CsA a través de aumentar la producción de radicales libre también altera la producción de enzimas antioxidantes. En consecuencia, la administración de

antioxidantes, como la vitamina E y la N-acetilcisteína durante el desarrollo de la nefrotoxicidad aguda experimental son efectivas para reducir los efectos tóxicos de la CsA [33;68].

Sistema nervioso simpático (SNS). Existe controversia en la participación de la CsA sobre el SNS, ya que unos autores reportan que la hipertensión arterial se debe a la activación de este sistema [49;150], mientras que otros han encontrado que a pesar de estar activado el SNS no se observan cambios en la presión arterial media [128]. La estimulación adrenérgica inducida por la CsA resulta en aumento de norepinefrina y epinefrina lo que induce aumento en las resistencias renovasculares; este incremento en las catecolaminas puede explicar, en parte, la hipertensión que desarrollan los pacientes [39].

Nefrotoxicidad crónica

La nefrotoxicidad crónica se desarrolla con el tratamiento a largo plazo con la CsA y también se caracteriza por presentar vasoconstricción renal y por la presencia de lesiones estructurales en el tejido renal como lo son la arteriopatía y la fibrosis túbulo intersticial, siendo esta última irreversible. Se desarrolla después de 12 meses de estar bajo el tratamiento con la CsA [34;83;94].

Los cambios histológicos de la arteriopatía consisten en la vacuolización de las células endoteliales y del músculo liso en las arteriolas aferentes, seguido por necrosis. Posteriormente, se deposita fibrina y plaquetas en la membrana basal causando obliteración de la luz de los vasos sanguíneos. A nivel tubular el daño se caracteriza por atrofia tubular y fibrosis túbulo-intersticial. Estos cambios aparecen como focos irregulares. La fibrosis tiende a ser un proceso progresivo [32].

Mecanismos de nefrotoxicidad crónica inducida por CsA

En cuanto a los factores que causan el desarrollo de las alteraciones estructurales en la nefrotoxicidad crónica por CsA, se han propuesto al menos tres factores importantes:

1. Activación del sistema renina angiotensina: El aumento de angiotensina II no solo aumenta la vasoconstricción renal y promueve los procesos fibróticos a través de la activación de los receptores de angiotensina tipo 1 (AT1), sino también incrementa los niveles de aldosterona [117;139].
2. Hipoxia: Al igual que en la nefrotoxicidad aguda, se presenta mayor vasoconstricción renal y por lo tanto mayor grado de hipoxia, lo que trae como consecuencia la formación de radicales libres que inducen daño celular y promueven apoptosis, contribuyendo a mayor daño tisular [8;151;181;182].
3. Sobre-expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). El TGF- β es una citocina que promueve fibrosis en la mayoría de las enfermedades crónicas del riñón y de otros órganos. En la nefrotoxicidad por CsA, se reportó que la CsA aumenta los niveles de expresión del TGF- β , lo cual promueve fibrosis renal al aumentar la síntesis de proteínas de matriz extracelular como la colágena y la fibronectina y reduce la producción de colagenasas [41;86;139;140;161].

Modelos experimentales de nefrotoxicidad por CsA

En los roedores se pueden reproducir los dos tipos de nefrotoxicidad. El modelo de nefrotoxicidad aguda se induce al administrar dosis repetidas de CsA [114]. Mientras que el modelo de nefrotoxicidad crónica se obtiene con la administración de dosis repetidas de CsA en conjunto con alimentación con dieta baja en sodio [124], la ingesta baja en sodio activa al sistema renina angiotensina, lo que aumenta la susceptibilidad a CsA en los roedores y la aparición de lesiones estructurales características que se observan en el humano.

Maniobras para reducir la nefrotoxicidad por CsA

Se han estudiado diferentes maniobras, principalmente farmacológicas para disminuir tanto la nefrotoxicidad aguda como la crónica inducidas por la CsA. Con lo que respecta a la **nefrotoxicidad aguda** se ha tratado de revertir la vasoconstricción, por lo que se han administrado inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II [13;139], bloqueadores de los receptores de endotelina [44;63;115] e inhibidores de tromboxano [114;155]. Solo la inhibición de los receptores de endotelina y la administración de dexametasona previno la vasoconstricción renal inducida por la CsA [19].

En un estudio posterior se observó que la administración de nifedipina, bloqueador de los canales de calcio tipo L, evitó la disminución de la función renal inducida por la CsA, este efecto al parecer se debió a una mayor biodisponibilidad del óxido nítrico [130]. Además, la administración de L-arginina, precursor del óxido nítrico, previno las alteraciones hemodinámicas inducidas por la CsA [9;179]. Estos resultados muestran que las maniobras que aumentan la síntesis y la biodisponibilidad del óxido nítrico revierten o reducen la nefrotoxicidad aguda por la CsA, probablemente porque la estimulación de la síntesis del óxido nítrico puede contrarrestar la acción de los factores vasoconstrictores, aun cuando esta vía parece no ser alterada por la CsA.

En cuanto a la **nefrotoxicidad crónica** en la tabla 2 se detallan cada uno de los estudios donde se evaluaron diferentes maniobras farmacológicas con el propósito de reducir o revertir la nefrotoxicidad crónica por CsA. Entre las que se encuentran el bloqueo de los receptores de angiotensina II [117;139], la administración del factor de crecimiento del endotelio vascular, promotor de la angiogénesis, remodelado vascular y estimulación de la producción de óxido nítrico [75], la administración del polisulfato de pentosan, un fármaco derivado de la heparina el cual tiene propiedades anti-inflamatorias y anti-proliferativas [135] y la administración con suplementos de magnesio. Aunque la suplementación con magnesio parece mejorar

la función y la estructura renal en forma parcial como se observa en la tabla 2; en nuestro laboratorio no hemos observado hipomagnesemia en las ratas con nefrotoxicidad aguda o crónica como este grupo reporta [11]. Los estudios más recientes evalúan el efecto de la pravastatina [84] y de anticuerpos dirigidos contra el TGF- β [65].

Los resultados que se han obtenido no han sido del todo satisfactorios, ya que en la mayoría de los casos sólo se reduce el daño estructural, pero no se consigue el reestablecimiento de la función renal ó viceversa. Recientemente en el laboratorio observamos que el bloqueo de los receptores de la aldosterona con la espironolactona en la nefrotoxicidad crónica por CsA [41] previno tanto la caída de la filtración glomerular y redujo el desarrollo de la arteriopatía y de la fibrosis túbulo-intersticial. Lo que sugiere que la aldosterona juega un papel fundamental en el establecimiento de este tipo de nefrotoxicidad.

Tabla 2. Efecto de diferentes tratamientos farmacológicos utilizados para reducir la disfunción renal y las alteraciones estructurales durante la nefrotoxicidad crónica por CsA.

Tratamiento	Función Renal	Daño Estructural	Referencia
Losartán	Acentuó la caída de la función renal	Reducción parcial del daño estructural	[151]
BQ123	Mejoría parcial	Reducción parcial del daño estructural	[63]
Polisulfato de pentosan	Sin mejoría	Reducción parcial del daño estructural	[135]
Factor de crecimiento del endotelio vascular	Sin mejoría	Reducción parcial del daño estructural	[75]
L-arginina	Mejoría parcial	Reducción parcial del daño estructural	[179]
Suplemento de magnesio	Recuperación de la función renal	Reducción parcial del daño estructural	[11]
Ac anti TGF- β	Mejoría parcial	Reducción parcial del daño estructural	[65]
Espironolactona	Recuperación de la función renal	Reducción parcial del daño estructural	[41]

II.3 SISTEMA MINERALOCORTICOIDE

La aldosterona es un mineralocorticoide cuya función principal es el mantenimiento del volumen extracelular a través de aumentar la reabsorción de sodio y la secreción de potasio. Este mineralocorticoide es sintetizado por la sintasa de la aldosterona en las glándulas suprarrenales, aunque también esta enzima se ha observado en otros tejidos incluyendo al riñón. La mayoría de las acciones conocidas de aldosterona, tanto en células epiteliales como no epiteliales son mediadas a través de la activación de los receptores a mineralocorticoides, los cuales son capaces de regular la expresión y transcripción de diversos genes. Los receptores a mineralocorticoides se encuentran en el túbulo distal y colector pero, también se han encontrado en miocitos, hipocampo, tejido adiposo, cerebro, endotelio vascular [104] y recientemente en el aparato yuxtaglomerular [5].

Los glucocorticoides y mineralocorticoides tienen la misma afinidad por los receptores de la aldosterona, como los glucocorticoides son más abundantes que los mineralocorticoides, la especificidad para que la aldosterona se una a su receptor se debe a: 1) los glucocorticoides se unen a proteínas circulantes como la albúmina, quedando solo cantidades pequeñas de los glucocorticoides libres para interactuar con los receptores 2) La presencia de la enzima 11 β -deshidrogenasa hidroesteroidea tipo 2 (11 β HSD2), la cual degrada a los glucocorticoides permitiendo que solo la aldosterona se una a su receptor (Figura 5). Por lo que, la presencia de esta enzima es esencial para que la aldosterona ejerza sus efectos.

En el tejido renal esta enzima se encuentra principalmente en el epitelio del túbulo distal y colector, pero también se ha observado en el epitelio y en el endotelio glomerular. Además, estudios recientes muestran que la inhibición selectiva de la 11 β HSD2, induce aumento en la expresión de los receptores de angiotensina II y vasoconstricción [104]. Estas observaciones junto con la presencia de la sintasa de la

aldosterona en diferentes tejidos, sugieren que la aldosterona ejerce acciones locales en diversos órganos independientes de su acción clásica conocida.

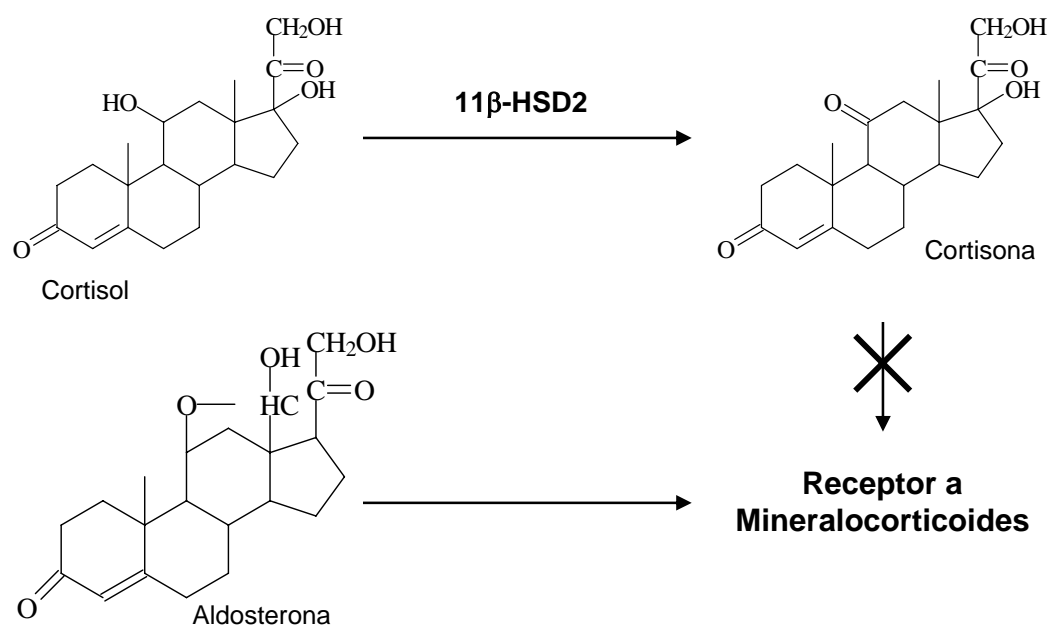


Figura 5. Acción de 11β-deshidrogenasa hidroesteroidea (11βHSD2) sobre el cortisol.

II.4 ALDOSTERONA

La aldosterona es una hormona mineralocorticoide involucrada en la regulación y homeostasis del agua y de los electrolitos al estimular el transporte de iones en el túbulo distal [20]. La aldosterona se sintetiza en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales y su síntesis parte del colesterol. Dentro de las principales enzimas que participan en la síntesis de la aldosterona se encuentran la colesterol desmolasa (enzima limitante) y la sintasa de aldosterona (Figura 6). Una vez que la aldosterona se secreta, cerca del 37% permanece en circulación y el resto se une a proteínas (principalmente albúmina). Para que la aldosterona no sea blanco de la enzima 11βHSD2, este aldehído se cicla con el grupo hidroxilo en el carbono 11 para formar

la estructura 11,18-hemiacetato [46]. La aldosterona no se almacena dentro de la célula disponible para su rápida secreción.

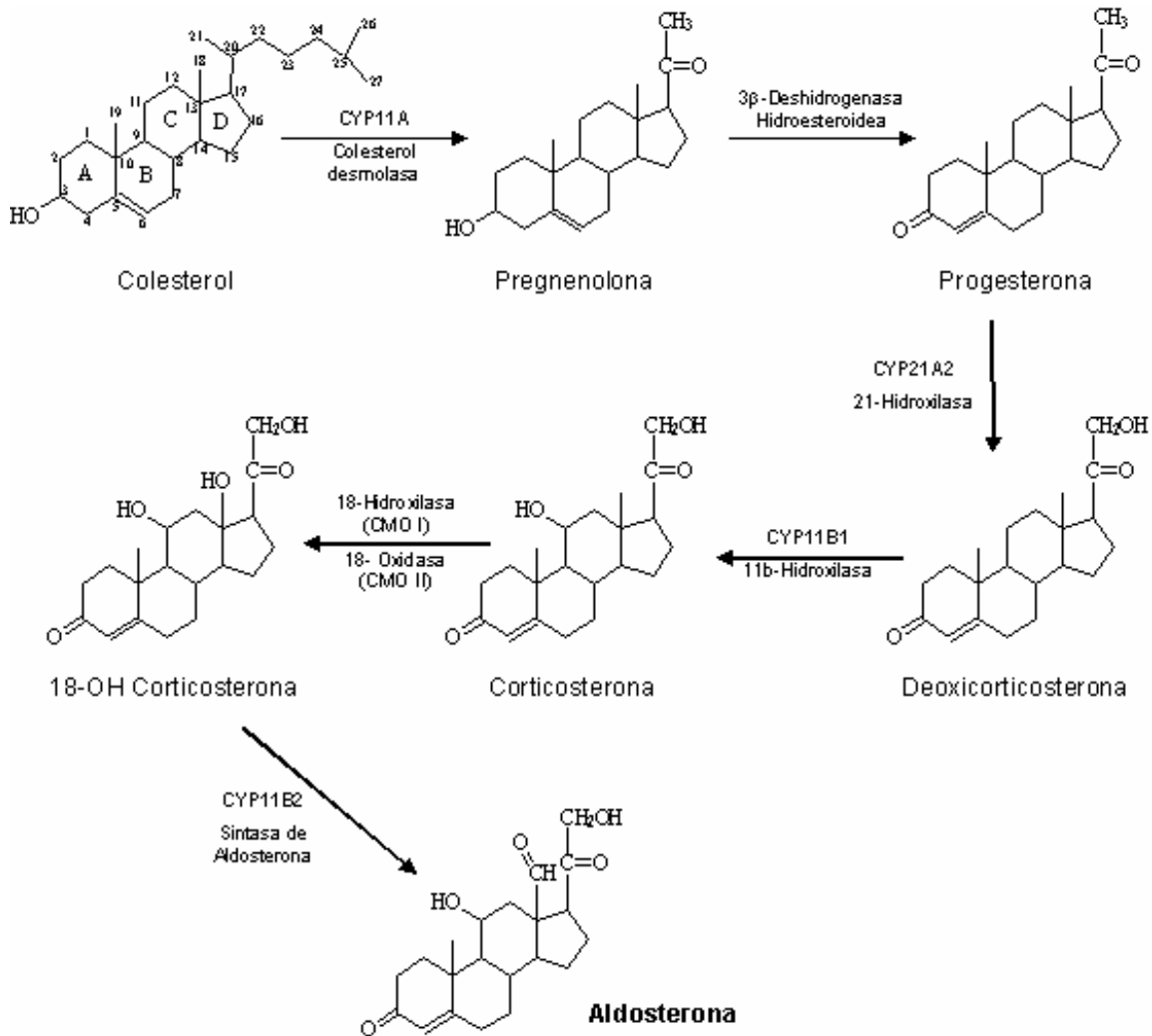


Figura 6. Síntesis de aldosterona.

La secreción de la aldosterona por las células de la zona glomerulosa es independiente de la regulación del cortisol y los andrógenos y existen al menos tres mecanismos que la controlan [173]:

1. *El sistema renina-angiotensina*: La angiotensina II es el principal secretagogo de la síntesis de aldosterona, esta hormona se une a sus receptores de angiotensina tipo 1 (AT₁) localizados en la membrana de las células de la glomerulosa. Este receptor se encuentra acoplado a proteínas Gq lo que ocasiona aumento en los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) lo que conlleva a un aumento en los niveles de calcio citosólico y finalmente vasoconstricción. El incremento en los niveles de calcio en la zona glomerulosa de la glándula suprarrenal inducen la secreción de aldosterona.
2. *La concentración de potasio sérico*: El ión potasio estimula directamente la secreción de aldosterona. Además activa localmente el sistema renina-angiotensina en la capa glomerulosa de la corteza renal. Un incremento tan pequeño del potasio sérico de 0.1 meq/L estimula el aumento de los niveles de la aldosterona plásmatica.
3. *La concentración de la hormona adrenocorticotropica (ACTH)*: Cantidades fisiológicas de la ACTH estimulan la secreción de la aldosterona. Sin embargo, hay reportes donde le dan poca importancia a la ACTH en el control de la liberación de la aldosterona, a este respecto se ha reportado que sujetos que reciben altas dosis de glucocorticoides con supresión completa de la ACTH tienen secreción normal de la aldosterona [173].

Los niveles séricos normales de la aldosterona en humanos son alrededor de 50 a 100 ng/ml. Esta hormona se metaboliza principalmente en el hígado, se elimina por bilis y orina, a nivel hepático se produce una conjugación de grupos sulfato y glucorónicos lo que aumenta su solubilidad.

Acciones genómicas y no genómicas de la aldosterona

Debido a su liposolubilidad, la aldosterona difunde fácilmente al interior de las células donde interactúa con el receptor mineralocorticoide esta acción se conoce como "efecto genómico" de la aldosterona. La mayoría de las acciones conocidas de esta hormona son en las células epiteliales como no epiteliales y son mediadas a través de la activación de los receptores a mineralocorticoides, los cuales son capaces de regular la transcripción de diversos genes. Una vez que se forma el complejo aldosterona-receptor en la células del túbulo distal y túbulo colector, es translocado al núcleo donde se une a diferentes regiones promotoras de diversos genes que contienen elementos de respuesta a los mineralocorticoides. Los genes más conocidos son los que codifican para el transportador sodio:cloro (TSC), la subunidad alfa del canal epitelial de sodio (ENaC), el canal epitelial de potasio (ROMK) y la ATPasa sodio:potasio localizados en el túbulo distal y en el túbulo colector [77;92;137]. El aumento en la expresión de estas proteínas produce la acción clásica conocida de aldosterona que es aumentar la reabsorción de sodio y la secreción de potasio; este efecto no es inmediato y tarda más de 45 minutos, alcanzando el efecto máximo después de varias horas (figura 6) [5].

Otras acciones de la aldosterona son las conocidas como efectos "no genómicos", tales efectos no son mediados a través de la unión de la aldosterona a su receptor a mineralocorticoide. Se ha reportado en líneas celulares de leucocitos mononucleares humanos, células del músculo liso vascular y cardiomiocitos, que la aldosterona puede producir acciones rápidas (en segundos) que se caracterizan por un aumento en los niveles de inositol trifosfato (IP3) y calcio intracelular [27;170], así como la disminución en la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y la activación de la bomba Na^+/K^+ ATPasa [104]. Efectos que no fueron revertidos por antagonistas del receptor a mineralocorticoide [26;171]. Por lo tanto, la aldosterona puede ejercer diferentes acciones por mecanismos independientes al receptor de mineralocorticoides.

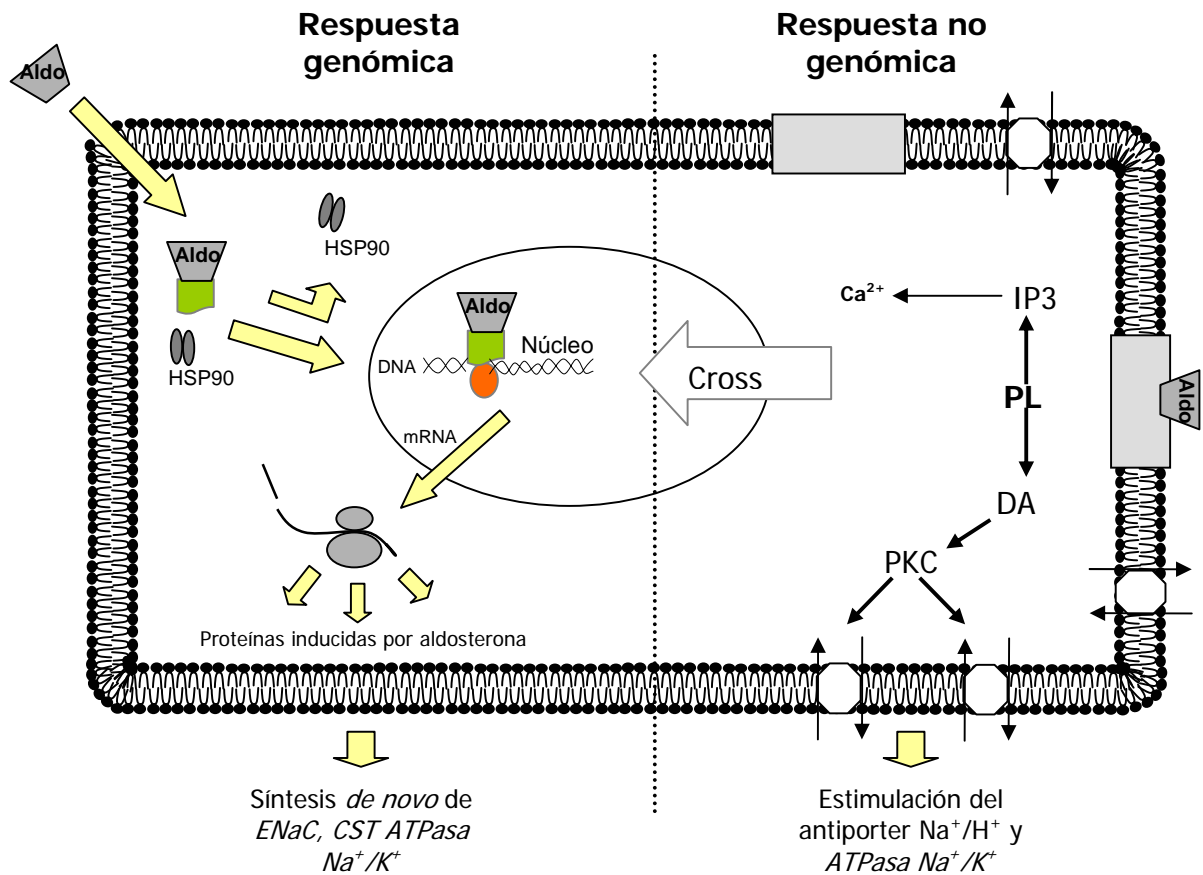


Figura 7. Mecanismo genómico y no genómico de la aldosterona.

Recientemente Arima y colaboradores, encontraron que la aldosterona causa vasoconstricción no genómica en arteriolas aferentes y eferentes de conejo, a través de la activación de la fosfolipasa C [10]. Aunado a esto, en estudio aleatorio, doble ciego realizado en humanos, mostró que la administración intravenosa de aldosterona produce aumento en las resistencias vasculares periféricas y gasto cardíaco comparado con el placebo. Estos efectos aparecieron a los 3 min, un curso de tiempo demasiado rápido como para explicarlo por vía genómica [133;172]. Por lo que, se ha propuesto que la aldosterona ejerce efectos directos sin modificar la transcripción de genes, estos efectos parecen ser mediados por receptores de membrana aun no identificados [160] (Figura 7).

Espironolactona: antagonista del receptor de mineralocorticoides

La espironolactona es un fármaco diurético que se une al receptor de mineralocorticoides y es utilizado en el tratamiento de la hipertensión esencial, la insuficiencia cardíaca, la cirrosis hepática asociada a edema y/o ascitis, el síndrome nefrótico, el hiperaldosteronismo primario y por sus efectos ahorradores de potasio es útil en la hipopotasemia. Es auxiliar en la hipomagnesemia inducida por otros diuréticos. La espironolactona también se ha utilizado para tratar el síndrome del ovario poliquístico y el hirsutismo.

Farmacocinética

La espironolactona se absorbe por el tracto digestivo en un 70 al 90% después de la administración oral y se metaboliza principalmente en el hígado. La biodisponibilidad del fármaco aumenta con los alimentos debido a que se reduce su metabolismo. Sus principales metabolitos activos son la canrenona y la 7-alfa(tiometil) espironolactona. El tiempo de vida media de la espironolactona es alrededor de 1.4 horas sin embargo, la canrenona posee una vida media de aproximadamente 16.5 horas, lo que prolonga los efectos biológicos de la espironolactona. Tanto la espironolactona como sus metabolitos tienen alta afinidad por las proteínas plasmáticas (> 90%). La vía de eliminación de la espironolactona y de sus metabolitos es a través de la orina, solo un pequeño porcentaje se elimina por la excreción biliar y la leche materna.

Farmacodinamia

La espironolactona inhibe de modo competitivo la unión de la aldosterona a su receptor mineralocorticoide presente principalmente en el túbulo distal y colector de la nefrona. La espironolactona actúa como un diurético ahorrador de potasio, causando un aumento en la excreción de sodio y agua, pero preservando el potasio y el magnesio.

Efectos secundarios

La espironolactona puede causar arritmias y debido a su estructura esteroide (Figura 8) puede causar ginecomastia, disminución de la libido e impotencia en los hombres. En las mujeres produce irregularidades menstruales, hemorragias postmenopáusicas, hirsutismo y amenorrea. Estos efectos endocrinos pueden traducirse en infertilidad y suelen ser reversibles cuando se discontinúa el tratamiento. Los efectos gastrointestinales reportados durante el tratamiento con espironolactona incluyen anorexia, náusea, vómitos, diarrea, gastritis, dolor abdominal, hemorragias y ulceraciones gástricas, también puede inducir cefaleas, mareos, confusión mental y ataxia [186].

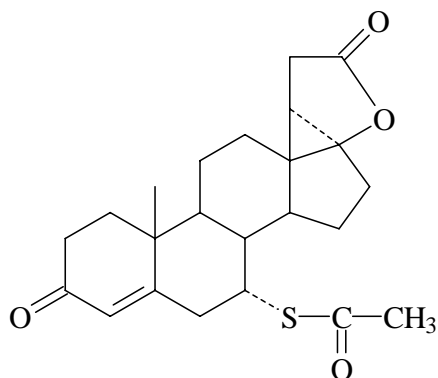


Figura 8. Estructura química de la espironolactona

La aldosterona en la progresión de enfermedades cardiovasculares y renales

El sistema renina-angiotensina-aldosterona juega un papel importante en la patogénesis y progresión de las enfermedades renales y cardiovasculares. Aunque la angiotensina II ha sido identificada como el mediador primario del sistema, en estudios recientes en humanos y en animales se ha demostrado que la aldosterona, también participa en la hipertrofia y la fibrosis cardiovascular. De esta forma se ha observado mayor incidencia de hipertrofia vascular en pacientes con hiperaldosteronismo que presentan valores bajos de angiotensina II [125]. La inhibición de los receptores de aldosterona con espironolactona redujo en un 30% la morbilidad y mortalidad de pacientes con insuficiencia cardiaca [118]. Dentro del miocardio la aldosterona actúa a través de su receptor a mineralocorticoide incrementando los depósitos de colágena y proteínas de la matriz extracelular [180]. Se ha reportado que bajas dosis del antagonista del receptor a mineralocorticoide, sin afectar la presión sanguínea y poco o nada de efecto sobre la masa ventricular, es capaz de prevenir la acumulación de colágena cardiaca en modelos renovasculares y modelos de hipertensión por aldosterona [22].

Desde el punto de vista renal, muy reciente se reportó que la administración continua de la aldosterona en ratas normales induce un aumento en la expresión del RNA mensajero de TGF- β [61;72], lo que sugiere que esta hormona podría participar en procesos fibróticos intrarrenales. En 1999 Fitzgibbon y colaboradores [42] utilizaron las ratas Wistar-Furth, una cepa que posee resistencia a las acciones de la aldosterona y encontraron que esta hormona media, al menos en parte, el daño renal en el modelo de ablación renal. Por otro lado, existe evidencia de que esta hormona es capaz de aumentar tanto los niveles intracelulares de fosfato de inositol [10], los receptores de angiotensina II [132], así como de alterar la respuesta vasodilatadora a acetilcolina [10], sugiriendo que la aldosterona puede modular el tono vascular ya

sea por un efecto directo y/ó por alterar el sistema mineralocorticoide, sin embargo los mecanismos exactos aún no están definidos.

Así mismo, en las ratas espontáneamente hipertensas (SPHR) que desarrollan nefropatía maligna, Rocha y colaboradores [122;123] encontraron que la inhibición selectiva de los receptores de la aldosterona con la espironolactona previene la aparición de proteinuria y desarrollo de glomeruloesclerosis, lo cual no fue observado cuando se administró la aldosterona de manera exógena [123]. También, en un modelo clásico de progresión de daño renal, el modelo de ablación renal, Greene y colaboradores [48] demostraron que la aldosterona juega un papel importante en la progresión del daño renal, ya que observaron que el bloqueo de la angiotensina II con losartán reduce los niveles de la aldosterona en el plasma, presión sistólica, proteinuria y lesiones renales, pero este efecto fue revertido en animales a los que se les infundió la aldosterona. Kapturczak y colaboradores [76] encontraron que la aldosterona puede jugar un papel muy importante en la iniciación y progresión de la nefropatía diabética en humanos. Estos autores encontraron que el bloqueo de los receptores de la aldosterona con la espironolactona reduce 30% de la albuminuria en pacientes diabéticos tipo 1 que ya presentaban nefropatía.

Además de las acciones fibróticas de la aldosterona, existe evidencia de que a éste mineralocorticoide puede alterar el tono vascular, pero el mecanismo no se conoce con exactitud. Se ha observado que la aldosterona aumenta el efecto vasoconstrictor de las catecolaminas [167], altera la respuesta vasodilatadora a acetilcolina [148], aumenta la expresión de los receptores β -adrenérgicos [67] y de la angiotensina II [131;132]. Otros efectos adversos reportados de la aldosterona sobre la vasculatura se incluyen la disfunción endotelial, la vasoconstricción y la aterogénesis. La disfunción endotelial es precursora de enfermedad cardiovascular y esto puede ser una anomalía temprana de daño vascular mediado por la aldosterona en modelos animales [71;119;147]. También se ha propuesto que la

aldosterona produce vasoconstricción renal a través de un efecto directo no genómico [10;104] (Figura 9).

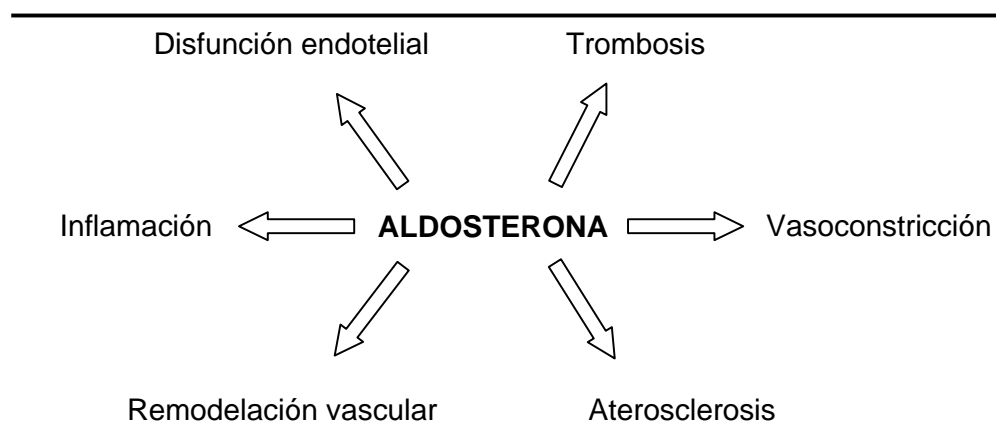


Figura 9. Efectos adversos de la aldosterona sobre la vasculatura.

La aldosterona en la nefrotoxicidad inducida por la CsA

Como se mencionó anteriormente, la nefrotoxicidad por CsA se acompaña de la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y aumento en la expresión de TGF- β , efectos que parecen ser regulados en parte por la aldosterona. En un estudio reciente de nuestro laboratorio evaluamos si la aldosterona participaba en el desarrollo de nefrotoxicidad por CsA en la rata [41], donde se muestra que el bloqueo de los receptores de la aldosterona en la nefrotoxicidad crónica inducida por la CsA previno la caída de la función renal, estos resultados apoyan fuertemente que la aldosterona ejerce acciones vasoactivas en este modelo de nefrotoxicidad, sin embargo, no sabemos si esto es mediado por aumento en las vías vasoconstrictoras o disminución de vías vasodilatadoras o ambas (vías vasoactivas) en el tejido renal o por un efecto directo de la aldosterona sobre la vasculatura renal.

II.5 VÍAS VASOACTIVAS EN EL TEJIDO RENAL

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

El SRAA juega un papel crítico en la regulación de la presión sanguínea y el balance de sal en los mamíferos. Este sistema engloba un conjunto de reacciones químicas en forma de cascada enzimática (figura 10), que es desencadenada por la liberación de renina, una proteasa producida en las células del aparato yuxtglomerular del riñón [111]. La liberación de renina está regulada por la acción de diferentes factores que actúan sobre las células yuxtglomerulares de entre los cuales destacan: estimulación simpática de los vasos renales, disminución de la presión de perfusión al riñón, mecanismo baroreceptor en las células yuxtglomerulares, mecanismo de la mácula densa; factores humorales como: angiotensina II y endotelina 1, entre otros. La liberación de la renina se realiza a través del incremento de la formación de AMP cíclico, el cual estimula la exocitosis de esta enzima [165].

Una vez liberada la renina, esta actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno de origen hepático cuya reacción tiene como producto el decapeptido angiotensina I, sobre el cual actúa la enzima convertidora de angiotensina dando finalmente origen al octapeptido vasoactivo: angiotensina II, esta conversión ocurre en el pulmón (figura 9). Esta última interactúa con receptores de membranas del tipo 1 y 2 (AT1 y AT2), ubicados en el sistema cardiovascular, sistema nervioso, glándulas suprarrenales y renal [157;184]. En los roedores se han encontrado subclases del receptor AT1, que son los subtipos AT1A y AT1B. Otra acción de angiotensina II es la de estimular la liberación de aldosterona. El paso limitante de este sistema es la liberación de renina

La angiotensina II es más conocida por su potente efecto vasoconstrictor, sin embargo posee diversas funciones en el organismo. Afecta la función renal actuando sobre el flujo sanguíneo, la filtración glomerular y sobre el transporte tubular, al aumentar la actividad del intercambiador Na^+/H^+ en el túbulo proximal. También

estimula la contracción del mesangio glomerular y el depósito de fibronectina y colágena [2]. Por otro lado, estimula el crecimiento de la pared de los vasos en el organismo, en especial a nivel renal [147]. Esto provoca la disminución de la luz de la vasculatura renal.

Se ha reportado que todos los componentes de SRAA están presentes en el riñón [142]. El receptor AT1 es el receptor más abundante y se localiza en la arteriola aferente y eferente, el glomérulo y el túbulo proximal tanto en los animales como en los humanos y se encarga de regular las acciones vasoconstrictoras de angiotensina II [136], de la reabsorción de sodio y agua, pero también promueve la hipertrofia celular, la proliferación y los depósitos de matriz extracelular en el riñón, así como la estimulación de la secreción de TGF- β [73]. El receptor AT2 se localiza en la corteza renal en particular en las arteriolas interlobulares pero no en el glomérulo, además es muy abundante en el tejido fetal pero disminuye rápidamente después del nacimiento [95] y la unión de la angiotensina II a este receptor produce vasodilatación.

En cuanto a la participación del SRAA en la nefrotoxicidad crónica por la CsA se ha demostrado un incremento en la secreción y liberación de renina lo que induce un aumento de los niveles de angiotensina II. En experimentos realizados en ratas con nefrotoxicidad crónica por la CsA, Shihab y colaboradores [139] observaron que la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o de los receptores AT1 reduce la fibrosis túbulointersticial, pero la función renal se ve más comprometida, por lo que, estos resultados sugieren que la angiotensina II participa en el establecimiento de la fibrosis y no en la disfunción renal.

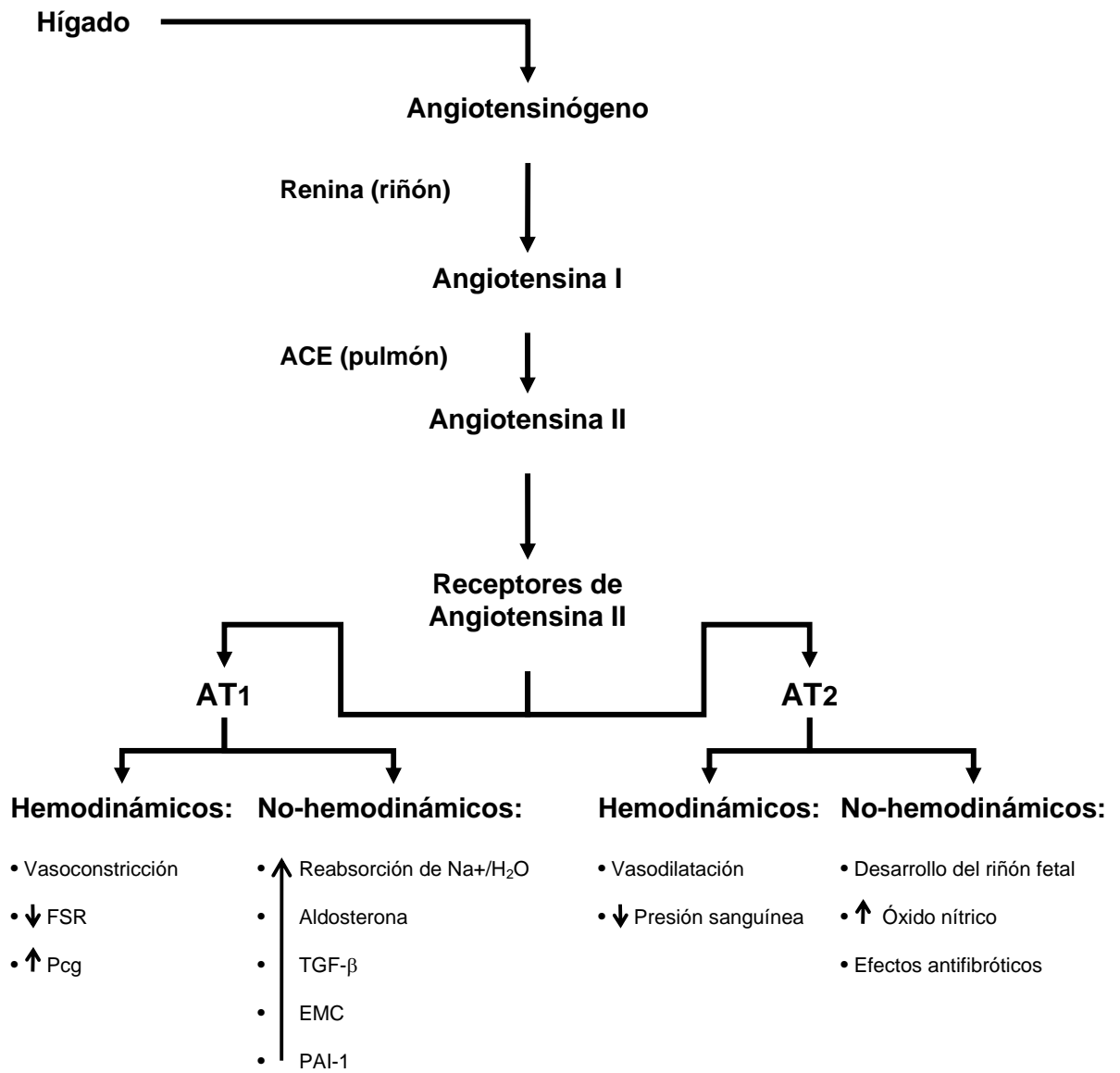


Figura 10. Sistema renina-angiotensina. ACE= enzima convertidora de angiotensina, FSR= flujo sanguíneo renal, Pcg= presión capilar glomerular, TGF-β= factor de crecimiento transformante beta, PAI-1= factor activador inhibidor del plasminógeno 1.

Endotelina

La endotelina (ET-1) es un péptido de 21 aminoácidos derivado del endotelio celular y es el agente vasoconstrictor más potente del organismo [178], aunque también se ha reportado que es producido por células no endoteliales, tales como células del epitelio renal y células mesangiales. La ET-1 produce vasoconstricción y aumento de la presión arterial. La ET-1 actúa sobre dos receptores: ETA y ETB; el RETA media vasoconstricción, infiltración de células mononucleares y producción de proteínas de matriz extracelular, mientras que el RETB media vasorelajación dependiente de endotelio vía prostaciclina y óxido nítrico [35;177] (figura 11). La ET-1 controla diversas funciones renales, tales como aumento en las resistencias vasculares, contracción de células mesangiales, reducción de la reabsorción de sodio y potasio en la nefrona, estimulación de la acumulación de matriz extracelular, disminución del flujo renal y de la filtración glomerular y su bloqueo previene estos efectos; es por ello que se ha propuesto que ET-1 puede ser un mediador en la progresión de daño renal [37;79].

Como se mencionó anteriormente, en la nefrotoxicidad inducida por CsA se encuentran involucrados diversos sistemas vasoactivos. En cuanto a ET-1 se ha reportado que la CsA estimula su producción tanto *in vivo* como *in vitro* [23;80], y aumenta la expresión del RNA mensajero de ETA [101]. Interesantemente, la disfunción renal inducida por CsA correlaciona con incremento urinario de ET-1 en humanos y en ratas [116] e incluso la vasoconstricción renal aguda y crónica inducida por la CsA es parcialmente inhibida con el uso de anticuerpos y bloqueadores del receptor ETA (BQ123)[63;80].

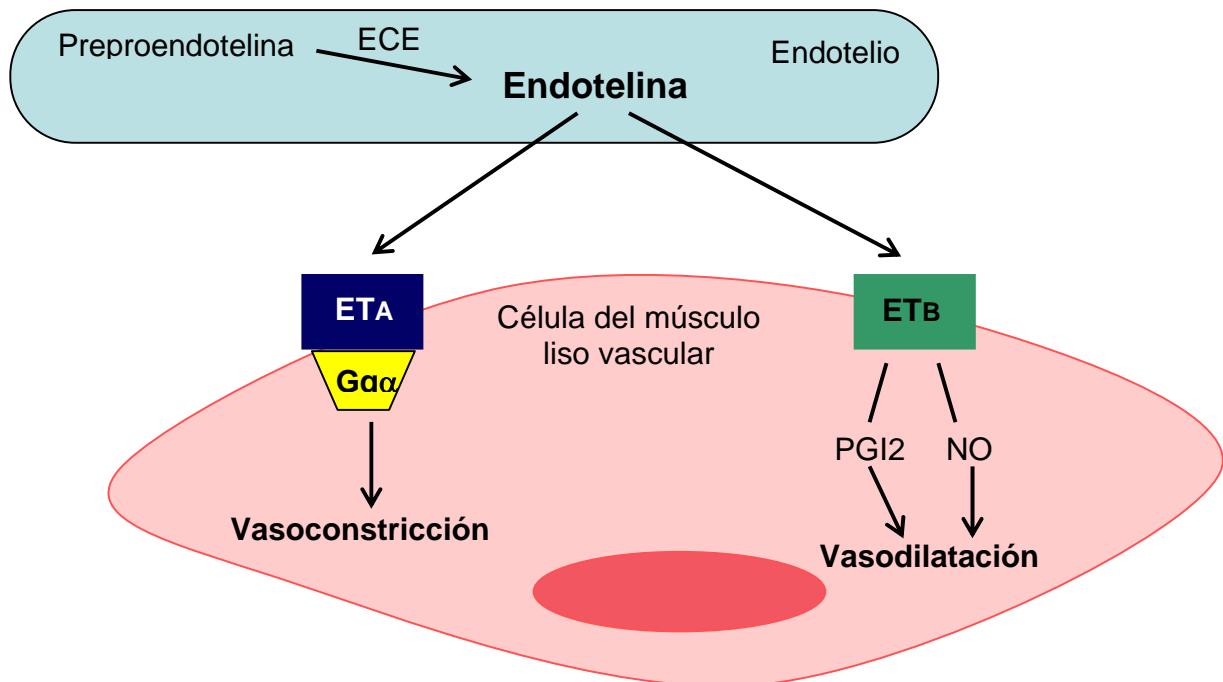


Figura 11. Efecto de la endotelina sobre sus receptores ETA y ETB. ECE= enzima convertidora de endotelina, Gqα=proteína Gq, PGI2= prostaciclina 2, NO= óxido nítrico.

Prostaglandinas

En el riñón las prostaglandinas son importantes mediadores del tono vascular, del balance de agua y sodio y de la liberación de renina. La síntesis de las prostaglandinas se inicia con la liberación del ácido araquidónico de la membrana celular y por acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) con el ácido araquidónico se sintetizan el tromboxano, las prostaciclina y las prostaglandinas. La enzima COX está conformada principalmente por dos miembros: COX-1 y COX-2. COX-1 es una enzima que se expresa amplia y constitutivamente en el organismo. Cuando COX-1 se activa se producen principalmente prostaciclina las cuales evitan la agregación plaquetaria y es citoprotectora en el tracto gastrointestinal; mientras que COX-2 es inducible y se expresa durante procesos inflamatorios [143], aunque en algunos órganos también se expresa en forma constitutiva, como es el caso del riñón. En el

tejido renal COX-2 se expresa en el glomérulo, en el asa ascendente gruesa de Henle y en la macula densa y parece regular la secreción de renina [54]. Al igual que interleucina 2, el gen de COX-2 también contiene sitios de unión para NFAT en la región promotora, por lo que este factor regula la transcripción del gen de COX-2 (Figura 12)[145].

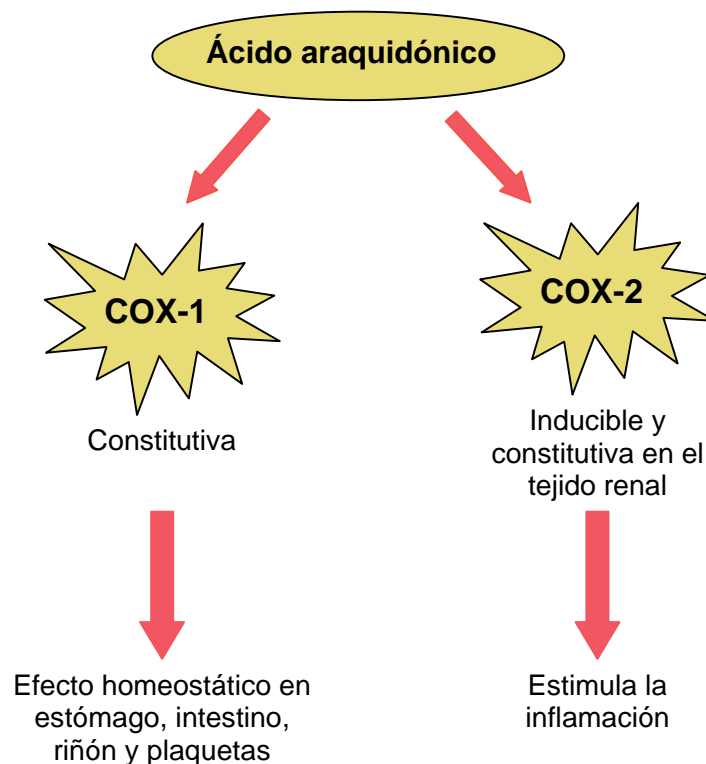


Figura 12. Efecto de las ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2) en el organismo.

Adenosina

La adenosina es un nucleósido de adenina el cual se origina por el rompimiento intracelular o extracelular del trifosfato de adenosina (el ATP) o por la hidrólisis de S-adenosil-L-homocisteina. Por la naturaleza de los nucleótidos de adenosina todas las células son productoras de adenosina [146]. La adenosina tiene una función importante parácrina en la regulación de la hemodinámica renal [103].

También se sabe que la adenosina modula el tono de la arteriola aferente y eferente modificando de esta forma la filtración glomerular [60]. Los efectos de la adenosina son mediados por cuatro receptores específicos: Ad1, Ad2a, Ad2b y Ad3, todos ellos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y se expresan constitutivamente en el tejido renal [110]. Los receptores Ad1 se expresan en los vasos preglomerulares, en el aparato yuxtglomerular, en los conductos corticales medulares y en la vasa recta de la medula externa; los Ad2a se encuentran en el glomérulo, la arteriola aferente y vasa recta; los Ad2b en los vasos preglomerulares (solo en rata, por lo que se dice que son especie específica), la vasa recta descendiente, el túbulo distal y el asa ascendente gruesa de Henle, mientras que los Ad3 se expresan poco en el riñón y su localización no ha sido definida [82;164].

Actualmente se considera a la adenosina como factor vasoactivo debido a que produce vasoconstricción y/o vasodilatación en las células del músculo liso vascular dependiendo de los receptores a los que se une y del tejido donde ejerce sus efectos. Específicamente, en el tejido renal se ha observado que la adenosina produce vasodilatación cuando se une a los receptores Ad2a y Ad2b los cuales están acoplados a proteínas Gs (estimuladora) y activan a la proteína cinasa A (figura 13). Hay reportes donde indican que el receptor Ad2a regula la circulación sanguínea en la medula renal [82] mientras que el receptor Ad2b controla el flujo sanguíneo intrarrenal [168]. En cambio, la adenosina produce vasoconstricción cuando se une a su receptor Ad1 el cual está acoplado a proteínas Gi (inhibidora) y a la proteína Gq en las células del músculo liso vascular [52] (figura 13). Aunque se conoce poco del papel fisiológico renal de la adenosina, se ha propuesto que participa en el mantenimiento de la función renal a través de tres vías: por la regulación del tono vascular renal, por su participación en la regulación del sistema retroalimentario túbulo-glomerular [146] y en la secreción de la renina [112;144].

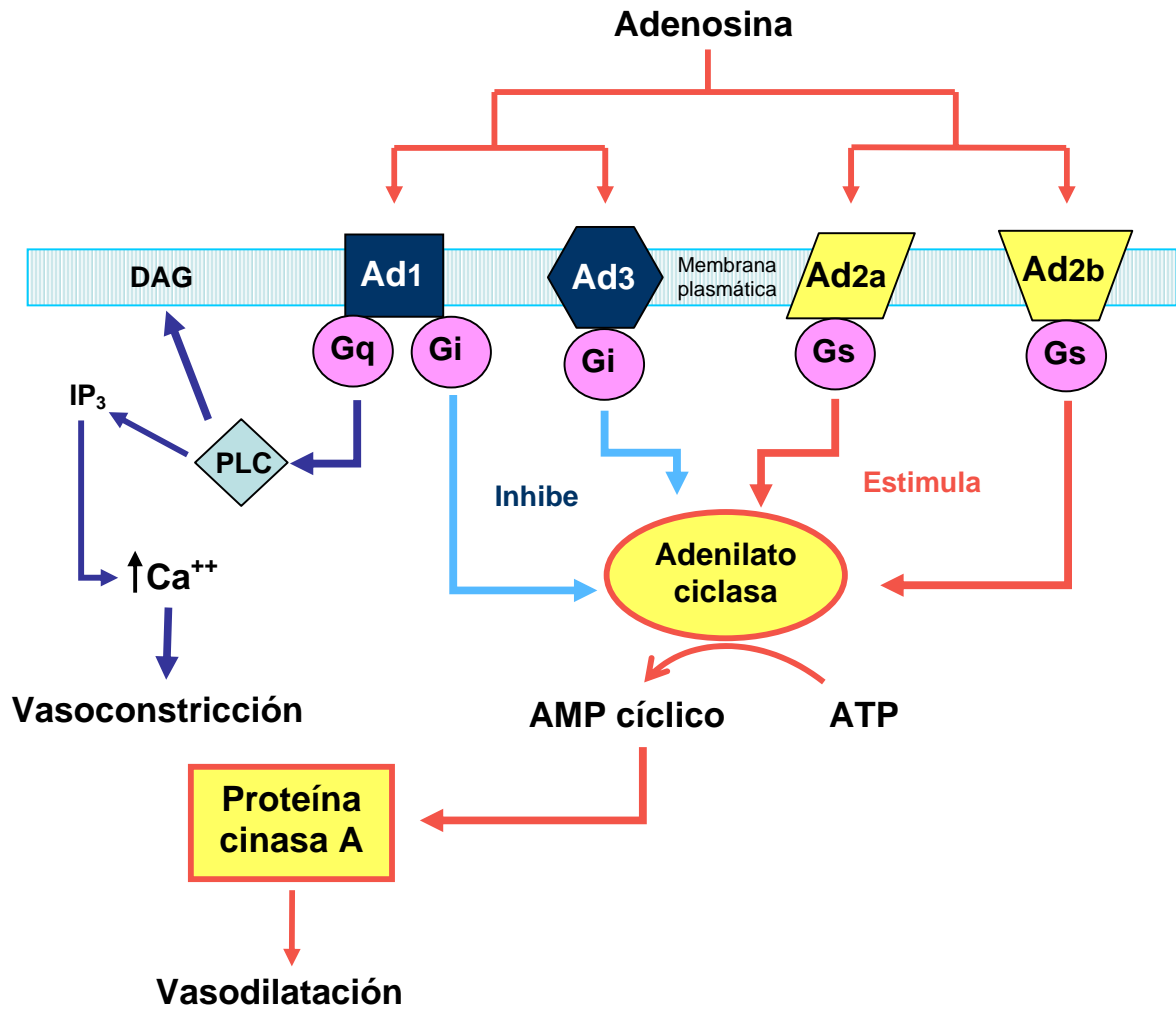


Figura 13. Efecto de la adenosina sobre sus receptores. Ad1, Ad2a, Ad2b y Ad3= receptores de adenosina, Gq= proteína G, Gi= proteína G inhibidora, Gs= proteína G estimuladora, AMP=adenosina monofosfato, ATP= adenosina trifosfato, PLC= fosfolipasa C, DAG= diacil glicerol, IP3= trifosfato de inositol.

Renina

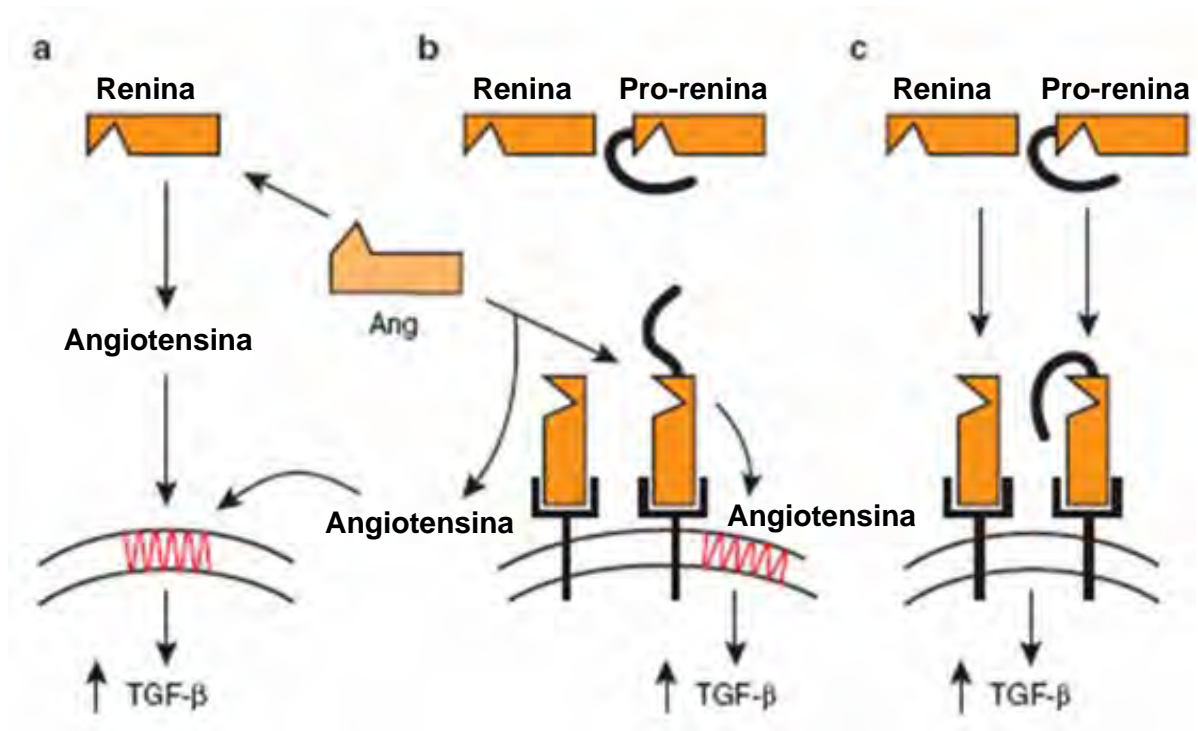
La renina es una enzima especie-específica encargada de producir angiotensina I. Esta enzima se sintetiza como preprorenina en las células granulares del aparato yuxtaglomerular. La síntesis de la renina inicia como un pro-péptido llamado prorenina, el cual es convertido a renina en las células secretoras de renina del músculo liso de la arteriola aferente glomerular [29]. La secreción de la renina del aparato yuxtaglomerular en el riñón se controla principalmente por la presión de perfusión renal, la actividad renal del sistema nervioso simpático, la mácula densa y una variedad de agentes humorales y parácrinos.

En la nefrotoxicidad experimental aguda y crónica, la ciclosporina aumenta los gránulos de renina en las células secretoras de renina de la arteriola aferente así como su liberación [78]. Sin embargo, no se conoce si este efecto resulta de la intensa vasoconstricción que produce la CsA o del efecto directo de este fármaco sobre estas células o bien de ambos factores.

Receptor de Renina

Recientemente, se ha reportado la existencia de dos receptores que se unen con la misma afinidad a la renina y a la pro-renina efecto que es independiente del papel enzimático de renina sobre el angiotensinógeno. Uno es el receptor de manosa-6-fosfato y el otro es un receptor específico. El receptor de la manosa-6-fosfato se ha localizado en miocitos de rata [156] y en las células del endotelio humano [7] y une exclusivamente a las formas glicosiladas de la renina y de la pro-renina. Lo que produce internalización y degradación de la renina en el citoplasma. Por lo que este receptor parece tener un efecto depurador de la renina plasmática. Por el contrario, el receptor específico de la renina o de la pro-renina se clonó de una librería de DNA complementario de riñón humano y es una proteína de 350 aminoácidos con un solo dominio transmembrana y no es homólogo con ninguna proteína de membrana conocida [105;106]. El mismo grupo que lo clonó [107] en un trabajo posterior

reportaron que el receptor de la renina induce la fosforilación de residuos de serina y treonina asociadas con la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés), principalmente las proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2) y también parece que este receptor actúa como cofactor ya que incrementa la eficiencia del rompimiento del angiotensinógeno hacia angiotensina I por la renina lo que facilita la formación de angiotensina II. Recientemente Huang y colaboradores [62] realizaron experimentos en cultivos de células mesangiales de humano y de rata, donde reportan que la renina y la pro-renina al unirse a este receptor específico aumenta la expresión del factor transformante beta (TGF- β) mecanismo que fue independiente de la generación y/o acción de angiotensina II (figura 14). Este receptor ayuda a explicar la existencia de pro-renina activa que puede mediar acciones patofisiológicas como en la diabetes donde hay niveles bajos de renina y altas concentraciones de pro-renina [187]. A este respecto recientemente se observó que ratones transgénicos que sobreexpresan al receptor de renina desarrollan glomerulosclerosis y proteinuria. Todos estos resultados sugieren fuertemente que la renina, no solo es la enzima responsable de producir angiotensina I, sino que ella "*per se*" puede mediar acciones locales intrarrenales a través de sus receptores, aunque se requerirán mas estudios para elucidar las acciones y el mecanismo de daño de la pro-renina y de la renina a través de este receptor.



Células mesangiales

Figura 14. Producción de TGF- β en cultivos de células mesangiales por acción de la renina. El aumento de TGF- β parece ser mediado por tres diferentes vías reguladas por pro-renina y/o renina. a) La síntesis de angiotensina II activa la síntesis de TGF- β en las células mesangiales. b) La unión de la renina y/o pro-renina al receptor de la renina permite la activación enzimática de pro-renina e incrementa la actividad catalítica de la renina lo que aumenta la síntesis de angiotensina II y esta a su vez activa la síntesis de TGF- β . c) La unión de la renina y/o pro-renina al receptor de la renina puede activar la síntesis de TGF- β . Ang = angiotensinógeno, TGF- β = factor de crecimiento transformante beta.

III. OBJETIVOS GENERALES

- I. Estudiar si la administración de espironolactona revierte o evita la nefrotoxicidad aguda inducida por la CsA.
- II. Evaluar el o los mecanismos responsables por los cuales la aldosterona modifica el tono vascular renal.
- III. Estudiar la participación de los factores vasoactivos en el efecto protector conferido por la espironolactona.
- IV. Estudiar si la administración de espironolactona revierte o evita la progresión de la función y de la estructura renal durante la nefrotoxicidad crónica por CsA previamente establecida.

III.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el efecto del bloqueo de los receptores de aldosterona con espironolactona sobre la nefrotoxicidad aguda producida por CsA.
2. Estudiar la influencia de la aldosterona y el bloqueo de sus receptores sobre la expresión génica intrarrenal de factores vasoactivos, durante la nefrotoxicidad crónica producida por CsA.
3. Evaluar si la administración de CsA modifica la expresión de la vía mineralocorticoide intrarrenal.
4. Estudiar si el bloqueo de los receptores de aldosterona revierte la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina previamente establecida.

IV. MATERIAL Y METODOS

IV.1 INCLUSIÓN DE GRUPOS EXPERIMENTALES

- Protocolo 1: Nefrotoxicidad aguda: se incluyeron cuatro grupos de ocho ratas Wistar macho cada uno, con peso de 300-350 g. El primer grupo formado por ratas normales recibieron aceite de olivo como vehículo (V, n= 8), el otro grupo recibió CsA a una dosis de 30 mg/Kg, vía subcutánea (s.c., n= 10), otro grupo recibió espironolactona (Es), 20 mg/Kg, vía intragástrica (i.g., n= 8) y finalmente el cuarto grupo recibió CsA+Es (n= 10). Los tratamientos fueron administrados diariamente durante 7 días. Las ratas tratadas con ciclosporina tuvieron libre acceso a agua y alimento, mientras que las ratas control recibieron alimentación pareada, es decir, la cantidad de alimento que consumieron fue el promedio consumido por los animales tratados con CsA (Figura 15).

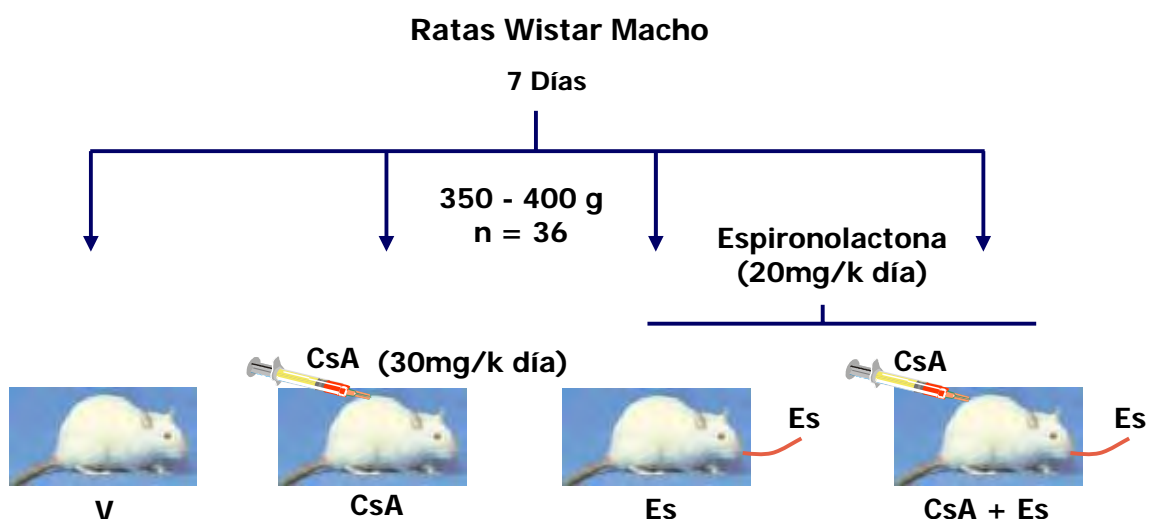


Figura 15. Protocolo de nefrotoxicidad aguda inducido por la CsA. n= número de ratas utilizadas en este protocolo, V= vehículo, CsA= ciclosporina, Es= espironolactona, CsA+Es= ciclosporina mas espironolactona.

- Protocolo 2: Nefrotoxicidad crónica: se estudiaron cinco grupos de seis ratas Wistar macho cada uno, con peso de 300-320 g. Cuatro fueron alimentados con dieta baja en sodio y se dividieron en: vehículo (V, n= 6), CsA (30 mg/k s.c., n= 9), Es (20 mg/kg i.g., n= 6) y CsA+Es (n= 10) durante 3 semanas. El quinto grupo estuvo compuesto por ratas normales que recibieron dieta normal. Al igual que en la nefrotoxicidad aguda los grupos controles (V y Es) recibieron alimentación pareada con respecto los grupos experimentales (CsA y CsA+Es). Diariamente se registró peso corporal, ingesta de agua y alimento (Figura 16).

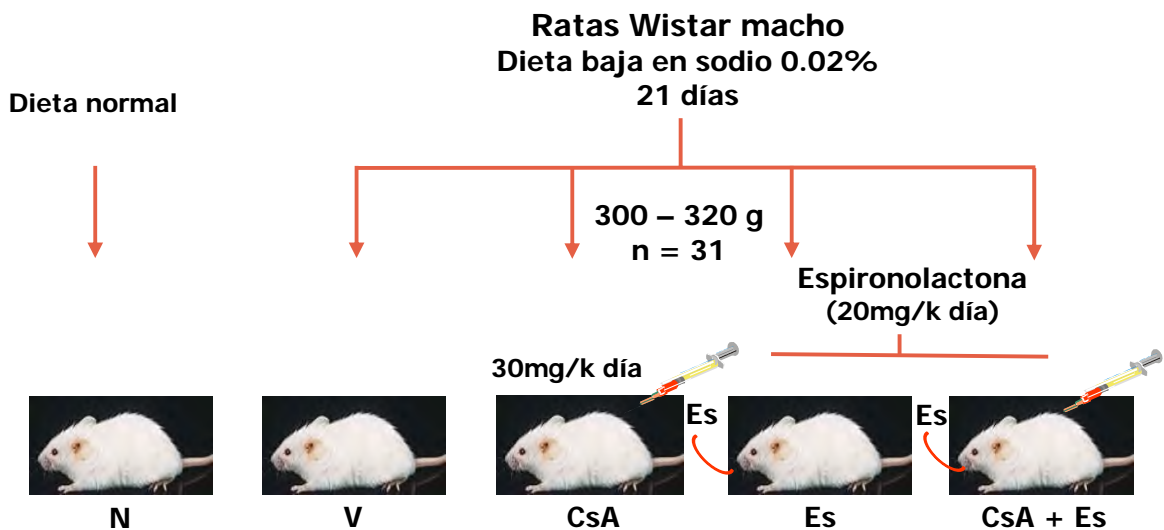


Figura 16. Protocolo de nefrotoxicidad crónica inducido por la CsA. n= número de ratas utilizadas en este protocolo, V= vehículo, CsA= ciclosporina, Es= espironolactona, CsA+Es= ciclosporina mas espironolactona.

Protocolo 3: Nefrotoxicidad crónica por CsA previamente establecida: Como muestra la figura 16, se incluyeron cuatro grupos de diez ratas Wistar macho cada uno, con peso de 300-330 g y se alimentaron con dieta baja en sodio por 36 días. Se dividieron en dos grupos: dos controles y dos experimentales. Las ratas control recibieron aceite de olivo (V, n= 6) durante todo el experimento y a uno de los grupos además se administró espironolactona (20 mg/K vía i.g., n= 6) a partir del día 18 y hasta finalizar el experimento. Los otros dos grupos fueron los experimentales a los que se les administró CsA (15 mg/K s.c., n= 9) durante 36 días y justo al día 18 la mitad de los animales tratados con ciclosporina fueron tratadas también con espironolactona (n= 9) hasta finalizar el experimento (Figura 17). Cabe mencionar que en todos los grupos experimentales se registró diariamente el peso corporal, la ingesta de alimento y agua. Los grupos controles fueron alimentados en forma pareada con los grupos experimentales.

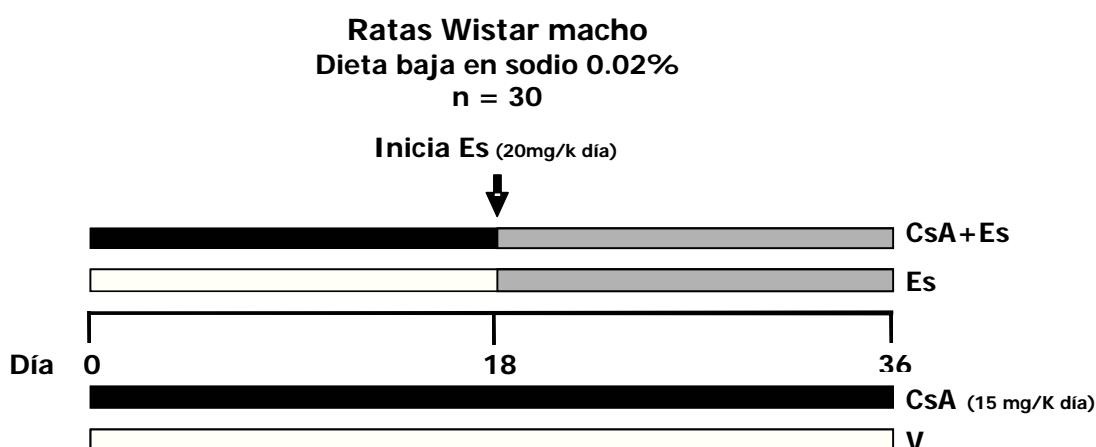


Figura 17. Diseño experimental en la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina ya establecida. n= número de ratas utilizadas en este protocolo, V= vehículo, CsA= ciclosporina, Es= espironolactona, CsA+Es= ciclosporina mas espironolactona.

IV.2 ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

Depuración de creatinina

Un día antes de finalizar los diferentes tratamientos, las ratas se colocaron en jaulas metabólicas de manera individual y se recolectó la orina de 24 horas para determinar el flujo urinario (volumen de orina/tiempo de recolección) y posteriormente se determinó la concentración de creatinina en suero y orina. La depuración de creatinina se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Depuración de Creatinina} = \frac{\text{Flujo urinario} * [\text{Creatinina en orina}]}{[\text{Creatinina en suero}]}$$

Filtración glomerular

Una vez que las ratas se retiraron de la jaula metabólica, se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal) y las ratas se mantuvieron dormidas por la administración de dosis suplementarias en el peritoneo. La preparación quirúrgica se realizó por medio de microcirugía de la siguiente forma: se colocó a la rata en una mesa termoregulada a 37°C, se cateterizó la tráquea con un tubo de polietileno PE-240, las venas yugulares y la arteria femoral con tubo de polietileno PE-50 y la vejiga con tubo de polietileno PE-90. Durante todo el experimento se registró la presión arterial media utilizando un polígrafo de Grass. Las ratas se mantuvieron en condiciones de euvolemia (sin aumento o disminución de volumen) por la infusión de 10 ml/kg de plasma durante la cirugía a una velocidad de 7 ml/hr, seguida de una infusión de inulina al 5% a una velocidad de 1.3 ml/hr. Después de un periodo de equilibrio de aproximadamente 45 min, se recolectó la orina durante 30 minutos; se tomaron muestras de sangre de la arteria femoral al inicio y al final de la recolección. El volumen de sangre que se recolectó se reemplazó con sangre de una rata donadora a través de la vena yugular. En el

plasma y la orina recolectados se cuantificó la concentración de inulina utilizando el método modificado de Davidson y Sackner [31].

Flujo sanguíneo renal (FSR)

Para medir el flujo sanguíneo renal, una vez realizada la cirugía y con el animal estable se disecó la arteria renal izquierda y se colocó una sonda alrededor de la arteria renal, la cual fue conectada al flujómetro Transonic System en donde se registró en forma continua el flujo sanguíneo renal.

IV.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinación de inulina

La determinación de inulina se realizó en plasma y orina por el método modificado de Davidson y Sackner [31]. La reacción de antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas y aldopentosas, en el cual el medio ácido hidroliza el enlace glicosídico de la sacarosa y los monosacáridos resultantes reaccionan con la antrona produciendo un color verde. Brevemente, las muestras de plasma se desproteinizaron mediante la adición de 250 μ l de ácido tricloroacético 1 N y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. Las orinas se diluyeron desde 1,000 hasta 2,500, dependiendo de su concentración.

La reacción se lleva a cabo mediante la adición de una solución de antrona (0.08 mg/100 mL), la cual se prepara mezclando 100 mg de antrona más 100 mL de H₂SO₄ concentrado y frío más 26 mL de H₂O destilada, la solución anterior debe estar todo el tiempo sobre hielo y protegida de la luz. Una vez terminada la desproteinización de los plasmas, las diluciones de las orinas y la solución de antrona, se colocan 100 μ L de cada muestra en un frasco y se les adicionan 500 μ l de la solución de antrona, se agitan e incuban en baño maría a 45°C durante 50 min.

Finalmente las absorbancias se leen en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU 640 a una longitud de onda de 620 nm. Cabe mencionar que en cada determinación se corrió una curva estándar con un rango de concentración de 10-50 µg/mL. Se midió el volumen de orina para determinar el flujo urinario (volumen de orina/tiempo de recolección). La tasa de filtración glomerular se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Depuración de Inulina} = \frac{\text{Flujo plasmático} * [\text{inulina en orina}]}{[\text{inulina en suero}]}$$

Creatinina

La concentración de creatinina en suero, plasma y orina se determinó utilizando el método cinético de Jaffé [56] utilizando un equipo automatizado analizador de químicas Technicon RA-1000. La determinación se basa en la reacción del ácido pícrico con la muestra en medio alcalino, donde se forma un complejo color rojo. La velocidad de formación del complejo se mide bicromáticamente por detectores a 520 y 560 nm y la formación de este complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Sodio y potasio

El sodio y el potasio se determinaron en suero por el método ión-selectivo utilizando el aparato analizador de electrolitos Nova-4.

Concentración de CsA en sangre total

La concentración de CsA en sangre total se determinó mediante la técnica de polarización fluorescente (FPIA). En esta técnica se aplica un inmunoensayo de unión competitiva, en donde la ciclosporina compite con una molécula similar marcada con fluoresceína por sitios de unión a anticuerpos dentro de una solución. La

concentración de ciclosporina en sangre es inversamente proporcional a la concentración de la molécula marcada unida al anticuerpo.

IV.4 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Una vez que se finalizó con los diferentes tratamientos experimentales, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal) y se realizó microcirugía para cateterizar las arterias femorales, con una de ellas se registro la presión y por la otra se perfundió el riñón. Mediante una incisión en la cavidad abdominal se ligó la arteria y vena renal derecha y rápidamente se removió el riñón (el cual se utilizó para los estudios moleculares). Posteriormente se ligó la aorta por arriba de las arterias renales y la arteria mesentérica y se hizo una pequeña incisión en la vena y por una de las arterias femorales se perfundió el riñón izquierdo con solución salina a una presión constante y similar a la tensión arterial que tenía previamente la rata, una vez que se limpió el riñón de sangre se pasó el formaldehído al 10% para fijar el riñón. Se extrajo el riñón, se incluyó en parafina y se hicieron cortes de 3 micras para posteriormente teñirlos con PAS (ácido per-iódico de Schiff), para el análisis de arteriopatía y Masson para la cuantificación de fibrosis. Para los estudios de microscopía de luz se utilizó un microscopio Nikon triocular modelo Eclipse 80i conectado a una cámara digital y las imágenes digitalizadas se evaluaron en el programa eclipse net. La arteriopatía se analizó en los tejidos teñidos con PAS con el objetivo 40X, para lo cual se contó el número total de glomérulos en cada laminilla y el número de glomérulos que presentaban arteriolas dañadas y se calculó el porcentaje de arteriopatía; los resultados se expresaron como el porcentaje de arteriolas afectadas sobre el número total de arteriolas.

Posteriormente se realizaron 3 mediciones del espesor de la pared de cada arteriola preglomerular incluyendo un total de, al menos, 25 arteriolas por cada rata; los resultados se expresan como el promedio del grosor arteriolar en cada grupo \pm el

error estándar. Se midió el diámetro glomerular de todos los glomérulos presentes (alrededor de 500 glomérulos por grupo) utilizando el objetivo 10X; para esto se tomaron 3 mediciones del diámetro de cada glomérulo, se obtuvo el promedio y los glomérulos se agruparon por rangos, se utilizó el software Eclipse Net de la marca Nikon. El grado de fibrosis túbulo-intersticial se evaluó con la tinción de Masson, para ello se realizó un análisis morfométrico computarizado, donde se digitalizaron 5 campos subcorticales utilizando el objetivo 10X. Se midió el área de fibrosis y el área total por campo excluyendo glomérulos y se calculó el porcentaje de fibrosis.

IV.5 ESTUDIOS MOLECULARES

Los riñones obtenidos de los diferentes grupos experimentales se colocaron en solución salina fría y mediante un corte sagital se dividió macroscópicamente la médula de la corteza renal; los tejidos se cortaron y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C .

Extracción de RNA

El RNA se extrajo mediante homogenización en tiocianato de guanidina y ultracentrifugación a través de un gradiente discontinuo de cloruro de cesio [129]. Para determinar la calidad del RNA se cuantificó su concentración por espectrofotometría de UV y se separó en geles de agarosa/formaldehído para visualizar las bandas 28 y 18S. Para evitar cualquier contaminación con DNA todas las muestras se incubaron con DNAsa I libre de RNAsa a 37°C por 15 min. El RNA se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con acetato de sodio y etanol.

TR- transcripción reversa

Para obtener el DNA complementario a partir de RNA se utilizó la reacción de la transcripción reversa (TR) con $10\ \mu\text{g}$ de RNA total de la corteza renal. Previamente

el RNA se lleva a 65°C por 10 min. La reacción se incubó a 37°C por 60 min, en un volumen final de 20 µl, utilizando 200 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia en el mono (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV, Stratagene), 100 pmol de hexámeros al azar (random primers, Life Technologies), 0.5 mM de cada dNTP (una mezcla de dCTP, dATP, dGTP, dTTP, Sigma) y 1X de buffer de TR (75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, pH 8.3). Al finalizar el tiempo de reacción, las muestras se llevaron a 95°C por 5 min para inactivar a la transcriptasa reversa. Se incluyeron controles negativos, los cuales eran muestras problema con todos los reactivos para la TR, pero sin transcriptasa reversa.

PCR semicuantitativa

Para la reacción en cadena de la polimerasa, se utilizó DNA complementario obtenido de la transcriptasa reversa para amplificar los fragmentos específicos para los siguientes genes: angiotensinógeno, prorenina, receptor de renina, preproendotelina 1, los receptores de angiotensina II AT1A y AT1B así como los receptores de endotelina ETA y ETB, ciclooxigenasa 2 (COX-2), los receptores de adenosina Ad1, Ad2a, Ad2b y Ad3 y de la vía mineralocorticoide, el receptor a mineralocorticoide y la enzima 11β-deshidrogenasa hidroesteroidea tipo 2 (11β-HSD2). Se amplificó β-actina como gen control. En la tabla 3 se detalla la secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados, los cuales fueron reportados en trabajos previos y se obtuvieron de Invitrogen (Gaithersburg, MD).

Se utilizó un décimo de reacción de TR de cada muestra para realizar la PCR en un volumen final de 20 µl. Esta reacción se realizó en presencia de 0.2 µCi de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (~3,000 Ci/mmol, 9.25 MBq, 250 µCi); 2 µl buffer 1X PCR (10 mM Tris-HCl; 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl, pH 8.3); 0.2 mM de cada dNTP, 10 µM de cada par de oligonucleótidos y una unidad de Taq DNA polimerasa (Stratagene). Se realizó una cinética de amplificación para calcular el número de ciclos óptimo para cada par de oligonucleótidos, en la cinética se obtienen dos fases: la exponencial y de meseta, se

utilizó la fase exponencial para obtener el número ideal de ciclos en cada uno de los genes, como previamente se reportó [121;16;17]. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Whatman Biometra, Goettingen, Germany. El gen control se amplificó simultáneamente con cada reacción problema.

Para el análisis del producto de PCR la mitad de cada reacción se corrió en geles de acrilamida al 5%. Las bandas se tiñeron con bromuro de etidio, se revelaron con luz UV, se cortaron y cada banda se colocó en 1 ml de líquido de centelleo (Ecolume, ICN, Aurora, OH). El fósforo radiactivo incorporado en cada banda se midió en cuentas por minuto en un contador de centelleo (Beckman LS6500, Fullerton, CA). Todas las reacciones se realizaron por triplicado. La expresión de cada isoforma se evaluó por triplicado y de forma individual en cada grupo estudiado. Los controles negativos se incluyeron en cada reacción.

PCR en tiempo real (cuantitativa)

Se utilizó un equipo ABI 7000 Prism (Applied Biosystems) y se emplearon sondas para PCR marcadas con FAM o VIC TaqMan® de Applied Biosystems, los cuales son específicos para detectar y cuantificar secuencias de DNA complementario sin detectar DNA genómico. FAM (6-carboxifluoresceína) y VIC son utilizados como reporteros fluorescentes; estos conjugados detectan cada copia amplificada. La cantidad de fluorescencia de FAM o VIC emitida en cada reacción se midió en función del número de ciclos de PCR. Mediante esta técnica se evaluó la expresión de: TGF- β , el receptor AT2 de angiotensina II y la molécula de daño renal (Kim-1, por sus siglas en inglés). Las sondas utilizadas fueron: Rn00572010_m1 para TGF- β , Rn00560677_s1 para el receptor AT2 y Rn00597703_m1 para Kim-1. Estas sondas fueron prediseñadas y probadas por Applied Biosystems. Se utilizó el RNA ribosomal (18s) como gen control. El volumen total de la reacción fue de 15 μ l, se utilizaron 3 μ l de muestras de DNA complementario, 7.5 μ l de MasterMix, 3.9 μ l de agua y 0.6 μ l de sonda (primer específico para cada reacción, Tabla 3). La reacción de PCR se realizó

en placas de reacción de 96 pozos utilizando DNA complementario a partir de 2.5 ng del total de RNA aislado de forma individual de cada muestra de corteza renal.

Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes: 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos a 95°C por 1 min, y 1 min a 60°C. Los resultados se registraron utilizando un software de ABI PRISM 7000 SDS (Applied Biosystems). Se obtuvo el ciclo de umbral (C_T) de cada reacción de PCR, el C_T es definido como el número de ciclos al cual la cantidad del blanco amplificado alcanza un umbral fijo. La relación de expresión del gen problema con el gen control fue determinado por $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Gen problema}) - \Delta C_T (\text{Gen control (18S)})$$

$$\Delta C_T (\text{Gen problema}) = C_T (\text{Gen problema}) - C_T (18S)$$

$$\Delta C_T (\text{Gen normal}) = C_T (\text{Gen normal}) - C_T (18S)$$

El valor de C_T de cada gen en cada muestra se determinó por triplicado y los resultados fueron analizados como la relación entre el gen problema/18S RNA ribosomal (gen constitutivo).

IV.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentaron como el promedio \pm el error estándar y la significancia estadística se alcanzó cuando el valor de P fue menor que 0.05. Los resultados obtenidos se analizaron por ANOVA seguida por un análisis de Student-Neumann-Kuels. La diferencia de los diámetros glomerulares se determinó a través de un análisis de contingencia de variables y la diferencia entre grupos se evaluó por chi-cuadrada.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para cada gen estudiado por PCR- semicuantitativa.

Gen amplificado	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño (pb)	T (°C)	Ciclos	Referencia
β-actina	5' CGT AAA GAC CTC TAT GCC AA 3' 5' AGC CAT GCC AAA TGT CTC AT 3'	349	54-63	18	[141]
Angiotensinógeno	5' CCT CGC TCT CTG GA CTT ATC 3' 5' CAG ACA CT GAG GTG CTG TTG 3'	226	59	26	[169]
RAT1A	5' CGT CAT CCA TGA CTG TAA AAT TTC 3' 5' GGG CAT TAC ATT GCC AGT GTG 3'	306	62	26	[96]
RAT1B	5' CAT TAT CCG TGA CTG TGA AAT TG 3' 5' GCT GCT TAG CCC AAA TGG TCC 3'	363	62	30	[96]
Prorenina	5' CTG CCA CCT TGT TGT GTG AG 3' 5' CCA GTA TGC ACA GGT CAT CG 3'	264	57	24	[169]
R. de renina	5' TCT ACC CCC AGG CAG TGT CAT TTC 3' 5' CAG AGT CTT CCC CAT AAC GCT TCC 3'	430	62	31	
Preproendotelina	5' ATG GAT TAT TTT CCC GTG AT 3' 5' GGG AGT GTT GAC CCA GAT GA 3'	231	55	26	[6]
Receptor ETA	5' ATC ACT GTC CTG AAT CTC TGC G 3' 5' ACC AGT CCT TCA CGT CTT GG 3'	217	55	26	[6]
Receptor ETB	5' TTT GCC CTC TGT TGG CTT CC 3' 5' CTG TAT TTA TTG CTG GAG CGG 3'	325	55	24	[6]
COX-2	5' GAA ATG GCT GCA GAG TTG 3' 5' TCA TCT AGT CTG GAG TGG 3'	356	54	26	[163]
Ad1	5' CAG ATA GTG AGC CTG AGT GCT G 3' 5' GGT AGA TGA GGA CCA TGA GGA G 3'	790	64	28	[66]
Ad2a	5' AGC TTC CTC ATG GTC TTC AGA G 3' 5' CCC TGT GAC TAA GTG CAT GGT A 3'	615	62	29	[66]
Ad2b	5' CAC AGA GCT CCA TCT TTA GCC T 3' 5' GTG GGC AAG GAA GAT ACT GAA C 3'	1281	63	34	[66]
Ad3	5' GGT CTA CGA TCC TGT CAA GGA C 3' 5' AGT CCC ACC AGA AAG GAC ACT A 3'	640	62	31	[66]
R mineralocorticoide	5' AGA AGA TGC ATC AGT CTG CC 3' 5' GTG ATG ATC TCC ACC AGC AT 3'	380	55	25	[154]
11β-HSD2	5' TCG CCT GAA GCT GCT GCA GAT 3' 5' TGT CTT GGA GCA GCC AGG CTT G 3'	411	60	21	[15]

T = Temperatura de alineación; Ciclos = No. de ciclos de amplificación; pb = pares de bases. RAT1A, RAT1B y RAT2 = receptor de angiotensina II 1A, 1B y 2. RETA y RETB = receptores de endotelina A y B. A1 A2a, A2b y A3 = receptores de adenosina 1, 2a, 2b y 3. 11β-HSD2 = enzima 11-β deshidrogenasa hidroesteroidea tipo 2.

V. RESULTADOS

V.1 BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE ALDOSTERONA DURANTE LA NEFROTOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR LA CsA

En estudios recientes de nuestro laboratorio se ha demostrado que el bloqueo de los receptores de aldosterona con espironolactona es efectivo en la prevención de la disfunción renal y en la disminución del daño estructural observado en la nefrotoxicidad crónica por CsA [41]. Por lo que en este estudio decidimos evaluar si la espironolactona también puede prevenir la caída de la función renal durante la nefrotoxicidad aguda inducida por la ciclosporina que es la complicación mas frecuente en humanos.

Para desarrollar este objetivo se incluyeron cuatro grupos de ratas: un grupo administrado con aceite de oliva como vehículo (V); otro grupo al que además del vehículo también se administró espironolactona (Es); otros dos grupos que recibieron la CsA y uno de ellos además de la CsA también recibió la espironolactona. En la tabla 4 se muestran los parámetros fisiológicos de los cuatro grupos estudiados. Al final del experimento no encontramos diferencia significativa en el peso corporal, ni en los niveles séricos de sodio y potasio. Los animales tratados con CsA presentaron valores de tensión arterial media (TAM) significativamente más bajos en comparación con el grupo control, esta diferencia no fue observada en las ratas tratadas conjuntamente con la ciclosporina y la espironolactona.

Los niveles de la CsA fueron ligeramente menores en los animales tratados con espironolactona en comparación con el grupo que solo fue tratado con CsA, probablemente como resultado en la normalización en la función renal, como veremos adelante.

Tabla 4. Parámetros fisiológicos durante la nefrotoxicidad aguda inducida por la CsA.

Grupo	Peso corporal g	TAM mmHg	Na ⁺ Sérico mEq/L	K ⁺ Sérico mEq/L	CsA ng/mL
V	305 ± 7	112.6 ± 2.8	145.8 ± 2.4	3.9 ± 0.2	ND
Es	303 ± 12	112.1 ± 6.3	152.4 ± 5.6	4.2 ± 0.1	ND
CsA	311 ± 8	96.1 ± 6.5 ^a	142.5 ± 2.1	4.3 ± 0.3	6025 ± 340
CsA + Es	324 ± 12	109.9 ± 2.3 ^b	137.4 ± 2.7	4.5 ± 0.2	4667 ± 312 ^b

Los datos se muestran como promedio ± error estándar. ND no determinado, **a** p<0.05 vs. V y **b** p<0.05 vs. CsA. TAM= tensión arterial media, DCr= depuración de creatinina, FSR= flujo sanguíneo renal, V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

En la figura 18 se muestran los resultados de la filtración glomerular, que se cuantificó por la determinación de la depuración de inulina. La administración de espironolactona no modificó la función renal en las ratas control. En cambio y como era de esperarse, los animales tratados con CsA por 7 días presentaron disminución significativa del filtrado glomerular comparado con el grupo control, como previamente se demostró en nuestro laboratorio [41]. En cambio, las ratas que recibieron simultáneamente CsA y el antagonista del receptor a mineralocorticoide (espironolactona) no presentaron disfunción renal.

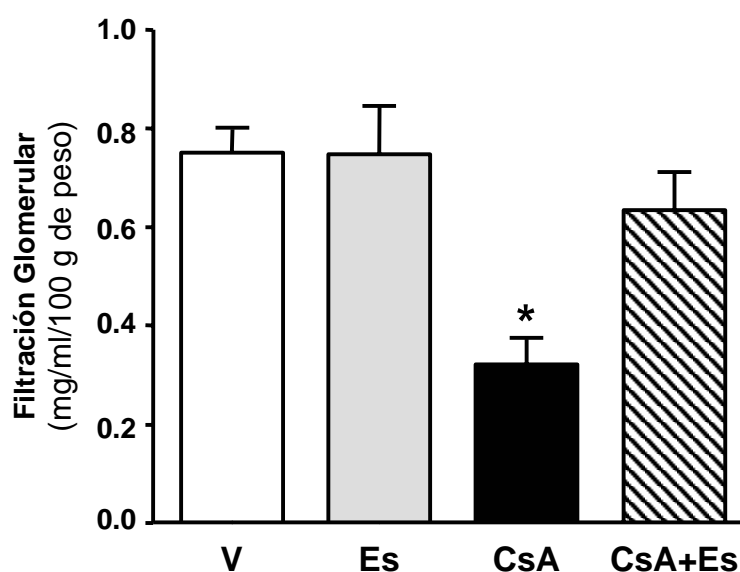


Figura 18. El bloqueo de los receptores de la aldosterona con la Es previno la disfunción renal inducida por CsA en la nefrotoxicidad aguda. * p<0.05 vs todos los grupos estudiados. V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

La caída de la función renal inducida por CsA es mediada principalmente por la vasoconstricción renal que produce este inmunosupresor. Por lo tanto decidimos evaluar si la espironolactona modificaba el flujo sanguíneo renal. En la figura 19 se presentan los valores de Flujo sanguíneo renal (FSR), se observa que el grupo que recibió espironolactona presentó valores similares al grupo control. Por el contrario, la CsA reduce el FSR alrededor del 50% en comparación con el grupo control. Esta reducción se protegió totalmente con la administración simultánea de CsA y espironolactona.

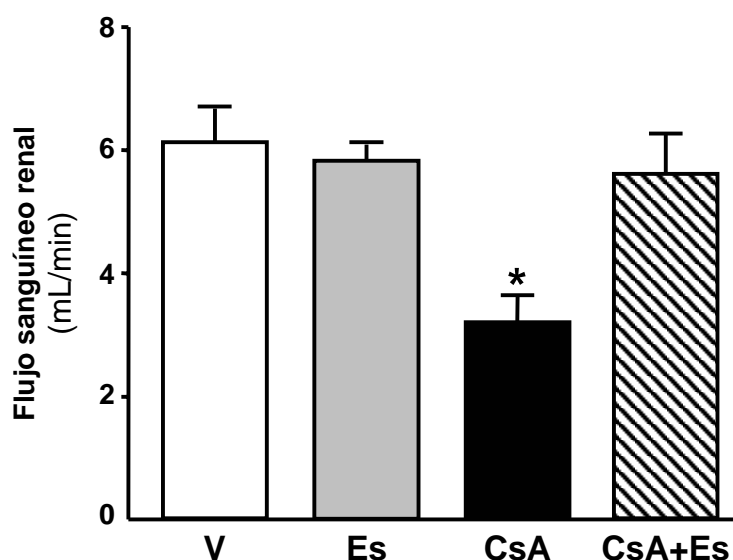


Figura 19. Efecto del bloqueo del receptor a mineralocorticoide sobre el Flujo sanguíneo renal durante la nefrotoxicidad aguda inducida por CsA. * $p < 0.05$ vs todos los grupos estudiados. V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

El bloqueo de los receptores de aldosterona previno la reducción tanto de la función renal como del flujo sanguíneo renal inducida por CsA. Estos resultados muestran que la aldosterona participa en las alteraciones hemodinámicas glomerulares presentes durante la nefrotoxicidad aguda inducida por la CsA. El efecto renoprotector de la espironolactona en la nefrotoxicidad aguda y crónica por la CsA sugiere que la aldosterona participa en la vasoconstricción que se observa con el

tratamiento con este inmunosupresor, ya que en ambos tipos de nefrotoxicidad, el bloqueo de sus receptores previno la disfunción renal.

V.2 BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE ALDOSTERONA EN LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA INDUCIDA POR LA CsA

Con el fin de entender los mecanismos por los cuales la aldosterona puede inducir vasoconstricción renal decidimos evaluar el efecto de la espironolactona sobre los niveles de expresión del RNA mensajero de proteínas que regulan el tono vascular del riñón como son el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), la endotelina y sus receptores, los receptores de adenosina y la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2). Para lo cual se emplearon 5 grupos de ratas. Cuatro grupos fueron alimentados con dieta baja en sodio, la administración de la CsA en estas condiciones se efectuó para causar el desarrollo de arteriopatía y fibrosis túbulo intersticial como se observa en el humano. Uno de los grupo recibió vehículo (V), otro se trato con CsA, otro grupo de ratas recibieron espironolactona (Es) y un grupo que recibió CsA+Es, durante 3 semanas. Además se incluyó un grupo con dieta normal (N) como grupo control.

Se cuantificaron los niveles de RNA mensajero a través de RT-PCR semicuantitativa y de RT-PCR en tiempo real. En ambos casos se realizó la cinética de amplificación para cada par de oligonucleótidos de los genes de interés. En la PCR semicuantitativa se calculó el número óptimo de ciclos de amplificación; tomando en consideración el punto medio de la fase exponencial de la cinética. Mientras que, en la RT-PCR en tiempo real se realizaron diluciones del DNA complementario para conocer la dilución a la cual se realizaría la PCR. Se utilizó β -actina para la RT-PCR semicuantitativa y RNA ribosomal (18S) para la RT-PCR en tiempo real, como genes control. En la figura 20 se muestran las gráficas de las cinéticas de los genes amplificados con RT-PCR semicuantitativa y en la figura 21 se muestran las cinéticas de los genes amplificados por RT-PCR en tiempo real.

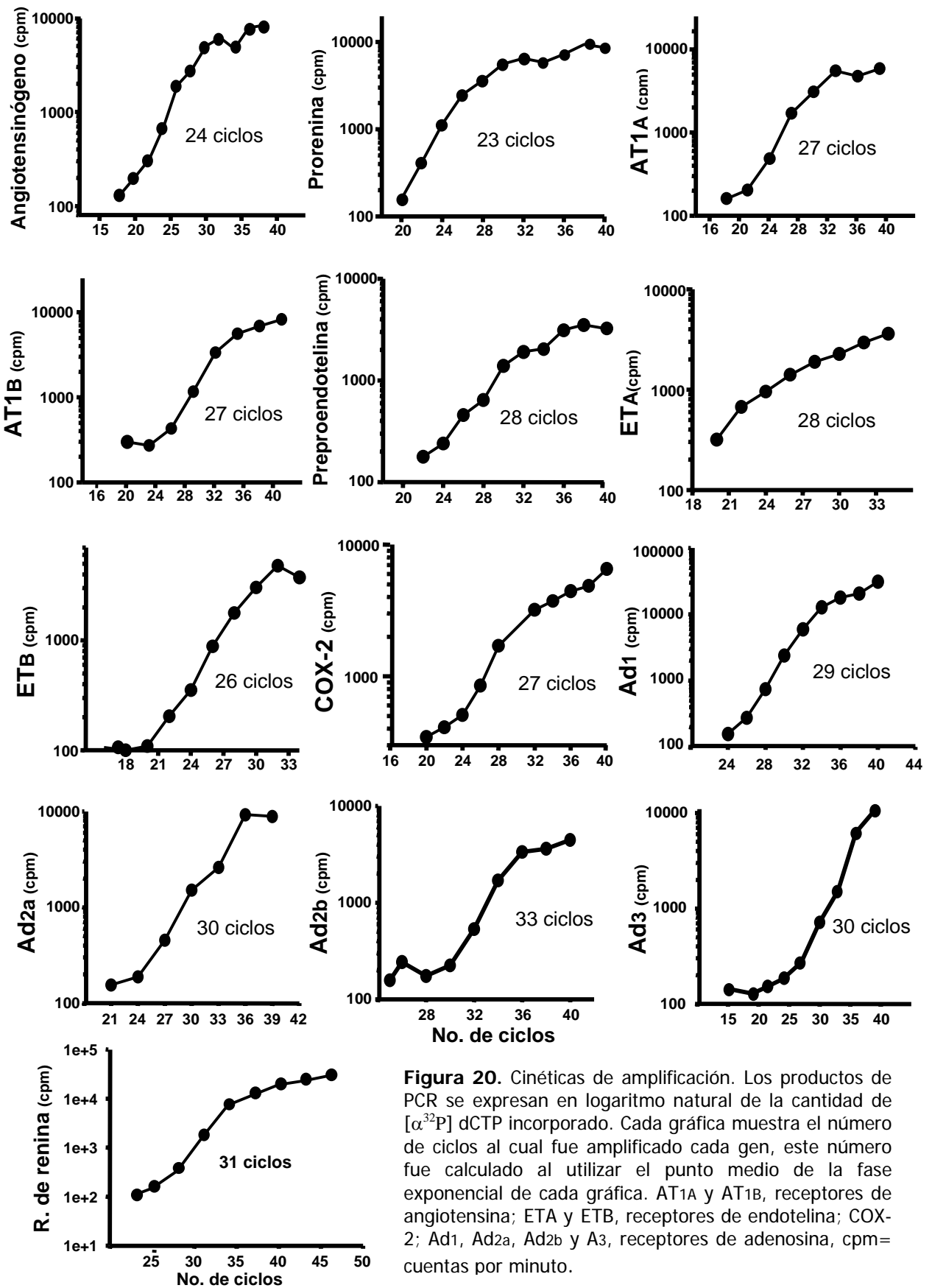


Figura 20. Cinéticas de amplificación. Los productos de PCR se expresan en logaritmo natural de la cantidad de $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP incorporado. Cada gráfica muestra el número de ciclos al cual fue amplificado cada gen, este número fue calculado al utilizar el punto medio de la fase exponencial de cada gráfica. AT1A y AT1B, receptores de angiotensina; ETA y ETB, receptores de endotelina; COX-2; Ad1, Ad2a, Ad2b y Ad3, receptores de adenosina, cpm= cuentas por minuto.

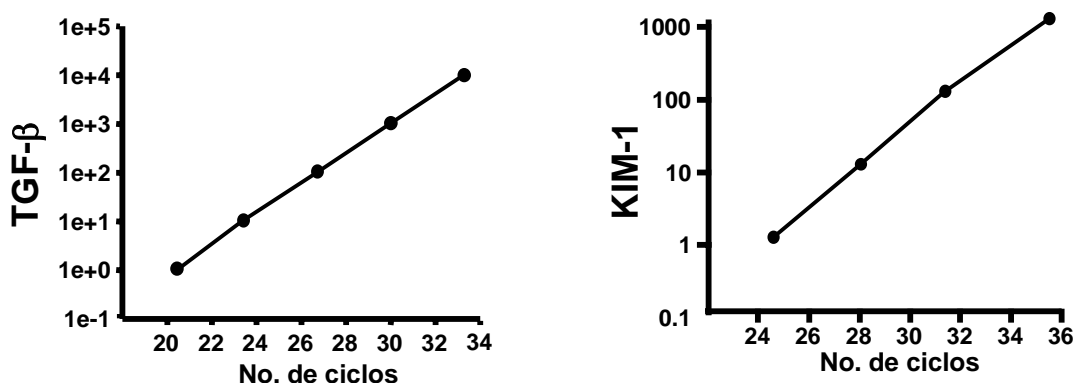


Figura 21. Cinética de amplificación de PCR en Tiempo Real para TGFβ y KIM-1. Los productos estudiados se expresan en logaritmo natural del gen problema/gen control.

Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Se evaluaron los niveles del RNA mensajero del angiotensinógeno, de pro-renina, del receptor de renina y de los receptores de angiotensina II: AT1A, AT1B y AT2 como muestra la figura 22. La dieta baja en sodio produjo aumento en los niveles del RNA mensajero de los receptores AT1A, AT1B, de pro-renina y el receptor de renina. El bloqueo del receptor de la aldosterona en las ratas control normalizó los niveles de los RNAs mensajeros de AT1A, parcialmente la de AT1B y no produjo ningún efecto sobre pro-renina y su receptor. En cambio la administración crónica de la CsA produjo una reducción de los RNAs mensajeros del 50% en angiotensinógeno, los receptores de angiotensina AT1A, AT1B y del receptor de renina, comparada con el grupo administrado con dieta baja en sodio, a excepción de la pro-renina la cual presentó aumento de más del doble. En cambio, la administración de la espironolactona en las ratas con nefrotoxicidad crónica por la CsA previno el aumento en los niveles del RNA mensajero de la prorenina y aumentó la expresión del receptor AT2.

Nuestros resultados proponen que: 1) Cuando se activa el SRAA por depleción de sodio, la aldosterona parece regular los niveles del RNA mensajero de los receptores AT1A y parcialmente AT1B, ya que el bloqueo de los receptores de aldosterona previno estos cambios. 2) La administración de CsA aumentó los niveles de RNA mensajero de prorenina y disminuyó la del angiotensinógeno, los receptores de angiotensina AT1A, AT1B y del receptor de renina. 3) El bloqueo de los receptores de aldosterona con la espironolactona se asoció con la normalización de los niveles del RNA mensajero de pro-renina y aumento los niveles de RNA mensajero del receptor AT2.

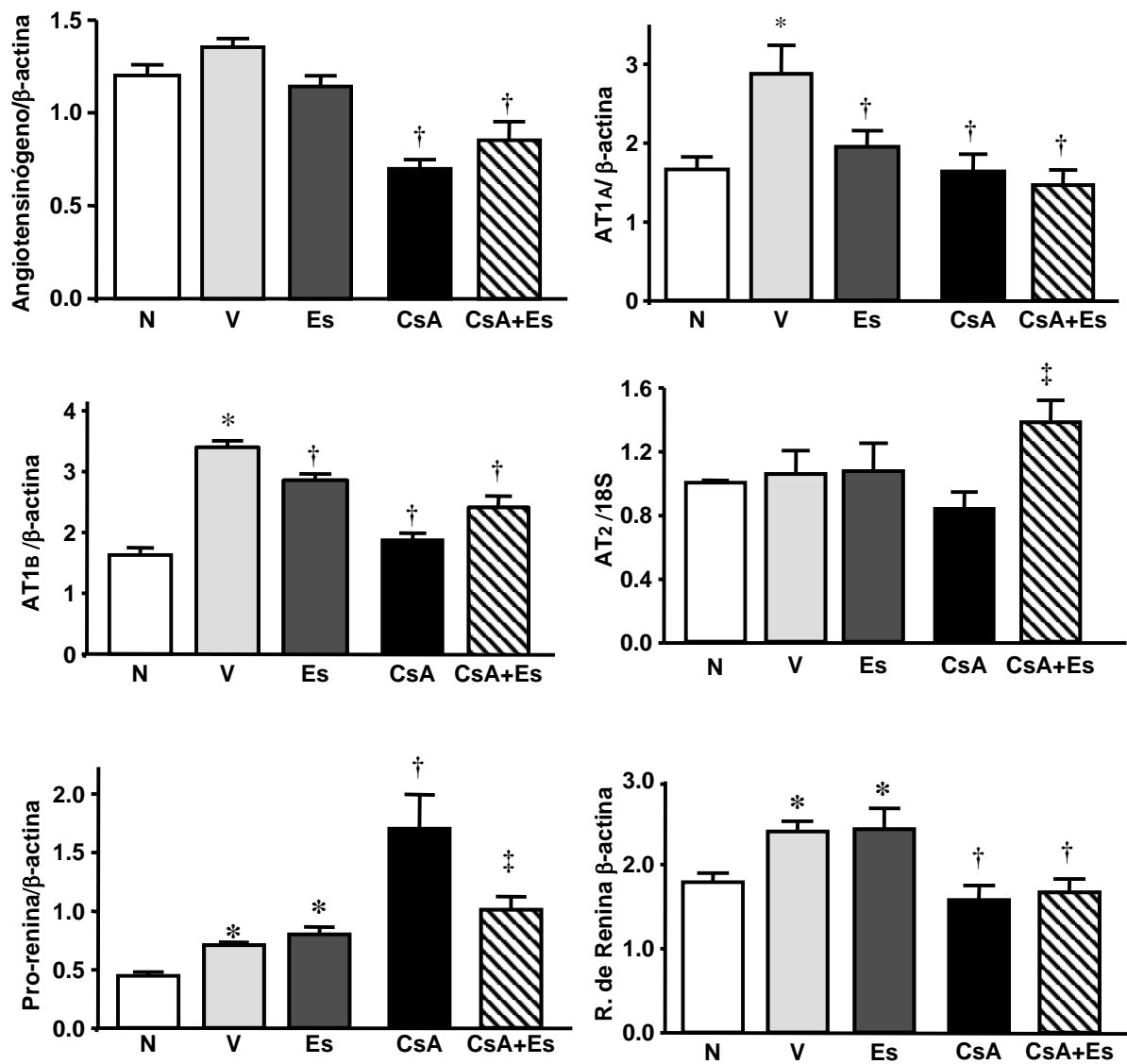


Figura 22. Efecto de la dieta baja en sodio, espironolactona y ciclosporina en los niveles de expresión del RNA mensajero de angiotensinógeno, pro-renina, y los receptores de angiotensina AT1A, AT1B, AT2 y del receptor de renina. Los resultados se expresan como la relación entre cada gen analizado sobre β-actina o 18S (genes control). * p<0.05 vs. N; † p<0.05 vs. V; ‡ p<0.05 vs. CsA. N= grupo alimentado con dieta normal (0.2% de sodio), V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

Vía de endotelina

La figura 23 muestra los resultados de los niveles de RNA mensajero de preproendotelina y sus receptores ETA y ETB. La dieta baja en sodio no modificó la expresión de preproendotelina, ni del receptor ETA, pero indujo un incremento significativo en el RNA mensajero del receptor ETB comparada con el grupo control. La espironolactona no modificó este efecto en los animales control, lo que sugiere que la aldosterona no participa en la regulación de la expresión de la endotelina y de sus receptores. La administración de la ciclosporina produjo aumento significativo de la transcripción del gen de preproendotelina y disminuyó la expresión del receptor ETB. Interesantemente, la espironolactona no modificó la sobreexpresión de los niveles de RNA mensajero de preproendotelina, pero si redujo al receptor ETA y aumentó ligeramente al receptor ETB, receptor responsable del efecto vasodilatador de endotelina.

Todos estos resultados sugieren que: 1) durante la restricción de sodio, la expresión del receptor ETB es regulado por la activación del sistema renina-angiotensina, pero no por la aldosterona, 2) la CsA incrementó la expresión de preproendotelina y redujo al receptor vasodilatador ETB y 3) el efecto protector de la espironolactona durante la nefrotoxicidad crónica por la CsA se asoció con la reducción de los niveles del RNA mensajero del receptor vasoconstrictor (ETA) y restableció la del receptor vasodilatador (ETB) sin modificar la sobreexpresión de la preproendotelina.

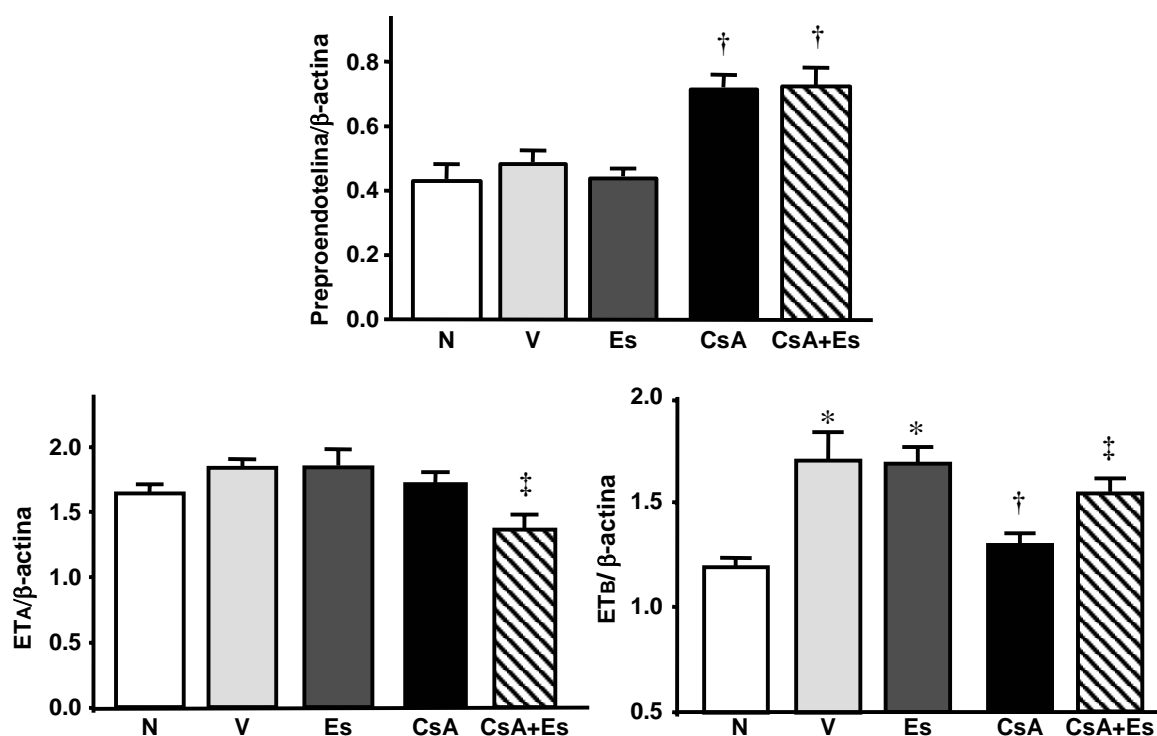


Figura 23. Efecto de la dieta baja en sodio, espironolactona y ciclosporina en los niveles de expresión génica de endotelina y sus receptores ETA y ETB. Los resultados se muestran como la relación del gen problema sobre β-actina (gen control). * p<0.05 vs. N; † p<0.05 vs. V; ‡ p<0.05 vs. CsA. N= grupo alimentado con dieta normal (0.2% de sodio), V= vehículo, Es=

Vía de ciclooxygenasa-2

Los resultados de los niveles de RNA mensajero de COX-2 se muestran en la figura 24. Encontramos que la activación del SRAA con dieta baja en sodio aumentó los niveles del RNA mensajero de COX-2 en un 64%, interesantemente el aumento en la expresión de COX-2 fue potenciada con la administración de la espironolactona un 40% más. Por el contrario, la CsA disminuyó en forma muy significativa la expresión de COX-2, efecto que no fue modificado por la espironolactona. De esta forma, nuestros resultados sugieren: 1) Que en condiciones basales, la aldosterona inhibe parcialmente a la COX-2, ya que el bloqueo de sus receptores aumentó aun más su expresión. 2) Dado que previamente se demostró que la transcripción del gen de COX-2 es regulado por NFAT [59;64] y dado que la CsA inactiva a este factor,

observamos una reducción importante y significativa de la expresión de COX-2. 3) Dado que la CsA afecta la transcripción de COX-2 directamente, la espironolactona no modificó su expresión.

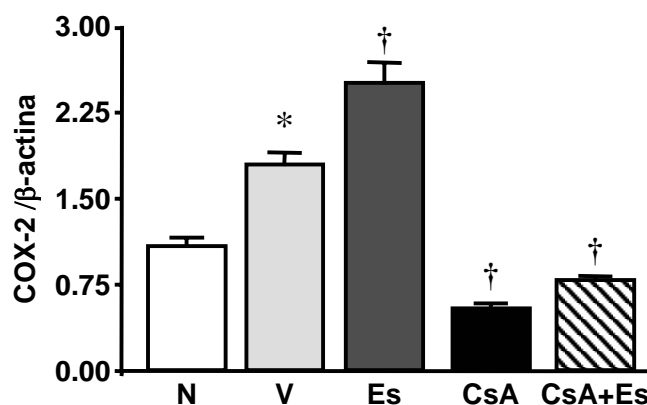


Figura 24. Efecto de la dieta baja en sodio, espironolactona y ciclosporina en los niveles de RNA mensajero de COX-2 en corteza renal. Los resultados se muestran como la relación COX-2/β-actina. * $p < 0.05$ vs. N; † $p < 0.05$ vs. V. N= grupo alimentado con dieta normal (0.2% de sodio), V= vehículo, Es= espironolactona,

Vía de adenosina

La figura 25 muestra los niveles del RNA mensajero de los receptores de adenosina. La dieta baja en sodio aumento la expresión de los 4 receptores de adenosina en comparación con el grupo de animales alimentados con dieta normal, el porcentaje de incremento para Ad1, Ad2a, Ad2b y Ad3 fue del 58, 53, 67 y 120%, respectivamente. El bloqueo de los receptores de la aldosterona con la espironolactona, normalizó la sobreexpresión del receptor Ad2a. En contraste, la CsA aumentó aún más los niveles del RNA mensajero de los receptores Ad1 y Ad3 y redujo los niveles de expresión del receptor Ad2b y no produjo cambios en el receptor Ad2a. Mientras que, la administración conjunta de la CsA con la espironolactona únicamente disminuyó la expresión del receptor Ad2a.

En resumen nuestros resultados sugieren: 1) El SRAA regula la expresión de los receptores de la adenosina y en especial muestra que el receptor Ad2a es

regulado por la aldosterona, tanto en condiciones normales, como durante la nefrotoxicidad crónica por la CsA, 2) la administración de la CsA aumento la expresión del RNA mensajero de los receptores Ad1 y Ad3 y redujo la expresión del receptor Ad2b; efectos que no fueron modificados por el bloqueo de los receptores de aldosterona. Sorprendentemente, observamos que la CsA afecta la expresión de estos receptores, efecto que probablemente participa en la vasoconstricción que induce la CsA, sin embargo, el hecho de que la espironolactona prácticamente no modifique los niveles del RNA mensajero de estos receptores sugiere que el efecto protector de este fármaco no es mediado por cambios en la expresión de los receptores de la adenosina.

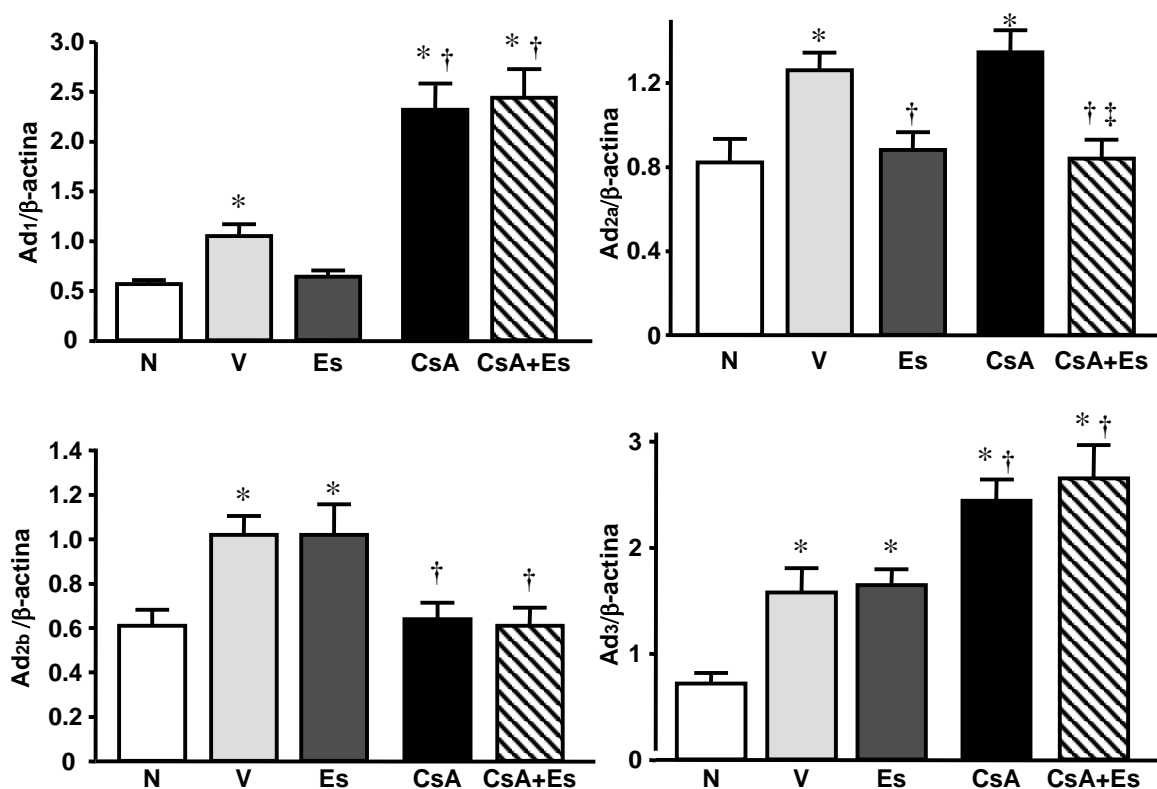


Figura 25. Sobre expresión renocortical de los receptores de adenosina por la restricción de la dieta baja en sodio y el efecto de la administración crónica de CsA y espironolactona. Las barras describen el promedio de 3 experimentos individuales \pm el error estándar de la relación gen problema/ β -actina. * $p < 0.05$ vs. N; † $p < 0.05$ vs. V y ‡ $p < 0.05$ vs. CsA. N= grupo alimentado con dieta normal (0.2% de sodio), V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

V.3 LA VÍA MINERALOCORTICOIDE EN LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA

La aldosterona actúa a través de sus receptores intracelulares a mineralocorticoides, aunque los glucocorticoides también se unen a estos receptores, la especificidad de la aldosterona a su receptor radica en la presencia de la enzima 11β -deshidrogenasa hidroesteroidea (11β HSD2). Por lo que, tanto los receptores a mineralocorticoides intracelulares, así como la enzima 11β HSD2, además de modular las acciones ejercidas por la aldosterona, son esenciales para que la aldosterona ejerza sus efectos tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas. Es por ello, que en este trabajo decidimos evaluar el papel que juega la vía mineralocorticoide durante el efecto protector de la espironolactona durante la nefrotoxicidad crónica inducida por la CsA.

Como puede apreciarse en la figura 26 no se observaron cambios significativos en la expresión del receptor a mineralocorticoide y 11β HSD2 en ninguno de los grupos estudiados. Lo que sugiere que el bloqueo de los receptores de la aldosterona durante la nefrotoxicidad crónica por la CsA no depende de cambios en la expresión de la vía mineralocorticoide, sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la aldosterona esté actuando y/o modificando otro tipo de receptores no conocidos por los cuales la aldosterona pueda ejercer sus efectos deletéreos en este tipo de nefrotoxicidad.

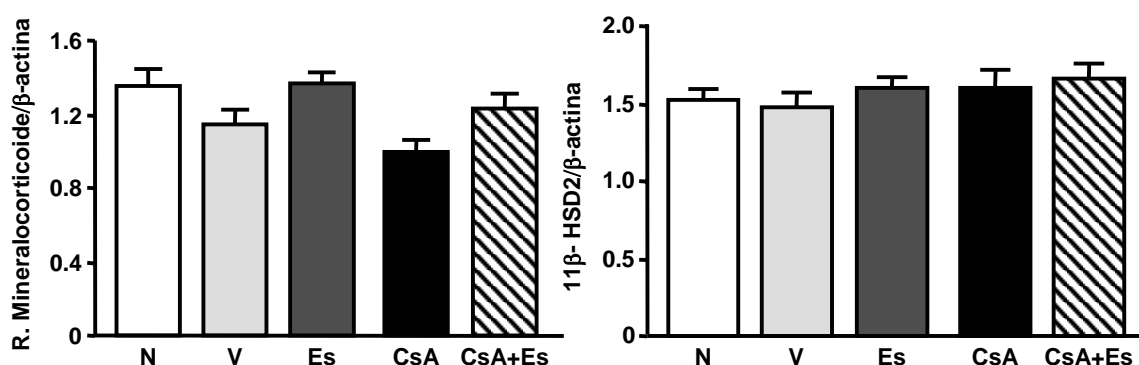


Figura 26. Efecto de la activación del SRAA, espironolactona y la administración crónica de CsA y espironolactona en la vía mineralocorticoide. Las barras describen el promedio de 3 experimentos individuales \pm el error estándar de la relación gen problema/ β -actina. N= grupo alimentado con dieta normal (0.2% de sodio), V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

V.4 BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE LA ALDOSTERONA EN LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA POR CICLOSPORINA YA ESTABLECIDA

Dado el efecto renoprotector de la espironolactona en la nefrotoxicidad aguda y crónica decidimos evaluar si la espironolactona es un medicamento útil para reducir la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina ya establecida.

Estudios funcionales

Para lograr este objetivo se indujo la nefrotoxicidad crónica por la CsA en dos grupos mediante la administración diaria de la ciclosporina a ratas alimentadas con dieta baja en sodio durante 18 días, tiempo suficiente para observar las alteraciones funcionales y estructurales características de este modelo. Una vez establecida la nefrotoxicidad crónica, un grupo recibió la espironolactona por 18 días más, sin suspender la administración de la ciclosporina y el otro grupo continuó con el tratamiento de ciclosporina.

En la tabla 5 se muestran diferentes parámetros fisiológicos estudiados. Encontramos que los animales tratados con la CsA perdieron alrededor de un 10% de peso corporal. No encontramos diferencias significativas en la tensión arterial media (TAM), ni en los niveles séricos de sodio, pero si hubo un ligero incremento en los niveles de potasio. Al igual que en la nefrotoxicidad aguda, los niveles de la ciclosporina en sangre en el grupo que recibió la espironolactona tendieron a ser menores, pero la diferencia no alcanzó significancia estadística.

Tabla 5. Parámetros fisiológicos durante la nefrotoxicidad crónica por CsA ya establecida.

Grupo	Peso corporal g	TAM mmHg	Na ⁺ sérico mEq/L	K ⁺ sérico mEq/L	CsA ng/mL
V	306 ± 7	109 ± 5.9	148.6 ± 5.2	4.7 ± 0.2	ND
Es	313 ± 11	95 ± 6.6	153.6 ± 2.0	5.5 ± 0.2	ND
CsA	272 ± 15 ^a	91 ± 2.7	150.2 ± 2.8	6.3 ± 0.3 ^a	3562 ± 778
CsA + Es	284 ± 11 ^a	97 ± 2.6	158.2 ± 2.7	5.6 ± 0.3	2538 ± 435

Valores ± error estándar. ND no determinado, ^a p<0.05 vs. V. TAM= tensión arterial media, Na⁺= sodio sérico, K⁺= potasio sérico, V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

De forma similar a lo que observamos en la nefrotoxicidad crónica [41], el bloqueo de los receptores de la aldosterona disminuyó la mortalidad inducida por la CsA alrededor de un 17% como se muestran en la figura 27.

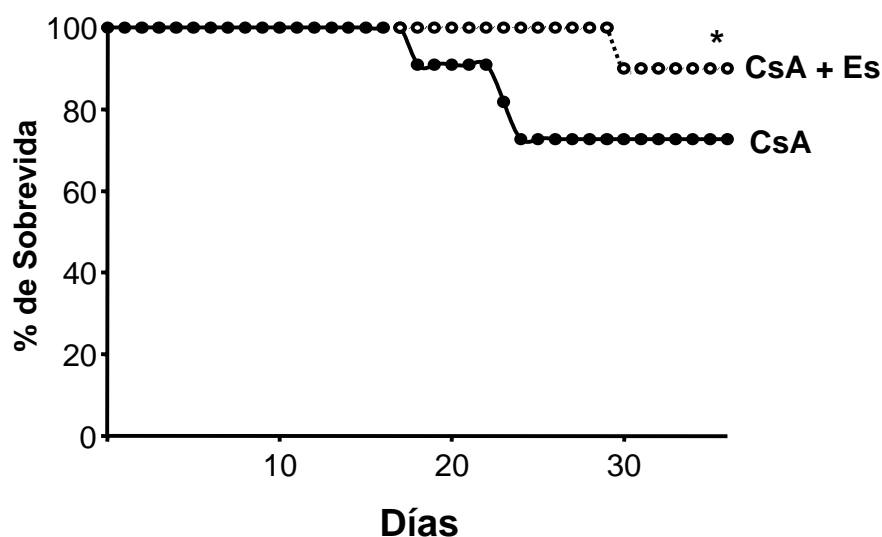


Figura 27. Porcentaje de supervivencia de los animales tratados con CsA y CsA+Es, durante la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina ya establecida. * $p < 0.05$ vs. CsA. Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

Se realizaron tres determinaciones de depuración de creatinina a lo largo del estudio. Para ello, todos los animales se colocaron en jaulas metabólicas y se recolectó la orina durante 24 horas. La primera determinación se realizó al inicio del protocolo (día 0); la segunda se realizó al día 18 con la finalidad de asegurarnos que los animales ya cursaban con nefrotoxicidad antes de iniciar el tratamiento con la espironolactona y finalmente la tercera determinación se realizó al finalizar el experimento (día 36).

En la figura 28 se muestra la depuración de creatinina, en la cual observamos que todos los grupos estudiados presentaban valores similares de depuración de creatinina al inicio del experimento. No se observaron diferencias significativas en los grupos controles (V y Es) a los días 18 y 36. En cambio, los animales tratados con la

CsA al día 18 ya presentaban disfunción renal significativa en comparación con el grupo control. Posteriormente, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos: los que continuaron con CsA y el grupo que además de CsA se inició la administración de la espironolactona. En el grupo que únicamente recibió CsA, la disfunción renal progresó, siendo diferente significativamente cuando se comparó con el grupo de CsA al día 18. En cambio, en el grupo que recibió la espironolactona la disfunción renal no se revirtió, pero tampoco se deterioró más, mostrando de esta manera que la administración de la espironolactona detuvo la progresión del daño renal.

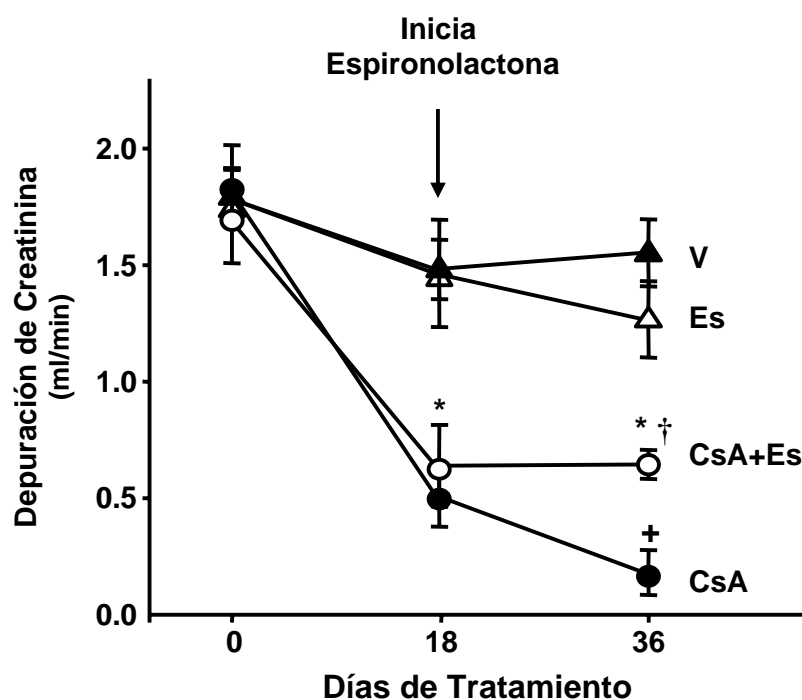


Figura 28. Depuración de Creatinina de todos los grupos estudiados. ▲ grupo vehículo; △ grupo V+Es; ● grupo de CsA y ○ grupo de CsA+Es, durante la nefrotoxicidad crónica ya establecida.* $p < 0.05$ vs. V, † $p < 0.05$ vs. CsA 36 días, + vs. CsA 18 días. V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

Análisis histopatológico

Además de los estudios de función renal, también se realizaron estudios histopatológicos para evaluar el efecto de la espironolactona sobre el daño estructural inducido por la ciclosporina. Se cuantificó el porcentaje de la arteriopatía y el área de fibrosis túbulo intersticial a los días 18 y 36. Se digitalizaron las imágenes tanto de la tinción de PAS, como la de Masson para realizar los análisis respectivos.

Los resultados del análisis del grado de fibrosis túbulo intersticial se muestran en la figura 29 y 30. En la figura 27 se muestran micrografías digitalizadas de cortes histológicos teñidos con Masson (imagen tomada con un aumento de 10X) representativos de los grupos de ratas administradas con la CsA a los 18 y 36 días de tratamiento y el grupo tratado con CsA+Es.

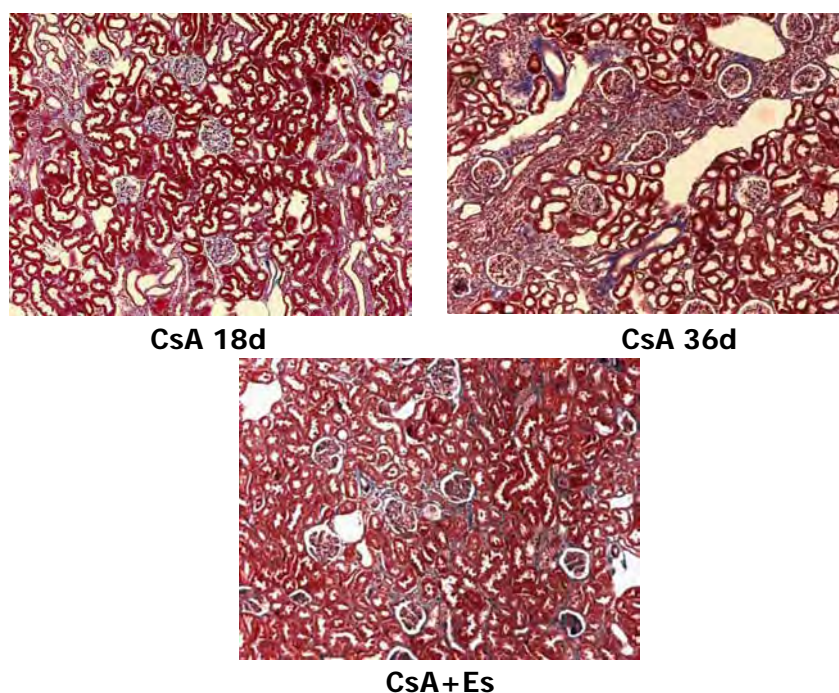


Figura 29. Cortes histológicos de corteza teñido con Masson (10X), para el análisis de la fibrosis túbulo intersticial en los grupos de CsA a los 18 días de tratamiento, CsA 36 días y CsA+Es. Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

Como se observa en la figura anterior que los animales ya presentaban lesión estructural cuando se comenzó a administrar la espironolactona (cuantificada por acumulación de fibrosis túbulo intersticial), en el grupo de animales tratado exclusivamente con la ciclosporina se acentuó más el desarrollo de fibrosis, mientras que, el grupo al que se le bloqueó el receptor a mineralocorticoide con la espironolactona la acumulación de fibrosis túbulo intersticial fue menor con respecto al grupo que sólo recibió la CsA (CsA+Es 30.5 vs CsA 45.8%, $p < 0.05$), sin embargo, la cantidad de fibrosis que presentó el grupo de CsA+Es fue similar al grupo de la CsA al día 18 (CsA 18d 26.2%) tal como se muestra en la figura 30, sugiriendo de esta manera que el bloqueo del receptor de la aldosterona evita la progresión del daño renal aun cuando la nefrotoxicidad crónica por la ciclosporina ya está establecida.

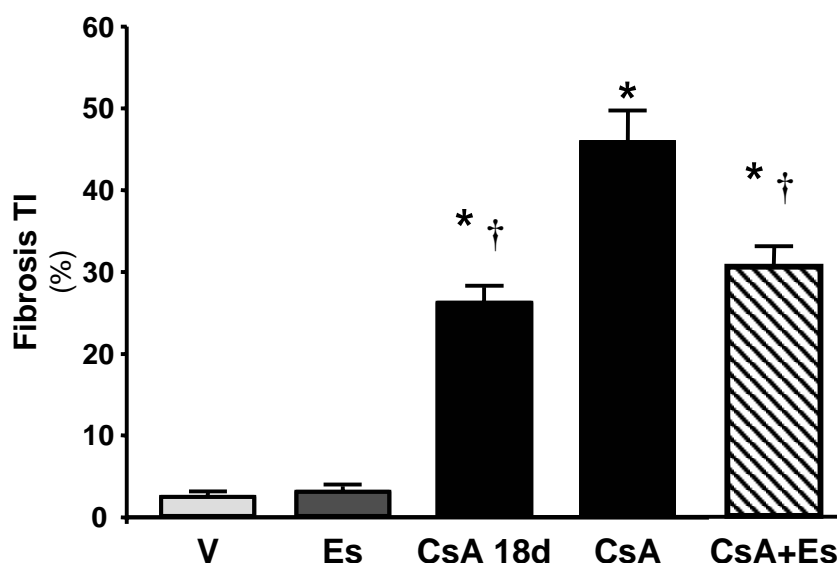


Figura 30. Porcentaje de fibrosis túbulo intersticial encontrado en los animales con nefrotoxicidad crónica por ciclosporina ya establecida. * $p < 0.05$ vs. V, † $p < 0.05$ vs. CsA. V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina a los 18 y 36 días de tratamiento.

En la figura 31 se muestra el porcentaje de la arteriopatía obtenida al contar alrededor de 100 arteriolas cercanas a su glomérulo por cada grupo. Como se puede apreciar, el grupo de ratas tratadas con la ciclosporina al día 18 ya presentaban arteriopatía; el grupo tratado con la ciclosporina por 36 días presentó mayor porcentaje de arteriopatía, mientras que la proporción de las arteriolas afectadas fue menor en el grupo que recibió la espironolactona en comparación con el grupo que sólo recibió la CsA al día 36, sin embargo, las diferencias no fueron significativas.

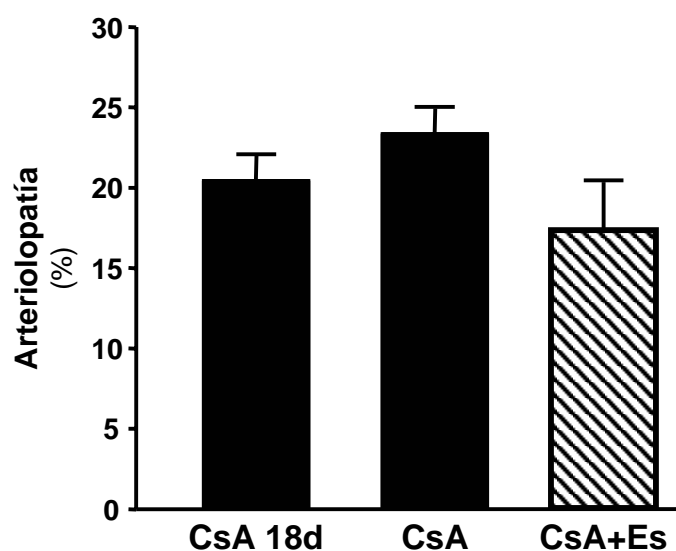


Figura 31. Porcentaje de la arteriopatía en los animales tratados con CsA al día 18, CsA y CsA+Es al día 36, durante la nefrotoxicidad crónica por la ciclosporina ya establecida. Es= espironolactona, CsA= ciclosporina a los 18 y 36 días de tratamiento.

La figura 32 muestra imágenes digitalizadas representativas de cortes histológicos teñidos con PAS (40X), en donde se observa la presencia de arteriopatía desde el día 18 en los animales tratados con CsA justo antes de iniciar el tratamiento con la espironolactona. De igual forma es notoria esta lesión en los grupos de CsA y CsA+Es, sin embargo se puede apreciar que el grosor de la arteriola

en el grupo tratados con la espironolactona es menor en comparación con las ratas tratadas con la CsA sola.

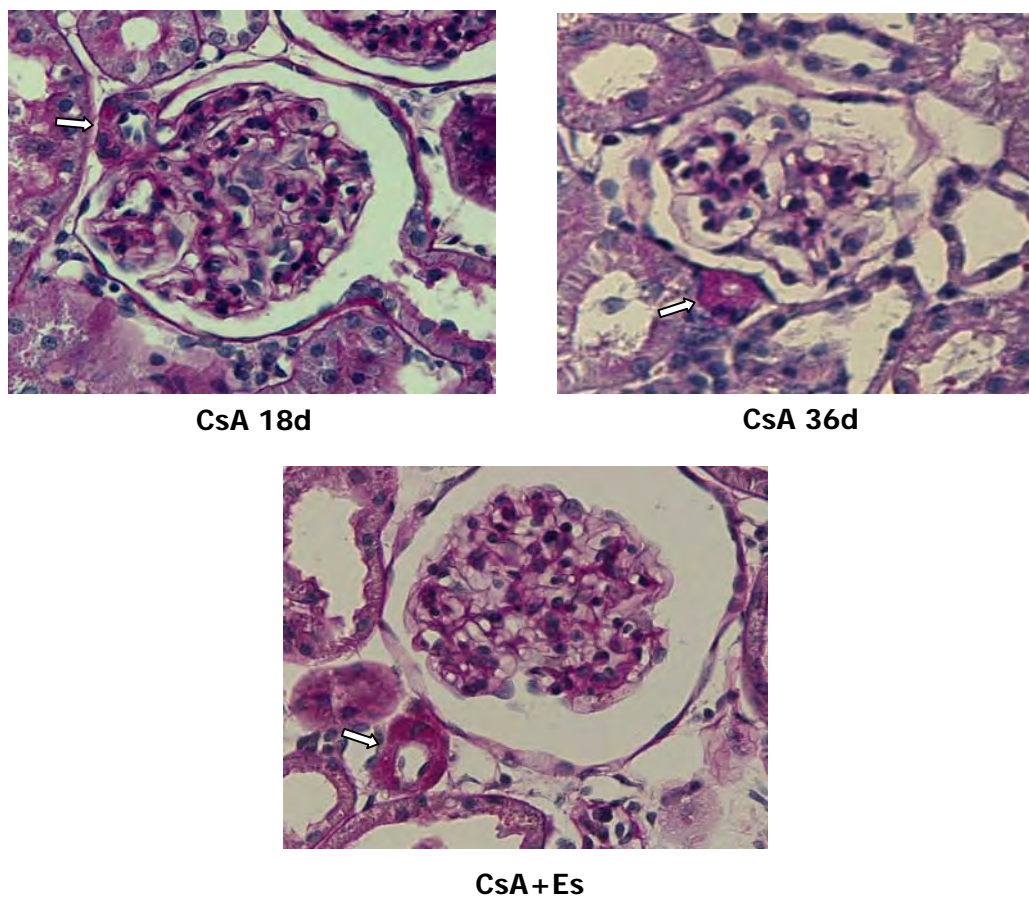


Figura 32. Cortes histológicos de corteza teñido con PAS, ácido peryódico de Schiff (40X), para el análisis de arteriopatía en los grupos CsA y CsA+Es.

Por lo que, al evaluar el grosor de las arteriolas, se observó que el grupo de CsA+Es mostró un grosor arteriolar significativamente menor en comparación con los animales con nefrotoxicidad por CsA. Los resultados se muestran la figura 33.

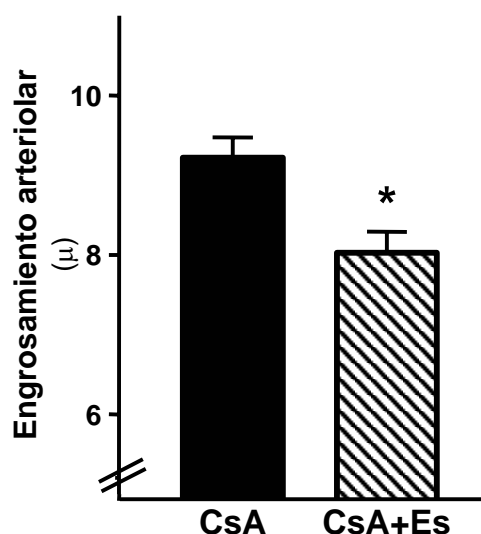


Figura 33. Grosor arteriolar en los animales tratados con CsA y CsA+Es, durante la nefrotoxicidad crónica por la ciclosporina ya establecida. * $p < 0.05$ vs. CsA. Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

Como se observó que el bloqueo de los receptores de la aldosterona evitó un deterioro mayor de la función renal y que durante el análisis histológico observamos menor cantidad de glomérulos pequeños en las ratas que recibieron la espironolactona, estos resultados sugerían que este grupo presentaba menor grado de hipoperfusión glomerular, por lo que se midió el diámetro glomerular en al menos 80 glomérulos por rata en los grupos que recibieron vehículo, CsA y CsA+Es mediante un análisis morfométrico. Los diámetros de los glomérulos se distribuyeron por rango de 50-75, 76-100, 101-125, 126-150 y 151-175 micras.

Como se aprecia en la figura 34. Los glomérulos de los animales alimentados con la dieta baja en sodio mostraron una distribución normal, donde la mayoría de los glomérulos se encontraron en un rango de entre 101-125 micras. A diferencia de esto, los animales tratados con la ciclosporina, la distribución tiende a desplazarse a la izquierda donde aumenta el diámetro de glomérulos pequeños y disminuyen el diámetro de sus glomérulos normales; por lo que encontramos un 13.8% de glomérulos en el rango entre 50 y 75 micras, 36.8% entre 76 y 100 micras y 40.9%

entre 101 y 125 micras. En cambio, los animales que recibieron la espironolactona cuando la nefrotoxicidad crónica ya esta establecida, mostraron menor cantidad de glomérulos en los rangos menores a 100 micras. De esta forma este grupo presentó un mayor número de glomérulos en el rango de 101 a 125 micras comparado con el grupo que sólo recibió la CsA (49.3 vs. 40.9%) y un mínimo porcentaje en el rango de 50 a 75 micras (4.0 vs. 13.8%).

Las diferencias entre los diámetros glomerulares se evaluaron con un análisis de contingencia de variables. El grupo de la CsA presentó mayor cantidad de diámetros menores, los cuales fueron diferentes estadísticamente cuando se compararon con el grupo control. Mientras que el grupo tratado con la espironolactona conservó el tamaño de los glomérulos en rangos normales, principalmente en los rangos de entre 50-75 y 101-125 micras cuando se compararon con el grupo de la CsA, esto cambios fueron significativos.

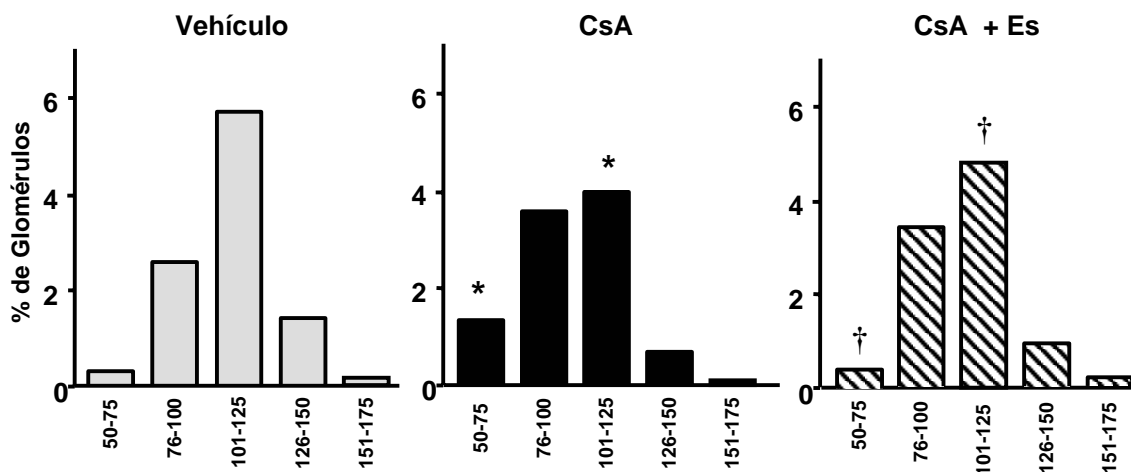


Figura 34. Distribución del diámetro glomerular en los animales con nefrotoxicidad crónica por la ciclosporina ya establecida. * $p < 0.05$ vs. V, † $p < 0.05$ vs. CsA. Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

Estudios moleculares

Se realizaron los estudios moleculares a través de la RT-PCR en tiempo real para evaluar los niveles del RNA mensajero de la citocina profibrótica TGF β y la molécula de daño renal 1 (Kim-1). La figura 35 muestra los resultados del TGF β , donde encontramos que en ratas normales la espironolactona no altera la expresión de esta citocina. En cambio, la CsA produjo un aumento a más del doble en la expresión del RNA mensajero de TGF β en comparación con el grupo control, mientras que el bloqueo del receptor a mineralocorticoide disminuyó el aumento en la expresión de este gen, estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos a nivel histopatológico.

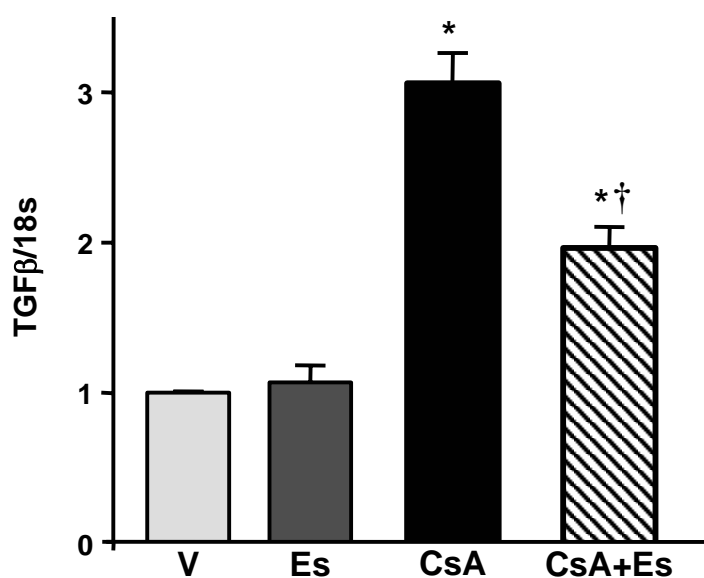


Figura 35. Sobre regulación del gen de TGF β en la nefrotoxicidad crónica por CsA ya establecida. Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos \pm error estándar. * $p < 0.05$ vs. V, † $p < 0.05$ vs. CsA. V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

La figura 36 muestra los niveles de la molécula de daño renal, Kim-1, en donde se observaron resultados similares a los del TGF β . La espironolactona no modificó la expresión de este marcador, en cambio el grupo de ratas tratadas únicamente con la CsA, los niveles de Kim-1 aumentaron alrededor de 40 veces con respecto al grupo control, mientras que el bloqueo del receptor de la aldosterona con la espironolactona disminuyó cerca del 50% la expresión de esta molécula en la nefrotoxicidad por la ciclosporina ya establecida.

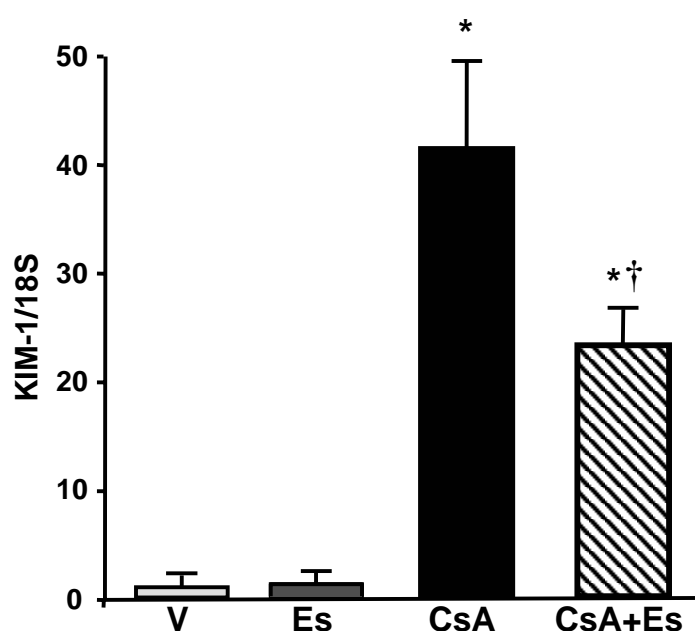


Figura 36. Sobre regulación del gen de KIM-1 en la nefrotoxicidad crónica por la CsA ya establecida. Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos \pm error estándar. * $p < 0.05$ vs. V, † $p < 0.05$ vs. CsA. V= vehículo, Es= espironolactona, CsA= ciclosporina.

En resumen encontramos que la espironolactona previno la progresión de la disfunción renal y redujo el daño estructural en la nefrotoxicidad crónica por la CsA previamente establecida, el efecto renoprotector de la espironolactona se asoció con reducción de los niveles de RNA mensajero del TGF- β y de Kim-1.

VI. DISCUSIÓN

Las células del túbulo distal y colector son las que expresan principalmente los receptores a mineralocorticoides, los cuales fueron considerados por muchos años el único blanco celular de la aldosterona en el riñón. Sin embargo, este tipo de receptores se ha localizado en otros tipos de células dentro del riñón, así como en diferentes tejidos, incluyendo tejido epitelial y no epitelial. Estos receptores se han detectado en el sistema cardiovascular, el cerebro y la vasculatura [126]. Dentro del tejido renal se encuentran también en el glomérulo, la arteriola aferente y eferente [10;154].

Dada la presencia de los receptores a mineralocorticoides en diversos tejidos y la evidencia en estudios experimentales y clínicos se ha propuesto que la aldosterona juega un papel importante en la fisiopatología de enfermedades renales y cardiovasculares [45;118;123;126;183], específicamente, se ha enfatizado el papel potencial de esta hormona en procesos fibróticos a través de sus receptores [30;72]. En este contexto, para que los roedores desarrollen nefrotoxicidad crónica por la CsA es necesario alimentar a las ratas con dieta baja en sodio, lo que activa al sistema renina-angiotensina-aldosterona, la activación de este eje ayuda a desencadenar la toxicidad crónica por la ciclosporina. En estudios previos se había observado que el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides con la espironolactona reduce el daño renal inducido por la ciclosporina, lo que sugiere que la aldosterona, más que la angiotensina II, es la hormona que media el efecto tóxico de la ciclosporina.

VI.1 Nefrotoxicidad aguda inducida por CsA

El hecho de que la espironolactona no sólo reduzca el daño estructural, si no que también prevenga totalmente la disfunción renal sugiere que la aldosterona también participa en la regulación del tono vascular [41]. En el presente trabajo observamos que en un modelo de nefrotoxicidad aguda por la ciclosporina (la complicación más frecuente en la práctica clínica), la administración de la

espironolactona previno totalmente la caída de la filtración glomerular, lo que se acompañó con el restablecimiento del flujo sanguíneo renal. Estos datos muestran que el bloqueo del receptor a mineralocorticoide previene la vasoconstricción renal lo que sugiere que la aldosterona tiene efecto sobre la hemodinámica renal.

Los animales tratados con CsA+Es presentaron menor concentración de ciclosporina en la sangre en comparación con los animales tratados únicamente con la ciclosporina; esta diferencia tal vez sea causada por el restablecimiento de la función renal observado en el grupo de CsA+Es, el 10% de la ciclosporina es eliminada por vía urinaria. La prevención de la nefrotoxicidad aguda observado con la administración de la espironolactona, no puede ser relacionada con menor concentración de la ciclosporina en sangre, ya que en estudios experimentales previos se ha demostrado que niveles de ciclosporina por encima de 1000 ng/ml son suficientes para producir disfunción renal [140] y en nuestro estudio los valores estuvieron por arriba de esta cifra.

Recientemente se ha reportado que la aldosterona tiene dos vías de acción: la clásica llamada "vía genómica" y la "vía no genómica". La primera vía depende de la unión de la aldosterona al receptor a mineralocorticoide, localizado en el citoplasma; la traslocación de la aldosterona y su receptor al núcleo promueve la transcripción de diversos genes, mientras que el segundo mecanismo parece ser mediado por un receptor de membrana no conocido, el cual media acciones rápidas de la aldosterona independientes de transcripción [104] (Figura 7). Los resultados observados tanto en la nefrotoxicidad aguda como en la crónica apoyan la hipótesis de que la aldosterona actúa a través de su vía genómica [41], apoyado esto por el hecho de que la espironolactona previno la caída de la filtración glomerular. Sin embargo, no podemos excluir que la otra vía este involucrada.

Recientemente Li y colaboradores [84] reportaron que la toxicidad inducida por la CsA se encuentra asociada con un incremento del mensajero de renina, la cual no fue prevenida por la pravastatina, un inhibidor de la reductasa de la 3-hidroxi-3-

metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) lo que disminuye la producción de colesterol. En cambio nosotros observamos que la espironolactona previno totalmente la sobreexpresión de renina. Esta diferencia que se observa sobre el efecto en la expresión de renina sugiere que la pravastatina probablemente produzca mejoría en la función renal a través de otro mecanismo diferente al de la aldosterona.

Un posible mecanismo por el cual la aldosterona pueda estar regulando el tono vascular incluye el aumento en el efecto vasoconstrictor de las catecolaminas [167], la disminución en la respuesta vasodilatadora de acetilcolina [87;148;162] y la sobre regulación de los receptores de angiotensina II [131;175;176]. Con todo lo anterior, pensamos que la aldosterona puede regular el tono vascular al producir un desequilibrio en la liberación y/o acción de agentes vasoactivos, es decir, un aumento en la expresión de vías vasoconstrictoras y disminución de vías vasodilatadoras.

VI.2 Nefrotoxicidad crónica inducida por la CsA

Sistema renina-angiotensina-aldosterona

La angiotensina II, es el principal efector del SRAA, está involucrada en una serie de eventos fisiológicos y fisiopatológicos dentro del tejido renal. Las acciones de la angiotensina II son mediadas al estimular sus receptores AT₁ ó AT₂. Los receptores AT₁ se encuentran acoplados a las proteínas G, las cuales estimulan la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y el inositol trifosfato (IP₃); estos receptores están presentes en las células mesangiales, glomerulares, del epitelio del túbulo distal y proximal y de la vasculatura renal. La activación de este receptor induce la vasoconstricción, la reabsorción de sodio y el crecimiento celular; por el contrario, el receptor AT₂ no se conoce su mecanismo de señalización, se localiza en la vasculatura renal, el glomérulo, el aparato yuxtglomerular y los túbulos renales. La activación del receptor AT₂ causa vasodilatación y en el túbulo renal contribuye a la excreción de sodio y la presión natriurética [14]. Recientemente Nguyen y colaboradores [105;106] reportaron la existencia de un receptor a la renina localizado

dentro del tejido renal, aunque no se sabe mucho sobre el papel fisiológico de este receptor, se ha reportado que la unión de renina o de prorenina a su receptor enciende la vía de las MAP cinasas, aumentando al factor activador inhibidor del plasminógeno-1 (PAI-1) y la producción de angiotensina II por incrementar la eficiencia del rompimiento del angiotensinógeno a angiotensina I [107] y más recientemente se reportó que la estimulación del receptor de la renina aumenta la producción de TGF- β y de proteínas de matriz extracelular independientemente de la vía de la angiotensina II [62]. Por lo tanto la renina parece ejercer más funciones de las que se conocían.

En este trabajo, corroboramos la regulación riñón-específica de la participación del sistema renina-angiotensina-aldosterona por la restricción de sodio en varios de sus componentes [70;166]. La depleción de sodio se asoció con un incremento del RNA mensajero de los niveles de prorenina, del receptor de renina y de los receptores AT1A y AT1B, pero no tuvo efecto sobre la expresión del angiotensinógeno y del receptor AT2. Algunos de esos cambios se previnieron con la espironolactona, como la sobreexpresión del receptor AT1A y parcialmente del receptor AT1B (figura 22), sugiriendo que la aldosterona media a estos receptores cuando el SRAA es activado. Interesantemente, la nefrotoxicidad inducida por la CsA redujo la mayoría de la expresión de los componentes de esta vía, a excepción de la pro-renina, la cual fue significativamente sobre expresada. El efecto benéfico de la espironolactona estuvo asociado con la prevención en la sobre expresión de la pro-renina e incremento en la expresión del receptor vasodilatador AT2. Anteriormente Klar y colaboradores [78] reportaron que la aldosterona incrementa los niveles del RNA mensajero de prorenina en cultivos primarios de las células yuxtaglomerulares del ratón. Estas observaciones juntas sugieren que la prevención en la disfunción renal se asoció al menos parcialmente con la reducción de la expresión de pro-renina, junto con el incremento en la expresión del receptor AT2, el cual es el receptor conocido

que media los efectos vasodilatadores de la angiotensina II, lo que contrarresta la vasoconstricción inducida por la CsA.

Sistema de la endotelina

La endotelina 1 (ET-1) es el vasoconstrictor derivado del endotelio más potente del organismo, además es un péptido que regula la reabsorción de sodio en el tejido renal. Dentro del riñón, la ET-1 es sintetizada en el endotelio de la vasculatura renal, en las células mesangiales, en los capilares peritubulares y en el epitelio del túbulo proximal, el asa ascendente gruesa de Henle y una parte del túbulo colector en la médula. El efecto biológico de la ET-1 es mediado por receptores de membrana específicos. El receptor ETA se encuentra ampliamente distribuido en la vasculatura del glomérulo y la médula, mientras que el receptor ETB está presente en los túbulos renales y colectores [91]. El efecto vasoconstrictor o vasodilatador de la endotelina depende de la abundancia de cada uno de los subtipos de receptores.

En este estudio observamos que la dieta baja en sodio indujo la sobre expresión del receptor ETB en la corteza renal. Este efecto no fue revertido por la espironolactona. Resultados similares fueron reportados por Vanni y colaboradores [158] dentro de la médula renal, lo que sugiere que la restricción de sodio modula la expresión del receptor ETB. Varios autores han señalado a la endotelina como la molécula clave que promueve los efectos vasoconstrictores de la ciclosporina [25;63;80;90;120], de hecho, encontramos que la administración de la CsA incrementa los niveles del RNA mensajero de preproendotelina y reduce los del receptor ETB. Esta combinación probablemente resulta en la vasoconstricción renal ya que, por un lado, el incremento en la expresión de endotelina y por el otro la reducción de la expresión del receptor ETB puede llevar a que la acción de endotelina sea la vasoconstricción. El efecto de la CsA sobre la expresión de la endotelina no fue prevenido por el bloqueo del receptor a mineralocorticoide, pero se observaron cambios significativos en la expresión de los receptores de la endotelina, donde

observamos disminución del receptor ETA y aumento del receptor ETB (Figura 15). Aunque el incremento en la expresión de la endotelina no se afectó por la espironolactona, es posible que la vasoconstricción inducida por la ET-1 es reducida en presencia de la espironolactona por el cambio en el patrón de la expresión de los receptores de la endotelina ya que aumentaron los vasodilatadores y disminuyeron los vasoconstrictores.

Ciclooxigenasa-2

Dentro del tejido renal, las prostaglandinas son importantes mediadores del tono vascular, el balance de agua y sal así como, la liberación de la renina. La activación de la fosfolipasa A2 genera el ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de la membrana celular. El ácido araquidónico es metabolizado por las enzimas COX-1 y COX-2 iniciando la producción de las prostaglandinas, las prostaciclina y el tromboxano. Las isoformas COX-1 y COX-2 derivan de genes diferentes, en el humano se localizan en el cromosoma 9 y 1, respectivamente. Ambas enzimas tienen en común entre el 60 y 80% de su secuencia de aminoácidos, dependiendo de la especie que se trate, pero los sitios residuales activos se encuentran altamente conservados. La COX-1 se expresa constitutivamente en casi todos los tejidos, mientras que la COX-2 es una enzima inducible que es casi indetectable en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas. Mientras que la expresión de COX-1 puede aumentar 2 y 3 veces por encima de su valor basal durante su estimulación, la de COX-2 puede aumentar de 20 a 80 veces cuando es inducida por los productos bacterianos como las endotoxinas y las citocinas [4].

La COX-2 es una proteína inmunoreactiva que se ha observado en células de la mácula densa y en la parte superior de las células del asa ascendente gruesa de Henle (junto a la mácula densa). Dentro del tejido renal la COX-2 se expresa en podocitos y en células del músculo liso vascular arteriolar [55]. Existen reportes que sugieren que la COX-2 está involucrada en la regulación de la síntesis y la secreción de la renina del aparato yuxtglomerular así como, en la absorción de sal y agua a

nivel tubular [53;54;69;127]. Las células de la mácula densa regulan el tono arteriolar y la liberación de la renina al censar la concentración de NaCl a través del cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$. Cuando la concentración de sal intraluminal en la mácula densa es baja, la síntesis y la liberación de la renina aumenta por un proceso en el cual, la inducción de la COX-2 se ha implicado, ya que la administración no específica de inhibidores de la COX incrementa la liberación de la renina mediada por la mácula densa [55]. De acuerdo con estos estudios, observamos que la dieta baja en sodio se asoció con sobre expresión renocortical de la COX-2; interesantemente, el bloqueo del receptor a mineralocorticoide incrementó aún más la expresión de este gen, sugiriendo que la aldosterona es un regulador de la expresión de la COX-2 durante la depleción de sodio. En contraste, las ratas tratadas con la CsA presentaron una marcada reducción en la expresión de la COX-2. Kurtz realizó observaciones similares [59]. De acuerdo a nuestros resultados en donde hubo niveles de renina elevados inducidos tanto por la dieta baja en sodio como por un efecto directo de la ciclosporina, sugieren que la expresión de la renina puede ser regulada por un mecanismo independiente de la COX-2 (Figura 16). De hecho, la CsA como inhibidor de la fosfatasa de calcineurina inhibe la vía del factor de activación nuclear de las células T (NFAT). La NFAT estimula la expresión del gen de COX-2 [38;59;64]. Por esta razón, la espironolactona no fue capaz de prevenir la supresión de la COX-2 inducida por la ciclosporina, sugiriendo que la supresión de la formación del prostanoide no es crítica en el mantenimiento del tono vascular durante la nefrotoxicidad crónica inducida por la CsA.

Vía de la adenosina

Las acciones extracelulares de la adenosina son mediadas por cuatro tipos de receptores acoplados a proteínas G, conocidos como Ad1, Ad2a, Ad2b y Ad3. En muchos vasos sanguíneos incluyendo la vasculatura renal, la adenosina produce vasodilatación, la cual es mediada a través de sus receptores Ad2a y Ad2b. En cambio,

un claro efecto vasoconstrictor es observado cuando la adenosina se une a su receptor Ad1. Dentro del tejido renal, Ad1 es expresado principalmente en la arteriola aferente, mientras que Ad2a y Ad2b están presentes en todos los vasos preglomerulares y en la vasa recta [52]. Existen estudios donde se ha reportado que el antagonista del receptor de adenosina 1,1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina puede tener efecto protector en animales normales, diabéticos e hipertensos [58]. Nosotros observamos que la deficiencia de sodio produce aumento significativo en la expresión del RNA mensajero de los receptores de la adenosina, pero sólo la expresión del receptor Ad2a fue prevenido por la espironolactona, sugiriendo que la expresión de este receptor es regulada por la aldosterona. Interesantemente, la vasoconstricción renal inducido por la CsA estuvo asociado con un aumento en los niveles del RNA mensajero del receptor Ad1 y reducción del receptor vasodilatador Ad2b (Figura 17). Estos cambios no fueron corregidos al bloquear el receptor a mineralocorticoide, sugiriendo que los cambios observados en la expresión del receptor de la adenosina durante la toxicidad por la ciclosporina no son influidos por la aldosterona.

Cabe mencionar que el resultados del análisis del RNA mensajero de los 19 genes estudiados se va a realizar el análisis de las proteínas de aquellos genes donde observamos mayores cambios.

VI.3 Nefrotoxicidad crónica inducida por la CsA previamente establecida

En la práctica clínica es muy importante contar con fármacos que reviertan o eviten que continúe progresando las nefropatías, por lo que, algunos medicamentos que tienen efecto protector en muchas ocasiones no son útiles cuando son administrados una vez que ya se establecieron las lesiones. Por esta razón en este trabajo evaluamos si la espironolactona es capaz de revertir o detener la progresión de lesiones funcionales y estructurales en la nefrotoxicidad por la ciclosporina previamente establecida.

Para corroborar que los animales ya presentaban nefrotoxicidad crónica por ciclosporina antes de iniciar el tratamiento con la espironolactona, justo al día 18 se midió la función renal cuantificando la depuración de creatinina, estos animales presentaban disfunción renal aproximadamente del 50% y se corroboró la presencia de arteriopatía y fibrosis túbulo intersticial. Una vez que la nefrotoxicidad crónica por CsA ya se encontraba establecida se inició el tratamiento con la espironolactona.

Observamos que el bloqueo de las acciones de la aldosterona no revirtió la disfunción renal, pero evitó que la disfunción renal progresara. Al igual que en la nefrotoxicidad aguda y crónica, es poco probable que la protección conferida por la espironolactona se deba al efecto de este fármaco sobre la presión sanguínea, ya que en este protocolo no encontramos diferencias significativas en la tensión arterial media en ninguno de los grupos estudiados; tampoco puede deberse al cambio en los niveles de ciclosporina, ya que a pesar de observarse una disminución muy discreta en los niveles de este inmunosupresor, la diferencia no fue significativa.

El efecto benéfico de la espironolactona estuvo asociado con la reducción significativa de la fibrosis túbulo intersticial y menor vasoconstricción arteriolar, la cual se asoció con menor engrosamiento de la pared arteriolar. Interesantemente, estos animales también presentaron una distribución del diámetro glomerular similar al grupo de ratas normales, lo que sugiere fuertemente que la espironolactona reduce el grado de hipoperfusión en las ratas con nefrotoxicidad por ciclosporina.

El efecto protector de la espironolactona durante la nefrotoxicidad crónica fue evidenciado por la reducción de fibrosis dentro del tejido renal, lo que sugiere que la aldosterona participa en el desarrollo de fibrosis túbulo intersticial. En apoyo a estos resultados Nagai y colaboradores [99] encontraron que la infusión crónica de la aldosterona estimula la expresión de colágena en fibroblastos renales a través de la activación de la vía de las MAP cinasas principalmente ERK1 y ERK2, lo que contribuye a la progresión de fibrosis túbulo intersticial inducida por la administración de la aldosterona.

Por otro lado Shihab y colaboradores [139] y estudios previos de nuestro laboratorio [41] mostraron que la toxicidad por la ciclosporina en las ratas se asocia con sobre expresión del RNA mensajero de TGF- β y este efecto se previene al bloquear la acción de la angiotensina II, ya sea a través de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (enalapril), por bloquear sus receptores AT₁ (losartán) o por la inhibición de los receptores de la aldosterona, lo que sugiere que la regulación del TGF- β durante la toxicidad por la CsA es independiente de la hemodinámica renal y es mediado en parte por la activación del sistema renina-angiotensina y mas específicamente por la aldosterona. En este estudio, el efecto renoprotector de la espirolactona se acompañó con reducción parcial de los niveles de expresión del RNA mensajero de TGF- β sugiriendo que la sobre expresión de esta citocina profibrótica es regulada por la aldosterona y es responsable en gran parte del desarrollo de fibrosis. En apoyo a esto se encuentran los estudios realizados por Juknevičius y colaboradores [72] donde ellos observan que una infusión de aldosterona en las ratas normales aumenta los niveles del TGF- β en el riñón de la rata.

El efecto benéfico de la espirolactona también se corroboró con la expresión de la molécula de daño renal (Kim-1). La Kim-1 es una proteína transmembrana que no es detectable en el riñón normal, solo se expresa en células del epitelio del túbulo proximal en procesos de isquemia o de toxicidad por algún fármaco [51]; por estas características se ha propuesto como un biomarcador endógeno de daño renal. Como muestra nuestro estudio hubo un incremento de 40 veces en la expresión del RNA mensajero de la Kim-1 con respecto al grupo control, lo que indica la presencia de daño renal. Este hallazgo también correlacionó con la presencia de fibrosis y de arteriopatía. En cambio, la espirolactona disminuyó la expresión de este biomarcador sugiriendo menor daño renal lo cual también correlacionó con el menor grado de fibrosis, de arteriopatía y de disfunción renal que observamos con los estudios fisiológicos e histopatológicos.

En conclusión, mostramos que el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides previene la nefrotoxicidad aguda, la cual fue evidente al prevenirse la caída de la función determinada por la filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal. También encontramos que el efecto protector de la espironolactona es mediado por la modificación de la expresión de ciertos receptores que median acciones vasoconstrictoras o vasodilatadoras, las cuales junto con la reducción en la expresión de pro-renina, pueden contribuir a reducir la vasoconstricción renal observada durante la nefrotoxicidad crónica inducida por la ciclosporina. Aunado a estos estudios, encontramos que la administración de la espironolactona disminuye la progresión de daño renal, tanto funcional como estructural durante la nefrotoxicidad crónica por la CsA previamente establecida. El efecto protector de la espironolactona fue evidenciado por la mayor proporción de diámetros glomerulares normales, la reducción en los niveles del RNA mensajero de TGF- β y la molécula de daño renal (Kim-1).

Este estudio y previos de nuestro laboratorio indican que el inicio temprano del bloqueo de los receptores de la aldosterona con la espironolactona reducen el daño y reestablece la disfunción renal inducida por la administración aguda y crónica de la ciclosporina y evita la progresión del daño renal cuando la nefrotoxicidad por la ciclosporina ya se encuentra establecida. Por lo tanto estos resultados señalan a la espironolactona como un tratamiento potencial para prevenir o reducir la nefrotoxicidad por la ciclosporina en pacientes trasplantados.

VII. CONCLUSIONES

VII.1 Modelo de nefrotoxicidad aguda

- ❖ La ciclosporina produjo disminución en la filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal.
- ❖ La disfunción renal inducida por la CsA fue totalmente prevenida al bloquear el receptor a mineralocorticoide con la espironolactona.
- ❖ Estos resultados muestran que la aldosterona participa en la fisiopatología de la vasoconstricción renal inducida por la ciclosporina.

VII.2 Modelo de nefrotoxicidad crónica por CsA

- ❖ Nuestros resultados sugieren que el aumento del RNA mensajero de angiotensinógeno y los receptores AT1A y AT1B inducida por la dieta baja en sodio es mediada por la aldosterona.
- ❖ El restablecimiento de la función renal inducido por la espironolactona en las ratas con CsA se asoció con la normalización de los niveles del RNA mensajero de la renina y de los receptores ETB y AT1B, un aumento en los niveles de AT2 y disminución del receptor ETA.
- ❖ La sobreexpresión del RNA mensajero de los receptores de adenosina Ad1, Ad2b y Ad3 por CsA no fue afectada por la espironolactona, sugiriendo que la aldosterona modula el tono vascular independiente de esta vía.
- ❖ El efecto de la espironolactona en la función renal no afectó los niveles del RNA mensajero de COX-2, por lo que proponemos que la regulación a la baja de COX-2 no juega un papel importante en la disfunción renal inducida por la ciclosporina.
- ❖ El bloqueo de los receptores de la aldosterona durante la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina no depende de cambios en la expresión de la vía mineralocorticoide, sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que la

aldosterona esté actuando y/o modificando otros receptores por los cuales pueda ejercer sus efectos deletéreos en este tipo de nefrotoxicidad.

VII.3 Modelo de nefrotoxicidad crónica por la CsA previamente establecida

- ❖ La CsA produjo disfunción renal a los 18 días, la cual se acentuó aún más a los 36 días de tratamiento.
- ❖ La espironolactona no revirtió la disfunción renal inducida por la CsA, pero evitó que progresara el deterioro renal.
- ❖ Los hallazgos histopatológicos sugieren que la espironolactona mantiene a los animales con nefrotoxicidad por CsA con menor grado de hipoperfusión y fibrosis túbulo intersticial.
- ❖ El efecto renoprotector de la espironolactona se asoció con la disminución en los niveles del RNA mensajero de TGF- β y de Kim-1.

VIII. PERSPECTIVAS

Con el fin de profundizar en los mecanismos por los que la aldosterona produce vasoconstricción en este modelo de nefrotoxicidad inducida por la CsA, se evaluarán los niveles de proteína de los genes que fueron modificados por la administración de la espironolactona.

También hemos planeado estudiar si el efecto renoprotector de la espironolactona se asocia con la reducción del estrés oxidativo y de la apoptosis.

Para diseccionar el papel de la aldosterona en el desarrollo de daño estructural inducidos por la CsA, se pretende estudiar el efecto de la administración continua de la aldosterona (con bombas miniosmóticas) en ratas que reciban CsA en un régimen de ingesta normal de sodio.

Los resultados de este estudio han permitido elaborar un protocolo para inicial un estudio clínico controlado con pacientes trasplantados con injerto renal.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Glomerular Filtration and Renal Blood Flow, chap. 3, in *Renal Physiology*, second ed., edited by Koeppen BM, Stanton BA, St Louis, Missouri, Mosby, 1997, pp 31-76
2. *Tratado de Histología*, 12 ed. Madrid, McGraw-Hill Interamericana, 1997, 794-800
3. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1). *Nephrol.Dial.Transplant.* 15 Suppl 7:1-85, 2000
4. Urine Formation by the Kidneys: I. Glomerular Filtration, Renal Blood Flow, and Their Control, chap. 26, in *Medical Physiology*, 10 ed., edited by Guyton AC, Hall JE 2000, pp 279-294
5. Glomerular Filtration and Renal Blood Flow, chap. 33, in *Medical Physiology*, edited by Boron Walter, Boulpaep Emile, Philadelphia, Pennsylvania, ELSEVIER SAUNDERS, 2005, pp 757-773
6. Abassi Z, Gurbanov K, Rubinstein I, Better OS, Hoffman A, Winaver J: Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric oxide. *Am.J.Physiol* 274:F766-F774, 1998
7. Admiraal PJ, van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Sluiter W, Schalekamp MA: Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. *J Hypertens.* 17:621-629, 1999
8. Amore A, Emancipator SN, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N, Coppo R: Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int.* 57:1549-1559, 2000
9. Andoh TF, Gardner MP, Bennett WM: Protective effects of dietary L-arginine supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 64:1236-1240, 1997
10. Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, Satoh F, Takeuchi K, Ito S: Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J.Am.Soc.Nephrol.* 14:2255-2263, 2003
11. Asai T, Nakatani T, Yamanaka S, Tamada S, Kishimoto T, Tashiro K, Nakao T, Okamura M, Kim S, Iwao H, Miura K: Magnesium supplementation prevents experimental

- chronic cyclosporine a nephrotoxicity via renin-angiotensin system independent mechanism. *Transplantation* 74:784-791, 2002
12. Backman L, Morales JM: Is nonnephrotoxic immunosuppression a possibility? *Transplantation* 69:SS27-SS30, 2000
 13. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 32:19-25, 1987
 14. Taal MW, Brenner BM: Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57: 1803-1817, 2000
 15. Bens M, Vallet V, Cluzeaud F, Pascual-Letallec L, Kahn A, Rafestin-Oblin ME, Rossier BC, Vandewalle A: Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line. *J.Am.Soc.Nephrol.* 10:923-934, 1999
 16. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, Herrera-Acosta J: Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am.J.Physiol* 274:F791-F798, 1998
 17. Bobadilla NA, Herrera JP, Merino A, Gamba G: Semi-quantitative PCR: a tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch.Med.Res.* 28:55-60, 1997
 18. 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
 19. Bobadilla NA, Tapia E, Jimenez F, Sanchez-Lozada LG, Santamaria J, Monjardin A, Bolio A, Gamba G, Herrera-Acosta J: Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. *Am.J.Physiol* 277:F464-F471, 1999
 20. Bonvalet JP: Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int.Suppl* 65:S49-S56, 1998
 21. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6:468-475, 1976
 22. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT: Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol.* 71:12A-16A, 1993

23. Bunchman TE, Brookshire CA: Cyclosporine-induced synthesis of endothelin by cultured human endothelial cells. *J Clin. Invest* 88:310-314, 1991
24. Campistol JM, Sacks SH: Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation* 69:SS5-10, 2000
25. Cavarape A, Endlich K, Feletto F, Parekh N, Bartoli E, Steinhausen M: Contribution of endothelin receptors in renal microvessels in acute cyclosporine-mediated vasoconstriction in rats. *Kidney Int.* 53:963-969, 1998
26. Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K, Wehling M: Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25:117-123, 1995
27. Christ M, Wehling M: Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 64:35-41, 1999
28. Christians U, Sewing KF: Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol. Ther.* 57:291-345, 1993
29. Clark AF, Sharp MG, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ: Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol. Chem.* 272:18185-18190, 1997
30. Cooney GF, Habucky K, Hoppu K: Cyclosporin pharmacokinetics in paediatric transplant recipients. *Clin. Pharmacokinet.* 32:481-495, 1997
31. Davidson D.W., Sackner M.A.: Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J. Lab. Clin. Med.* 62:351-356, 1963
32. Davies DR, Bittmann I, Pardo J: Histopathology of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *Transplantation* 69:SS11-SS13, 2000
33. de Lorgeril M, Boissonnat P, Salen P, Monjaud I, Monnez C, Guidollet J, Ferrera R, Dureau G, Ninet J, RENAUD S: The beneficial effect of dietary antioxidant supplementation on platelet aggregation and cyclosporine treatment in heart transplant recipients. *Transplantation* 58:193-195, 1994
34. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM: Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 35:333-346, 2000
35. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary

- circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:9797-9800, 1988
36. Diederich D, Yang Z, Luscher TF: Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2:1291-1297, 1992
 37. Ding SS, Qiu C, Hess P, Xi JF, Clozel JP, Clozel M: Chronic endothelin receptor blockade prevents renal vasoconstriction and sodium retention in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc.Res.* 53:963-970, 2002
 38. Duque J, Fresno M, Iniguez MA: Expression and Function of the Nuclear Factor of Activated T Cells in Colon Carcinoma Cells: Involvement in the regulation of cyclooxygenase -2. *J.Biol.Chem.* 280:8686-8693, 2005
 39. Duruibe VA, Okonmah A, Panton L, Blyden GT: Effect of cyclosporin A on rat kidney catecholamines. *Life Sci.* 47:255-261, 1990
 40. English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM: Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 44:135-141, 1987
 41. Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, Gonzalez MA, Uribe N, Garcia-Torres R, Lopez-Casillas F, Gamba G, Bobadilla NA: Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int.* 63:43-52, 2003
 42. Fitzgibbon WR, Greene EL, Grewal JS, Hutchison FN, Self SE, Latten SY, Ullian ME: Resistance to remnant nephropathy in the Wistar-Furth rat. *J.Am.Soc.Nephrol.* 10:814-821, 1999
 43. Flechner SM, Zhou L, Derweesh I, Mastroianni B, Savas K, Goldfarb D, Modlin CS, Krishnamurthi V, Novick A: The impact of sirolimus, mycophenolate mofetil, cyclosporine, azathioprine, and steroids on wound healing in 513 kidney-transplant recipients. *Transplantation* 76:1729-1734, 2003
 44. Fogo A, Hellings SE, Inagami T, Kon V: Endothelin receptor antagonism is protective in vivo acute cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 42:770-774, 1992
 45. Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, Ishibashi S: Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int.* 66:1493-1502, 2004

46. Funder JW: New biology of aldosterone, and experimental studies on the selective aldosterone blocker eplerenone. *Am Heart J* 144:S8-11, 2002
47. Gamba Gerardo: Función de los túbulos renales, chap. 19, in *Fisiología Médica*, Primera ed., edited by Drucker Colin, Mexico, Manual Moderno, 2006, pp 221-233
48. Greene EL, Kren S, Hostetter TH: Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J.Clin.Invest* 98:1063-1068, 1996
49. Grobecker HF, Riebel K, Wellenhofer T: Cyclosporine A-induced hypertension in SHR and WKY: role of the sympatho-adrenal system. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol Suppl* 22:S94-S95, 1995
50. Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, Wrighton SA, Janardan SK, Watkins PB, Hall SD: Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol.Pharmacol.* 50:52-59, 1996
51. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV: Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 62:237-244, 2002
52. Hansen PB, Schnermann J: Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 285:F590-F599, 2003
53. Harris RC, Jr.: Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol.* 89:10D-17D, 2002
54. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J.Clin.Invest* 94:2504-2510, 1994
55. Harris RC, Zhang MZ, Cheng HF: Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand.* 181:543-547, 2004
56. Hervey GR: Determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Nature* 171:1125, 1953
57. Heusler K, Pletscher A: The controversial early history of cyclosporin. *Swiss.Med.Wkly.* 131:299-302, 2001
58. Heyne N, Wolf S, Petersen P, Merten S, Schober W, Erley CM, Risler T, Osswald H: Adenosine receptor antagonism in the prevention of acute cyclosporine A-nephrotoxicity in normal, diabetic and hypertensive rats. *Nephrol.Dial.Transplant.* 14 Suppl 4:23-24, 1999

-
-
59. Hocherl K, Dreher F, Vitzthum H, Kohler J, Kurtz A: Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc.Nephrol.* 13:2427-2436, 2002
 60. Holz FG, Steinhausen M: Renovascular effects of adenosine receptor agonists. *Ren Physiol* 10:272-282, 1987
 61. Hostetter TH, Rosenberg ME, Kren S, Greene EL: Aldosterone induces glomerular sclerosis in the remanant kidney. (abstract) *J.Am.Soc.Nephrol.* 6:1016, 1996
 62. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, Noble NA, Border W: Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* 69:105-113, 2006
 63. Hunley TE, Fogo A, Iwasaki S, Kon V: Endothelin A receptor mediates functional but not structural damage in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J.Am.Soc.Nephrol.* 5:1718-1723, 1995
 64. Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M: An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 275:23627-23635, 2000
 65. Islam M, Burke JF, Jr., McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, Kanalas J, Sharma K: Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 59:498-506, 2001
 66. Jackson EK, Zhu C, Tofovic SP: Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F41-F51, 2002
 67. Jazayeri A, Meyer WJ, III: Mineralocorticoid-induced increase in beta-adrenergic receptors of cultured rat arterial smooth muscle cells. *J.Steroid Biochem.* 33:987-991, 1989
 68. Jenkins JK, Huang H, Ndebele K, Salahudeen AK: Vitamin E inhibits renal mRNA expression of COX II, HO I, TGFbeta, and osteopontin in the rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 71:331-334, 2001
 69. Jensen BL, Kurtz A: Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.* 52:1242-1249, 1997

-
-
70. Jo H, Yang EK, Lee WJ, Park KY, Kim HJ, Park JS: Gene expression of central and peripheral renin-angiotensin system components upon dietary sodium intake in rats. *Regul.Pept.* 67:115-121, 1996
 71. Joffe HV, Adler GK: Effect of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on vascular inflammation. *Heart Fail.Rev.* 10:31-37, 2005
 72. Juknevičius I, Segal Y, Kren S, Lee R, Hostetter TH: Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 286:F1059-F1062, 2004
 73. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J.Clin.Invest* 93:2431-2437, 1994
 74. Kahan BD: Cyclosporine. *N.Engl.J.Med.* 321:1725-1738, 1989
 75. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga SI, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennett W, Schreiner GF, Johnson RJ: Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 280:F727-F736, 2001
 76. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B: Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant.Proc.* 36:25S-32S, 2004
 77. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA: The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:14552-14557, 1998
 78. Klar J, Vitzthum H, Kurtz A: Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 286:F349-F355, 2004
 79. Kohan DE: Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am.J.Kidney Dis.* 29:2-26, 1997
 80. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL: Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int.* 37:1487-1491, 1990
 81. Kopp JB, Klotman PE: Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1:162-179, 1990
 82. Kreisberg MS, Silldorff EP, Pallone TL: Localization of adenosine-receptor subtype mRNA in rat outer medullary descending vasa recta by RT-PCR. *Am.J.Physiol* 272:H1231-H1238, 1997

83. Li C, Yang CW, Kim WY, Jung JY, Cha JH, Kim YS, Kim J, Bennett WM, Bang BK: Reversibility of chronic cyclosporine nephropathy in rats after withdrawal of cyclosporine. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F389-F398, 2003
84. Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY, Kim SB, Kim YS, Kim J, Bang BK: Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 286:F46-F57, 2004
85. Lindholm A, Sawe J: Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Ther.Drug Monit.* 17:570-573, 1995
86. Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, Ledbetter S: Therapeutic Role of TGF-beta-Neutralizing Antibody in Mouse Cyclosporin A Nephropathy: Morphologic Improvement Associated with Functional Preservation. *J Am Soc.Nephrol.* 14:377-388, 2003
87. Liu Y, Jones AW, Sturek M: Attenuated Ca²⁺ response to acetylcholine in endothelial cells from aorta of aldosterone-salt hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* 8:404-408, 1995
88. Lopez-Ongil S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M, Lamas S: Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol* 271:H1072-H1078, 1996
89. MacDonald AS: Management strategies for nephrotoxicity. *Transplantation* 69:SS31-SS36, 2000
90. Marsen TA, Weber F, Egink G, Suckau G, Baldamus CA: Differential transcriptional regulation of endothelin-1 by immunosuppressants FK506 and cyclosporin A. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 14:401-408, 2000
91. Masaki T: Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35:235-255, 1995
92. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA: Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin.Invest* 104:R19-R23, 1999
93. Maurer G, Lemaire M: Biotransformation and distribution in blood of cyclosporine and its metabolites. *Transplant.Proc.* 18:25-34, 1986

94. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F: The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int.Suppl* 52:S63-S69, 1995
95. Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G, Catt KJ: Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:11440-11444, 1991
96. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW, Jr.: Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am.J.Physiol* 277:F437-F446, 1999
97. Morales JM, Andres A, Rengel M, Rodicio JL: Influence of cyclosporin, tacrolimus and rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 16 Suppl 1:121-124, 2001
98. Murray BM, Paller MS, Ferris TF: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int.* 28:767-774, 1985
99. Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A: Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 46:1039-1045, 2005
100. Najarian JS, Frey DJ, Matas AJ, Gillingham KJ, So SS, Cook M, Chavers B, Mauer SM, Nevins TE: Renal transplantation in infants. *Ann.Surg.* 212:353-365, 1990
101. Nambi P, Pullen M, Contino LC, Brooks DP: Upregulation of renal endothelin receptors in rats with cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *Eur.J.Pharmacol.* 187:113-116, 1990
102. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N.Engl.J.Med.* 349:2326-2333, 2003
103. Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD: Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev.* 76:425-536, 1996
104. Ngarmukos C, Grekin RJ: Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 281:E1122-E1127, 2001
105. Nguyen G, Bouzahir L, Delarue F, Rondeau E, Sraer JD: [Evidence of a renin receptor on human mesangial cells: effects on PAI1 and cGMP]. *Nephrologie* 19:411-416, 1998
106. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD: Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int.* 50:1897-1903, 1996

-
-
107. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD: Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J.Clin.Invest* 109:1417-1427, 2002
 108. Noble S, Markham A: Cyclosporin. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs* 50:924-941, 1995
 109. Bobadilla Norma: Filtración Glomerular, chap. 18, in *Fisiología Médica* (vol 1), Primera ed., edited by Drucker Colin, Mexico, Manual Moderno, 2006, pp 209-220
 110. Olah ME, Stiles GL: Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35:581-606, 1995
 111. Ondetti MA, Cushman DW: Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu.Rev.Biochem.* 51:283-308, 1982
 112. Osswald H, Hermes HH, Nabakowski G: Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int.Suppl* 12:S136-S142, 1982
 113. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, Piccinelli A, Remuzzi G: Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin- angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin.Nephrol.* 25 Suppl 1:S83-S88, 1986
 114. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzzi G: Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am.J.Physiol* 251:F581-F587, 1986
 115. Perico N, Dadan J, Remuzzi G: Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1:76-83, 1990
 116. Perico N, Ruggenenti P, Gaspari F, Mosconi L, Benigni A, Amuchastegui CS, Gasparini F, Remuzzi G: Daily renal hypoperfusion induced by cyclosporine in patients with renal transplantation. *Transplantation* 54:56-60, 1992
 117. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA, Shankland SJ, Alpers CE, Bennett WM, Couser WG: Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J.Am.Soc.Nephrol.* 6:1186-1196, 1995
 118. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart

- failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N.Engl.J.Med.* 341:709-717, 1999
119. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P: Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation* 105:2212-2216, 2002
120. Ramirez C, Olmo A, O'Valle F, Masseroli M, Aguilar M, Gomez-Morales M, Revelles F, Garcia-Chicano MJ, Arrebola F, Reguero ME, del Moral RG: Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Exp.Nephrol.* 8:161-172, 2000
121. Ramirez V, Uribe N, Garcia-Torres R, Castro C, Rubio J, Gamba G, Bobadilla NA: Upregulation and intrarenal redistribution of heat shock proteins 90alpha and 90beta by low-sodium diet in the rat. *Cell Stress.Chaperones.* 9:198-206, 2004
122. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT, Jr.: Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 31:451-458, 1998
123. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT, Jr.: Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 33:232-237, 1999
124. Rosen S, Greenfeld Z, Brezis M: Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury. *Transplantation* 49:445-452, 1990
125. Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, Pessina AC: Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* 27:1039-1045, 1996
126. Rudolph AE, Rocha R, McMahon EG: Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Mol.Cell Endocrinol.* 217:229-238, 2004
127. Russo-Marie F: Glucocorticoid control of eicosanoid synthesis. *Semin.Nephrol.* 10:421-429, 1990
128. Ryuzaki M, Stahl LK, Lyson T, Victor RG, Bishop VS: Sympathoexcitatory response to cyclosporin A and baroreflex resetting. *Hypertension* 29:576-582, 1997
129. Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular cloning a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 7-7.15

-
-
130. Sanchez-Lozada LG, Gamba G, Bolio A, Jimenez F, Herrera-Acosta J, Bobadilla NA: Nifedipine prevents changes in nitric oxide synthase mRNA levels induced by cyclosporine [In Process Citation]. *Hypertension* 36:642-647, 2000
 131. Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J: Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 63:1522-1527, 1985
 132. Schiffrin EL, Gutkowska J, Genest J: Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptors in rats. *Am.J.Physiol* 246:H608-H614, 1984
 133. Schmidt BM, Montealegre A, Janson CP, Martin N, Stein-Kemmesies C, Scherhag A, Feuring M, Christ M, Wehling M: Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84:3528-3533, 1999
 134. Schroeder TJ, Hariharan S, First MR: Variations in bioavailability of cyclosporine and relationship to clinical outcome in renal transplant subpopulations. *Transplant.Proc.* 27:837-839, 1995
 135. Schwedler SB, Bobadilla N, Striker LJ, Vaamonde CA, Herrera-Acosta J, Striker GE: Pentosan polysulfate treatment reduces cyclosporine-induced nephropathy in salt-depleted rats. *Transplantation* 68:1583-1588, 1999
 136. Sechi LA, Grady EF, Griffin CA, Kalinyak JE, Schambelan M: Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am.J.Physiol* 262:F236-F240, 1992
 137. Seok JH, Hong JH, Jeon JR, Hur GM, Sung JY, Lee JH: Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 47:251-254, 1999
 138. Serino F, Grevel J, Napoli KL, Kahan BD, Strobel HW: Oxygen radical formation by the cytochrome P450 system as a cellular mechanism for cyclosporine toxicity. *Transplant.Proc.* 26:2916-2917, 1994
 139. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF: Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 52:660-673, 1997
 140. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF: Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity [In Process Citation]. *Kidney Int.* 58:1174-1185, 2000

141. Shin SJ, Lee YJ, Tan MS, Hsieh TJ, Tsai JH: Increased atrial natriuretic peptide mRNA expression in the kidney of diabetic rats. *Kidney Int.* 51:1100-1105, 1997
142. Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM: Renal interstitial fluid angiotensin. Modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 25:1021-1024, 1995
143. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu.Rev.Biochem.* 69:145-182, 2000
144. Spielman WS, Thompson CI: A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *Am.J.Physiol* 242:F423-F435, 1982
145. Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R: Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 12:1359-1368, 2001
146. Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J: Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:9983-9988, 2001
147. Sun Y: The renin-angiotensin-aldosterone system and vascular remodeling. *Congest.Heart Fail.* 8:11-16, 2002
148. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 21:929-933, 1993
149. Tariq M, Morais C, Sobki S, Al Sulaiman M, Al Khader A: N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol.Dial.Transplant.* 14:923-929, 1999
150. Tavares P, Fontes Ribeiro CA, Teixeira F: Cyclosporin effect on noradrenaline release from the sympathetic nervous endings of rat aorta. *Pharmacol.Res.* 47:27-33, 2003
151. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, Johnson RJ: Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 53:897-908, 1998
152. Thomson AW, McAuley FT, Whiting PH, Simpson JG: Angiotensin-converting enzyme inhibition or aldosterone antagonism reduces cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Transplant.Proc.* 19:1242-1243, 1987

-
-
153. Thomson SC, Tucker BJ, Gabbai F, Blantz RC: Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J.Clin.Invest* 83:960-969, 1989
 154. Todd-Turla KM, Schnermann J, Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A, Smart A, Killen PD, Briggs JP: Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. *Am.J.Physiol* 264:F781-F791, 1993
 155. Torras J, Valles J, Sanchez J, Sabate I, Seron D, Carrera M, Castelao AM, Herrero I, Puig-Parellada P, Alsina J: Prevention of experimental cyclosporine nephrotoxicity by dietary supplementation with LSL 90202, a lysine salt of eicosapentaenoic acid. Role of thromboxane and prostacyclin in renal tissue. *Nephron* 67:66-72, 1994
 156. van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA: Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 30:1389-1396, 1997
 157. van Rodijnen WF, van Lambalgen TA, van Wijhe MH, Tangelder GJ, Ter Wee PM: Renal microvascular actions of angiotensin II fragments. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 283:F86-F92, 2002
 158. Vanni S, Polidori G, Cecioni I, Serni S, Carini M, Modesti PA: ET(B) receptor in renal medulla is enhanced by local sodium during low salt intake. *Hypertension* 40:179-185, 2002
 159. Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y: Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int.* 54:482-491, 1998
 160. Verrey F: Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol* 277:F319-F327, 1999
 161. Vieira JM, Jr., Noronha IL, Malheiros DM, Burdmann EA: Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* 68:1746-1753, 1999
 162. Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL: Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 40:504-510, 2002

163. Vitzthum H, Abt I, Einhellig S, Kurtz A: Gene expression of prostanoid forming enzymes along the rat nephron. *Kidney Int.* 62:1570-1581, 2002
164. Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Kramer BK, Kurtz A: Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int.* 65:1180-1190, 2004
165. Wagner C, Kurtz A: Regulation of renal renin release. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 7:437-441, 1998
166. Wang DH, Du Y: Distinct mechanisms of upregulation of type 1A angiotensin II receptor gene expression in kidney and adrenal gland. *Hypertension* 26:1134-1137, 1995
167. Wang W, McClain JM, Zucker IH: Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. *Hypertension* 19:270-277, 1992
168. Webb RL, Barclay BW, Graybill SC: Cardiovascular effects of adenosine A2 agonists in the conscious spontaneously hypertensive rat: a comparative study of three structurally distinct ligands. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 259:1203-1212, 1991
169. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD: Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F254-F265, 2001
170. Wehling M: Nongenomic aldosterone effects: the cell membrane as a specific target of mineralocorticoid action. *Steroids* 60:153-156, 1995
171. Wehling M, Kasmayr J, Theisen K: Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am.J.Physiol* 260:E719-E726, 1991
172. Wehling M, Spes CH, Win N, Janson CP, Schmidt BM, Theisen K, Christ M: Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin.Endocrinol.Metab* 83:3517-3522, 1998
173. Williams GH, Dluhy RG: Disorders of the adrenal cortex, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15 ed., New York, McGraw-Hill companies Inc, 2001, p 2084
174. Wissmann C, Frey FJ, Ferrari P, Uehlinger DE: Acute cyclosporine-induced nephrotoxicity in renal transplant recipients: the role of the transplanted kidney. *J.Am.Soc.Nephrol.* 7:2677-2681, 1996
175. Wu MS, Yang CW, Chang CT, Bens M, Vandewalle A: Cyclosporin increases the density of angiotensin II subtype 1 (AT1) receptors in mouse medullary thick ascending limb cells. *Nephrol.Dial.Transplant.* 18:1458-1465, 2003

-
-
176. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, Vinson GP: Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 44:340-345, 2004
 177. Xu S, Denton CP, Holmes A, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM: Endothelins: effect on matrix biosynthesis and proliferation in normal and scleroderma fibroblasts. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 31 Suppl 1:S360-S363, 1998
 178. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415, 1988
 179. Yang CW, Kim YS, Kim J, Kim YO, Min SY, Choi EJ, Bang BK: Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Exp.Nephrol.* 6:50-56, 1998
 180. Zannad F, Radauceanu A: Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure. *Heart Fail.Rev.* 10:71-78, 2005
 181. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, Raleigh JA, Mason RP, Thurman RG: Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am.J.Physiol* 275:F595-F604, 1998
 182. Zhong Z, Connor HD, Yin M, Moss N, Mason RP, Bunzendahl H, Forman DT, Thurman RG: Dietary glycine and renal denervation prevents cyclosporin A-induced hydroxyl radical production in rat kidney. *Mol.Pharmacol.* 56:455-463, 1999
 183. Zhou X, Ono H, Ono Y, Frohlich ED: Aldosterone antagonism ameliorates proteinuria and nephrosclerosis independent of glomerular dynamics in L-NAME/SHR model. *Am.J.Nephrol.* 24:242-249, 2004
 184. Zhuo J, Ohishi M, Mendelsohn FA: Roles of AT1 and AT2 receptors in the hypertensive Ren-2 gene transgenic rat kidney. *Hypertension* 33:347-353, 1999
 185. <http://quierodonar.com.mx>
 186. Diuréticos, chap 29, en *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, décima ed., editada por Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA, McGraw-Hill Interamericana, 1996, pp 735-765
 187. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int.* 69:1503-1506

X. ANEXOS

X.1 Artículos generados con la realización de esta tesis

- Acción Novedosa de la aldosterona en la nefrotoxicidad por ciclosporina
- Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity
- Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity (enviado)

Acción novedosa de la aldosterona en la nefrotoxicidad por ciclosporina

Jazmin M. Pérez-Rojas,* Norma A. Bobadilla*

* Unidad de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Novel action of aldosterone in CsA nephrotoxicity

ABSTRACT

Calcineurin inhibitors are helpful immunosuppressive agents in clinical practice. Thanks to their lower cost respect with new immunosuppressive therapy, calcineurin inhibitors in our country continue being the most used treatment in solid organ transplant recipients or patients with autoimmune disease. In the 80's decade cyclosporine A (CsA) was introduced as the first calcineurin inhibitor transforming the immunosuppression therapy. Up to date, many articles evaluating beneficial and adverse effects of CsA have been published. In this review, basic aspects and actions of CsA are analyzed together with studies from our laboratory that pointed out the pathophysiological role of aldosterone as a mediator of functional and structural changes that are observed in CsA nephrotoxicity. Based in our findings, we proposed that in CsA nephrotoxicity, the aldosterone mediates renal vasoconstriction and enhances TGF β expression promoting the development of nephrotoxicity. Finally, results from our laboratory and others allow us to suggest that aldosterone receptors blockade with spironolactone or eplerone could be a pharmacological therapy to reduce or prevent acute and chronic CsA nephrotoxicity in transplant recipients.

Key words. Spironolactone. Acute and chronic nephrotoxicity.

MECANISMO DE ACCIÓN POR CICLOSPORINA A

Los linfocitos T son glóbulos blancos especializados que se producen o maduran en diferentes tejidos linfoides y se encargan de eliminar antígenos de superficie (como toxinas, bacterias, virus, tejidos trasplantados, fármacos, etc.). Los receptores de membrana de

RESUMEN

Los inhibidores de calcineurina son los agentes inmunosupresores más potentes con los que se cuenta en la práctica clínica, y gracias a su bajo costo respecto a las nuevas terapias inmunosupresoras, en nuestro país continúan siendo los agentes terapéuticos más utilizados para el manejo de pacientes con enfermedades autoinmunes o que reciben trasplantes. En la década de los 80's se introdujo la ciclosporina A (CsA) como primer inhibidor de calcineurina, lo cual revolucionó la terapia inmunosupresora. Desde entonces se han publicado muy variados artículos donde se han evaluado los efectos benéficos y deletéreos de estos inhibidores; específicamente nos enfocaremos a revisar las acciones de CsA y, en particular, los resultados de nuestro laboratorio que muestran el papel fisiopatológico que juega la aldosterona como mediador de los cambios funcionales y estructurales que se observan en la nefrotoxicidad por ciclosporina. Específicamente su participación en promover la vasoconstricción renal asociada a CsA y en el desarrollo de fibrosis al inducir la expresión de TGF β . Por lo tanto, nuestros resultados y los de otros autores nos permiten proponer el bloqueo de los receptores de aldosterona con espironolactona o eplerone como un tratamiento farmacológico útil para reducir la incidencia de nefrotoxicidad aguda y crónica, inducida por CsA en pacientes con enfermedades autoinmunes o que reciben trasplante de órganos.

Palabras clave. Espironolactona. Nefrotoxicidad aguda y crónica.

células T (RCT) detectan al antígeno, esto inicia una serie de eventos que resulta en la estimulación del crecimiento y proliferación de los linfocitos T. Una vez que el RCT es activado, esto promueve aumento en los niveles de calcio citosólico y la concomitante activación de la fosfatasa de calcineurina. La calcineurina desfosforila al factor activador nuclear de la transcripción de células T (NFAT). Como se muestra en la figura 1A, una

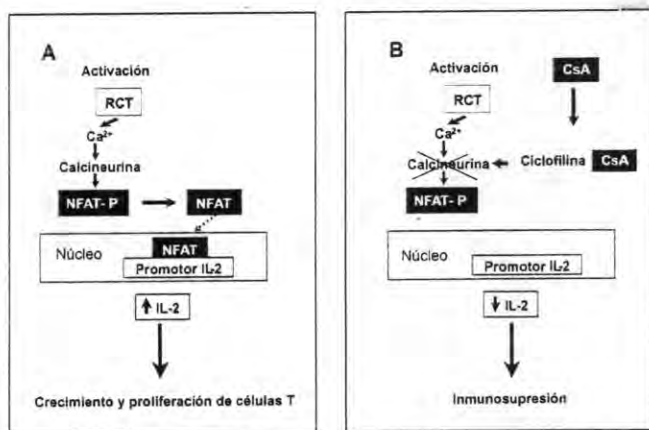


Figura 1. Mecanismo de inmunosupresión por ciclosporina. Receptor de células T (RCT), factor activador nuclear de la transcripción de células T desfosforilado (NFAT) y fosforilado (NFAT-P), interleucina 2 (IL-2).

vez que este factor es desfosforilado es entonces translocado al núcleo y puede promover la transcripción de algunas citocinas entre las que se encuentra la interleucina-2 (IL-2) que es la proteína encargada del crecimiento y proliferación de células T. En cambio, como muestra la figura 1B, la CsA es una molécula liposoluble que difunde fácilmente al interior de la célula y en el citoplasma se une con la ciclofilina, la formación de este complejo inhibe en forma selectiva la actividad fosfatasa de la calcineurina, evitando la desfosforilación del NFAT y su translocación al núcleo.¹ Por lo tanto, el efecto inmunosupresor de CsA está mediado por disminuir la producción de IL-2 y mantener a los linfocitos T en la fase G₀ del ciclo celular.

CICLOSPORINA A COMO INMUNOSUPRESOR

La introducción de CsA como agente inmunosupresor aumentó en forma considerable la sobrevida tanto de los pacientes trasplantados como del injerto. En la figura 2 se muestra la capacidad inmunosupresora de CsA en comparación con la terapia convencional (azatioprina-prednisona-metilprednisolona) sobre la sobrevida de pacientes con trasplante renal así como del injerto. Para los pacientes trasplantados recibieron tratamiento con CsA, la sobrevida fue de 99% entre el primer y quinto año posttrasplante, mientras que la sobrevida con la terapia convencional fue de 88 y 78%, respectivamente. Las diferencias fueron más evidentes en la sobrevida del injerto, de 95% en el primer año y 83% en el quinto año para los pacientes tratados con CsA, y de 80 y 60%, respectivamente, para los pacientes que recibieron terapia convencional.^{2,3}

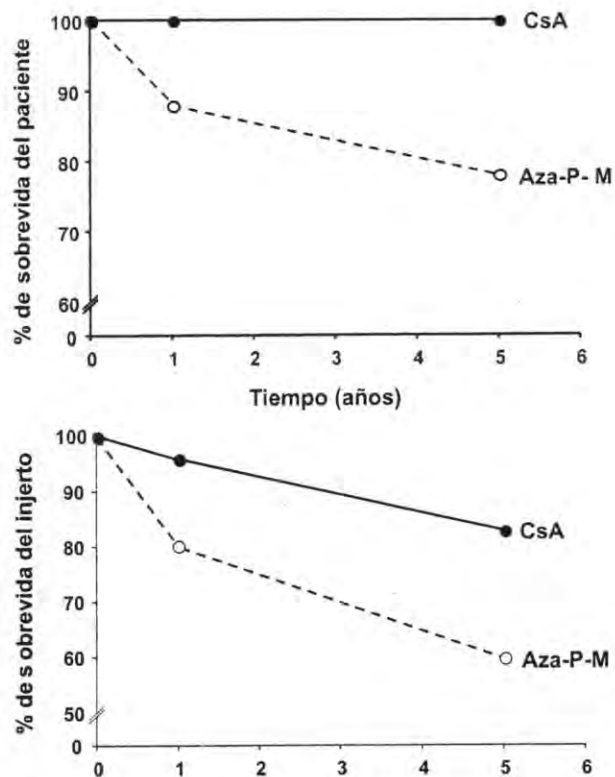


Figura 2. Efecto de la introducción de ciclosporina (CsA) sobre la sobrevida del injerto y del paciente con trasplante renal, comparada con la terapia convencional azatioprina, prednisona y metilprednisolona (Aza-P-M).

EFFECTOS SECUNDARIOS DE CICLOSPORINA A

Aunque los beneficios de CsA han sido evidentes, su uso a largo plazo se encuentra limitado por sus efectos secundarios como: disfunción renal aguda y crónica, hipertensión, desórdenes electrolíticos (hiperkalemia, hipomagnesemia e hipocalcemia), acidosis tubular, síndrome urémico hemolítico e incapacidad para concentrar la orina. Sin embargo, la nefrotoxicidad es la más frecuente y de mayor relevancia desde el punto de vista clínico.⁴ En un estudio recientemente publicado en el *New England Journal of Medicine*, Nankivell, *et al.* mostraron que después de 10 años de tratamiento con inhibidores de calcineurina, 100% de los pacientes trasplantados presentan nefrotoxicidad.⁵

Se han descrito dos formas de nefrotoxicidad: la aguda o moderada y la crónica o severa, las cuales dependen del tiempo de administración del fármaco, así como de la dosis utilizada. Se ha observado que la nefrotoxicidad aguda es reversible al disminuir la dosis de CsA o suspender el fármaco; sin embargo, esto puede conducir al rechazo del injerto. En cambio, la nefrotoxicidad crónica, que se

desarrolla con el tratamiento a largo plazo con CsA, se caracteriza por la presencia de lesiones estructurales en el tejido renal como lo son arteriopatía y fibrosis tubulointersticial, siendo esta última irreversible.^{1,6,7}

Los modelos en animales han sido muy útiles para estudiar los mecanismos involucrados en el desarrollo de daño renal inducido por CsA. En los roedores se pueden reproducir los dos tipos de nefrotoxicidad que se observan en el humano. El modelo de nefrotoxicidad aguda se induce al administrar dosis repetidas de CsA⁸ mientras que el modelo de nefrotoxicidad crónica se obtiene con la administración de dosis repetidas de CsA juntamente con alimentación con dieta baja en sodio⁹ la ingesta baja en sodio activa al sistema renina angiotensina, lo que aumenta la susceptibilidad a la CsA en los roedores y la aparición de lesiones estructurales características que se observan en el humano.

NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR CICLOSPORINA A

Existen trabajos en los que se ha determinado la hemodinámica glomerular en forma experimental por medio de estudios de micropunción renal; se ha observado que la CsA produce vasoconstricción tanto en la arteriola aferente como en la eferente, siendo más importante la constricción preglomerular, lo que provoca disminución del flujo plasmático renal (QA). También se ha demostrado disminución en el coeficiente de ultrafiltración (Kf). La reducción de estos dos parámetros hemodinámicos da como resultado una disminución significativa de la filtración glomerular por nefrona, la cual se refleja en la filtración glomerular total.¹⁰⁻¹² Por lo tanto, en humanos y animales, la reducción de la filtración glomerular es el hallazgo característico de la presencia de nefrotoxicidad aguda.

Mecanismos de nefrotoxicidad aguda inducida por ciclosporina A

- **Factores vasoactivos.** La vasoconstricción renal inducida por CsA parece ser el resultado de un desequilibrio en la liberación de factores vasoactivos; por una parte, la CsA induce aumento de factores vasoconstrictores como endotelina,¹³ tromboxano,¹⁴ angiotensina II,^{8,15} así como disminución de factores vasodilatadores como prostaciclina⁸ y óxido nítrico, aunque existe controversia con este último.^{16,17} Estudios recientes de nuestro laboratorio y otros

han mostrado que la CsA aumenta los niveles de RNAm de la sintasa de óxido nítrico endotelial, y que la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas con nefrotoxicidad aguda produce mayores alteraciones tanto funcionales como estructurales que en las ratas normales, lo que sugiere fuertemente que la producción de óxido nítrico (ON) es normal y contrarresta la vasoconstricción renal observada en este tipo de nefrotoxicidad.^{11,18,19}

- **Formación de radicales libres.** Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la CsA aumenta la formación de radicales libres que se inducen durante el fenómeno de hipoxia, la cual se presenta como consecuencia de la vasoconstricción renal inducida por CsA y también se ha sugerido que este inmunosupresor altera el microambiente celular e induce en forma directa estrés celular.

Además del aumento en la formación de radicales libres, Tariq, *et al.* mostraron que la CsA disminuye el contenido renal de glutatión; esta molécula sirve para contrarrestar la formación de radicales libres. Estos autores también mostraron que el uso de antioxidantes en este tipo de nefrotoxicidad restableció la cantidad de glutatión, lo que sugiere que la CsA, al aumentar la producción de radicales libres, también altera la producción de las enzimas antioxidantes.²⁰ En consecuencia, la administración de antioxidantes en la nefrotoxicidad aguda experimental ha mostrado ser efectiva para reducir los efectos tóxicos de CsA,^{20,21} pero este efecto benéfico no ha sido bien explorado en pacientes trasplantados.²²

- **Sistema nervioso simpático (SNS).** La estimulación adrenérgica inducida por CsA da por resultado el aumento de norepinefrina, bloqueo de calcineurina neuronal y elevación de catecolaminas plasmáticas.²³ Sin embargo, el bloqueo del SNS ha mostrado resultados contradictorios; aunque en un estudio el bloqueo farmacológico del SNS previno los cambios hemodinámicos inducidos por CsA,²⁴ en otro la denervación no previno la disfunción renal en ratas tratadas con CsA.²⁵

Mecanismos de nefrotoxicidad crónica inducida por ciclosporina A

En cuanto a los factores que causan el desarrollo de las alteraciones estructurales en la nefrotoxicidad crónica por CsA, se han propuesto al menos tres factores importantes:

- 1. Activación del Sistema Renina Angiotensina.** El aumento de angiotensina II no sólo aumenta la vasoconstricción renal y promueve los procesos fibróticos a través de la activación de los receptores AT1, sino que también incrementa los niveles de aldosterona.^{26,27}
- 2. Hipoxia.** Al igual que en la nefrotoxicidad aguda, en la crónica se presenta mayor vasoconstricción renal y, por lo tanto, mayor grado de hipoxia, lo que trae como consecuencia la formación de radicales libres que inducen daño celular y promueven apoptosis, contribuyendo a mayor daño tisular.^{24,28-30}
- 3. Sobreexpresión del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ).** El TGFβ es una citosina que promueve fibrosis en la mayoría de las enfermedades crónicas del riñón y de otros órganos. En este modelo de nefropatía, previamente se demostró que CsA aumenta los niveles de expresión de TGFβ, promoviendo fibrosis renal a través de la inducción de aumento de proteínas de matriz extracelular como colágena y fibronectina.^{27,31-34}

Maniobras para reducir la nefrotoxicidad por ciclosporina A

Se han estudiado varias maniobras para reducir la nefrotoxicidad aguda por CsA; por ejemplo, la administración de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II,^{10, 27} bloqueadores de los receptores de endotelina³⁵⁻³⁷ e inhibidores de tromboxano^{14,38} dentro de estos tratamientos, la inhibición de los receptores de endotelina ha sido el tratamiento farmacológico más efectivo para reducir la vasoconstricción renal inducida por CsA. Hemos mostrado, además, que la dexametasona previene la vasoconstricción renal inducida por CsA, lo que se acompañó con aumento en los niveles de RNAm de eNOS.³⁹ En un estudio poste-

rior, observamos que la administración de nifedipina, bloqueador de los canales de calcio, evitó la disminución de la función renal inducida por CsA, efecto que al parecer fue el resultado de mayor biodisponibilidad de ON.⁴⁰ Adicionalmente, la administración de L-arginina, el precursor de ON, previno las alteraciones hemodinámicas inducidas por CsA.^{41,42}

Estos resultados comprueban que las maniobras que aumentan la síntesis y biodisponibilidad de ON revierten o reducen la nefrotoxicidad aguda por CsA, probablemente porque la estimulación de la síntesis de ON puede contrarrestar la acción de los factores vasoconstrictores, aun cuando esta vía parece no ser alterada por CsA.

Con respecto a la nefrotoxicidad crónica, en el cuadro 1 se detallan cada uno de los estudios donde se evaluaron diferentes maniobras farmacológicas con el propósito de reducir o revertir la nefrotoxicidad crónica por CsA, entre las que se encuentran el bloqueo de los receptores de angiotensina II,^{26,27} la administración del factor de crecimiento del endotelio vascular,⁴³ el efecto del polisulfato de pentosan, el cual es un fármaco con propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas⁴⁴ y la suplementación con magnesio, pero los resultados no han sido del todo satisfactorios, ya que en la mayoría de los casos sólo se reduce en forma parcial el daño estructural, pero no se consigue el restablecimiento de la función renal o viceversa. Aunque la suplementación con magnesio parece mejorar la función y la estructura renal en forma parcial, tal como se observa en el cuadro 1, en nuestro laboratorio no hemos observado hipomagnesemia en las ratas con nefrotoxicidad aguda o crónica como este grupo previamente reportó.⁴⁵

ALDOSTERONA

Hallazgos recientes en otro tipo de nefropatías crónicas e información reciente de nuestro laborato-

Cuadro 1. Efecto de diferentes tratamientos farmacológicos para reducir la nefrotoxicidad crónica por CsA.

Tratamiento	Función renal (FR)	Daño renal	Referencia
Losartán	Acentuó la caída de la FR	Reducción parcial del daño	Thomas, <i>et al.</i> ²⁹
BQ123	Mejoría parcial	Reducción parcial del daño	Hunley T, <i>et al.</i> ³⁷
Polisulfato de pentosan	Sin mejoría	Reducción parcial del daño	Schwedler S, <i>et al.</i> ⁴⁴
Factor de crecimiento del endotelio vascular	Sin mejoría	Reducción parcial del daño	Kang D, <i>et al.</i> ⁴³
L-arginina	Mejoría parcial	Reducción parcial del daño	Kang D, <i>et al.</i> ⁴²
Suplemento de magnesio	Recuperación de la FR	Reducción parcial del daño	Asai T, <i>et al.</i> ⁴⁵
Espironolactona	Recuperación de la FR	Reducción parcial del daño	Feria I, <i>et al.</i> ³¹

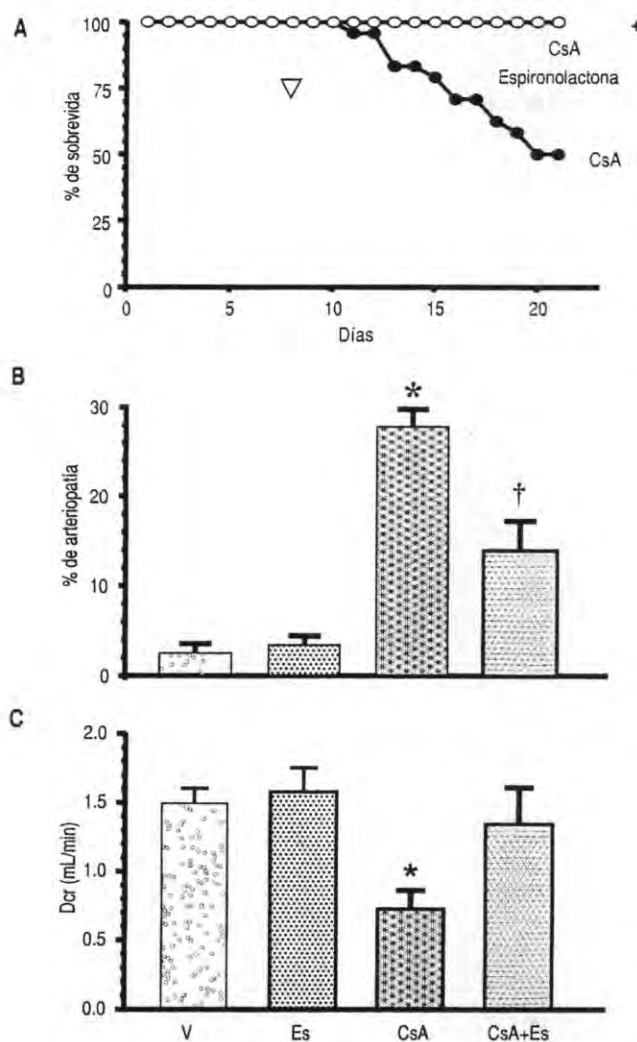


Figura 3. Bloqueo de los receptores de aldosterona con espironolactona (Es), en la nefrotoxicidad crónica por CsA. A) La espironolactona aumentó el porcentaje de supervivencia de los animales con toxicidad por CsA. B) La espironolactona redujo la arteriopatía en la nefrotoxicidad crónica por CsA. C) El bloqueo de los receptores de aldosterona previno la disfunción renal cuantificada por la depuración de creatinina (Dcr).

rio sugieren que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona podría ser una terapia farmacológica útil en la prevención de la toxicidad crónica por ciclosporina.

La aldosterona es un mineralocorticoide cuya función principal es el mantenimiento del volumen extracelular a través del aumento de la reabsorción de sal y la secreción de potasio en el túbulo distal y colector. Este mineralocorticoide es sintetizado por la sintasa de aldosterona en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales, aunque también esta enzima se ha observado en otros tejidos incluyendo el riñón. Debido a la solubilidad de la aldosterona en los lípidos, ésta

difunde fácilmente al interior de las células donde interactúa con el receptor mineralocorticoide y a esta acción se le conoce como "efecto genómico" de la aldosterona. La mayoría de las acciones conocidas de la aldosterona, tanto en células epiteliales como no epiteliales, son mediadas a través de la activación de los receptores mineralocorticoides, los cuales son capaces de regular la expresión y transcripción de diversos genes. Una vez que el complejo aldosterona-receptor viaja al núcleo, se une a diferentes regiones promotoras de diversos genes que contienen elementos de respuesta a mineralocorticoides; los genes más conocidos regulados por la aldosterona son los que codifican para el transportador sodio: cloro (TSC), subunidad alfa del canal de sodio (ENaC), canal epitelial de potasio (ROMK) y ATPasa sodio-potasio localizados en el túbulo distal y en el túbulo colector.⁴⁶⁻⁴⁸ El aumento en la expresión de estas proteínas produce la acción clásica de la aldosterona, que es aumentar la reabsorción de sodio y la secreción de potasio; este efecto no es inmediato y tarda más de 45 minutos, alcanzando el efecto máximo después de varias horas.⁴⁹

Además de la presencia de los receptores mineralocorticoides en el túbulo distal y colector, éstos también se encuentran en miocitos, cerebro y endotelio vascular.⁵⁰

Se conoce que los glucocorticoides y mineralocorticoides tienen la misma afinidad por los receptores de aldosterona, además de que los primeros son más abundantes que los segundos, por lo que la especificidad para que la aldosterona se una a su receptor es mediada por la presencia de la enzima 11 β -deshidrogenasa hidroesteroidea (11 β HSD2), que degrada a los glucocorticoides permitiendo que sólo la aldosterona se una a su receptor; por lo tanto, la presencia de esta enzima es esencial para que la aldosterona ejerza sus efectos. En el tejido renal, esta enzima se encuentra principalmente en el epitelio del túbulo distal y colector, pero también se ha observado en el epitelio y endotelio glomerular. Por otra parte, estudios recientes muestran que la inhibición selectiva de la 11 β HSD2 induce sobrerregulación de receptores de angiotensina y modificación del tono vascular.⁵⁰ Estas observaciones, junto con la presencia de la sintasa de aldosterona en diferentes tejidos, sugieren que ésta ejerce acciones locales en diversos órganos independientes de su acción clásica conocida.

Otras acciones de la aldosterona son las conocidas como efectos no genómicos. En líneas celulares de leucocitos mononucleares humanos, células del músculo liso vascular y cardiomiocitos,⁵¹ se ha observado que la aldosterona puede producir acciones

rápidas (en segundos) que se caracterizan por aumento en los niveles de trifosfato inositol (IP3) y calcio intracelular, así como disminución de la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y la activación de la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{AT}$ pasa,⁵⁰ por lo que se ha propuesto que la aldosterona ejerce efectos directos sin modificar la transcripción de genes, lo que se ha denominado "efectos no genómicos" de la aldosterona, que parecen ser mediados por receptores de membrana aún no identificados.⁵²

Aldosterona en la progresión de enfermedades cardiovasculares y renales

Estudios recientes en humanos y animales han mostrado que la aldosterona participa en la hipertrofia y fibrosis cardiovascular. Se ha observado una mayor incidencia de hipertrofia vascular en pacientes con hiperaldosteronismo que presentan valores bajos de angiotensina II.⁵³ De manera interesante, la inhibición de los receptores de aldosterona con espironolactona redujo en 30% la mortalidad de pacientes con insuficiencia cardíaca.⁵⁴ Desde el punto de vista renal, recientemente se reportó que la infusión de aldosterona en ratas normales induce sobreexpresión de $\text{TGF}\beta$,^{55,56} lo que sugiere que esta hormona podría participar en procesos fibróticos intrarrenales. Asimismo, en ratas espontáneamente hipertensas (SPHR) que desarrollan nefropatía maligna, Rocha, *et al.* mostraron que la inhibición selectiva de aldosterona previene la aparición de proteinuria y el desarrollo de glomeruloesclerosis.^{57,58} En un modelo clásico de progresión de daño renal, el modelo de ablación renal, Greene, *et al.*⁵⁵ mostraron que la aldosterona juega un papel importante en la progresión del daño renal.

Aldosterona en la nefrotoxicidad inducida por CsA

Como se mencionó anteriormente, la nefrotoxicidad por CsA es acompañada por la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, y tomando en consideración que durante esta nefropatía se produce aumento en la expresión de $\text{TGF}\beta$, factor que parece ser regulado por aldosterona; en un estudio reciente de nuestro laboratorio evaluamos si la aldosterona participaba en el desarrollo de nefrotoxicidad por CsA en la rata.³¹ Nuestro primer hallazgo fue que la sobrevivida a 21 días de los animales a los que se les indujo nefrotoxicidad crónica por CsA aumentó de manera espectacular cuando se bloquearon los receptores de aldosterona con espironolactona como se muestra en la

figura 3A. A nivel renal, los principales cambios histológicos que se han observado en este modelo son la arteriopatía y la fibrosis túbulo-intersticial. La figura 3B representa el porcentaje de arteriopatía cuantificado en 100 arteriolas preglomerulares por grupo. Esta lesión fue casi inexistente en los grupos controles (vehículo y espironolactona); en cambio, en el grupo tratado con CsA, el porcentaje de arteriolas dañadas aumentó considerablemente, el cual se redujo a la mitad con el empleo concomitante de espironolactona.

Resultados similares fueron observados al evaluar la fibrosis túbulo-intersticial. El área con fibrosis en la corteza renal fue de 18% en las ratas con toxicidad por CsA y la espironolactona redujo en forma considerable el área de esta lesión (datos no mostrados). Con el objetivo de conocer los mecanismos responsables del efecto protector de espironolactona sobre las alteraciones estructurales inducidas por CsA, evaluamos la expresión génica de $\text{TGF}\beta$, fibronectina, colágena I y colágena IV, por análisis de Northern blot. La nefrotoxicidad crónica por CsA se asoció con sobrerregulación de estas proteínas, efecto que fue completamente revertido con el bloqueo de los receptores de aldosterona, sugiriendo que la expresión de $\text{TGF}\beta$ es regulada por esta hormona mineralocorticoide.

Otro hallazgo particularmente interesante de nuestro estudio fue el efecto que ejerció la espironolactona sobre la función renal. Como era de esperarse, la administración crónica de CsA produjo disminución significativa de la función renal, que en este experimento en particular fue de 56%, como se muestra en la figura 3C. En cambio, la inhibición selectiva de los receptores de aldosterona con espironolactona previno completamente la disminución de la función renal en las ratas tratadas simultáneamente con CsA.

Nuestros resultados sugieren que la disfunción renal crónica inducida por CsA es mediada en buena parte por la aldosterona, ya que la espironolactona protegió al riñón de las alteraciones hemodinámicas inducidas por este inmunosupresor. Estudios preliminares de nuestro laboratorio muestran que el bloqueo de aldosterona también previene la nefrotoxicidad aguda por CsA, lo que se asoció con normalización del flujo sanguíneo renal. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren fuertemente que la aldosterona modula el tono de la vasculatura renal. En apoyo a nuestros hallazgos existe evidencia de que esta hormona es capaz tanto de aumentar los niveles de fosfato inositol y de los receptores de angiotensina II como de alterar la respuesta vasodilatadora a acetilcolina.⁵⁹⁻⁶²

Con todo lo anteriormente expuesto existen dos posibilidades por las cuales la aldosterona pudiera in-

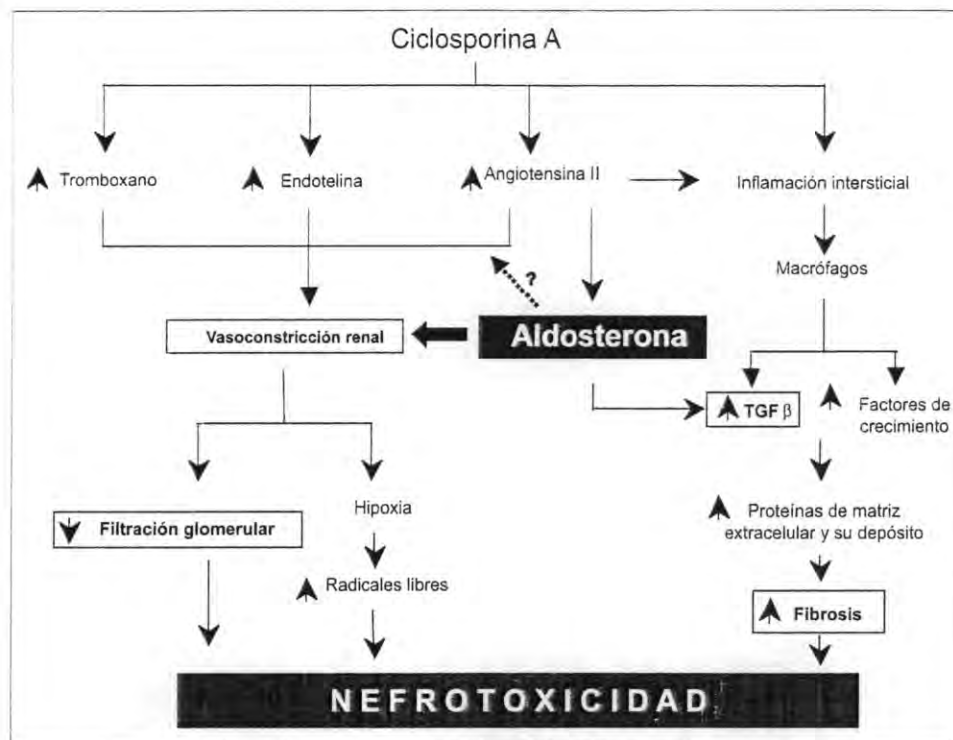


Figura 4. Diagrama que muestra las acciones de aldosterona en el desarrollo de la nefrotoxicidad por CsA.

tervenir en la regulación del tono vascular; una sería que esta hormona funcione como agente vasoactivo y otra que promueva la liberación de factores vasoconstrictores. Actualmente, nuestro laboratorio explora ambas posibilidades con el fin de profundizar el conocimiento que tenemos sobre las acciones de esta hormona tan particular en la vasculatura renal.

Finalmente, los resultados que obtuvimos con el bloqueo de los receptores de aldosterona con espironolactona y que son resumidos en el cuadro 1, nos permiten proponer el esquema que se muestra en la figura 4, en el cual se enfatiza la participación de la aldosterona en el establecimiento de la nefrotoxicidad por CsA.

Nuestra propuesta específica es que la aldosterona, más que la angiotensina II, produce efectos deletéreos mediante la alteración de diferentes vías. Por una parte, induce la expresión de $TGF\beta$, una importante citosina profibrótica, que promueve el depósito de proteínas de matriz extracelular con el concomitante desarrollo de fibrosis; y por otra, la aldosterona promueve vasoconstricción renal y, en consecuencia, disminución de la filtración glomerular por un mecanismo aún no dilucidado. Además, la vasoconstricción también contribuye al establecimiento de fibrosis para aumentar la formación de radicales libres.

Por lo tanto, el empleo de espironolactona o eplerenona podría ser un tratamiento farmacológico útil

para reducir la incidencia de nefrotoxicidad aguda y crónica inducida por CsA en pacientes que reciben trasplantes de órganos y con enfermedades autoinmunes.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados que se presentan de nuestro laboratorio fueron llevados a cabo con el apoyo económico de CONACYT (40182/A1) y de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN208602-3). Jazmin Pérez Rojas es alumna del posgrado de Ciencias Biomédicas y es becaria de CONACYT.

REFERENCIAS

1. De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 333-46.
2. Najarian JS, Frey DJ, Matas AJ, Gillingham KJ, So SS, Cook M, Chavers B, Mauer SM, Nevens TE. Renal transplantation in infants. *Ann Surg* 1990; 212: 353-65.
3. European Best Practice Guidelines for renal transplantation (part 1). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl. 7): 1-85.
4. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*: 1990; 1: 162-79.
5. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.
6. Li C, Yang CW, Kim WY, Jung JY, Cha JH, Kim YS, et al. Reversibility of chronic cyclosporine nephropathy in rats after

- withdrawal of cyclosporine. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F389-F398.
7. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1995; 52 (Suppl): S63-S69.
 8. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, et al. Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin Nephrol* 1986; 25 (Suppl 1): S83-S88.
 9. Rosen S, Greenfeld Z, Brezis M. Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury. *Transplant* 1990; 49: 445-52.
 10. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1987; 32: 19-25.
 11. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, López P, Mendoza S, García-Torres R, et al. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1994; 46: 773-9.
 12. Thomson SC, Tucker BJ, Gabbai F, Blantz RC. Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J Clin Invest* 1989; 83: 960-9.
 13. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 1990; 37: 1487-91.
 14. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F, Remuzzi G. Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Renal Physiol* 1986; 251: F581-F587.
 15. Thomson AW, McAuley FT, Whiting PH, Simpson JG. Angiotensin-converting enzyme inhibition or aldosterone antagonism reduces cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Transplant Proc* 1987; 19: 1242-3.
 16. Diederich D, Yang Z, Luscher TF. Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1291-7.
 17. Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y. Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int* 1998; 54: 482-91.
 18. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, López-Zetina P, Herrera-Acosta J. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Renal Physiol* 1998; 274: F791-F798.
 19. López-Ongil S, Laura M, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M, Lamas S. Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Renal Physiol* 1996; 271: H1072-H1078.
 20. Tariq M, Moraes C, Sobki S, Al Sulaiman M, Al Khader A. N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 923-9.
 21. Jenkins JK, Huang H, Ndebele K, Salahudeen AK. Vitamin E inhibits renal mRNA expression of COX II, HO I, TGFbeta, and osteopontin in the rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant* 2001; 71: 331-4.
 22. Barany P, Stenvinkel P, Ottosson-Seeberger A, Alvestrand A, Morrow J, Roberts JJ, et al. Effect of 6 weeks of vitamin E administration on renal haemodynamic alterations following a single dose of neoral in healthy volunteers. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 580-4.
 23. Duruibe VA, Okonmah A, Panton L, Blyden GT. Effect of cyclosporin A on rat kidney catecholamines. *Life Sci* 1990; 47: 255-61.
 24. Zhong Z, Connor HD, Yin M, Moss N, Mason RP, Bunzendahl H, et al. Dietary glycine and renal denervation prevents cyclosporin A-induced hydroxyl radical production in rat kidney. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 455-63.
 25. Elzinga LW, Rosen S, Burdman EA, Hatton DC, Lindsley J, Bennett WM. The role of renal sympathetic nerves in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Transplant* 2000; 69: 2149-53.
 26. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdman EA, et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1186-96.
 27. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 1997; 52: 660-73.
 28. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, Yin M, Frankenberg MV, Stachlewitz RF, et al. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Renal Physiol* 1998; 275: F595-F604.
 29. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53: 897-908.
 30. Amore A, Emancipator SN, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N, Coppo R. Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int* 2000; 57: 1549-59.
 31. Feria I, Pichardo I, Juárez P, Ramírez V, González MA, Uribe N, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003; 63: 43-52.
 32. Vieira JM, Jr., Noronha IL, Malheiros DM, Burdman EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplant* 1999; 68: 1746-53.
 33. Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, et al. Therapeutic role of TGF-beta-Neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 377-88.
 34. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2000; 58: 1174-85.
 35. Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 76-83.
 36. Fogo A, Hellings SE, Inagami T, Kon V. Endothelin receptor antagonism is protective in vivo acute cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1992; 42: 770-4.
 37. Hunley TE, Fogo A, Iwasaki S, Kon V. Endothelin A receptor mediates functional but not structural damage in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 1718-23.
 38. Torras J, Valles J, Sánchez J, Sabate I, Serón D, Carrera M, et al. Prevention of experimental cyclosporine nephrotoxicity by dietary supplementation with LSL 90202, a lysine salt of eicosapentaenoic acid. Role of thromboxane and prostacyclin in renal tissue. *Nephron* 1994; 67: 66-72.
 39. Bobadilla NA, Tapia E, Jiménez F, Sánchez-Lozada LG, Santamaría J, Monjardán A, et al. Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporine. *Am J Renal Physiol* 1999; 277: F464-F471.
 40. Sánchez-Lozada LG, Gamba G, Bolio A, Jiménez F, Herrera-Acosta J, Bobadilla NA. Nifedipine prevents changes in nitric oxide synthase mRNA levels induced by cyclosporine. *Hypertens* 2000; 36: 642-7.
 41. Andoh TF, Gardner MP, Bennett WM. Protective effects of dietary L-arginine supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant* 1997; 64: 1236-40.

42. Yang CW, Kim YS, Kim J, Kim YO, Min SY, Choi EJ, et al. Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 1998; 6: 50-6.
43. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga SI, Mazzali M, et al. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F727-F736.
44. Schwedler SB, Bobadilla N, Striker LJ, Vaamonde CA, Herrera-Acosta J, Striker GE. Pentosan polysulfate treatment reduces cyclosporine-induced nephropathy in salt-depleted rats. *Transplant* 1999; 68: 1583-8.
45. Asai T, Nakatani T, Yamanaka S, Tamada S, Kishimoto T, Tashiro K, et al. Magnesium supplementation prevents experimental chronic cyclosporine a nephrotoxicity via renin-angiotensin system independent mechanism. *Transplant* 2002; 74: 784-91.
46. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14552-7.
47. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999; 104: R19-R23.
48. Seok JH, Hong JH, Jeon JR, Hur GM, Sung JY, Lee JH. Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 251-4.
49. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*. USA: Saunders; 2003, p. 1057-61.
50. Ngarmukos C, Grekin RJ. Non-traditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1122-E1127.
51. Christ M, Wehling M. Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 1999; 64: 35-41.
52. Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Renal Physiol* 1999; 277: F319-F327.
53. Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P, et al. Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertens* 1996; 27: 1039-45.
54. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-17.
55. Hostetter TH, Rosenberg ME, Kren S, Greene EL. Aldosterone induces glomerular sclerosis in the remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996; 6: 1016.
56. Juknevičius I, Segal Y, Kren S, Lee R, Hostetter TH. Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am J Renal Physiol* 2004; 286: F1059-F1062.
57. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT, Jr. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertens* 1998; 31: 451-8.
58. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003; 63: 1791-800.
59. Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 1522-7.
60. Schiffrin EL, Gutkowska J, Genest J. Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptors in rats. *Am J Physiol* 1984; 246: H608-H614.
61. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertens* 1999; 33: 981-6.
62. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertens* 1993; 21: 929-33

Reimpresos:

Dra. Norma A Bobadilla
 Unidad de Fisiología Molecular
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
 Salvador Zubirán
 Vasco de Quiroga No. 15. Tlalpan
 14000, México, D.F.
 Tel: 525-485-2676
 Fax: 525-655-0382
 nab@biomédicas.unam.mx



Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity

Jazmin M. Pérez-Rojas, Stephanie Derive, Jorge A. Blanco, Cristino Cruz, Lilia Martínez de la Maza, Gerardo Gamba and Norma A. Bobadilla

AJP - Renal 289:1020-1030, 2005. First published Jul 5, 2005; doi:10.1152/ajprenal.00166.2005

You might find this additional information useful...

This article cites 68 articles, 32 of which you can access free at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/289/5/F1020#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/289/5/F1020>

Additional material and information about *AJP - Renal Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajprenal>

This information is current as of October 10, 2005 .



Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity

Jazmin M. Pérez-Rojas, Stephanie Derive, Jorge A. Blanco, Cristino Cruz, Lilia Martínez de la Maza, Gerardo Gamba, and Norma A. Bobadilla

Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Submitted 20 April 2005; accepted in final form 28 June 2005

Pérez-Rojas, Jazmin M., Stephanie Derive, Jorge A. Blanco, Cristino Cruz, Lilia Martínez De La Maza, Gerardo Gamba, and Norma A. Bobadilla. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1020–F1030, 2005. First published July 5, 2005; doi:10.1152/ajprenal.00166.2005.—We showed that spironolactone reduced structural damage and prevented renal dysfunction in chronic cyclosporine (CsA) nephrotoxicity. These findings evidenced an aldosterone renal vascular effect under this condition. To investigate aldosterone's role in modulating renal vascular tone, renocortical vasoactive pathways mRNA levels in chronic CsA nephrotoxicity as well as spironolactone's effect on renal function in acute CsA nephrotoxicity were evaluated. Two experimental sets were designed. For chronic nephrotoxicity, rats fed with low-sodium diet were divided into groups receiving vehicle, spironolactone (Sp), CsA, and CsA+Sp, for 21 days. Creatinine clearance, survival percentage, and renocortical mRNA levels of pro-renin, angiotensinogen (Ang), angiotensin receptors (AT_{1A}, AT_{1B}, and AT₂), preproendothelin, endothelin receptors (ET_A, ET_B), cyclooxygenase-2 (COX-2), and adenosine receptors (Ad₁, Ad_{2A}, Ad_{2B}, and Ad₃) were analyzed. For acute nephrotoxicity, similar groups fed with a standard chow diet for 7 days were included. Serum potassium and sodium, glomerular filtration rate (GFR), and renal blood flow (RBF) were determined. In chronic model, CsA produced pro-renin and ET upregulation, altered adenosine receptors expression, and reduced Ang, AT_{1A}, AT_{1B}, ET_B, and COX-2 mRNA levels. Spironolactone protective effect in chronic nephrotoxicity was associated with prevention of pro-renin upregulation and increased AT₂, together with ET_B reduction. In acute nephrotoxicity, spironolactone completely prevented GFR and RBF reduction induced by CsA. Our results suggest that aldosterone contributes to renal vasoconstriction observed in CsA nephrotoxicity and that renoprotection conferred by spironolactone was related to modification of renocortical vasoactive pathways expression, in which pro-renin normalization was the most evident change in chronic nephropathy. Finally, our data point to spironolactone as a potential treatment to reduce CsA nephrotoxicity in transplant patients.

renin; AT₂ receptors; COX-2; acute CsA nephrotoxicity

CYCLOSPORINE A (CsA) is a widely used immunosuppressive drug to prevent tissue allograft rejection. However, its use for long periods is limited due to its nephrotoxic effect, which is characterized by renal vasoconstriction and the development of histological lesions such as arteriopathy and scarring tubulointerstitial fibrosis (12), which in turn are associated with loss of renal function and the development of end-stage renal disease. In a large study of diabetic recipients of a kidney-

pancreas transplant, Nankivell et al. (40) observed that after 10 yr of immunosuppression with calcineurin inhibitors, all patients eventually developed nephrotoxicity.

Because CsA is considered as an excellent immunosuppressive drug (12), several therapeutic agents have been studied in animal models of chronic CsA nephrotoxicity to prevent or decrease CsA-inducing toxic renal effects. The tested agents include endothelin (32) and angiotensin inhibitors (32, 53, 66), vascular endothelial growth factor (VEGF) (29), polysulphate pentosan (52), L-arginine (2, 67), gene therapy with hepatocyte growth factor (HGF) (39), and pravastatin (34). Most of these treatments have effectively reduced either functional or structural damage induced by CsA in the kidney. For instance, although administration of losartan (53, 66), VEGF (29), HGF (39), and pentosan polysulphate (52) partially prevented the structural damage induced by CsA, these agents did not improve renal function. In contrast, blockade of the endothelin A/B receptor was effective in improving renal function as measured by creatinine clearance, but had no positive effect on CsA-induced arteriopathy and tubulointerstitial fibrosis (32). The hypocholesterolemic drug pravastatin, which also possesses anti-inflammatory and antifibrotic effects, partially reduced both structural damage and renal dysfunction induced by CsA (34), suggesting that this agent may have an unknown effect on renal vasoconstriction.

Although angiotensin II has received the greatest consideration as a mediator of cardiovascular and renal injury, there is enough evidence pointing to aldosterone as a deleterious component of the renin-angiotensin-aldosterone system in cerebral, cardiovascular, and kidney tissues. Some studies have shown that the detrimental actions of aldosterone in the kidney include hypertrophy, remodeling, and fibrosis that could be reverted by aldosterone receptor blockade (for a review, see Refs. 22 and 41). In this regard, we have shown in chronic CsA nephrotoxicity in the rat that spironolactone effectively reduced arteriopathy and fibrosis and completely prevented the reduction of the glomerular filtration rate, suggesting that aldosterone is an important mediator of both functional and structural injury in this model of nephropathy (13). The fact that spironolactone improved the glomerular filtration rate suggests that in this model aldosterone participates in promoting renal vasoconstriction. Possible mechanisms include impaired vasodilatation in response to acetylcholine (35, 55, 59), upregulation of the angiotensin II receptor (AT₁) (51, 64, 65), increased vasoconstrictor effects of catecholamines (62), and a direct aldosterone

Address for reprint requests and other correspondence: N. A. Bobadilla, Unidad de Fisiología Molecular, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 14000 México City, Mexico (e-mail: nab@biomedicas.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

effect that could be mediated through genomic and non-genomic mechanisms (4, 63). To evaluate whether aldosterone's vascular effect is through modifying the expression of vasoactive pathways, in the present study we assessed the mRNA renocortical expression of the main renal vasoactive pathways during the spironolactone's protective effect in chronic CsA nephrotoxicity.

Because chronic CsA toxicity results from a combination of vasoconstriction and structural damage, the improvement of renal function in spironolactone-treated CsA rats could result from either vasodilation and/or reduction of structural injury. In the present study, we hypothesized that if aldosterone is playing a major role in CsA-inducing renal vasoconstriction, then spironolactone should also be an effective drug to prevent acute CsA nephrotoxicity, a reversible condition in which it is known that tissue changes have not yet been established and renal vasoconstriction is the main protagonist. Thus to investigate the role of aldosterone as a modulator of renal vascular tone in CsA nephrotoxicity, we also evaluated the effect of aldosterone blockade in an acute model of nephrotoxicity.

METHODS

Protocol 1

Chronic cyclosporine nephrotoxicity. Four groups with six male Wistar rats each weighing 330–370 g were used for the study. To induce chronic nephrotoxicity, the animals were treated for 21 days and fed a low-salt diet (0.02%). *Group I* received 0.1 ml subcutaneously (sc) of olive oil as vehicle every 24 h (LS); *group II* received 20 mg·kg⁻¹·day⁻¹ of spironolactone (LS+Sp) by gastric gavage; *group III* was treated with a daily dose of CsA (30 mg/kg sc; LS+CsA); and *group IV* was formed by rats treated with cyclosporine and spironolactone (LS+CsA+Sp). The LS and LS+Sp groups were pair fed with the LS+CsA and LS+CsA+Sp groups, respectively. In addition,

six control rats fed with standard chow diet were included (C). At the end of the study (21 days), rats were placed in metabolic cages and urine that was spontaneously voided during every 24 h was collected. Serum and urine creatinine concentrations were measured with an autoanalyzer (Technicon RA-1000, Bayer, Tarrytown, NY). Renal creatinine clearances were calculated by the standard formula $C = U * V/P$, where U is the concentration in urine, V is urine flow rate, and P is plasma concentration. After urine collection, rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium and their kidneys were excised, macroscopically divided into renal cortex and medulla, frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until used.

RNA isolation. Total RNA was isolated from each renal cortex or medulla following the guanidine isothiocyanate-cesium chloride method (50). Integrity of isolated total RNA was examined by 1% agarose gel electrophoresis, and RNA concentration was determined by UV light absorbance at 260 nm (Beckman DU640, Brea, CA).

Semiquantitative RT-PCR. The relative level of pro-renin, angiotensinogen, angiotensin receptors AT_{1A}, AT_{1B}, and AT₂, preproendothelin, endothelin receptors ET_A and ET_B, cyclooxygenase-2 (COX-2), adenosine receptors Ad₁, Ad_{2A}, Ad_{2B}, and Ad₃, and β-actin mRNA expression was assessed in the renal cortex by semiquantitative RT-PCR, as previously described (5, 6, 13, 45, 57). Primer sequences are detailed in Table 1 and were custom obtained from Invitrogen (Gaithersburg, MD).

RT was carried out using 10 μg of total RNA from the renal cortex of each rat. RT was performed at 37°C for 60 min in a total volume of 20 μl using 200 U of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen), 100 pmol of random hexamers (Invitrogen), 0.5 mM of each dNTP (Sigma, St. Louis, MO), and 1× RT buffer (75 mM KCl, 50 mM Tris·HCl, 3 mM MgCl₂, and 10 mM DTT, pH 8.3). One-tenth of the RT from each individual sample was used for each PCR in 20-μl final volume reactions containing 0.2 μCi of [³²P]dCTP (~ 3,000 Ci/mmol, 9.25 MBq, 250 μCi). PCR cycles were performed in a DNA thermal cycler (Whatman Biometra, Goettingen, Germany). The control gene was amplified simultaneously in each reaction.

Table 1. Oligonucleotide sequence to amplify specific PCR fragments

Gene	Oligonucleotide Sequence	Size, bp	Reference No.
β-Actin	5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AA-3'	349	46
	5'-AGC CAT GCC AAA TGT CTC AT-3'		
Angiotensin 1 _A receptor	5'-CGT CAT CCA TGA CTG TAA AAT TTC-3'	306	38
	5'-GGG CAT TAC ATT GCC AGT GTG-3'		
Angiotensin 1 _B receptor	5'-CAT TAT CCG TCA CTG TCA AAT TG-3'	363	38
	5'-GCT GCT TAG CCC AAA TGG TCC-3'		
Preproendothelin	5'-ATG GAT TAT TTT CCC GTG AT-3'	231	1
	5'-GGG AGT GTT GAC CCA GAT GA-3'		
Endothelin A receptor	5'-ATC ACT GTC CTG AAT CTC TGC G-3'	217	1
	5'-ACC AGT CCT TCA CGT CTT GG-3'		
Endothelin B receptor	5'-TTT GCC CTC TGT TGG CTT CC-3'	325	1
	5'-CTG TAT TTA TTG CTG GAG CGG-3'		
Pro-renin	5'-CTG CCA CCT TGT TGT GTG AG-3'	264	31
	5'-CCA GTA TGC ACA GGT CAT CG-3'		
Angiotensinogen	5'-CCT CGC TCT CTG -GA CTT ATC-3'	226	31
	5'-CAG ACA CT- GAG GTG CTG TTG-3'		
COX-2	5'-GAA ATG GCT GCA GAG TTG-3'	356	60
	5'-TCA TCT AGT CTG GAG TGG-3'		
Adenosine 1 receptor	5'-CAG ATA GTG AGC CTG AGT GCT G-3'	790	25
	5'-GGT AGA TGA GGA CCA TGA GGA G-3'		
Adenosine 2A receptor	5'-AGC TTC CTC ATG GTC TTC AGA G-3'	615	25
	5'-CCC TGT GAC TAA GTG CAT GGT A-3'		
Adenosine 2B receptor	5'-CAC AGA GCT CCA TCT TTA GCC T-3'	1,281	25
	5'-GTG GGC AAG GAA GAT ACT GAA C-3'		
Adenosine 3 receptor	5'-GGT CTA CGA TCC TGT CAA GGA C-3'	640	25
	5'-AGT CCC ACC AGA AAG GAC ACTA-3'		

COX-2, cyclooxygenase-2.

Amplification kinetics for pro-renin, angiotensinogen, angiotensin receptors AT_{1A} , AT_{1B} , and AT_2 , preproendothelin, endothelin receptors ET_A and ET_B , COX-2, adenosine receptors Ad_1 , Ad_{2A} , Ad_{2B} , and Ad_3 and β -actin in renal cortex. The optimal number of cycles for each primer pair was assessed through kinetic amplification determination. To analyze the PCR products, one-half of each reaction was electrophoresed in a 5% acrylamide gel. Bands were ethidium bromide stained and visualized under UV light, cut out, suspended in 1 ml of scintillation cocktail (Ecolume, ICN, Aurora, OH), and counted by liquid scintillation (Beckman LS6500, Fullerton, CA). All reactions were performed individually from each cortex's total RNA in duplicate. Genomic DNA contamination was checked by treating all RNA samples with RNase-free DNAase I and by carrying samples through the PCR procedure without adding RT.

Protocol 2

Acute cyclosporine nephrotoxicity. Four groups of 10 male Wistar rats weighing 330–370 g fed a standard chow diet were included. Animals were subjected to the following daily treatments for 7 days: *group I* included rats that received 0.1 ml olive oil as vehicle (V); *group II* consisted of rats treated with 20 mg·kg⁻¹·day⁻¹ of spironolactone (Sp) by gastric gavage; *group III* was formed by rats that received CsA 30 mg/kg sc (CsA); and *group IV* was formed by rats treated with CsA and spironolactone (CsA+Sp). V and Sp groups were pair fed. All procedures were in accordance with our institutional guidelines for animal care.

Functional studies. At the end of the study (7 days), rats from *protocol 2* were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30 mg/kg) and placed on a homeothermic table to maintain the core body temperature at 37°C by means of a rectal probe attached to a temperature regulator that is, in turn, attached to a homeothermic blanket. The trachea, both jugular veins, and femoral arteries were catheterized with PE-240 and PE-50 polyethylene tubing. The bladder was cannulated with PE-50. Rats were maintained under euolemic conditions by infusing 10 ml·kg⁻¹·g body wt⁻¹ isotonic rat plasma during surgery, followed by an infusion of 5% polyfructosan, (Inutest, Laevosan-Gesellschaft, Linz, Austria) at 2.2 ml/h. Mean arterial pressure was monitored with a pressure transducer (model p23 db, Gould) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA). Via a midline abdominal incision, the left renal artery was exposed. An ultrasound transit-time flow probe (1RB, Transonic, Ithaca, NY) was placed around the left renal artery and filled with ultrasonic coupling gel (HR Lubricating Jelly, Carter-Wallace, New York, NY) for recording renal blood flow (RBF). After an equilibration period of 60 min, care was taken to avoid dead space in the bladder, urine was drained from the bladder by gravity and collected for 30–60 min, and blood samples were taken at the

beginning and at the end of each urine collection period. Intest concentrations in urine and plasma were determined by the Davidson et al. technique (9).

Statistical Analysis

Results are presented as means \pm SE. The significance of the differences between groups was tested by ANOVA using Bonferoni's correction for multiple comparisons. Statistical significance was defined when the *P* value was <0.05.

RESULTS

Chronic CsA Nephrotoxicity

Figure 1 shows the effect of spironolactone administration on survival percentage and body weight of the rats chronically treated with cyclosporine and fed a low-sodium diet. LS-CsA rats exhibited a significant reduction in survival rate by 50% (Fig. 1A). The CsA-inducing mortality was completely prevented with the simultaneous administration of spironolactone, because the survival of LS-CsA+Sp group was 100%. Figure 1B shows the evolution of body weight. LS-CsA induced a progressive body weight loss from *day 2* to *day 10* of treatment. Subsequently, body weight was maintained until the end of the study. The rats that received LS-CsA+Sp presented a similar pattern of body weight loss in the first 8 days; however, after *day 10*, these animals gained weight. These results suggest that aldosterone receptor blockade maintains LS-CsA+Sp-treated rats in better general health conditions than LS-CsA.

Figure 2 depicts creatinine clearance determined in the five groups at the end of the study. Sodium restriction or sodium restriction and spironolactone did not produce a significant change in renal function compared with control animals. As we previously reported (13), rats receiving CsA treatment presented a significant reduction of renal function by 59% compared with vehicle-treated rats. This reduction was completely prevented by spironolactone administration, because creatinine clearance in the LS-CsA+Sp group was not different from that shown in the control groups. We have previously shown (13) that the protective effect of spironolactone is not associated with a significant increase in serum potassium. In this study, similar results were obtained. Serum potassium levels in CsA-treated rats were 5.5 ± 0.3 meq/l and in CsA+spironolactone-

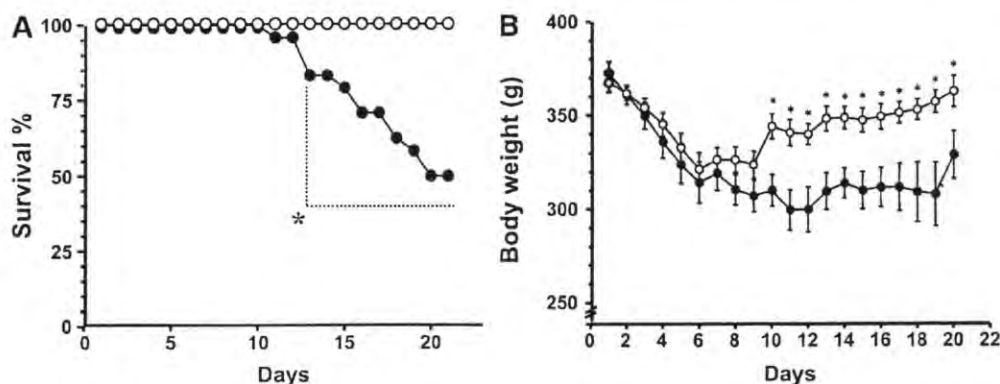


Fig. 1. Administration of spironolactone to rats in chronic cyclosporine (CsA) nephrotoxicity improved survival percentage (A) and body weight gain (B) during study. Low-salt diet plus cyclosporine (LS+CsA)-treated group is represented by filled circles and low-salt diet plus CsA plus spironolactone (LS+CsA+Sp)-treated group by open circles. **P* < 0.05 vs. LS+CsA group.

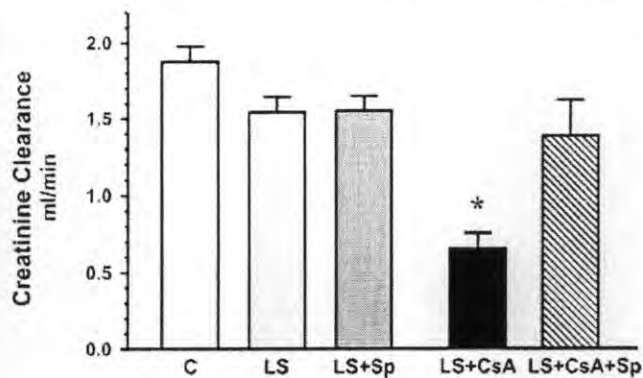


Fig. 2. Mineralocorticoid receptor blockade prevented renal dysfunction in rats with chronic CsA nephrotoxicity. All groups were fed a low-sodium diet, except the control group (C), which was fed with standard chow diet (open bar). In this figure and in Figs. 4–7, vehicle-treated rats are represented by a light gray bar (LS), spironolactone-treated rats by a dark gray bar (LS+Sp), the group with chronic CsA nephrotoxicity by a black bar (LS+CsA), and rats that received simultaneously CsA and spironolactone by a hatched bar (LS+CsA+Sp). * $P < 0.05$ vs. all studied groups.

treated animals were 5.5 ± 0.2 meq/l ($P =$ not significant). In addition, we (13) and others (10, 15, 42, 68) have previously shown that CsA nephrotoxicity is not associated with changes in urinary protein excretion.

Renocortical Expression of Vasoconstrictor Factors

Renocortical mRNA levels of vasoconstrictor pathways were assessed by semiquantitative RT-PCR by using the specific primers detailed in Table 1. As shown in Fig. 3, the amplification kinetics for each primer pair were determined. The optimal number of cycles to amplify each cDNA fragment was calculated by using the middle point of the exponential phase, as stated in each graph. All results are shown as the ratio between each amplified cDNA fragment and β -actin, which was used as a housekeeping gene.

Angiotensin pathway. The mRNA levels of angiotensinogen, pro-renin, and angiotensin receptors AT_{1A} , AT_{1B} , and AT_2 in the renal cortex for the five groups studied are shown in Fig. 4. The activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) with a low-sodium diet induced a significant increase in mRNA levels of pro-renin (0.7 ± 0.03 vs. 0.5 ± 0.03 , $P < 0.01$) and AT_{1A} (2.9 ± 0.4 vs. 1.7 ± 0.2) and AT_{1B} receptors (3.4 ± 0.1 vs. 1.6 ± 0.1). Mineralocorticoid receptor blockade in LS rats prevented AT_{1A} (ratio was 1.9 ± 0.2) and, partially, AT_{1B} upregulation induced by sodium restriction (ratio 2.8 ± 0.1).

Chronic CsA administration produced a significant reduction (nearly one-half) in the renocortical expression of the most components of the angiotensin pathway, compared with the LS group, except for pro-renin that, in contrast, was significantly

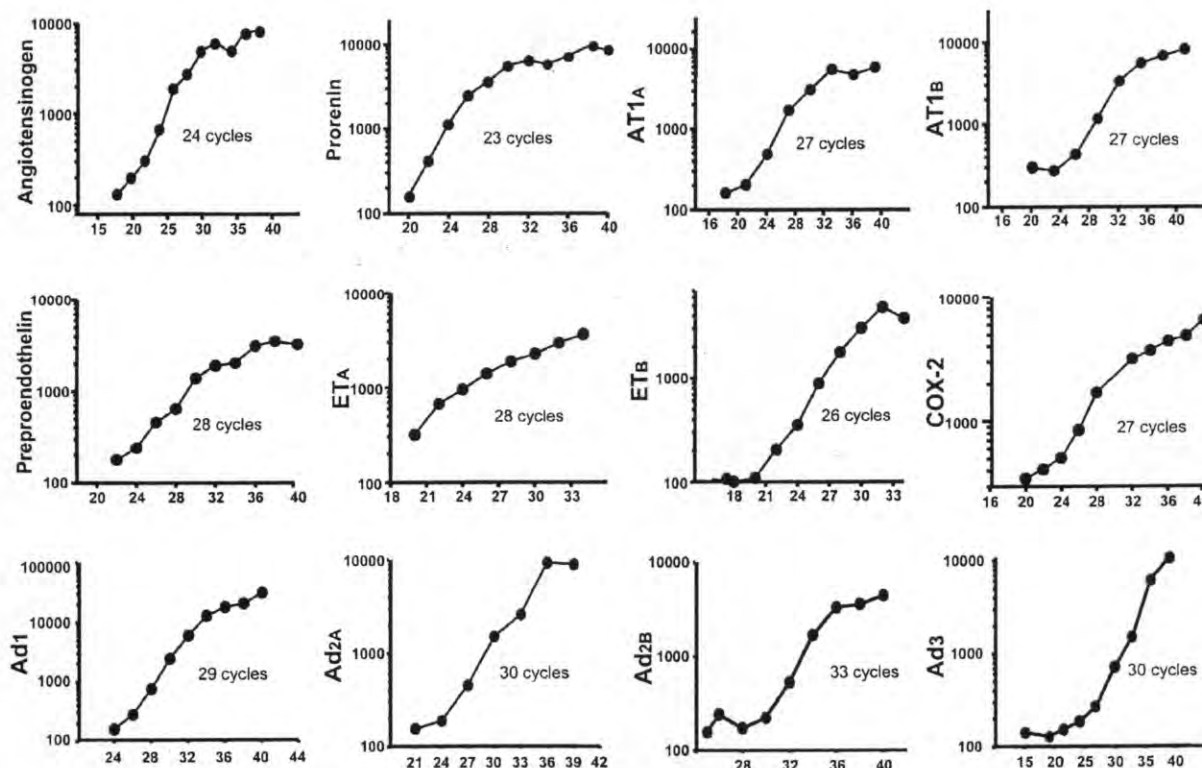


Fig. 3. Amplification kinetics of the vasoactive pathways studied. For each primer pair, PCR products were obtained at several cycles and resolved in acrylamide gels. Ethidium bromide-stained bands were cut, and radioactivity was determined by liquid scintillation counting. PCR product is expressed as log of the incorporated [α - 32 P]dCTP in bands excised from the gel. The optimal number of cycles to amplify each cDNA fragment was calculated by using the middle point of the exponential phase as stated in each graph. AT_{1A} and AT_{1B} , angiotensin receptors; ET_A and ET_B , endothelin receptors; COX-2, cyclooxygenase-2; Ad $_1$, Ad $_2A$, Ad $_2B$, and Ad $_3$: adenosine receptors.

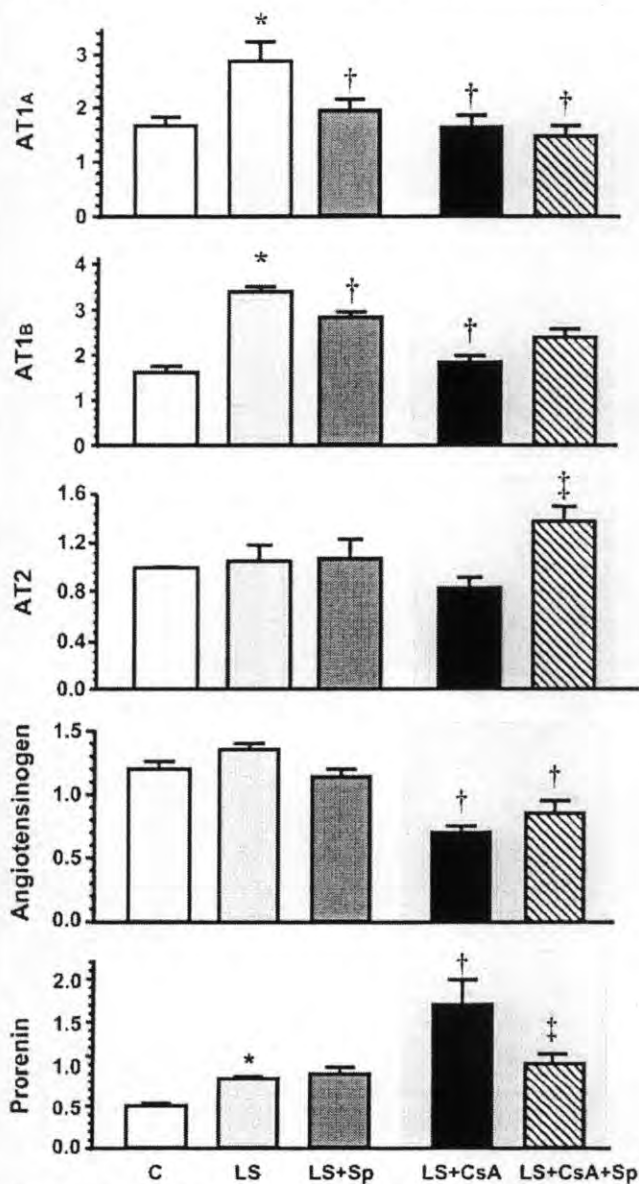


Fig. 4. Effect of a low-sodium diet, spironolactone, and chronic CsA on renocortical mRNA levels of angiotensinogen (Ang), pro-renin, and angiotensin receptors AT_{1A}, AT_{1B}, and AT₂ expressed as the ratio between each analyzed gene and β -actin as a housekeeping gene. * $P < 0.05$ vs. C group. † $P < 0.05$ vs. LS group. ‡ $P < 0.05$ vs. LS+CsA group.

upregulated. The percent reductions for angiotensinogen, AT_{1A}, and AT_{1B} were 50, 45, and 48%, respectively, whereas pro-renin increased more than twofold (ratio 1.6 ± 0.2 vs. 0.7 ± 0.03). Interestingly, spironolactone prevented pro-renin upregulation together with a significant increase in AT₂ receptor by 64%. Thus Fig. 4 shows that 1) during sodium depletion, aldosterone seems to regulate AT_{1A} and, partially, AT_{1B} mRNA receptor expression; 2) chronic CsA administration enhanced pro-renin mRNA expression and reduced angiotensinogen, AT_{1A}, and AT_{1B}; and 3) spironolactone protection was associated with the restoration of pro-renin and increased AT₂ mRNA levels.

Endothelin pathway. The mRNA levels of preproendothelin and ET_A and ET_B receptors in the studied groups are depicted in Fig. 5. A low-sodium diet did not modify the expression of preproendothelin and ET_A but induced a significant increase in the ET_B/ β -actin ratio compared with the control group (1.7 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1 , respectively, $P < 0.05$). CsA administration induced a significant increase in preproendothelin mRNA levels by 40%, together with a reduction in the ET_B receptor by 25%. Intriguingly, mineralocorticoid receptor blockade in rats with CsA nephrotoxicity did not modify endothelin upregulation but reduced ET_A and normalized ET_B mRNA levels. These observations together suggest that 1) during sodium restriction, the ET_B receptor is regulated by renin-angiotensin activation but not by aldosterone, 2) CsA enhanced preproendothelin expression and reduced the vasodilator ET_B receptor, and 3) the protective effect of spironolactone during chronic CsA nephrotoxicity was associated with a reduction in vasoconstrictor receptor (ET_A) and reestablishment of endothelin vasodilator receptor expression (ET_B) without modification of endothelin upregulation.

Adenosine receptors. Figure 6 shows adenosine receptor mRNA levels in the renal cortex. The activation of RAAS by sodium restriction induced a significant increase in all adenosine receptor mRNA levels compared with levels in rats fed a normal-salt diet. The percentage of increment for Ad₁, Ad_{2A},

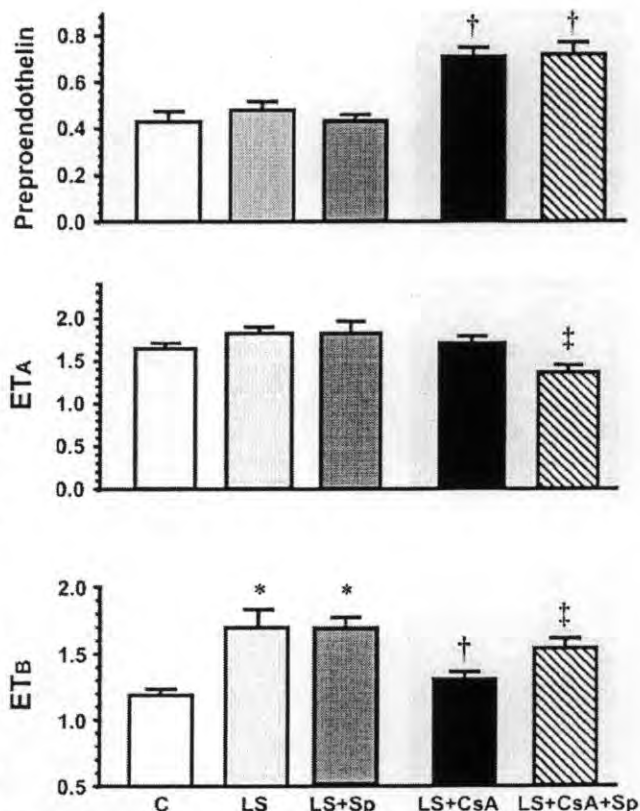


Fig. 5. Effect of sodium restriction and CsA on endothelin pathway. The semiquantitative RT-PCR analysis showing the ratio of preproendothelin/ β -actin (top), ET_A/ β -actin (middle), and ET_B/ β -actin (bottom) in chronic CsA nephrotoxicity. * $P < 0.05$ vs. C group. † $P < 0.05$ vs. LS group. ‡ $P < 0.05$ vs. LS+CsA group.

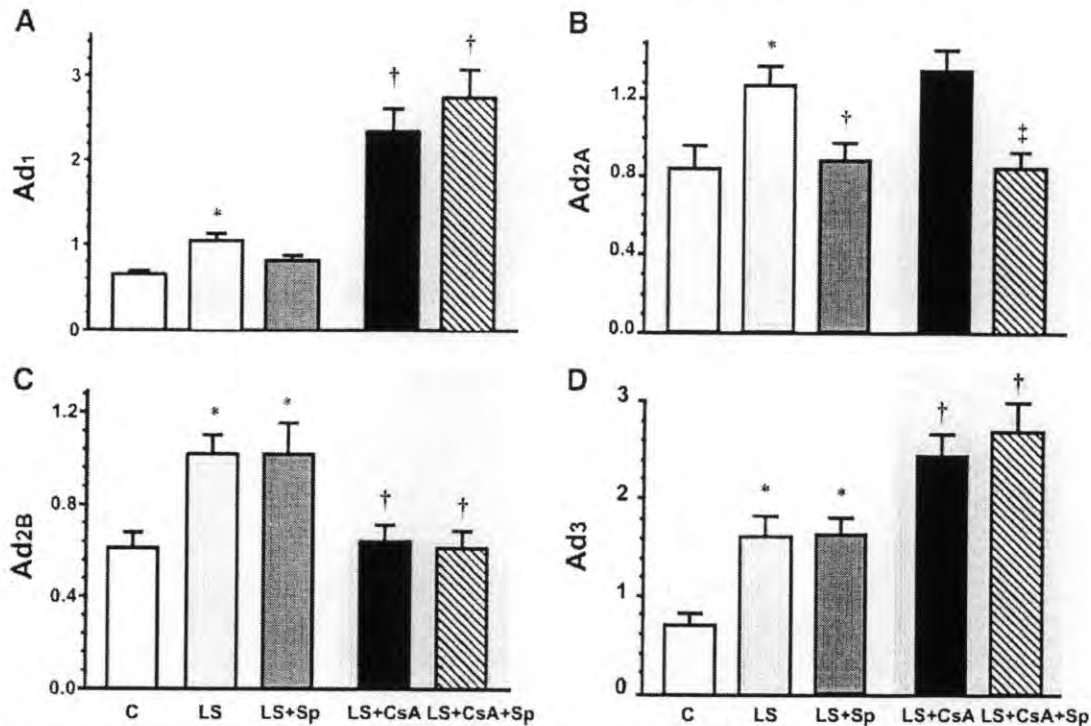


Fig. 6. Renocortical upregulation of adenosine receptors by sodium restriction and effect of chronic CsA and spironolactone administration. Values are means \pm SE of Ad₁/ β -actin (A), Ad_{2A}/ β -actin (B), Ad_{2B}/ β -actin (C), and Ad₃/ β -actin (D) ratios. * P < 0.05 vs. C group. † P < 0.05 vs. LS group. ‡ P < 0.05 vs. LS+CsA group.

Ad_{2B}, and Ad₃ was 58, 53, 67, and 120%, respectively. In rats fed a low-sodium diet, spironolactone prevented only Ad_{2A} upregulation. In contrast, CsA administration produced significant changes in the expression pattern of adenosine receptors compared with rats fed with LS. In the LS-CsA group, Ad₁ and Ad₃ mRNA expression increased by 3.4- and 0.6-fold, respectively, because the Ad₁/ β -actin ratio was 2.4 ± 0.3 in the LS-CsA vs. 0.7 ± 0.1 in the LS group and the Ad₃/ β -actin ratio was 2.5 ± 0.2 vs. 1.6 ± 0.2 , respectively. Ad_{2A} mRNA levels were not affected by CsA. In contrast, Ad_{2B} mRNA levels were significantly reduced in the LS-CsA group compared with rats fed a low-sodium diet, 0.6 ± 0.1 vs. 1.0 ± 0.1 (P < 0.05). All these changes in adenosine receptors induced by CsA were not modified by spironolactone, except for Ad_{2A}, where a similar effect than in the LS group was observed. All these findings together suggest that 1) adenosine receptor mRNA expression is regulated by RAAS and, specifically, Ad_{2A} is modulated by aldosterone, in view of the fact that spironolactone prevented Ad_{2A} upregulation in the control group and during chronic CsA nephrotoxicity; 2) CsA nephrotoxicity was associated with upregulation of Ad₁ and Ad₃, accompanied by Ad_{2B} downregulation; and 3) the protective effect of spironolactone in chronic CsA nephrotoxicity is not related to changes in the expression pattern of adenosine receptors.

COX-2 expression. COX-2 mRNA levels are depicted in Fig. 7. As has been previously reported (7), sodium restriction induced an increase in COX-2 mRNA levels by 64%. Intriguingly, spironolactone administration induced a further increase in COX-2 expression by 40%. CsA administration produced a remarkable downregulation of COX-2 mRNA levels from

1.8 ± 0.1 to 0.6 ± 0.1 . This reduction was not reversed by spironolactone administration. These results emphasize that 1) COX-2 is regulated by RAAS and 2) COX-2 downregulation induced by CsA was not prevented by spironolactone.

Acute CsA Nephrotoxicity

Table 2 shows the physiological parameters of the rats that were included in protocol 2, in which aldosterone's role in acute CsA nephrotoxicity was evaluated. At the end of the study, there was no difference in body weight, as well as in serum sodium and potassium, among the four groups studied.

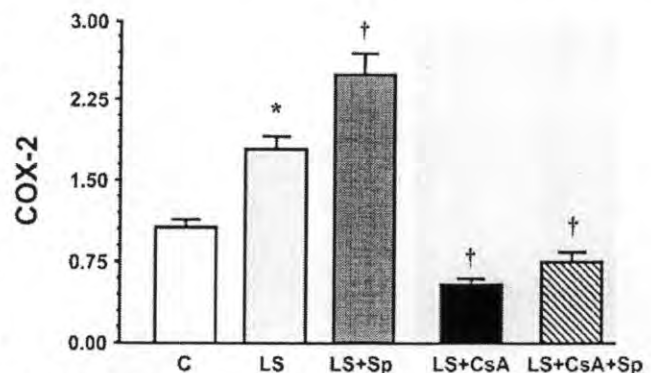


Fig. 7. Effect of a low-sodium diet, spironolactone, and chronic CsA on COX-2 mRNA levels in renal cortex assessed by RT-PCR. Each bar represents the ratio mean value \pm SE of COX-2/ β -actin in the 5 studied groups. * P < 0.05 vs. C group. † P < 0.05 vs. LS group.

Table 2. Physiological parameters in acute cyclosporine nephrotoxicity

Group	BW, g	MAP, mmHg	GFR, ml·min ⁻¹ ·100 g BW ⁻¹	Serum Na ⁺ , meq/l	Serum K ⁺ , meq/l
V	305 ± 7	112.6 ± 2.8	0.75 ± 0.05	145.8 ± 2.4	3.9 ± 0.2
Sp	303 ± 12	112.1 ± 6.3	0.71 ± 0.07	152.4 ± 5.6	4.2 ± 0.1
CsA	311 ± 8	97.2 ± 6.5*	0.28 ± 0.04*	142.5 ± 2.1	4.3 ± 0.3
CsA + Sp	324 ± 12	109.9 ± 2.3†	0.64 ± 0.07	137.4 ± 2.7	4.5 ± 0.2

Values are means ± SE. BW, body wt; MAP, mean arterial pressure; GFR, glomerular filtration rate; V, vehicle; Sp, spironolactone; CsA, cyclosporine A. * $P < 0.05$ vs. V. † $P < 0.05$ vs. CsA.

CsA-treated rats presented mean arterial pressure values significantly lower than the vehicle group. This difference was not observed in rats treated with CsA+Sp.

Figure 8A depicts the mean values of the total glomerular filtration rate, and Table 2 shows the glomerular filtration rate values corrected by body weight for the four groups studied. Spironolactone did not modify renal function in control rats (2.1 ± 0.2 vs. 2.3 ± 0.1 ml/min). As expected, CsA administration for 7 days significantly reduced glomerular filtration rate (0.8 ± 0.1 ml/min). As we have shown in chronic CsA nephrotoxicity (13), spironolactone administration completely prevented glomerular filtration rate reduction in rats treated with CsA (1.9 ± 0.1 ml/min). As shown in Fig. 8B, RBF recorded in the left renal artery was 6.1 ± 0.5 ml/min in control rats and 6.0 ± 0.1 ml/min in spironolactone-treated animals. Thus control rats receiving spironolactone had RBF values similar to the control group. Because RBF was assessed only in one kidney, it is reasonable that total RBF was about twice these numbers. CsA produced an intense renal vasoconstriction as evidenced by the reduction of RBF compared with the control group, 3.1 ± 0.5 vs. 6.1 ± 0.5 ml/min, respectively ($P < 0.05$). This reduction was abrogated by concomitant administration of spironolactone and CsA, 5.7 ± 0.7 ml/min. Thus these findings, together with our previous observations (13), support the hypothesis that aldosterone regulates renal vascular tone in both acute and chronic CsA nephrotoxicity.

DISCUSSION

In this study we showed that mineralocorticoid receptor blockade prevents acute CsA nephrotoxicity that was evi-

denced by restoration of the glomerular filtration rate and RBF to normal values. In addition, we also found that spironolactone modifies the expression of certain receptors that mediate vasoconstrictor or vasodilator actions that, together with the reduction of pro-renin expression, might contribute to reduce the renal vasoconstriction observed in chronic CsA nephrotoxicity.

Cells in the distal tubule and cortical collecting duct that express mineralocorticoid receptor were considered for a long time as the unique cellular target of aldosterone in the kidney. However, it is now clear that many other cell types in the kidney and other epithelial and nonepithelial tissues are also potential targets for aldosterone. In this regard, mineralocorticoid receptor has been detected in glomerulus, afferent and efferent arterioles (3, 56), as well as in the cardiovascular system, brain, and vasculature (for a review, see Ref. 48). Moreover, clinical and experimental studies have established that aldosterone plays a major role in the pathophysiology of cardiovascular and renal disease (14, 43, 47, 48, 69). Specifically, aldosterone has been associated with the fibrotic process. Of note is the fact that induction of chronic CsA nephrotoxicity in rats requires that animals are fed a low-salt diet, a maneuver that activates the RAAS, suggesting that activation of this axis provides the proper setting for CsA to express its full potential toxicity. In this regard, our previous observation (13) that spironolactone markedly reduces the renal damage induced by CsA suggests that aldosterone, and not angiotensin II, is the main hormone involved in this mechanism.

The fact that spironolactone not only reduced structural injury in chronic CsA nephrotoxicity but also completely prevented renal dysfunction suggests that aldosterone also participates in regulating renal vascular tone (13). To address this issue, we reasoned that mineralocorticoid receptor blockade should prevent acute CsA nephrotoxicity, a condition in which renal vasoconstriction is the main protagonist. We observed in the present study, using a model for acute CsA nephrotoxicity, that spironolactone administration completely prevented the fall in glomerular filtration rate that was accompanied by reestablishment of RBF. Thus these data, together with our previous observations in chronic CsA toxicity, show that mineralocorticoid receptor blockade prevents renal vasoconstriction, suggesting that aldosterone participates in renal homodynamic effect of CsA.

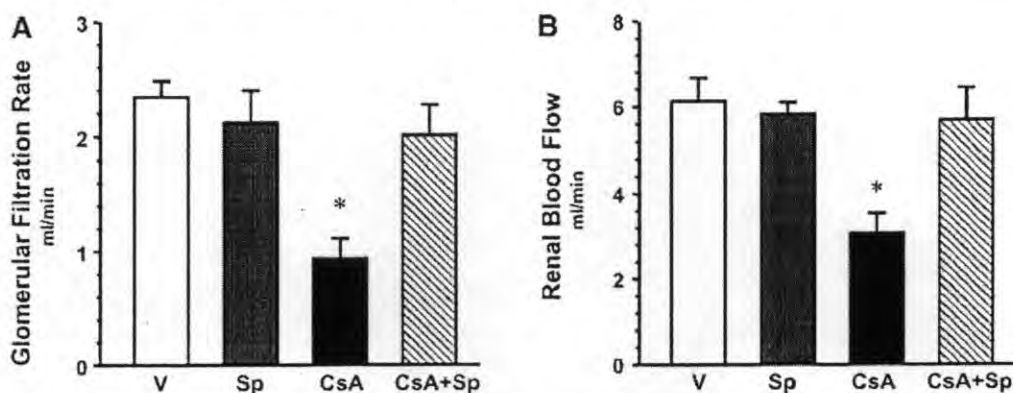


Fig. 8. Effect of mineralocorticoid receptor blockade in acute cyclosporin nephrotoxicity. A: glomerular filtration rate estimated by inulin. B: renal blood flow in the left kidney recorded by a probe placed around the renal artery. Open bars, vehicle-treated rats; dark gray bars, spironolactone-treated rats; black bars, rats with acute CsA nephrotoxicity; hatched bars, rats that simultaneously received CsA and spironolactone. * $P < 0.05$ vs. all studied groups.



Recent reports have documented that aldosterone exerts its actions by genomic and nongenomic mechanisms. The first is dependent on the classic mineralocorticoid receptor that promotes or prevents the transcription of certain genes, whereas the second seems to be mediated by a "membrane unknown receptor" that mediates fast actions independently of gene transcription (for a review, see Ref. 41). Our results with acute and chronic CsA nephrotoxicity support the notion that aldosterone contributes to renal vasoconstriction by a conventional genomic mechanism, because spironolactone effectively prevented the fall of the glomerular filtration rate in these models. However, we cannot exclude that other mediators are implicated. In this regard, Li et al. (34) recently showed that pravastatin reduced renal damage and improved renal function in chronic CsA nephrotoxicity, evidencing that in addition to its anti-inflammatory properties, pravastatin may modify renal vasoconstriction through mechanisms that have not been defined. Although in both Li et al. (34) and the present study, CsA toxicity was associated with a significant increase in renin expression, which pravastatin did not reverse, whereas spironolactone completely prevented renin upregulation. Thus the distinctive effect of pravastatin and spironolactone on renin expression suggests that these compounds may improve renal function in CsA-treated rats through different mechanisms.

Possible mechanisms by which aldosterone could regulate vascular tone include increased catecholamine vasoconstrictor effect (62), impaired vasodilation in response to acetylcholine (35, 55, 59), and upregulation of angiotensin II receptors (51, 64, 65). Taking all these together, we reasoned that aldosterone might regulate vascular tone by altering the renal expression of vasoactive pathways, that is, by either increasing the expression of vasoconstrictor, reducing expression of vasodilator pathways, or both. Thus the effect of spironolactone on renin mRNA expression of vasoactive hormones or their receptors was analyzed in chronic CsA nephrotoxicity.

Sodium restriction by itself, however, is known to modify the expression of vasoactive pathways within the kidney. Thus a control group fed a standard chow diet was included. Indeed, we observed that the rats fed a low-sodium diet developed changes in the mRNA expression pattern of several transcripts compared with rats fed a normal-sodium diet. Interestingly, some of these changes were abrogated when the animals were treated with spironolactone, suggesting that aldosterone is regulating the correspondent vasoactive pathways, as we discuss below.

Renin-Angiotensin Pathway

Angiotensin II, the major effector of the RAAS, is involved in a series of physiological and pathophysiological events, particularly in the kidney. All the components of RAAS are present within the kidney. Angiotensin II actions are mediated by stimulation of subtype receptors, namely, the AT₁ and AT₂ receptors. However, in some instances AT₂ receptor activation counteracts the effects of the AT₁ receptor. Thus the ratio between AT₁ and AT₂ receptor expression should be considered. The AT₁ receptor is a member of the superfamily of G protein-coupled receptors that stimulate the activity of protein kinase C and release of inositol triphosphate. This receptor is present in glomerular mesangial cells, proximal and distal tubular epithelia, and renal vasculature. The stimulation of the

renal AT₁ receptor in the kidney induces vasoconstriction, sodium reabsorption, and cell growth. AT₂ is also a G-coupled receptor that activates protein phosphotyrosine phosphatase and is located in renal vasculature, glomeruli, juxtaglomerular apparatus, and tubules. In afferent arterioles, AT₂ receptor stimulation causes vasodilation, whereas in renal tubules it contributes to sodium excretion and pressure-natriuresis (for a review, see Ref. 54).

In this study, we corroborated a kidney-specific regulation by using a low-sodium diet of several components of the angiotensin II pathway, as has been previously described (27, 61). Sodium depletion was associated with increased mRNA levels of pro-renin, AT_{1A}, and AT_{1B} receptors but did not influence angiotensinogen and AT₂ receptor expression. Some of these changes were prevented by spironolactone, such as upregulation of the AT_{1A} and, partially, AT_{1B} receptor (Fig. 4), suggesting that aldosterone mediates the upregulation of these receptors when the RAAS is activated. Interestingly, CsA nephrotoxicity reduced most of the component expression of this pathway, except pro-renin, which was significantly upregulated. The beneficial effect of spironolactone was associated with prevention of pro-renin upregulation and increased expression of the vasodilator AT₂ receptor. In this regard, Klar et al. (30) have shown in primary cultures of mouse juxtaglomerular cells that aldosterone enhanced pro-renin mRNA levels. These observations together suggest that the prevention of renal failure, which is associated with increased RBF induced by spironolactone in CsA nephrotoxicity, is at least partially due to the reduction of pro-renin expression and thus RAAS activity, together with increased expression of the AT₂ receptor (Fig. 4), which is known to mediate renal vasodilation, thus counteracting the vasoconstrictor state induced by CsA.

Endothelin Pathway

Endothelin-1 (ET-1) is a potent endothelial-derived vasoconstrictor and sodium reabsorption-regulating peptide. In the kidney, ET-1 is synthesized in the endothelium of the renal vasculature, mesangial cells, peritubular capillaries, and in the epithelium of the proximal tubule, medullary thick ascending limb, and inner medullary collecting duct. The biological effects of ET-1 are mediated by specific membrane receptors. ET_A receptors are predominantly distributed in the vasculature of glomeruli and medulla, whereas ET_B receptors are present in the renal tubules and collecting ducts (for a review, see Ref. 37). Whether relaxation or constriction is predominantly elicited by endogenous ET-1 may depend on the concentration of ET-1 in vascular beds and the density of ET receptor subtypes in endothelial and smooth muscle cells (28).

In the present study, we observed that a low-salt diet induced upregulation of the ET_B receptor in the renal cortex. This effect was not reversed by spironolactone. In this regard, similar results were observed by Vanni et al. (58) in the renal medulla, suggesting that sodium restriction modulates ET_B expression. Several studies have pointed to the endothelin as a key molecule that promotes CsA renal vasoconstriction (8, 23, 33, 36, 44). In fact, we found that CsA administration produced a significant upregulation of preproendothelin and reduction of ET_B receptor mRNA levels. This combination probably results in increased renal vasoconstriction induced by endothelin due, on the one hand, to an increased expression of endothelin and



on the other hand to a reduced expression of the ET_B receptor that is believed to promote vasodilation. The effect of CsA on endothelin expression was not prevented by mineralocorticoid receptor blockade, but significant changes in endothelin receptors were observed in such a way that expression of ET_A that is known to mediate vasoconstriction is reduced, whereas expression of the ET_B receptor is increased. Thus although increased expression of endothelin was not affected by spironolactone, it is possible that endothelin-induced vasoconstriction is reduced due to the switch in ET receptor expression.

Adenosine Pathway

Extracellular actions of adenosine are mediated by four types of G protein-coupled receptors, known as Ad_1 , Ad_{2A} , Ad_{2B} , and Ad_3 . In most blood vessels including the kidney vasculature, adenosine elicits marked vasodilatation, and this effect is mediated by Ad_{2A} and Ad_{2B} . In contrast, a clear vasoconstrictor effect is observed when adenosine binds to the Ad_1 receptor. In the kidney, Ad_1 is predominantly expressed in afferent arterioles, whereas Ad_{2A} and Ad_{2B} are present in all preglomerular vessels and in descending vasa recta (for a review, see Ref. 16). A preliminary study in acute CsA toxicity (20) suggested that the adenosine 1 receptor blocker 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine may have a protective effect in normal, diabetic, and hypertensive animals.

We observed that sodium restriction produced a significant upregulation of the adenosine receptors, but only Ad_{2A} was prevented by spironolactone, suggesting that expression of this receptor is regulated by aldosterone. Interestingly, renal vasoconstriction induced by CsA was associated with a significant increase in Ad_1 mRNA levels and reduction of the vasodilator receptor Ad_{2B} . These changes were not corrected by the selective blockade of the mineralocorticoid receptor, suggesting that the observed changes in adenosine receptor mRNA expression during CsA toxicity are not induced by genomic actions of aldosterone.

COX-2

In renal tissue, prostaglandins are also important mediators of vascular tone, salt and water balance, and renin release. The rate-limiting enzyme cyclooxygenase initiates the metabolism of arachidonic acid to PG_2 and subsequently to PGH_2 , which is then further metabolized by tissue-specific isomerases to diverse PGs and thromboxanes. There are at least two distinct cyclooxygenases, COX-1 and COX-2, which are the products of different genes and exhibit distinct patterns of expression and regulation. COX-2 mRNA and immunoreactive protein have been observed in cells of the macula densa and in scattered cells in the cortical thick ascending limb cells immediately adjacent to the macula densa. In human kidney, COX-2 expression has also been noted in podocytes and arteriolar smooth muscle cells (for a review, see Ref. 19). There is convincing evidence to suggest that COX-2-derived prostanoids are involved in the regulation of renin synthesis and secretion in the juxtaglomerular apparatus, as well as in tubular salt and water handling (17, 18, 26, 49). Macula densa cells regulate afferent arteriolar tone and renin release by sensing luminal chloride via the $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter. When intraluminal salt concentration in the macula densa is low, renin synthesis and release are increased by a process in which

induction of COX-2 has been proposed to be required (19), because administration of nonspecific COX inhibitors blunt increases in renin release mediated by the macula densa (19). Thus, in addition to salt depletion, high-renin states are seen with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin receptor blockers, diuretic administration, or increased COX-2 expression (17, 18, 26, 49). In agreement with all these studies, we observed that sodium restriction was associated with cortical COX-2 upregulation; intriguingly, mineralocorticoid receptor blockade further increased COX-2 expression, suggesting that aldosterone downregulates COX-2 mRNA levels during sodium depletion. In contrast, CsA-treated rats presented a remarkable reduction of cortical COX-2 expression. A similar observation was made by Hoehler et al. (21). Thus this particular situation represents a state of a high renin induced by both a low-sodium diet and the direct effect of CsA, but with reduction of COX-2 mRNA levels, suggesting that renin expression could be regulated by mechanisms independent of COX-2. Indeed, CsA as an inhibitor of calcineurin phosphatase inhibits the nuclear factor of activated T cells signaling pathway. This pathway also regulates COX-2 gene expression (11, 21, 24). Thus spironolactone was not able to prevent COX-2 downregulation, suggesting that suppression of COX-2-dependent prostanoid formation is not critical for maintaining vascular tone in chronic CsA nephrotoxicity.

In summary, this study shows that the prevention of renal vasoconstriction by spironolactone could be mediated, in part, by inducing changes in the expression pattern of vasoactive pathways that might reestablish the imbalance between vasoconstrictors and vasodilators observed in chronic CsA nephrotoxicity. The major changes observed in our study of vasoactive pathways were the upregulation of pro-renin mRNA and the downregulation of ET_B receptor expression induced by CsA and that spironolactone prevented both changes, suggesting that aldosterone receptor activity is involved. In addition, we observed that aldosterone participates in producing renal vasoconstriction during acute CsA nephrotoxicity. All our findings together pointed to spironolactone as a potential treatment to prevent or reduce CsA nephrotoxicity in transplant patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and discussion.

GRANTS

This work was supported by research grants C01-40182 and IN208602 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and National University of Mexico (DGAPA), respectively, to N. A. Bobadilla.

Part of this work was presented at the 36th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 12–17, 2003, San Diego, CA, and Experimental Biology 2005, April 2–6, 2005, San Diego, CA.

REFERENCES

1. Abassi Z, Gurbanov K, Rubinstein I, Better OS, Hoffman A, and Winaver J. Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F766–F774, 1998.
2. Andoh TF, Gardner MP, and Bennett WM. Protective effects of dietary L-arginine supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 64: 1236–1240, 1997.



3. Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, Satoh F, Takeuchi K, and Ito S. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 14: 2255–2263, 2003.
4. Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Urano A, Satoh F, Takeuchi K, and Ito S. Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. *Hypertension* 43: 352–357, 2004.
5. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, and Herrera-Acosta J. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F791–F798, 1998.
6. Bobadilla NA, Herrera JP, Merino A, and Gamba G. Semi-quantitative PCR: a tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch Med Res* 28: 55–60, 1997.
7. Castrop H, Kammerl M, Mann B, Jensen BL, Kramer BK, and Kurtz A. Cyclooxygenase 2 and neuronal nitric oxide synthase expression in the renal cortex are not interdependent in states of salt deficiency. *Pflügers Arch* 441: 235–240, 2000.
8. Cavarape A, Endlich K, Feletto F, Parekh N, Bartoli E, and Steinhilber M. Contribution of endothelin receptors in renal microvessels in acute cyclosporine-mediated vasoconstriction in rats. *Kidney Int* 53: 963–969, 1998.
9. Davidson DW and Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62: 351–356, 1963.
10. Desassis JF, Raats CJ, Bakker MA, Van Den BJ, and Berden JH. Antiproteinuric effect of cyclosporin A in adriamycin nephropathy in rats. *Nephron* 75: 336–341, 1997.
11. Duque J, Fresno M, and Iniguez MA. Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 280: 8686–8693, 2005.
12. European Renal Association; European Society for Organ Transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 15, Suppl 7: 1–85, 2000.
13. Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, Gonzalez MA, Uribe N, Garcia-Torres R, Lopez-Casillas F, Gamba G, and Bobadilla NA. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63: 43–52, 2003.
14. Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, and Ishibashi S. Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 66: 1493–1502, 2004.
15. Guray M, Sarioglu S, Turkmen M, Yilmaz O, Ellidokuz H, Gelal A, Islekel H, Coker A, and Ozer E. Cyclosporine A toxicity in association with reduced renal mass. *Transplant Proc* 35: 3128–3133, 2003.
16. Hansen PB and Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F590–F599, 2003.
17. Harris RC Jr. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol* 89: 10D–17D, 2002.
18. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, and Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94: 2504–2510, 1994.
19. Harris RC, Zhang MZ, and Cheng HF. Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand* 181: 543–547, 2004.
20. Heyne N, Wolf S, Petersen P, Merten S, Schober W, Erley CM, Rislér T, and Osswald H. Adenosine receptor antagonism in the prevention of acute cyclosporine A nephrotoxicity in normal, diabetic and hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 14, Suppl 4: 23–24, 1999.
21. Hocherl K, Dreher F, Vitzthum H, Kohler J, and Kurtz A. Cyclosporine A suppresses cyclooxygenase-2 expression in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 2427–2436, 2002.
22. Hostetter TH and Ibrahim HN. Aldosterone in chronic kidney and cardiac disease. *J Am Soc Nephrol* 14: 2395–2401, 2003.
23. Hunley TE, Fogo A, Iwasaki S, and Kon V. Endothelin A receptor mediates functional but not structural damage in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 5: 1718–1723, 1995.
24. Iniguez MA, Martínez-Martínez S, Punzon C, Redondo JM, and Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275: 23627–23635, 2000.
25. Jackson EK, Zhu C, and Tofovic SP. Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F41–F51, 2002.
26. Jensen BL and Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int* 52: 1242–1249, 1997.
27. Jo H, Yang EK, Lee WJ, Park KY, Kim HJ, and Park JS. Gene expression of central and peripheral renin-angiotensin system components upon dietary sodium intake in rats. *Regul Pept* 67: 115–121, 1996.
28. Just A, Olson AJ, and Arendshorst WJ. Dual constrictor and dilator actions of ET_B receptors in the rat renal microcirculation: interactions with ET_A receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F660–F668, 2004.
29. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga SI, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennett W, Schreiner GF, and Johnson RJ. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F727–F736, 2001.
30. Klar J, Vitzthum H, and Kurtz A. Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F349–F355, 2004.
31. Komatsu M, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Yamada A, Sato K, Hosoi M, and Nishizawa Y. eNOS gene polymorphism is associated with endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H557–H561, 2002.
32. Kon V, Hunley TE, and Fogo A. Combined antagonism of endothelin A/B receptors links endothelin to vasoconstriction whereas angiotensin II effects fibrosis. Studies in chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 60: 89–95, 1995.
33. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, and Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 37: 1487–1491, 1990.
34. Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY, Kim SB, Kim YS, Kim J, and Bang BK. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F46–F57, 2004.
35. Liu Y, Jones AW, and Sturek M. Attenuated Ca²⁺ response to acetylcholine in endothelial cells from aorta of aldosterone-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 8: 404–408, 1995.
36. Marsen TA, Weber F, Egink G, Suckau G, and Baldamus CA. Differential transcriptional regulation of endothelin-1 by immunosuppressants FK506 and cyclosporin A. *Fundam Clin Pharmacol* 14: 401–408, 2000.
37. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 235–255, 1995.
38. Miyata N, Park F, Li XF, and Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F437–F446, 1999.
39. Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, Mizuno S, Nakamura T, Ito T, Imai E, and Hori M. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 65: 2041–2053, 2004.
40. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, and Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326–2333, 2003.
41. Ngarmukos C and Grekin RJ. Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1122–E1127, 2001.
42. Noris M, Azzollini N, Pezzotta A, Mister M, Benigni A, Marchetti G, Gagliardini E, Perico N, and Remuzzi G. Combined treatment with mycophenolate mofetil and an angiotensin II receptor antagonist fully protects from chronic rejection in a rat model of renal allograft. *J Am Soc Nephrol* 12: 1937–1946, 2001.
43. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, and Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709–717, 1999.
44. Ramirez C, Olmo A, O'Valle F, Masseroli M, Aguilar M, Gomez-Morales M, Revelles F, Garcia-Chicano MJ, Arrebola F, Reguero ME, and del Moral RG. Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 8: 161–172, 2000.
45. Ramirez V, Uribe N, Garcia-Torres R, Castro C, Rubio J, Gamba G, and Bobadilla NA. Upregulation and intrarenal redistribution of heat shock proteins 90 α and 90 β by low-sodium diet in the rat. *Cell Stress Chaperones* 9: 198–206, 2004.
46. Rocco MV, Neilson EG, Hoyer JR, and Ziyadeh FN. Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic



- kidney disease. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 262: F679–F686, 1992.
47. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, and Stier CT Jr. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 33: 232–237, 1999.
 48. Rudolph AE, Rocha R, and McMahon EG. Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Mol Cell Endocrinol* 217: 229–238, 2004.
 49. Russo-Marie F. Glucocorticoid control of eicosanoid synthesis. *Semin Nephrol* 10: 421–429, 1990.
 50. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
 51. Schiffrin EL, Franks DJ, and Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 1522–1527, 1985.
 52. Schwedler SB, Bobadilla N, Striker LJ, Vaamonde CA, Herrera-Acosta J, and Striker GE. Pentosan polysulfate treatment reduces cyclosporine-induced nephropathy in salt-depleted rats. *Transplantation* 68: 1583–1588, 1999.
 53. Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, and Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF- β_1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 52: 660–673, 1997.
 54. Siragy HM. AT₁ and AT₂ receptor in the kidney: role in health and disease. *Semin Nephrol* 24: 93–100, 2004.
 55. Taddei S, Virdis A, Mattei P, and Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 21: 929–933, 1993.
 56. Todd-Turla KM, Schnermann J, Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A, Smart A, Killen PD, and Briggs JP. Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 264: F781–F791, 1993.
 57. Trujillo J, Ramirez V, Perez J, Torre-Villalvazo I, Torres N, Tovar AR, Munoz RM, Uribe N, Gamba G, and Bobadilla NA. Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F108–F116, 2005.
 58. Vanni S, Polidori G, Cecioni I, Serni S, Carini M, and Modesti PA. ET_B receptor in renal medulla is enhanced by local sodium during low salt intake. *Hypertension* 40: 179–185, 2002.
 59. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, and Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 40: 504–510, 2002.
 60. Vitzthum H, Abt I, Einhellig S, and Kurtz A. Gene expression of prostanoid forming enzymes along the rat nephron. *Kidney Int* 62: 1570–1581, 2002.
 61. Wang DH and Du Y. Distinct mechanisms of upregulation of type IA angiotensin II receptor gene expression in kidney and adrenal gland. *Hypertension* 26: 1134–1137, 1995.
 62. Wang W, McClain JM, and Zucker IH. Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. *Hypertension* 19: 270–277, 1992.
 63. Wehling M. Nongenomic aldosterone effects: the cell membrane as a specific target of mineralocorticoid action. *Steroids* 60: 153–156, 1995.
 64. Wu MS, Yang CW, Chang CT, Bens M, and Vandewalle A. Cyclosporin increases the density of angiotensin II subtype 1 (AT₁) receptors in mouse medullary thick ascending limb cells. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1458–1465, 2003.
 65. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, and Vinson GP. Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 44: 340–345, 2004.
 66. Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YO, Kim YS, Kim J, and Bang BK. Influence of the renin-angiotensin system on epidermal growth factor expression in normal and cyclosporine-treated rat kidney. *Kidney Int* 60: 847–857, 2001.
 67. Yang CW, Kim YS, Kim J, Kim YO, Min SY, Choi EJ, and Bang BK. Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 6: 50–56, 1998.
 68. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E, Andoh T, Bennett WM, and Couser WG. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 48: 439–448, 1995.
 69. Zhou X, Ono H, Ono Y, and Frohlich ED. Aldosterone antagonism ameliorates proteinuria and nephrosclerosis independent of glomerular dynamics in L-NAME/SHR model. *Am J Nephrol* 24: 242–249, 2004.

Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity

by

Jazmin Pérez-Rojas^{1,2}, Jorge A. Blanco^{1,2}, Cristino Cruz^{1,2}, Joyce Trujillo^{1,2}, Vishal S Vaidya³, Norma Uribe², Joseph V. Bonventre³, Gerardo Gamba^{1,2},

Norma A. Bobadilla^{1,2}

¹Molecular Physiology Unit,

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas,

Universidad Nacional Autónoma de México and

²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

³Renal Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115,

Short title: MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

Key Words: apoptosis, Kim-1, TGF β , glomerular diameter, fibrosis, pro-caspase 3

Corresponding author:

Norma A. Bobadilla PhD

Unidad de Fisiología Molecular

Vasco de Quiroga No. 15,

Tlalpan, 14000

México City

Tel: 5255-5485-2676

Fax: 5255-5655-0382

nab@biomedicas.unam.mx

Abstract

Recent studies from our laboratory have shown that the mineralocorticoid receptor blockade with spironolactone (Sp) prevented renal dysfunction and reduced renal injury in both acute and chronic cyclosporine (CsA) nephrotoxicity. This study was design to evaluate if Sp administration reduces functional and structural renal damage associated in the setting of preexisting chronic CsA nephrotoxicity.

Twenty eight male Wistar rats were fed a low sodium diet. Fourteen received vehicle (V) and the others were treated with CsA (15mg/K sc). After 18 days one half of each group received Sp (20 mg/K p.o.) for the subsequent 18 days. Creatinine clearance, arteriopathy, tubulo-interstitial fibrosis, arteriolar thickening, glomerular diameter, apoptosis index and TGF- β , procaspase-3 and kidney injury molecule 1 (Kim-1) mRNA levels, as well as Kim-1 shedding in urine were evaluated.

Spironolactone reduced the progression of renal dysfunction and tubulo-interstitial fibrosis in preexisting chronic CsA nephrotoxicity. There was a significant reduction of arteriolar thickening in the CsA+Sp group that was associated with greater glomerular diameter and reduction of apoptosis index. These renoprotective effects were associated with reduction of TGF- β , procaspase-3 and Kim-1 mRNA levels as well as Kim-1 shedding into the urine.

In conclusion mineralocorticoid receptor (MR) blockade with spironolactone prevented the progression of renal injury in preexisting chronic CsA nephropathy. These results suggest that spironolactone may reduce CsA-induced established nephrotoxicity in patients.

Introduction

In recent years there has been growing interest in the role of aldosterone and mineralocorticoid receptors (MR) in the pathophysiology of cardiovascular and renal diseases. The role of aldosterone in promoting cardiovascular injury is underlined by the randomized Aldactone evaluation study (RALES) (25) and the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) (24) trials. In these studies it was demonstrated that addition of the MR blockers spironolactone or eplerenone to standard therapy in heart failure patients and patients with myocardial infarction resulted in reduced cardiac mortality that could not be explained solely by blood pressure reduction. In addition, it has been reported that aldosterone infusion in hypertensive patients can induce endothelial dysfunction (8).

Although the role of angiotensin II in mediating progressive renal disease has been documented extensively, recent clinical and experimental evidence has supported the role of aldosterone/MR in the progression of renal injury that is independent of angiotensin II. Patients with primary hyperaldosteronism exhibit a higher prevalence of proteinuria (7; 21) and severe arteriolar sclerosis and interstitial fibrosis was observed in 50% of 32 renal biopsies from patients with aldosterone-producing adenomas (10). In animals on high sodium intake renal lesions of malignant nephrosclerosis are observed following unilateral nephrectomy and prolonged treatment with deoxycorticosterone acetate (DOCA) (17). In addition, the effectiveness of MR antagonism in ameliorating renal injury has also been documented. Pilot studies in humans showed that addition of spironolactone to ACE inhibitors had no hemodynamic effects, but markedly reduced proteinuria in patients with renal failure (3) and in patients with type 2 diabetes (32). The protective effect of spironolactone in patients with mild renal insufficiency has recently been

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

corroborated by a large double blind, placebo-controlled randomized trial (6). In rats, MR antagonists had no effect on systemic blood pressure, but markedly ameliorated glomerular and/or tubulointerstitial injury in several models of nephropathy including spontaneously hypertensive stroke prone rats (26; 27), angiotensin II and nitric oxide synthase inhibitor-treated rats (28), aldosterone treated rats (13), and in a model of unilateral ureteral obstruction (38). Moreover, Aldigier et al. (1) reported that MR blockade not only reduced the development of glomerulosclerosis, but also induced regression of existing glomerulosclerosis in rats after 5/6 nephrectomy. All these studies together emphasize the beneficial effect of MR antagonism in progressive renal diseases.

We previously observed that aldosterone also plays an important role in the toxicity induced by the immunosuppressant cyclosporine A (CsA), an agent that is extensively used for the prevention of allograft rejection (9; 22). Unfortunately, long term CsA administration is limited due to its nephrotoxic effect that is characterized by renal vasoconstriction and by the development of arteriolopathy and scarring tubulo-interstitial fibrosis. Thus, strategies to prevent or reverse CsA-induced nephropathy will be useful to allow its chronic use. In recent studies from our laboratory we observed that MR blockade with spironolactone completely prevented renal dysfunction induced by CsA in both acute and chronic CsA nephrotoxicity and significantly reduced renal structural damage (9; 22). Because acute kidney injury induced by CsA is associated with afferent arteriole vasoconstriction, these data suggested that aldosterone is not only implicated in chronic, structural renal damage, but also in the regulation of vascular tone (22). In these studies, spironolactone was administered simultaneously with CsA from the first day of the experiments. Thus, these observations indicate that spironolactone is an effective prophylactic agent to

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

prevent the development of CsA-nephrotoxicity. It is not known however, if MR blockade can contribute to prevent the progression of the already existing tubulo-interstitial injury and renal dysfunction in the model of chronic CsA nephropathy.

In the present study we show that spironolactone reduced the progression of existing tubulo-interstitial injury and arteriolar thickening in a model of nephropathy in which chronic CsA-nephrotoxicity was already established. The renoprotection was associated with a significant reduction of CsA-induced apoptosis, TGF β , procaspase-3 and Kim-1 expression. Thus, we propose that spironolactone may be useful in the treatment of chronic nephropathy in patients receiving this immunosuppressive agent.

Methods

Four groups of seven male Wistar rats each weighing 300-330 g were used. All groups were fed a low salt diet (0.02%). As shown in Fig 1, one group received 0.1 ml s.c per day of olive oil as vehicle (V) and another group received CsA 15 mg/kg/day, s.c. for 36 days (CsA). To test the effect of spironolactone in preexisting chronic CsA-nephrotoxicity two additional groups were included. One group received vehicle for 18 days and then vehicle plus spironolactone at 20 mg/kg/day by gastric gavage for another 18 days (Sp) and the other group was treated with CsA alone for 18 days following by CsA plus spironolactone for another 18 days (CsA+Sp). Control animals were pair fed with its corresponding CsA group. To confirm the presence of chronic CsA-nephrotoxicity at the middle of the study, an additional group of six animals was treated with CsA for 18 days and sacrificed to evaluate the renal structural damage. All animal procedures followed were in accordance with our institutional guidelines.

Functional and histological studies

At the beginning, at the middle and at the end of the study (0, 18, and 36 days), rats were placed in metabolic cages and urine that was spontaneously voided during 24 hours was collected. Serum and urine creatinine concentration were measured with an autoanalyzer (Technicon RA-1000, Bayer Co. Tarrytown, NY). Renal creatinine clearances were calculated by the standard formula $C = U \cdot V / P$, where U is the concentration in urine, V is urine flow rate and P is plasma concentration.

At the end of the study rats were anesthetized by intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.p.) and placed on a homeothermic table to

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

maintain core body temperature at 37°C, by means of a rectal probe attached to a temperature regulator which is in turn attached to a homeothermic blanket. Trachea, jugular veins and femoral arteries, were cannulated with polyethylene tubing PE-240 and PE-50. Mean arterial pressure was monitored with a pressure transducer (Model p23 db, Gould. Puerto Rico) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA). A midline laparotomy was made, right renal artery was ligated and the right kidney was excised, macroscopically divided into cortex and medulla, frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C until used. The left kidney was perfused through the femoral catheter with phosphate buffer preserving the mean arterial pressure of each animal. Following blanching of the kidney, the perfusate was replaced by 10% freshly prepared formalin buffer and the perfusion was continued until fixation was completed. After appropriate dehydration, kidney slices were embedded in paraffin, sectioned at 4µm and stained with routine methods: hematoxylin/eosin, periodic acid-Schiff, and Masson trichromic. The slides were analyzed blindly. Arteriopathy percentage was determined by counting at least 50 arterioles showing the characteristic lesion of this model. Arteriopathy was counted as present or non-present (dichotomic variable), thus, results are expressed as percentage of affected arterioles over total number of arterioles. Arteriolar thickening was evaluated in at least 25 arterioles per animal from recorded digital microphotographs, using a digital camera incorporated in a Nikon microscope. Three different measurements in each arteriole was made by using eclipse net software (magnification, X400). In addition, the glomerulus size was evaluated by measuring glomerular diameter. For this purpose ten to fifteen images of different renal cortex fields were recorded and the diameter of at least 500 glomeruli was measured in the digitalized microphotographs (magnification X100). Moreover, in Masson-stained sections ten subcortical

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

periglomerular fields per section were randomly selected in kidneys from the different groups to evaluate the degree of tubulo-interstitial fibrosis by morphometry. The images were recorded, the affected area was delineated, and the proportion of fibrosis was calculated dividing the interstitial fibrosis by total area excluding the area occupied for glomeruli in the field.

TUNEL assay. Apoptosis in kidney sections was determined by TUNEL assay using the ApopTag *in situ* apoptosis detection kit (S7101, Chemicon International, Temecula, CA, USA). The slides were prepared following the procedures described previously (41). A minimum of 10 fields per kidney rat were evaluated and all kidney tissues were examined (magnification 400x). Only tubular cells that contained TUNEL-positive nuclei with the characteristic morphology of apoptosis, including nuclear fragmentation and nuclear condensation were quantified. The number of TUNEL-positive tubules was counted and the results were expressed as the number of TUNEL-positive nuclei per square millimeter.

RNA isolation. Total RNA was isolated from each renal cortex following the guanidine isothiocyanate-cesium chloride method (31). Integrity of isolated total RNA was examined by 1% agarose gel electrophoresis and RNA concentration was determined by UV-light absorbance at 260 nm (Beckman DU640, Brea CA). Reverse transcription (RT) was carried out using 2.5 µg of total RNA from renal cortex of each rat. RT was performed at 37°C for 60 min in a total volume of 20 µl using 200 U of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen), 100 pmol of random hexamers (Invitrogen), 0.5 mM of each dNTP (Sigma Chemical Co., St. Louis MO), and 1X RT buffer (75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, pH 8.3).

Real time PCR.

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

The mRNA levels of TGF β , Kim-1 and procaspase-3 was quantified by real-time PCR on the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (*TaqMan*, Applied Biosystems ABI, Foster City, CA). FAM or VIC dye-labeled probes were selected from the Applied Biosystems Assays-on-Demand ABI product line and were specifically used to detect and quantify cDNA sequences without detecting genomic DNA. For Kim-1, procaspase 3, and TGF β expression FAM probes, and for eukaryotic 18S rRNA expression VIC probe, were used. The FAM (6-carboxyfluorescein) and VIC were used as fluorescent reporter dyes to detect amplification products. Primers and probes for TGF β , Kim-1 and procaspase-3 were ordered as kits: Rn00572010_m1, RN00597703_m1, and Rn00563902_m1 (Assays-on-Demand, ABI). Validation of amplification efficiency was made for every primer/probe set and was calculated for each run. As endogenous control, we used eukaryotic 18S rRNA (pre-designed assay reagent Applied by ABI, external run) to correct for potential variation in RNA loading or efficiency of the amplification reaction. Standard curves for each primer/probe were computed from a series of serial template dilutions from 0.187 through 187 ng. PCR was carried out in 96-well plates on cDNA equivalent to 3.5 ng of total RNA isolated individually from each renal cortex. Thermal cycling conditions were 10 min at 95°C followed with 40 cycles at 95°C for 1 min, and 60°C for 1 min. Data were collected using the ABI PRISM 7000 SDS analytical thermal cycler (Applied Biosystems). Each individual sample was tested in triplicate.

The relative quantification of TGF β , Kim-1 and procaspase-3 gene expression was performed using the comparative CT method (18). The threshold cycle (CT) is defined as the fractional cycle number at which the reporter fluorescence reaches a certain level (i.e., usually 10 times the standard deviation of the baseline). In all

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

experiments, 18S eukaryotic rRNA was used as control. Negative controls were included in the reaction plate.

Urinary Kim-1

Kim-1 protein in urine was measured by Microsphere-based Luminex xMAP™ technology (39). This technique is an adaptation of the recently developed and validated sandwich ELISA assay (40). For quantitation of urinary Kim-1 ectodomain 30 µL of 24h urine were analyzed in duplicate.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SE. The significance of the differences among groups was tested by ANOVA comparison using Bonferroni's correction for multiple comparisons. The differences in the ranks of glomerular diameters among the groups were evaluated by a contingency analysis and the differences were tested by chi-square test with Yates correction. Statistical significance was defined when p value was <0.05 .

Results

Animal body weight during the study, as well as serum sodium and potassium levels at the end of the study are shown in Table 1. At the beginning all rats had similar body weight, but it was significantly reduced at the end of the study, because of the little food consumption of CsA rats and the pair feeding of the control groups. Serum potassium levels tended to be higher in CsA group, but the difference was not statistically different and it was not enhanced by spironolactone administration.

The percentage of animals surviving after 36 days of treatment was 90% in the CsA+Sp treated group vs. 67% in the CsA group (Fig. 2A). Thus, spironolactone administration improved survival rate despite the delay in administration to CsA-treated animals. The creatinine clearance for the four groups studied at 0, 18, and 36 days is shown in Fig. 2B. At the beginning all groups had similar normal renal function that was not modified in both control groups along the study. Rats receiving CsA showed a significant and similar reduction of creatinine clearance at 18 days. Creatinine clearance was 0.7 ± 0.1 and 0.8 ± 0.1 ml/min in CsA and CsA+Sp groups, respectively. From this day, the spironolactone administration reduced the rate of progression of renal dysfunction. At the end of the study the creatinine clearance in CsA treated animals further decreased to 0.4 ± 0.1 ml/min ($p = 0.006$ vs. CsA alone at 18th day). In contrast, creatinine clearance in the CsA+Sp remained unchanged at 0.9 ± 0.1 ml/min at day 36 ($p = \text{NS}$ vs. CsA+Sp at 18th day).

After 18 days of CsA administration six rats were sacrificed and their kidneys fixed to determine the presence of arteriopathy and tubulo-interstitial fibrosis thereby evaluating the presence of chronic CsA nephropathy at this time of the study. We observed that this group presented structural renal injury with arteriopathy in

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

20.4 ± 1.6% of arterioles. In addition, 20.2 % of the analyzed area was affected by tubulo-interstitial fibrosis. These results together with the measurement of creatinine clearance after 18 days of CsA administration corroborated that at this time the rats had already established chronic CsA nephrotoxicity. When spironolactone was started at 18th day in the CsA+Sp group, the chronic CsA nephropathy did not progress. Represented in Fig. 3 are the quantitation of the area affected by fibrosis, together with representative photomicrographs, at the end of the study. In rats that received CsA, the area of fibrosis was enhanced at 36 days to a value of 45.6 ± 3.8 % ($p < 0.05$ vs 18 days). In contrast, the progression of renal fibrosis was reduced in rats that received spironolactone at the middle of the study (30.8 ± 2.3 % in CsA+Sp vs. 45.6 ± 3.8 % in CsA $p < 0.005$). In Figure 4 are representative images of arteriopathy in CsA and CsA+Sp groups together with the analysis of the percentage of arteriopathy and arteriolar thickening in these groups. In the CsA+Sp group arteriopathy percentage tended to be minor, but the difference did not reach statistical significance. In contrast, MR blockade produced a significant reduction of arteriolar thickening, since mean values for CsA group were 9.3 ± 0.3 µm vs. those of CsA+Sp group that were 8.1 ± 0.3 µm ($p < 0.05$).

The glomerular diameters were evaluated in rats that received vehicle, CsA, and CsA+Sp. In digitalized images, the diameter size was evaluated in at least 80 glomeruli per rat and distributed by rank. Figure 5 shows the normal diameter size distribution of the control group, in which it is possible to appreciate that most of the glomerulus are in the rank of 101 to 125 µm (56.9%) and a minor proportion are in the rank of 76 to 100 µm (25.7%), and 126 to 150 µm (13.9%). The histogram in control group presents a typical bell shaped Gaussian distribution. In contrast, in chronic CsA treated rats, the distribution of diameter size was shifted to the left,

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

reflecting glomerular constriction. Accordingly, the glomerular diameters were smaller: 13.8% from 50 to 75 μm , and 36.8% from 76 to 100 μm (25.7%). In addition, a lower proportion of glomeruli were in the diameter ranges from 101 to 125 μm (40.9%) and 126 to 150 μm (7.1%). All these differences were statistically significant by using a contingency analysis. The MR blockade was associated with less glomerular constriction in progressive chronic CsA nephrotoxicity (CsA+Sp), evidenced by a glomerular size distribution that was similar to control group. CsA+Sp group exhibited a greater percentage of glomerular diameters in the range from 101 to 125 μm (49.3%) and lesser proportion in the range from 50-75 μm (4.2%). Both differences were statistically significant when compared with the group treated with CsA alone.

Because it has been suggested that apoptosis plays a role in aldosterone-induced target organ damage (23), we evaluated if aldosterone receptor blockade modifies the apoptosis that is known to be induced by CsA during chronic nephropathy (35; 37). The presence of apoptotic cells in renal cortex in the CsA and CsA+Sp groups was evaluated with the TUNEL technique. Representative microphotographs of TUNEL staining in a rat treated with CsA for 36 days and a rat that received spironolactone after the 18th day of CsA treatment up to the end of the study are shown in Figures 6A and 6B, respectively. About sixty digitalized images from renal cortex sections from CsA and CsA+Sp groups were obtained using Eclipse net software and the positive nuclei per square millimeter were quantified. The results obtained are graphically expressed in figure 6C. Consistent with previous observations (35; 37), after 36 days of CsA treatment there was evident tubular cell apoptosis degree quantified as 698 ± 196 positive nuclei per mm^2 . A significant reduction in the number of apoptotic cells (174 ± 31 positive nuclei per mm^2) was

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

observed in rats treated with CsA in which the MR was blocked starting on day 18 (CsA+Sp group). In addition to these findings, we observed that CsA treated rats exhibited a 2.5-fold increase in renal cortex pro-caspase 3 mRNA expression when compared with control group (Fig. 6D). Spironolactone administration also significantly reduced the expression of pro-caspase 3. These results revealed that CsA induced significant degree of apoptosis in the kidney that was reduced by MR blockade.

The renoprotective effect of spironolactone was also corroborated with the evaluation of the expression of kidney injury molecule 1 (Kim-1) that we have demonstrated to be a sensitive marker of renal injury (40). Figures 7A and 7B show cortical mRNA levels and urinary protein Kim-1, respectively. Chronic CsA nephrotoxicity was associated with a marked increase in Kim-1 mRNA and Kim-1 protein levels by 40 and 8-fold, respectively. The Kim-1 up-regulation was partially prevented by the use of a MR inhibitor. An inversely proportional and significant correlation between Kim-1 urine levels and creatinine clearance was observed ($r=0.8441$), thus, with greater Kim-1 expression is associated with a greater reduction in creatinine clearance.

We have previously shown that prevention of chronic CsA toxicity when spironolactone was administered since the first day of treatment with CsA was associated with significant reduction in the CsA-induced up-regulation of TGF β -mRNA (9). As shown in Fig. 8, the chronic CsA-treated group exhibited a 3-fold increase in TGF β mRNA levels normalized to 18S (3.1 ± 0.2), compared with control group. Administration of spironolactone to rats with existing chronic CsA nephrotoxicity partially prevented the increase in TGF β mRNA levels (1.9 ± 0.1 , $p<0.05$).

Discussion

In the present study we found that MR blockade with spironolactone increases rat survival and prevents the progression of renal dysfunction, tubulo-interstitial fibrosis, and arteriolar thickening. Furthermore MR blockade reduces the amounts of apoptotic cells seen with preexisting chronic CsA nephrotoxicity. MR blockade mitigates the reduction of glomerular diameter and reduction of TGF β and procaspase-3 mRNA levels, as well as Kim-1 expression seen with continued CsA treatment.

Distal convoluted tubule cells and principal cells of collecting duct were considered for many years to be the main cellular target of aldosterone actions. In the last decade however, the localization of MR in several epithelial and non epithelial tissues has provided evidence that aldosterone plays a role in a variety of physiological and pathophysiological processes (3; 11; 16; 24-30; 33). These studies support the hypothesis that in addition to its physiological role in maintaining extracellular salt, potassium and water homeostasis, aldosterone seems to play an additional role as a pro-fibrotic hormone, thus contributing to organ damage when is produced in excess. For example, it has been reported that treatment of patients with chronic heart disease with spironolactone or eplerenone improves the survival rates due, at least in part, to the reduction in myocardial fibrosis (4; 25). In this regard, recent studies from our laboratory have also demonstrated that aldosterone plays a pivotal role in both renal functional and structural toxic effects of CsA (9; 22). Our previous studies, however, were designed to assess the prevention of renal injury with MR blockade, rather than to examine possible prevention of progression and/ or regression of already established renal injury.

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

Once chronic CsA was established after 18 days of treatment and confirmed through renal function and structural analysis, one group of rats received simultaneously CsA and spironolactone administration during 18 days more and was compared with the group that received only CsA for 36 days. We observed that renal dysfunction already established in CsA treated rats was not reverted by MR blockade. However, spironolactone administration beginning on the 18th or CsA treatment avoided further renal function deterioration. At the structural level, spironolactone produced significant renal protection associated with a reduction of arteriolar thickening, apoptosis and the area affected by tubulo-interstitial fibrosis, in spite of the continuous administration of CsA. Because it is known that tubulo interstitial fibrosis is associated with higher rates of progression of renal disease, (for review (20), the reduction observed in fibrosis in the CsA+Sp group could be responsible for the reduction in renal injury.

The reduction of arteriopathy induced by spironolactone was not significant; however, the decrease in arteriolar thickening observed in the CsA+Sp group was associated with greater glomerular size. We observed that distribution of glomerular diameters in the CsA+Sp group was similar to control group, while CsA alone treated animals exhibited a reduced glomerular size distribution, suggesting that MR blockade maintains a better renal perfusion state, counteracting CsA-inducing vasoconstriction. In this regard, we have previously observed that spironolactone completely prevented the renal dysfunction and reduction of renal blood flow induced by CsA during acute nephropathy in which afferent arteriolar vasoconstriction is an important component (22), suggesting that aldosterone plays a role in the regulation of vascular tone. The mechanism of aldosterone-inducing vasoconstriction in CsA nephrotoxicity is not well understood. We have observed that CsA up-regulates the

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

expression of pro-renin and modulates the expression of certain receptors that mediate vasoconstrictor or vasodilator actions that together could be responsible for renal vasoconstriction. These effects of CsA were partially prevented by spironolactone (22).

In the heart, it has been recognized that MR activation contributes to the pathophysiology of heart failure by inducing cardiomyocyte apoptosis that can be prevented by MR blockade, a finding that may explain the beneficial effects of MR blockade on ventricular remodeling following myocardial infarction (5; 19). Moreover in recent studies, Burniston et al. (5) and Williams (42) demonstrated that aldosterone increased apoptosis also in skeletal muscle and human vascular endothelial cells through a mechanism that implicated activation of caspase-3. In the present study, we extended these findings to the kidney. Chronic CsA administration in rats fed with low sodium diet produced a significant increase in procaspase-3 mRNA levels and cellular apoptosis. These effects were reduced by MR blockade, suggesting that aldosterone promotes cell death by apoptosis in chronic CsA toxicity.

Previous studies from us and others have shown that chronic toxicity induced by CsA is associated with TGF β overexpression and pharmacological agents that reduced the expression of this profibrotic cytokine reduced renal injury (9; 34; 36; 43). Therefore these studies emphasize the role of TGF β in promoting renal structural injury. Indeed, renal protection conferred by spironolactone in preexisting chronic CsA nephrotoxicity was associated with reduction of TGF β mRNA levels, confirming our previous finding that TGF β up-regulation by aldosterone is at least partially responsible for renal injury observed in this model (9). Supporting this hypothesis, Juknevičius et al. (16) observed that aldosterone infusion to normal rats results in renal TGF β up-regulation.

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

Kidney injury molecule (Kim-1), a recently discovered type 1 transmembrane glycoprotein, is undetectable in normal kidneys, but is up-regulated ~10 to 100 fold following renal proximal tubular damage in humans, rats, and mice (2; 12; 14; 15; 40). The function of Kim-1 is unclear, but it is implicated in damage processes and it has been proposed as a kidney injury marker. The Kim-1 ectodomain is cleaved by metalloproteinases and is detectable in urine. In chronic CsA nephropathy characterized by tubular injury, we observed a significant Kim-1 overexpression, evidenced by a 40-fold increase of Kim-1 mRNA levels and an 8-fold increase in Kim-1 ectodomain amount detected in the urine. Interestingly, the renal structural protection conferred by spironolactone was associated with reduction of urinary Kim-1, supporting the notion that Kim-1 could be also a marker of renal injury in chronic nephropathies.

In summary, our data shows that the aldosterone/MR pathway plays an important role in the pathophysiology of chronic CsA nephropathy and reveals that spironolactone administration prevents further renal function deterioration and structural damage in preexisting chronic CsA nephrotoxicity, in spite of continuous CsA administration. Our data pointed to spironolactone as a useful treatment to reduce chronic nephropathy in patients that are receiving this immunosuppressive agent, and suggest that MR blockade could also be useful in other chronic nephropathies in which the insult cannot be avoided.

Figure Legends

Figure 1. Experimental protocol. Male Wistar rats fed a low sodium diet (0.02%) were included and four groups were formed, vehicle (V), cyclosporine CsA, vehicle plus spironolactone (Sp) and CsA plus Sp (CsA+Sp). Vehicle and CsA were given during 36 days. In the Sp and CsA+Sp groups, spironolactone was started at the middle of the protocol (18th day) and continued to the end of the study.

Figure 2. A) Survival percentage of CsA and CsA+Sp treated rats along the study. B) Creatinine clearance in V (black squares), Sp (white squares), CsA (black circles) and CsA+Sp (white circles). * $p < 0.05$ vs. the same group at 0 days and ** $p < 0.05$ vs. the same group at 18 days.

Figure 3. A) Mean area per square millimeter affected by tubulo interstitial fibrosis in the four groups included at the end of the study (36 days): V (white bars), Sp (assured bars), CsA (black bars) and CsA+Sp (gray bars). * $p < 0.05$ vs. all the groups and † $p < 0.05$ vs. CsA group. B) and C) Representative images showing tubulo-interstitial fibrosis in CsA and CsA+Sp groups, respectively. * $p < 0.05$ vs. CsA group.

Figure 4. A) Percentage of arteriopathy and B) arteriolar thickening in CsA (black bars) and CsA+Sp groups (gray bars). C) and D) Representative images of arteriopathy showing arteriolar thickening in CsA and CsA+Sp groups respectively (magnification, X400). * $p < 0.05$ vs. CsA group.

Figure 5. Glomerular diameter distribution in vehicle group represented by white bars, CsA treated rats in black bars and CsA+Sp in gray bars. The significance was tested by contingency analysis and square chi. * $p < 0.05$ vs. the same rank in V group and ** $p < 0.05$ vs. the same rank in CsA treated rats.

Figure 6. A) and B) Representative microphotographs showing apoptotic cells by TUNEL assay of CsA and CsA+Sp groups respectively. C) Apoptotic positive nuclei

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

in CsA and CsA+Sp groups and D) Procaspase-3 mRNA levels in the four groups included at the end of the study (36 days). V (white bars), Sp (assured bars), CsA (black bars) and CsA+Sp (gray bars). * $p < 0.05$ vs. all the groups and ** $p < 0.05$ vs. the CsA group.

Figure 7. A) mRNA levels of kidney injury molecule (Kim-1) and B) Urinary Kim-1 shedding in the four groups included at the end of the study (36 days). * $p < 0.05$ vs. all the groups and ** $p < 0.05$ vs. CsA group.

Figure 8. A) mRNA levels of transforming growth factor (TGF β) in the four groups included at the end of the study (36 days). V (white bars), Sp (assured bars), CsA (black bars) and CsA+Sp groups (gray bars). * $p < 0.05$ vs. all the groups and ** $p < 0.05$ vs. CsA group.

Acknowledgment

Part of this work was presented at the Experimental Biology Meeting 2006, San Francisco CA. This work was supported by research grants No. 208602-3 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and by grant DGAPA IN228206-from National University of Mexico (to NAB); NIH grants DK39773 and DH72380 (to JVB) and American Heart Association Scientist Development Grant 0535492T (to VSV). We thank to Norma Vázquez for her technical assistance. JPR is supported by scholarship grants from CONACYT and DGAPA.

References

1. **Aldigier JC, Kanjanbuch T, Ma LJ, Brown NJ and Fogo AB.** Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 16: 3306-3314, 2005.
2. **Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M and Bonventre JV.** Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 277: 39739-39748, 2002.
3. **Bianchi S, Bigazzi R and Campese VM.** Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis* 46: 45-51, 2005.
4. **Brilla CG, Matsubara LS and Weber KT.** Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol* 71: 12A-16A, 1993.
5. **Burniston JG, Saini A, Tan LB and Goldspink DF.** Aldosterone induces myocyte apoptosis in the heart and skeletal muscles of rats in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 39: 395-399, 2005.
6. **Chrysostomou A, Pedagogos E, MacGregor L and Becker GJ.** Double-Blind, Placebo-Controlled Study on the Effect of the Aldosterone Receptor Antagonist spironolactone in Patients Who Have Persistent Proteinuria and Are on Long-Term Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy, with or without an Angiotensin II Receptor Blocker. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 256-262, 2006.
7. **Conn JW, Knopf RF and Nesbit RM.** Clinical characteristics of primary aldosteronism from an analysis of 145 cases. *Am J Surg* 107: 159-172, 1964.

8. **Farquharson CA and Struthers AD.** Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)* 103: 425-431, 2002.
9. **Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, Gonzalez MA, Uribe N, Garcia-Torres R, Lopez-Casillas F, Gamba G and Bobadilla NA.** Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63: 43-52, 2003.
10. **Grady RW, Kaylor WM, Lee JC, Bravo EL, Gephardt GN and Novick AC.** Renal pathology in patients with primary hyperaldosteronism secondary to an adrenal cortical adenoma. *Urology* 48: 369-372, 1996.
11. **Greene EL, Kren S and Hostetter TH.** Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 98: 1063-1068, 1996.
12. **Han WK, Alinani A, Wu CL, Michaelson D, Loda M, McGovern FJ, Thadhani R and Bonventre JV.** Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 16: 1126-1134, 2005.
13. **Hollenberg NK.** Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int* 66: 1-9, 2004.
14. **Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL and Sanicola M.** Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273: 4135-4142, 1998.
15. **Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL and Bonventre JV.** Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F552-F563, 2004.

16. **Juknevičius I, Segal Y, Kren S, Lee R and Hostetter TH.** Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F1059-F1062, 2004.
17. **Li JS, Schurch W and Schiffrin EL .** Renal and vascular effects of chronic endothelin receptor antagonism in malignant hypertensive rats. *Am J Hypertens* 9: 803-811, 1996.
18. **Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
19. **Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, Yamanaka S, Matoba S, Kobara M, Tanaka H, Shirayama T, Takamatsu T, Nozawa Y and Matsubara H.** Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation* 110: 317-323, 2004.
20. **Nangaku M.** Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17: 17-25, 2006.
21. **Nishimura M, Uzu T, Fujii T, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T and Kimura G.** Cardiovascular complications in patients with primary aldosteronism. *Am J Kidney Dis* 33: 261-266, 1999.
22. **Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martinez dIM, Gamba G and Bobadilla NA.** Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1020-F1030, 2005.
23. **Pitt B and Leopold JA.** A role for mineralocorticoid receptor blockade in the prevention of apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 39: 415-417, 2005.

24. **Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J and Gatlin M.** Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348: 1309-1321, 2003.
25. **Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J and Wittes J.** The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-717, 1999.
26. **Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A and Stier CT, Jr.** Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 31: 451-458, 1998.
27. **Rocha R, Chander PN, Zuckerman A and Stier CT, Jr.** Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 33: 232-237, 1999.
28. **Rocha R, Stier CT, Jr., Kifor I, Ochoa-Maya MR, Renke HG, Williams GH and Adler GK.** Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 141: 3871-3878, 2000.
29. **Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P and Pessina AC.** Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* 27: 1039-1045, 1996.
30. **Rudolph AE, Rocha R and McMahon EG.** Aldosterone target organ protection by eplerenone. *Mol Cell Endocrinol* 217: 229-238, 2004.
31. **Sambrook J, Fritsch E.F. and Maniatis T.** *Molecular cloning a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

32. **Sato A, Hayashi K, Naruse M and Saruta T.** Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 41: 64-68, 2003.
33. **Sato A, Hayashi K and Saruta T.** Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. *Am J Hypertens* 18: 44-49, 2005.
34. **Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM and Andoh TF.** Angiotensin II blockade decreases TGF-beta1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 52: 660-673, 1997.
35. **Shihab FS, Bennett WM, Yi H and Andoh TF.** Effect of pirfenidone on apoptosis-regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 79: 419-426, 2005.
36. **Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO and Andoh TF.** Mycophenolate mofetil ameliorates arteriopathy and decreases transforming growth factor-beta1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 3: 1550-1559, 2003.
37. **Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM and Johnson RJ.** Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 53: 897-908, 1998.
38. **Trachtman H, Weiser AC, Valderrama E, Morgado M and Palmer LS.** Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 172: 1590-1594, 2004.
39. **Vaidya, V. S., Ramírez V, Bobadilla NA, and Bonventre JV.** A microfluidics based assay to measure Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) in the urine as a biomarker for early diagnosis of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 16, 192A, 2005.

40. **Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA and Bonventre JV.** Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F517-F529, 2006.
41. **Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ and van Dierendonck JH.** A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41: 7-12, 1993.
42. **Williams TA, Verhovez A, Milan A, Veglio F and Mulatero P.** Protective effect of spironolactone on endothelial cell apoptosis. *Endocrinology* 147:2496-505, 2006.
43. **Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Li C, Kim HW, Choi BS, Cha JH, Kim YS, Kim J and Bang BK.** Cyclosporine withdrawal and mycophenolate mofetil treatment effects on the progression of chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 62: 20-30, 2002.

MR blockade in preexisting chronic CsA nephrotoxicity

Table 1. Effect of CsA and MR blockade on body weight and serum sodium and potassium levels

Group	BW (g) 0 days	BW (g) 18 days	BW (g) 36 days	Na⁺ meq/L	K⁺ meq/L
V	313 ± 11	306 ± 7	270 ± 8*	153.6 ± 1.1	4.7 ± 0.3
Sp	310 ± 13	314 ± 11	289 ± 8*	151.0 ± 1.7	5.4 ± 0.2
CsA	321 ± 6	269 ± 11	261 ± 13*	145.0 ± 4.3	5.8 ± 0.5
CsA+Sp	319 ± 4	268 ± 12	271 ± 16*	157.0 ± 4.2	5.4 ± 0.4

*p<0.05 vs. their respective groups at the beginning of the study

Figure 1. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

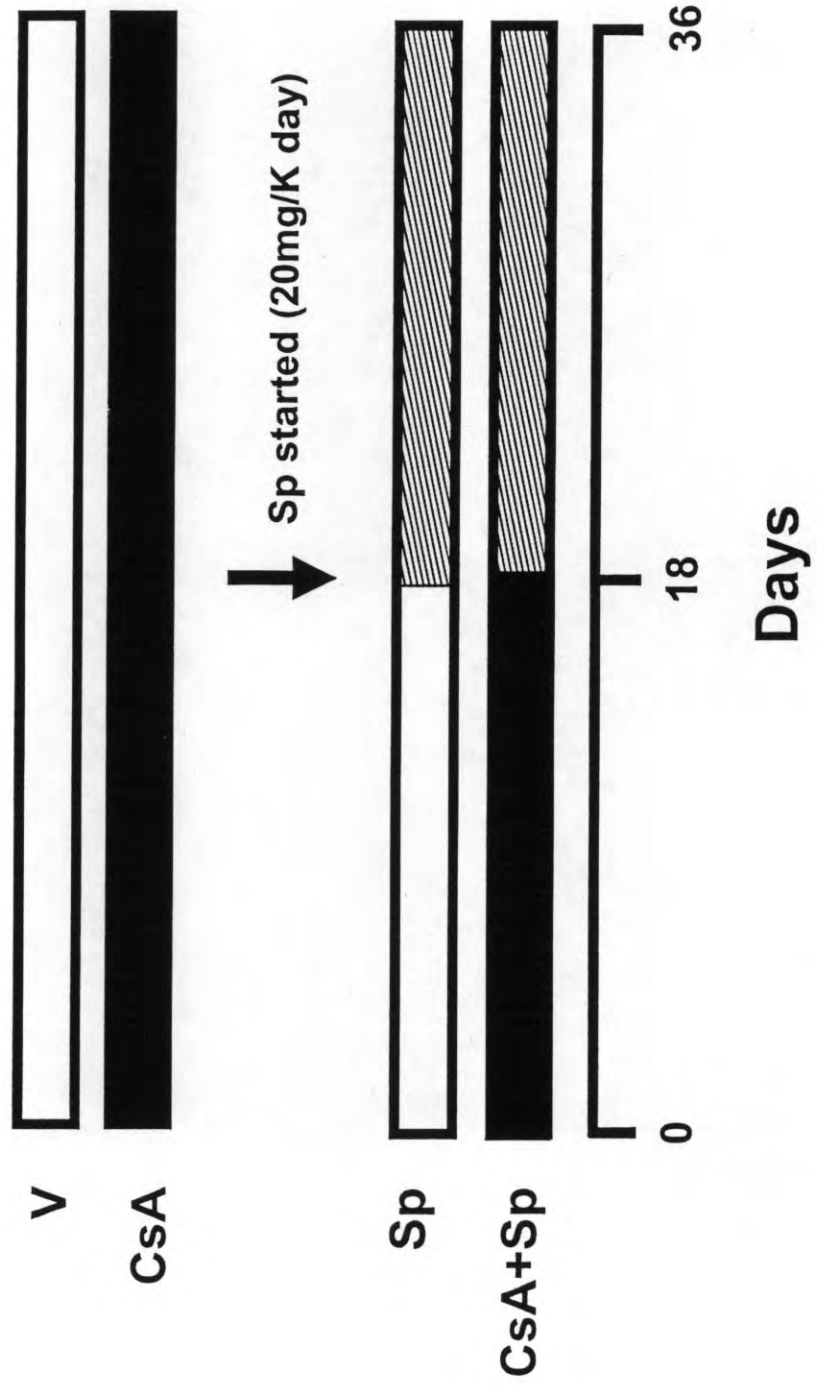


Figure 2. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

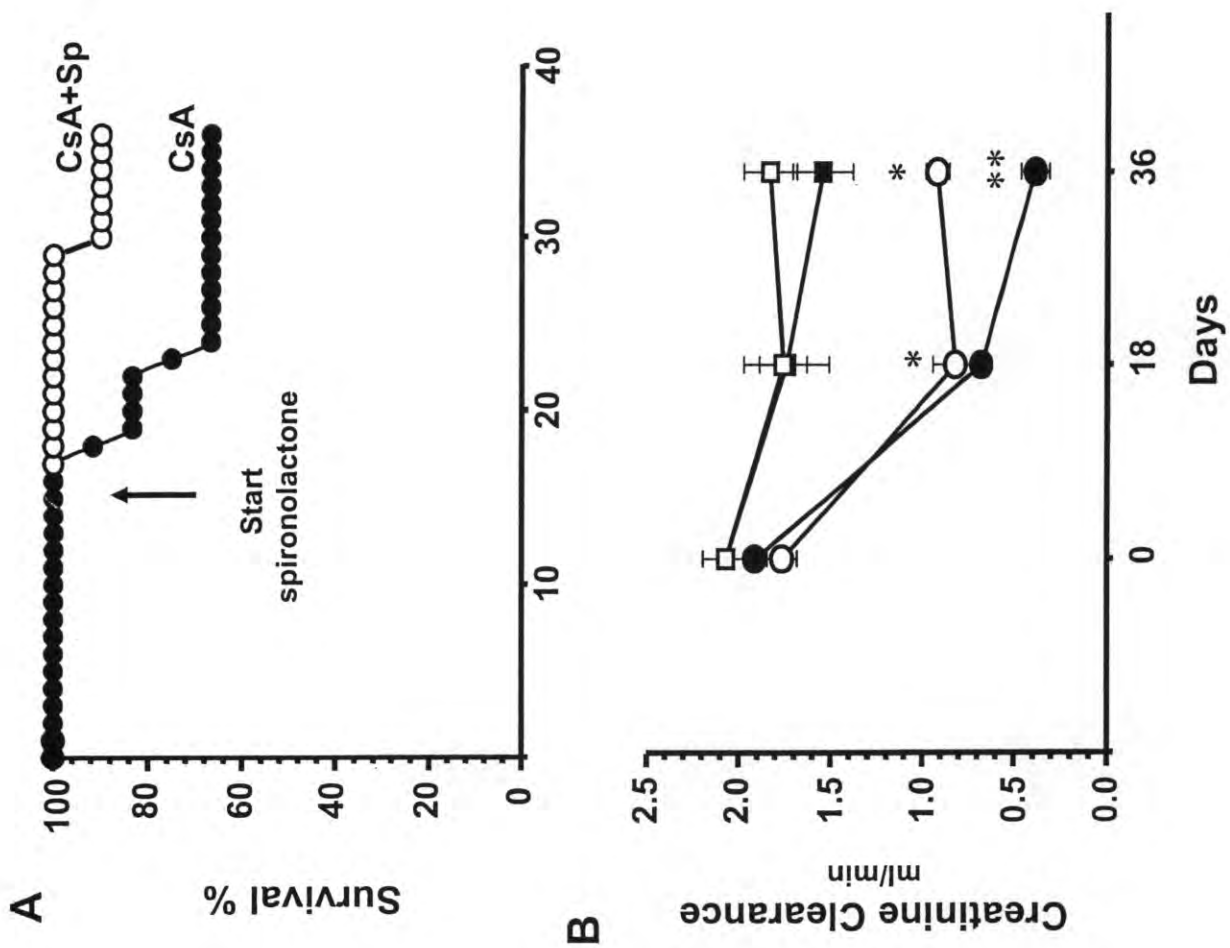


Figure 3. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

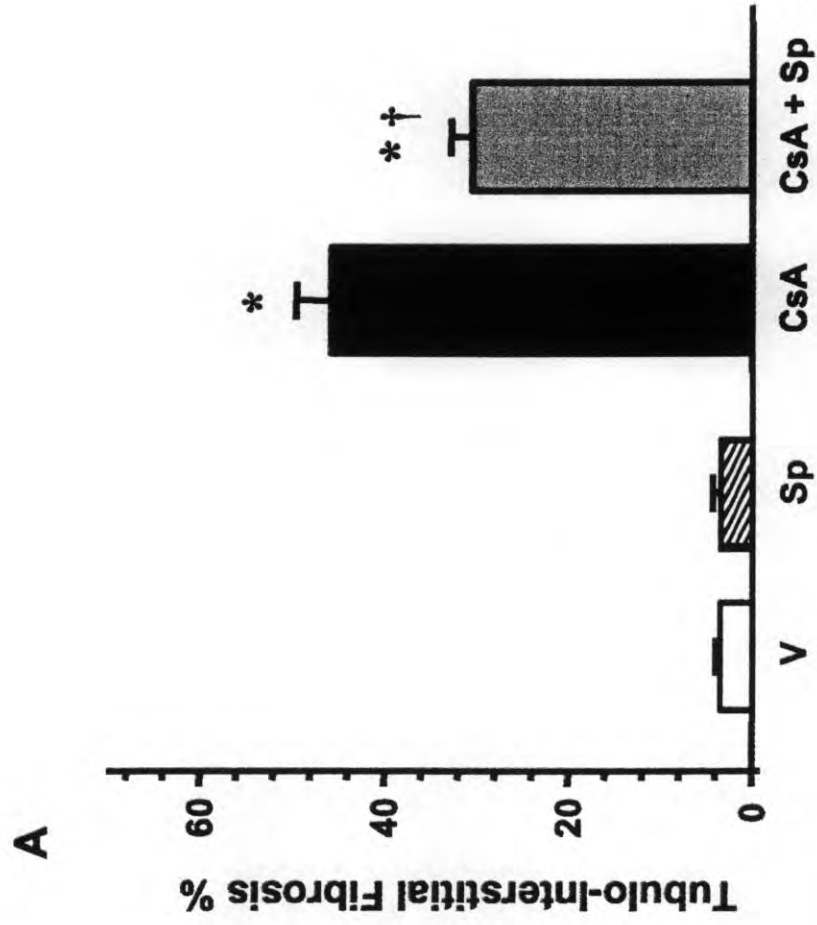
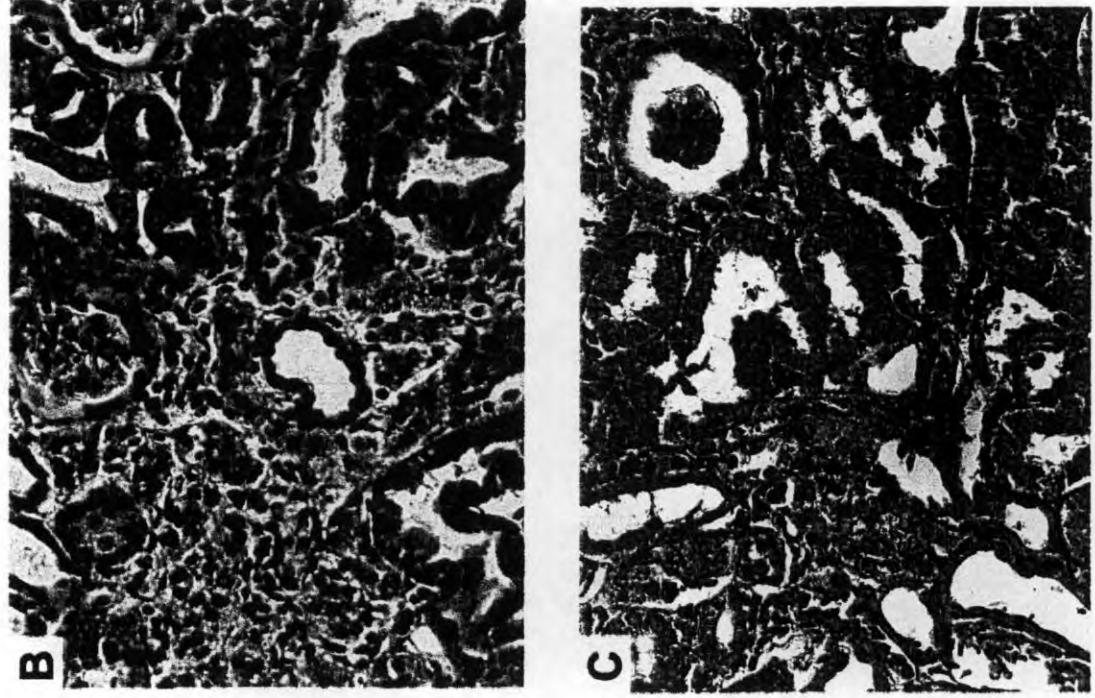


Figure 4. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

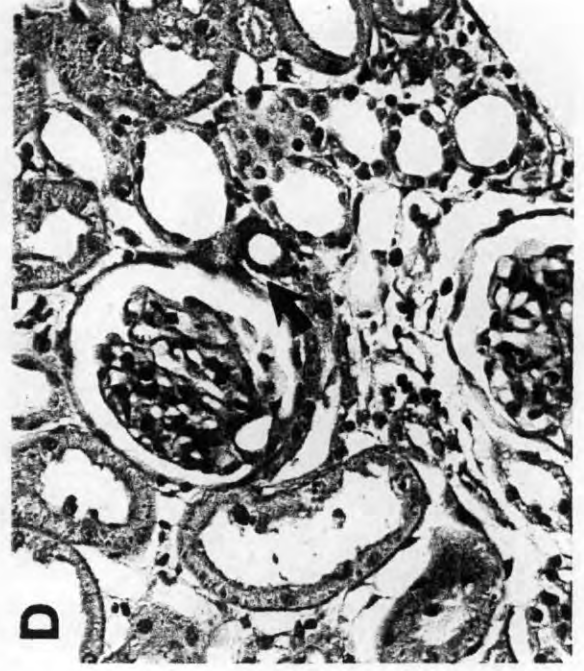
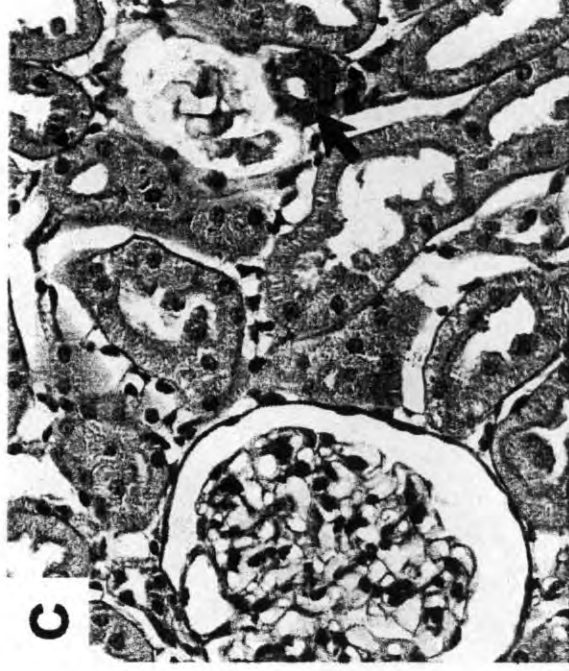
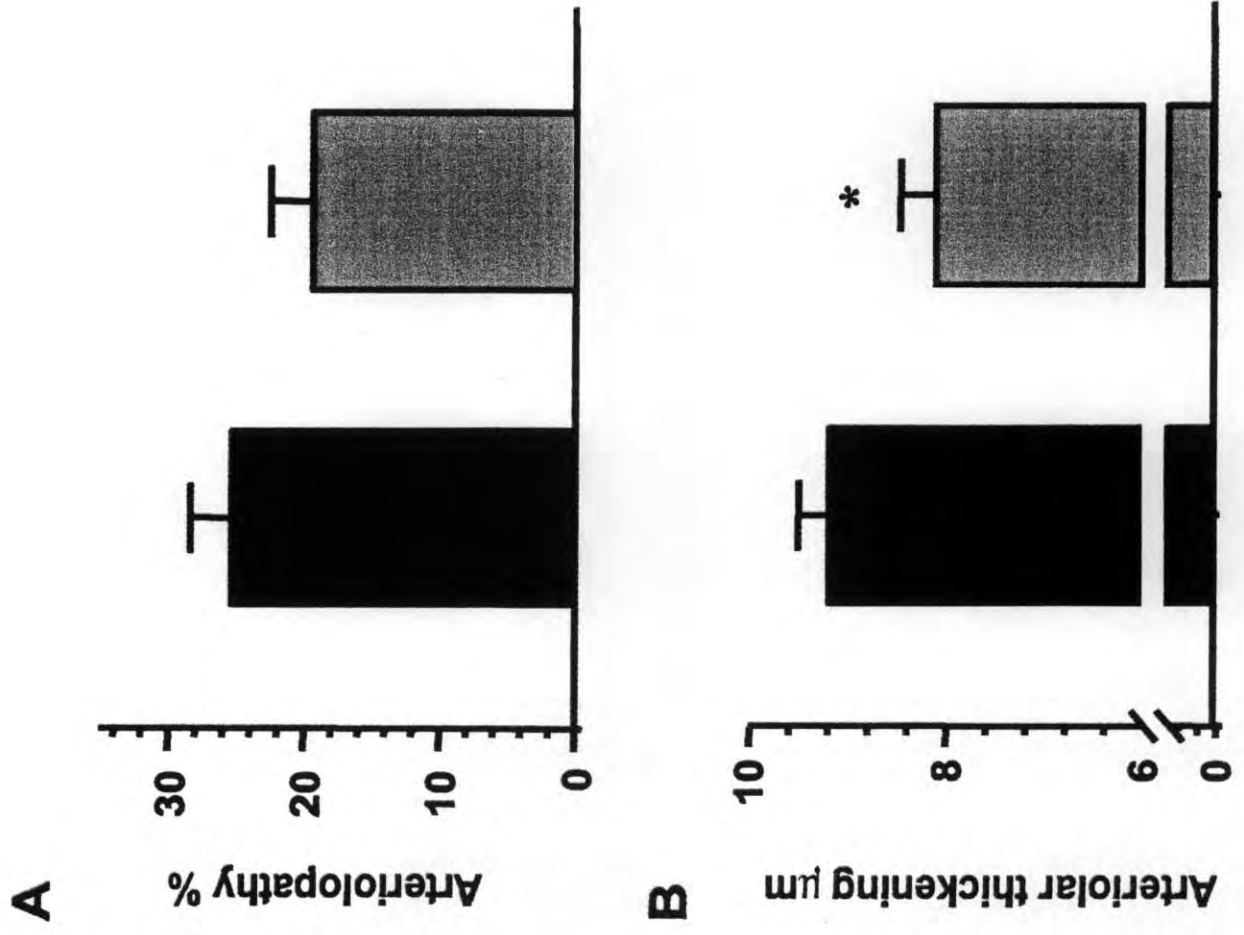


Figure 5. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

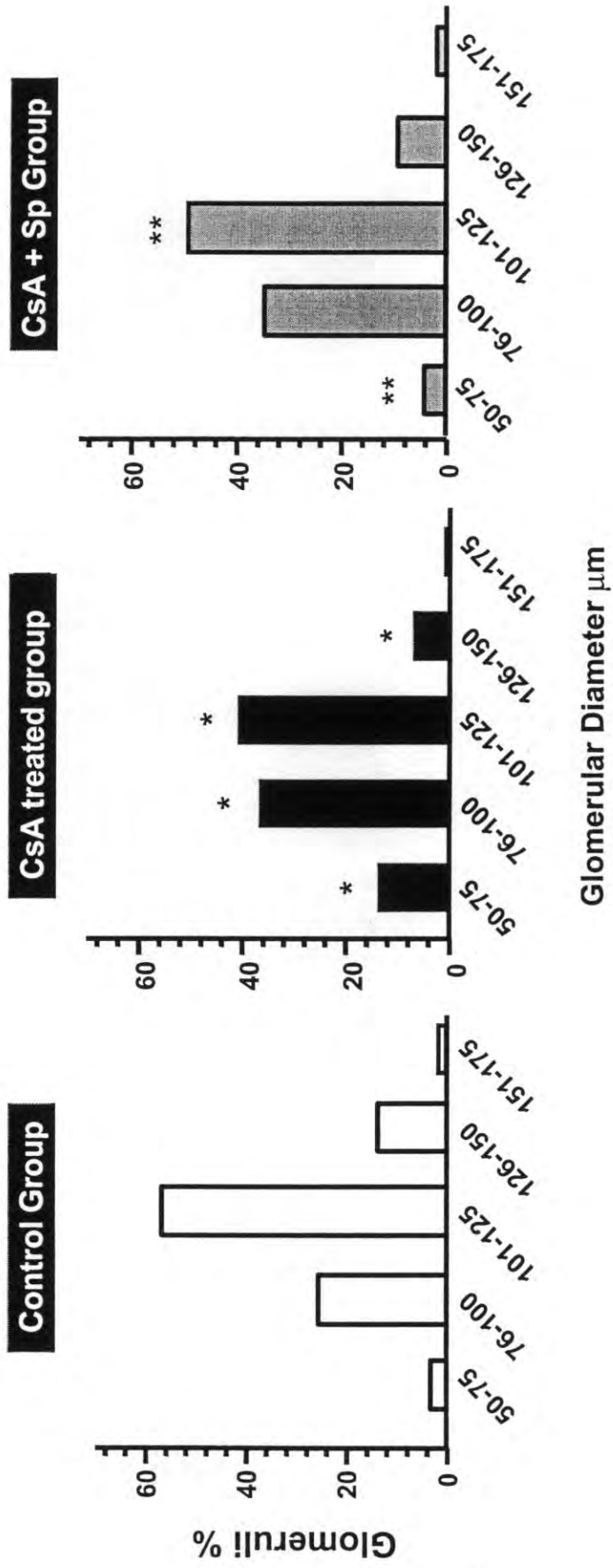


Figure 6. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

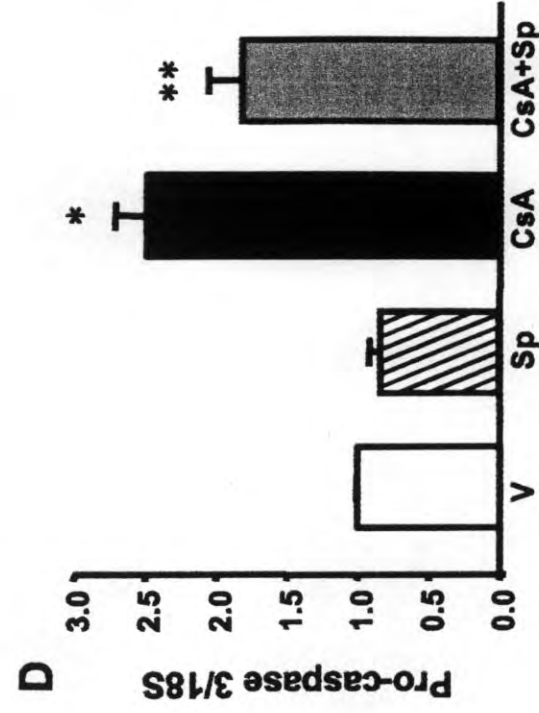
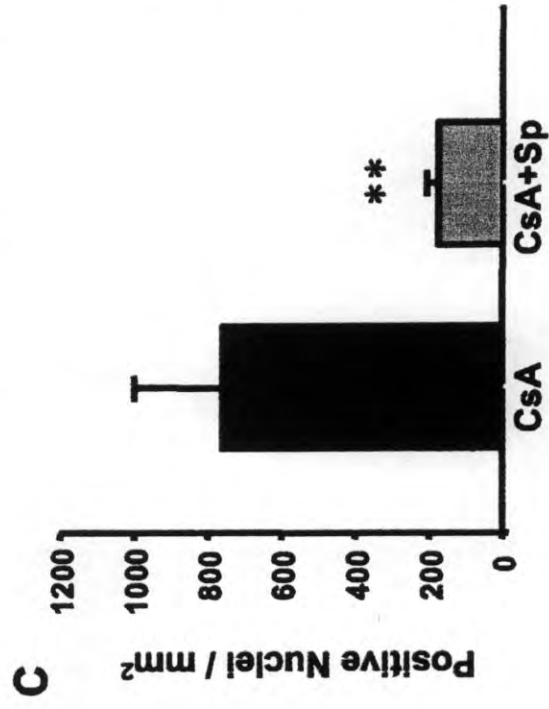
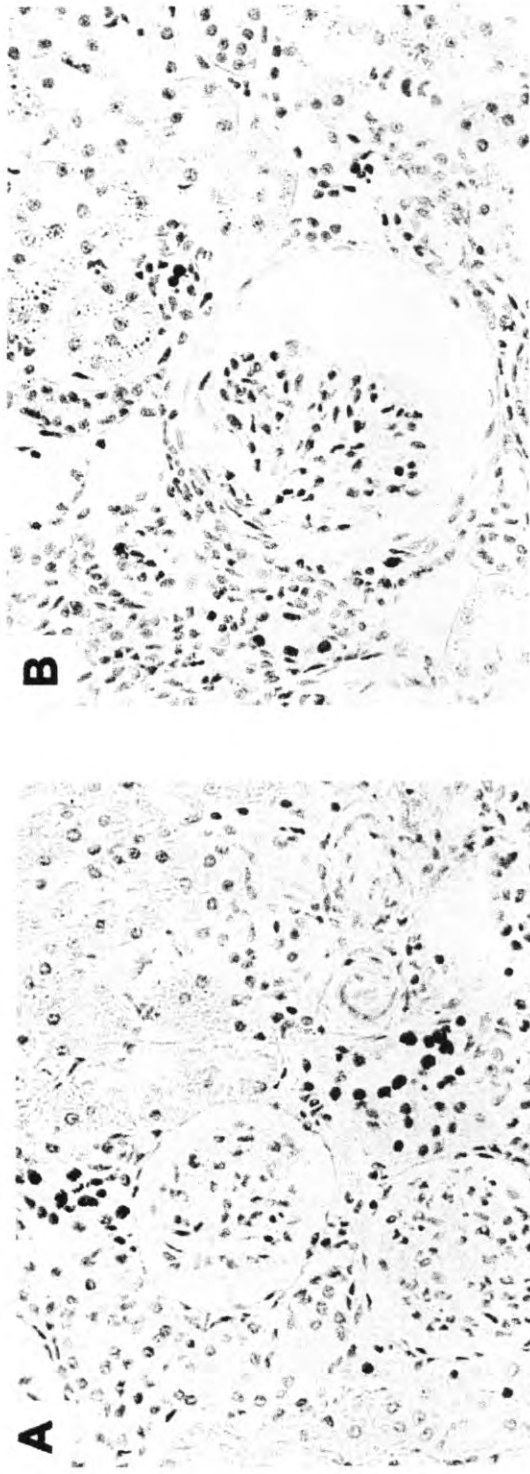


Figure 7. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity

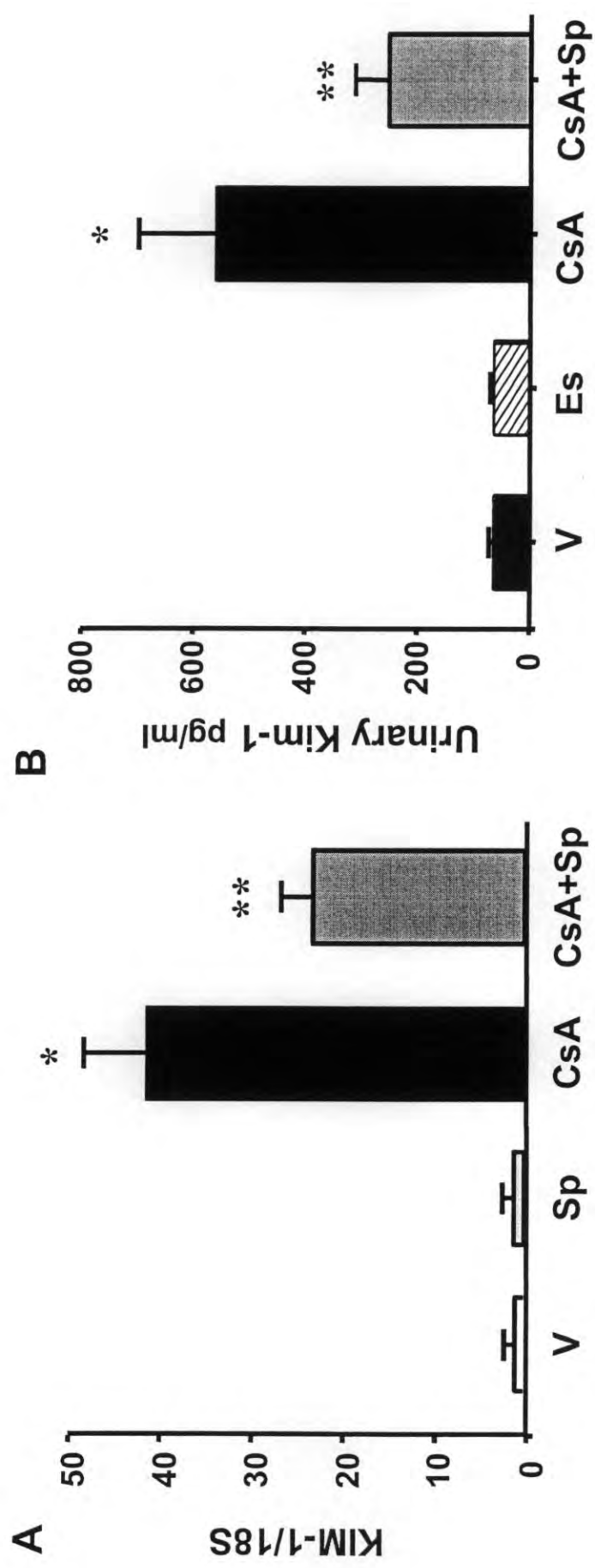
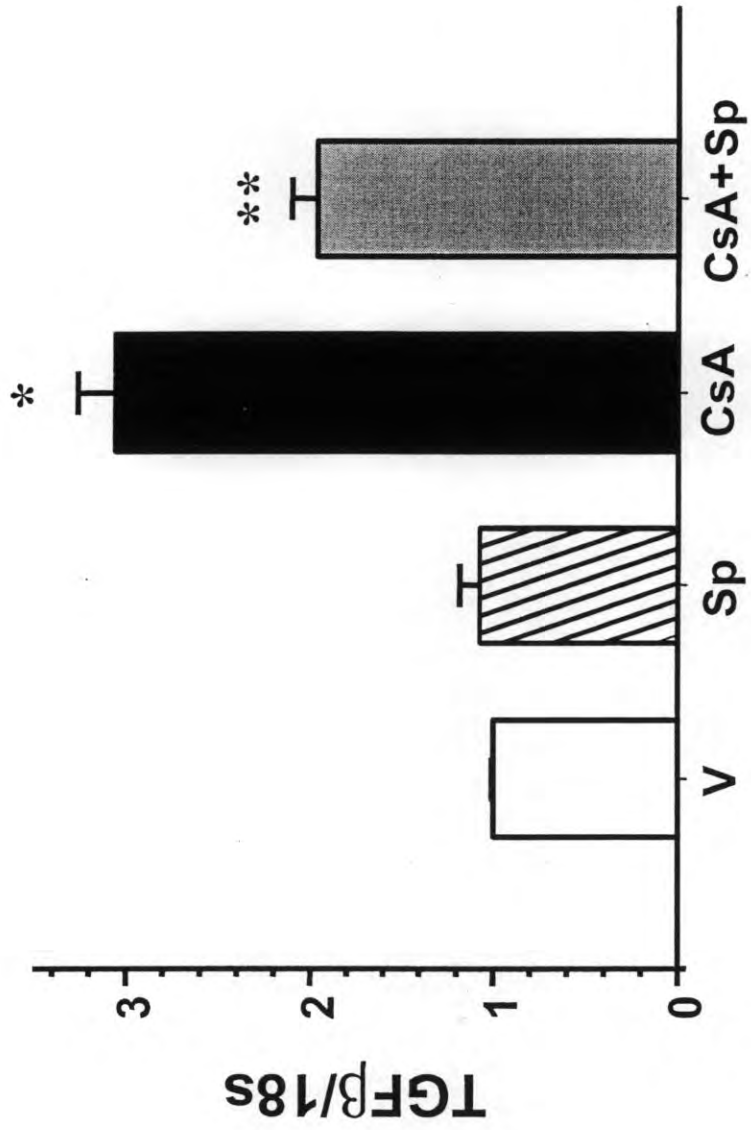


Figure 8. MR blockade in preexisting Chronic CsA Nephrotoxicity



X.2 Artículos generados en proyectos adicionales

- Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation
- Low calorie commercial sugar is a sensitive marker of glomerular filtration rate

Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation

Joyce Trujillo,^{1,2} Victoria Ramírez,^{1,2} Jazmín Pérez,^{1,2} Ivan Torre-Villalvazo,³ Nimbe Torres,³ Armando R. Tovar,³ Rosa M. Muñoz,⁴ Norma Uribe,⁵ Gerardo Gamba,^{1,2} and Norma A. Bobadilla^{1,2}

¹Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Departments of ²Nephrology, ³Physiology of Nutrition, ⁴Gastroenterology, and ⁵Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Submitted 10 March 2004; accepted in final form 18 August 2004

Trujillo, Joyce, Victoria Ramírez, Jazmín Pérez, Ivan Torre-Villalvazo, Nimbe Torres, Armando R. Tovar, Rosa M. Muñoz, Norma Uribe, Gerardo Gamba, and Norma A. Bobadilla. Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F108–F116, 2005. First published August 24, 2004; doi:10.1152/ajprenal.00077.2004.—The obese Zucker rat is a valuable model for studying kidney disease associated with obesity and diabetes. Previous studies have shown that substitution of animal protein with soy ameliorates the progression of renal disease. To explore the participation of nitric oxide (NO) and caveolin-1 in this protective effect, we evaluated proteinuria, creatinine clearance, renal structural lesions, nitrites and nitrates urinary excretion ($\text{UNO}_2^-/\text{NO}_3^-$), and mRNA and protein levels of neuronal NO synthase (nNOS), endothelial NOS (eNOS), and caveolin-1 in lean and fatty Zucker rats fed with 20% casein or soy protein diet. After 160 days of feeding with casein, fatty Zucker rats developed renal insufficiency, progressive proteinuria, and renal structural lesions; these alterations were associated with an important fall of $\text{UNO}_2^-/\text{NO}_3^-$, changes in nNOS and eNOS mRNA levels, together with increased amount of eNOS and caveolin-1 present in plasma membrane proteins of the kidney. In fatty Zucker rats fed with soy, we observed that soy diet improved renal function, $\text{UNO}_2^-/\text{NO}_3^-$, and proteinuria and reduced glomerulosclerosis, tubular dilation, interstitial fibrosis, and extracapillary proliferation. Renal protection was associated with reduction of caveolin-1 and eNOS in renal plasma membrane proteins. In conclusion, our results suggest that renal protective effect of soy protein appears to be mediated by improvement of NO generation and pointed out to caveolin-1 overexpression as a potential pathophysiological mechanism in renal disease.

plasma membrane proteins; endothelial nitric oxide synthase; nitrites and nitrates excretion

SEVERAL RISK FACTORS ASSOCIATED with an increased rate of progression in renal disease have been informed, including African-American race, male sex, hypertension, obesity, diabetes, hyperlipidemia, smoking, high-protein intake, phosphate retention, and metabolic acidosis (36). Although obesity is often associated with diabetes and hypertension, which are two of the most common risk factors for the development of end-stage renal disease (ESRD), it has been suggested that obesity per se is an independent risk factor (22). Massive obesity has been shown to produce nephrotic syndrome (56, 58), and it has been reported that proteinuria and segmental glomerulosclerosis can be present in obese patients, even in the

absence of diabetes (59). In addition, a large-scale study including 6,818 renal biopsies from 1986 to 2000 revealed a 10-fold increase in renal lesion, such as glomerulomegaly and focal segmental glomerulosclerosis, which were associated with obesity. Increased frequency of obesity-related glomerulopathy over the studied time ran in parallel with the increased prevalence of obesity within general population (33).

Mediators involved in obesity-induced renal injury are poorly understood. Available information comes from studies performed in rats and dogs fed with high-fat diet (23, 25) and from fatty Zucker rat (17, 31, 34, 38, 41, 49), an animal model of genetic obesity that results from inactivating mutation in leptin receptor gene. Homozygous Zucker rats (*fa/fa*) exhibit most of the metabolic picture seen in human obesity, including hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia, and proteinuria. These animals also develop glomerular hypertension, hypertrophy, and sclerosis (6, 17, 31, 49) and often die due to ESRD (31). The mechanism by which renal disease is produced in obese Zucker rats is largely unknown, but it has been shown that consumption of plant-derived proteins retards the development and progression of renal disease in humans and in several animal models of disease (9, 27, 30, 46, 52, 61). Maddox et al. (39) observed that soy protein diet reduces plasma cholesterol levels, urinary protein excretion, and the rate of progression of glomerular injury in obese Zucker rat. The mechanisms by which soy protein conferred renal protection, however, were not established, but it has been suggested that could be related to the high content of phytoestrogens in soybean products, compared with animal sources of protein (54). Isoflavones (the most common phytoestrogens in soy plant) have been shown to possess antiproliferative and antioxidant properties (51, 57) and to act as weak estrogens (40) by blocking transcription of growth factor- β_1 (35) and by inhibiting activation of transcription factors such as nuclear factor- κB and activator protein-1 (62, 63).

A number of recent studies showed that nitric oxide (NO) synthesis is reduced in chronic renal disease in both humans and animals (2, 48, 55, 60). Therefore, it has been suggested that an impaired NO synthetic pathway could have a key role in mediating the complex renal hemodynamic and nonhemodynamic mechanisms associated with the progression of renal disease (for a review, see Ref. 44). In this regard, Frisbee and Stepp (16) informed that obese Zucker rats exhibit a considerable impairment of endothelium-dependent vasodilatation in

Address for reprint requests and other correspondence: N. A. Bobadilla, Unidad de Fisiología Molecular, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México City, Mexico (E-mail: nab@biomedicas.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

skeletal muscle arterioles, raising the possibility that NO deficiency could contribute to progression of renal disease in this animal model. Caveolin-1, the resident integral membrane protein of caveolae, is upregulated in bovine aortic endothelial cells exposed to serum of hypercholesterolemic patients (12), and several lines of evidence demonstrate that, by interacting with endothelial NO synthase (eNOS), caveolin-1 inhibits the activity of this enzyme (19, 20, 32), thus reducing NO production. In addition, it is known that soy protein has a higher L-arginine content, the precursor of NO. Taking all this information together, we reasoned that one of the possible mechanisms by which soy diet confers renal protection in Zucker rats could be related to improvement of NO generation. Here, we show that renal protection conferred by soy protein diet in Zucker rats is associated with increase in NO metabolites excretion rate, changes in expression pattern of NO synthases, and reduction of caveolin-1 expression within the kidney.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-four lean (*Fa/Fa*) and 40 obese (*fa/fa*) Zucker rats were obtained at 5 wk of age (Harlan, Indianapolis, IN) and randomly divided into four groups: lean and obese Zucker rats fed ad libitum with 20% casein protein, constituting *Fa/Fa+cas* and *fa/fa+cas* groups, respectively. The other two groups of lean and obese Zucker rats were fed with 20% soy protein, forming *Fa/Fa+soy* and *fa/fa+soy* groups, respectively. Body weight and food intake were recorded every day. Rats were placed in metabolic cages every 30 days at 22°C with 12:12-h light-dark cycle and free access to water and thereafter were anesthetized with carbon dioxide and killed by decapitation. Obese rats were studied at 30, 60, 90, 120, and 160 days, whereas lean rats at 90, 120, and 160 days. All procedures followed were in accordance with our institutional guidelines.

Functional studies. Individual 24-h urine samples were collected by placing animals in metabolic cages. Urinary protein excretion was measured by TCA turbidimetric method (26). Serum and urine creatinine concentration were measured with an autoanalyzer (Technicon RA-1000, Bayer, Tarrytown, NY), and renal creatinine clearance was calculated by the standard formula $C = U \cdot V/P$, where U is the concentration in urine, V is urine flow rate, and P is the plasma concentration. The end products of NO, nitrites, and nitrates (NO_2^- and NO_3^-) were estimated in 24-h urine samples by reducing NO_3^- to NO_2^- using nitrate reductase (Roche) and β -adenine nicotinamide (β -NADPH, Sigma), followed by nitrites quantification with the Griess reagent, as we and others previously reported (8, 43).

Serum insulin was determined by RIA with rat insulin kit (Linco Research, St. Charles, MO). The sensitivity for rat insulin assay was 0.1 ng/ml, and the intra- and interassay coefficients of variation were <5 and <5%, respectively. Immune complexes were counted with cobra II gamma counter (Packard Instrument, Menden, CT). Serum cholesterol and triglycerides were measured enzymatically according to the manufacturer's instructions (Lakeside Diagnostics).

RNA isolation. Total RNA was isolated from cortex or medullas of each group following guanidine isothiocyanate-cesium chloride method (47). The integrity of isolated total RNA was examined by 1% agarose gel electrophoresis, and RNA concentration was determined by UV light absorbance at 260 nm (Beckman DU640, Brea, CA).

RT-PCR. Relative level of NOS and caveolin mRNA expression was assessed in renal cortex and medulla by semiquantitative RT-PCR, as previously described (3, 4). Briefly, all primer sequences were custom obtained from GIBCO BRL (Gaithersburg, MD). Sense nNOS primers were 5'-GAACCCCAAGACCATCC-3' and antisense 3'-GGCTTTGCTCCACAGTT-5', which amplified a fragment of 308 bp, bases 692 to 999 (3); sense inducible (i)NOS primers were 5'-GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG-3' and antisense 5'-CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC-3', which amplified a

fragment of 570 bp, bases 1407 to 1977 (42); sense eNOS primers were 5'-CCG GAA ATT CGA ATA CCA GCC TGA TCC ATG GAA-3' and antisense 5'-GCC GGA TCC TCC AGG AGG GTG TCC ACC GCA TG-3', which amplified a fragment of 614 bp, base 2456 to 3069 (1), and caveolin-1 sense primers were 5'-ATG TCT GGG GGT AAA TAC GT-3' and antisense: 5'-CCT TCT GGT TCC GCA ATC AC-3', which amplified a fragment of 230 bp, bases 1 to 230 (50). To evaluate or reduce nonspecific effects of experimental treatment and to semiquantify NOS isoforms or caveolin-1 expression, we amplified a fragment of GAPDH, using primers previously described (3). Genomic DNA contamination was checked by treating all RNA samples with DNAase and by carrying samples through PCR procedure without adding reverse transcriptase.

RT was carried out using 2.5 μg of total RNA from renal cortex or medullas. Before RT reaction, total RNA was heated at 65°C for 10 min. RT was performed at 37°C for 60 min in a total volume of 20 μl using 200 U of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO BRL), 100 pmol of random hexamers (GIBCO BRL), 0.5 mM of each dNTP (Sigma, St. Louis, MO), and 1 \times RT buffer (75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, pH 8.3). Samples were heated at 95°C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase and diluted to 40 μl with PCR grade water. One-tenth of RT individual samples of each group was used for each NOS isoform or GAPDH amplification in 20- μl final volume reactions containing 1 \times PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, pH 8.3), 0.1 mM of each dNTP, 0.2 μCi of [α - ^{32}P]-dCTP (~3,000 Ci/mmol, 9.25 MBq, 250 μCi), 10 μM of each primer, and one unit of *Taq* DNA polymerase (GIBCO, BRL). Samples were overlaid with 30 μl of mineral oil and PCR cycles were performed in a DNA thermal cycler (M.J. Research, Watertown, MA), with the following profile: denaturation 1 min at 94°C; annealing 1 min at 55°C for nNOS, iNOS, and caveolin, 58°C for eNOS primers; and 1 min extension step at 72°C. Last cycle was followed by a final extension step of 5 min at 72°C. Control gene was coamplified simultaneously in each reaction.

Amplification kinetics were performed following our standard procedure (3–5, 11). To analyze PCR products, one-half of each reaction was electrophoresed in a 5% acrylamide gel. Bands were ethidium bromide stained and visualized under UV light, cut out, suspended in 1 ml of scintillation cocktail (Ecolume, ICN, Aurora, OH), and counted by liquid scintillation (Beckman LS6500, Fullerton, CA). The amount of radioactivity recovered from the excised bands was plotted in a log scale against the number of cycles. To semiquantify each NOS isoform, caveolin, and the control gene, all reactions were performed at least by quadruplicate.

Western blot analysis. Plasma membrane proteins from pooled renal cortex or medullas were isolated by homogenization in sucrose buffer (0.32 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA). Homogenates were centrifuged at 3,000 g, supernatants were then centrifuged at 20,000 g, and final supernatants were centrifuged at 100,000 g. Each pellet was resuspended in a buffer containing 5 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 2 mM EDTA. For nNOS detection, total proteins were also extracted from pooled cortex or medullas by homogenization in four volumes of lysis buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, pH 7.0; 0.5 mM MOPS, pH 7.0, containing 5 mM benzimidazole and 5 mM DTT). Homogenates were centrifuged at 4,000 g for 4 min at 4°C to remove tissue debris without precipitating plasma membrane fragments. Protein concentrations were assessed in duplicate using Bio-Rad DC Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Protein samples containing 70 μg of total protein or 50 μg of plasma membrane proteins in 10 μl loading buffer (6% SDS, 15% glycerol, 150 mM Tris, 3% bromophenol blue, 2% β -mercaptoethanol, pH 7.6) were resolved by SDS-PAGE, semidried, and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). Thereafter, membranes were cut and the lower part was incubated with a rabbit caveolin-1 antibody 1:500 (Abcam, Lexington, KY) overnight at 4°C, whereas the upper membrane was incubated with a

Table 1. Physiological parameters in lean and obese Zucker rats at the end of the study

Group	Mean Food Intake, g	Body Weight, g	Left Kidney Weight, g	Cholesterol, mg/dl	Triglycerides, mg/dl	Insulin, mg/dl
<i>Fa/Fa+cas</i>	24.2±3.3	480±20	1.3±0.1	98±13	126±9	2.2±0.5
<i>Fa/Fa+soy</i>	24.2±3.3	440±16*	1.3±0.1	67±5*	78±5*	1.4±0.3
<i>fa/fa+cas</i>	22.4±1.0	592±48*	2.4±0.2*	575±66*	814±116*	7.5±3.1*
<i>fa/fa+soy</i>	21.2±1.3	708±45†	1.6±0.03†	180±31†	458±42†	6.4±0.9*

Values are means ± SE. * $P < 0.05$ vs. *Fa/Fa+cas*. † $P < 0.05$ vs. *fa/fa+cas*. Cas, casein.

goat actin antibody 1:2,500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Barbara, CA). Additional membranes containing total proteins or plasma membrane proteins were also incubated with rabbit nNOS polyclonal antibody 1:500 (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI) and monoclonal eNOS antibody 1:250 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), respectively. Thereafter, membranes were washed three times for 30 min with TBS-T. For caveolin and nNOS detection, each membrane was incubated with the secondary antibody AP-conjugated goat anti-rabbit IgG 1:2,500 (Bio-Rad) for 60 min at 37°C and washed again. For eNOS detection, membranes were incubated with a secondary antibody AP-conjugated goat anti-mouse IgG 1:3,000 (Bio-Rad) for 60 min at 37°C and washed again. Whereas for actin detection, membranes were incubated with a secondary antibody donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology). Proteins were detected by using an enhanced chemiluminescence kit (Bio-Rad) and autoradiography, following the manufacturer's recommendations. Bands were scanned for densitometric analysis.

Histological studies. Before renal cortex and medulla separation, one-half of the left kidney was taken and fixed in formalin-phosphate buffer for light microscopy studies. After appropriate dehydration, kidney slices were embedded in paraffin, sectioned at 3 μ m, and periodic acid-Schiff (PAS), eosin-hematoxylin, and trichromic stains were performed. Focal and global glomerulosclerosis as well as extracapillary proliferation were counted in at least 150 glomeruli. Tubular atrophy and dilation were evaluated in ~300 tubules. The degree of tubulointerstitial fibrosis was evaluated by morphometry as we previously reported (11). For this purpose, 10 subcortical periglomerular fields per Masson-stained section (magnification $\times 200$) were randomly selected in kidneys from the different groups. The images were recorded, and the affected areas were delimited and semiquantified using Leica processing and analysis system (Leica Imaging System, Cambridge, UK). Finally, the proportion of fibrosis was calculated dividing the interstitial fibrosis by total area per field excluding the luminal tubular area. The histological analysis was performed without knowing the group at which each kidney belonged.

Statistical analysis. Comparison among the groups for continuous data was made by using ANOVA. When ANOVA showed a statistically significant difference, a group-by-group comparison was performed using a *t*-test with a Bonferroni's correction for multiple comparisons.

RESULTS

Physiological parameters of the four groups of Zucker rats at the end of the study are presented in Table 1. As expected, body weight in obese rats was significantly elevated compared with that in lean controls. At the end of the study, obese rats fed with casein protein diet gained significantly less weight than rats fed with soy probably due to their physical deterioration. Kidney weight was also higher in obese rats compared with lean rats. The obese rats fed with soy (*fa/fa+soy*) appeared to have less renal hypertrophy than *fa/fa+cas* group, given their significantly lower kidney weights. This difference remained significant when kidney/body weight ratio was calculated: the ratio in *fa/fa+cas* vs. *fa/fa+soy* was 0.42 ± 0.07 and $0.23 \pm$

0.01 g/100 g body wt, respectively. Obese rats developed hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and hyperinsulinemia compared with lean controls. Whereas in obese soy-feeding rats, cholesterol and triglycerides serum levels were significantly lower than *fa/fa+cas*, without changes in insulin serum levels, confirming hypolipidemic effect of soy diet.

Figure 1 shows urinary protein excretion and creatinine clearance in lean and obese rats fed with casein or soy diet along the study. No differences in urinary protein excretion were observed in lean rats during the period of the study, which remained within normal values (Fig. 1A). In contrast, a significant progressive increase in proteinuria was observed in *fa/fa+cas* group throughout the study. Abnormal urinary protein excretion began at day 60, at which the average value was 70.9 ± 7.8 mg/24 h and at the end of the study proteinuria in this group was 280.5 ± 83.6 mg/24 h. Interestingly, soy protein intake was associated with a significant reduction in proteinuria levels in obese rats, because at the day 60, average value was 25.0 ± 8.0 mg/24 h and at day 160, the value was 92.8 ± 39.4 mg/24 h. These differences were statistically significant compared with *fa/fa+cas* group.

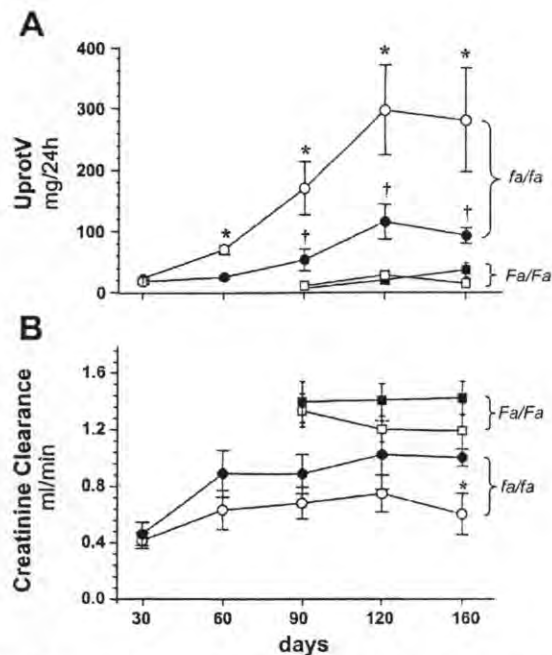


Fig. 1. A: creatinine clearance. B: urinary protein excretion measured every 30 days along the study of lean + casein (\square , *Fa/Fa+cas*), lean + soy *Fa/Fa+soy* (\blacksquare), Zucker + casein (\circ , *fa/fa+cas*), and Zucker + soy (\bullet , *fa/fa+soy*) groups. * $P < 0.05$ all groups.

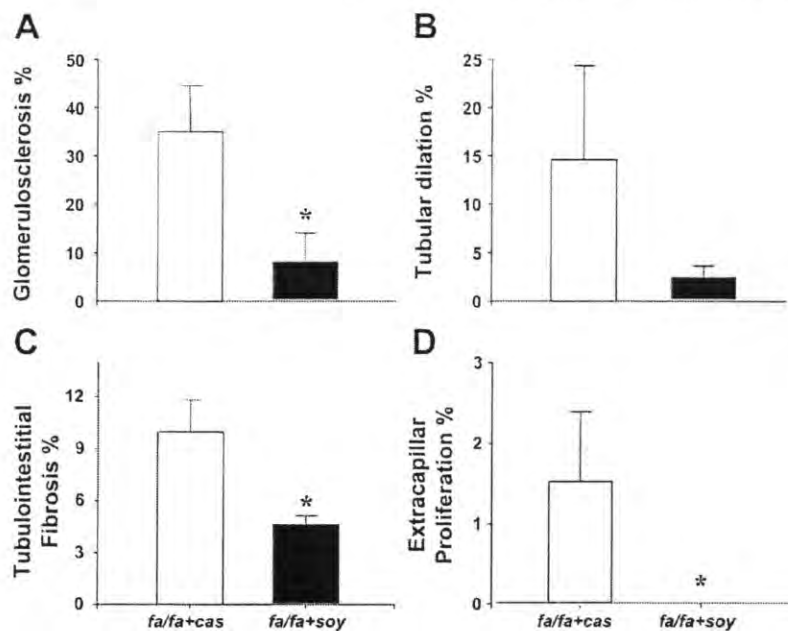


Fig. 2. Renal histological alterations in fatty Zucker rats after 160 days of feeding with casein (open bars) or soy diet (solid bars). Glomerulosclerosis (A) and extracapillary proliferation percentage (D) were calculated from at least 150 observed glomeruli, whereas tubular dilation percentage (B) was obtained from 300 examined tubules. Finally, the percentage of fibrosis (C) was calculated dividing the interstitial fibrosis by total area from 10 fields per Masson stained. * $P < 0.05$ vs. *fa/fa+cas*.

As shown in Fig. 1B, creatinine clearance in obese rats tended to be lower than control animals, but the difference was less evident in those rats fed with soy protein. Because at 160 days obese rats fed with casein had lesser body weight than soy animals, creatinine clearance was corrected by considering body weight of each animal. Glomerular filtration rate per 100 g of body weight in *Fa/Fa+cas* and *Fa/Fa+soy* was 0.26 ± 0.01 and 0.34 ± 0.02 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ($P = 0.06$), respectively, and in *fa/fa+cas* and *fa/fa+soy* was 0.04 ± 0.02 and 0.11 ± 0.02 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ($P = 0.03$), respectively. Although creatinine clearance in *fa/fa+soy* was not completely

normalized at the end of the study, a soy protective effect was clearly observed in this group, when it was compared with *fa/fa+cas* group.

Figure 2 shows the quantification of the most important lesions observed in fatty Zucker rats, and representative images are shown in Fig. 3. Fatty Zucker rats fed with casein exhibited the characteristic renal histological picture of this model that is segmental glomerulosclerosis, tubular dilation and atrophy, cast formation, and tubulointerstitial fibrosis. In *fa/fa+cas* group, percentage of glomerulosclerosis, tubular dilation, and tubulointerstitial fibrosis was 33.0 ± 11.8 ,

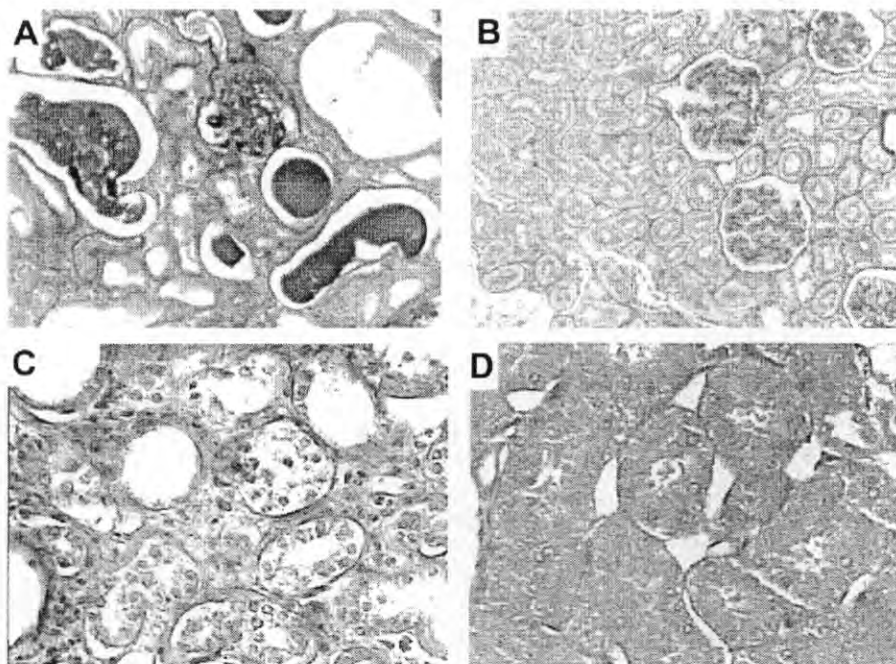


Fig. 3. Representative renal light microscopic findings of fatty Zucker rats after 160 days that were fed with casein or soy protein diet. Kidney slides were stained with periodic acid-Schiff, showing greater focal glomerulosclerosis and tubular dilation in *fa/fa+cas* (A) than *fa/fa+soy* (B) group (magnification $\times 100$). Also, tubulointerstitial fibrosis (C) and extracapillary proliferation (D) were more prominent in *fa/fa+cas* than *fa/fa+soy* group (Masson stain $\times 200$).

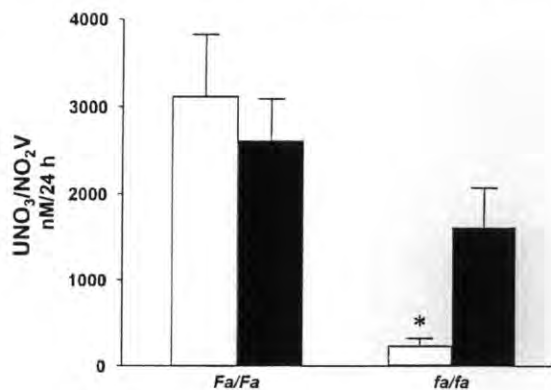


Fig. 4. Urinary nitrates and nitrites excretion (UNO₃/NO₂V) in lean and obese Zucker rats. Open bars represent animals fed with casein and solid bars represent rats fed with soy diet during 160 days. *P < 0.05 vs. all groups.

14.7 ± 9.8, and 10 ± 1.9%, respectively. All structural changes observed in obese rats were significantly reduced by soy protein diet. In *fa/fa*+soy group, mean percentage value of glomerulosclerosis, tubular dilation, and tubulointerstitial fibrosis were 8.3 ± 5.8, 2.5 ± 1.1, and 4.6 ± 0.5, respectively. Thus our results indicate that the consumption of soy diet by obese Zucker rats reduces structural and functional changes.

To characterize the soy-protective effect on NO synthesis, end NO metabolites were quantified in urine. Urinary nitrites and nitrates excretion (UNO₂/NO₃V) is shown in Fig. 4 in lean and obese Zucker rats at 160 days after feeding with casein or soy protein diets. In lean Zucker rats, soy feeding had no effect on end NO metabolites excretion. In contrast, *fa/fa*+cas rats exhibited a significant reduction in UNO₃/NO₂V. Mean value was 238 ± 77 nM/24 h in *fa/fa*+cas group vs. 3,114 ± 702

nM/24 h in *Fa/Fa*+cas (P < 0.004); however, the reduction observed in UNO₃/NO₂V in *fa/fa*+cas rats was restored by soy protein intake, because average excretion in *fa/fa*+soy group was 1,615 ± 456 nM/24 h, a value that is significantly higher to that observed in *fa/fa*+cas group.

To explore if soy-induced renal protection is related to changes in intrarenal expression of NOS, neuronal (n)NOS and eNOS mRNA and protein levels were evaluated by semiquantitative RT-PCR and Western blot analysis, respectively (Figs. 5 and 6). Figure 5, left, shows that in renal cortex, soy protein diet in lean rats did not produce changes in eNOS or nNOS mRNA levels compared with rats fed with casein. In contrast, cortical nNOS mRNA level was upregulated in obese rats fed with casein, an effect that was reverted in *fa/fa*+soy group, together with a significant increase of eNOS expression in renal cortex. As shown in Fig. 5, right, eNOS mRNA in medulla was downregulated in *fa/fa*+cas rats, whereas soy protein was associated with a significant increase of eNOS in both lean and obese animals. No changes in medulla nNOS mRNA levels among all groups were observed.

Western blotting was used to assess protein expression of these enzymes. Actin was used as control protein to normalize each sample. Figure 6 shows the abundance of eNOS in plasma membrane proteins extracted from renal cortex (A) and medulla (B). Figure 6, top insets, are representative images of eNOS immunoblot. The eNOS protein level was similar in lean rats fed with casein or soy protein diet. In contrast, in *fa/fa*+cas group, there was a significant increase by threefold of eNOS in plasma membrane proteins from renal cortex; this effect was not observed in the medulla. As expected, nNOS was not detected in membrane proteins fraction (data not shown); thus total proteins were used to analyze nNOS expression. No difference in cortical nNOS expression was observed in lean and obese rats, regardless the source of protein; how-

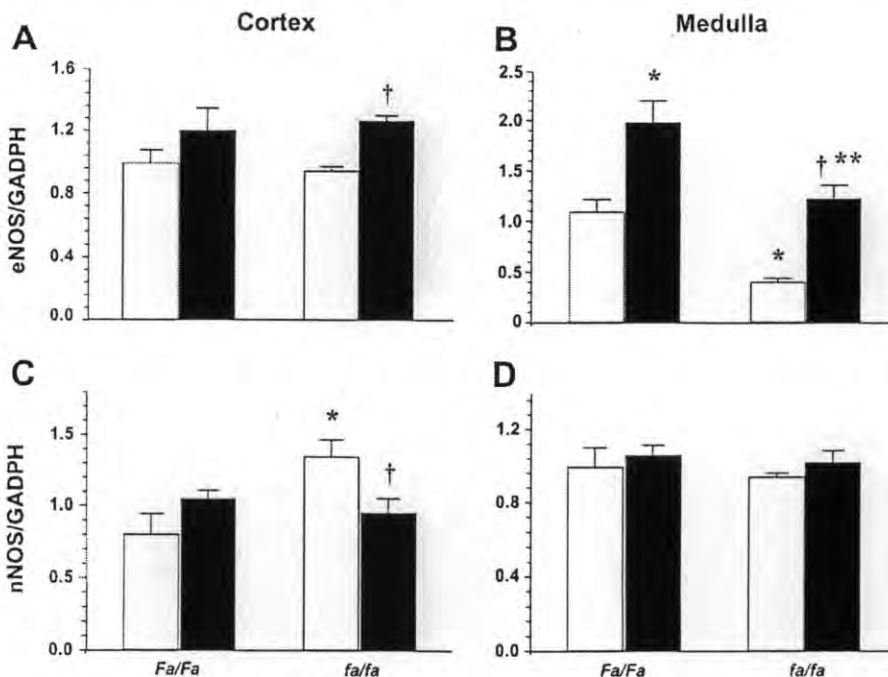


Fig. 5. mRNA levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal NOS (nNOS) in renal cortex (A and C) and medulla (B and D) of lean (*Fa/Fa*) and obese (*fa/fa*) Zucker rats at the end of the study, as stated. Open bars represent casein and solid bars represent soy diet-fed rats. Values were normalized by housekeeping gene expression. *P < 0.05 vs. *Fa/Fa*+cas. †P < 0.05 vs. *fa/fa*+cas. **P < 0.05 *Fa/Fa*+soy group.

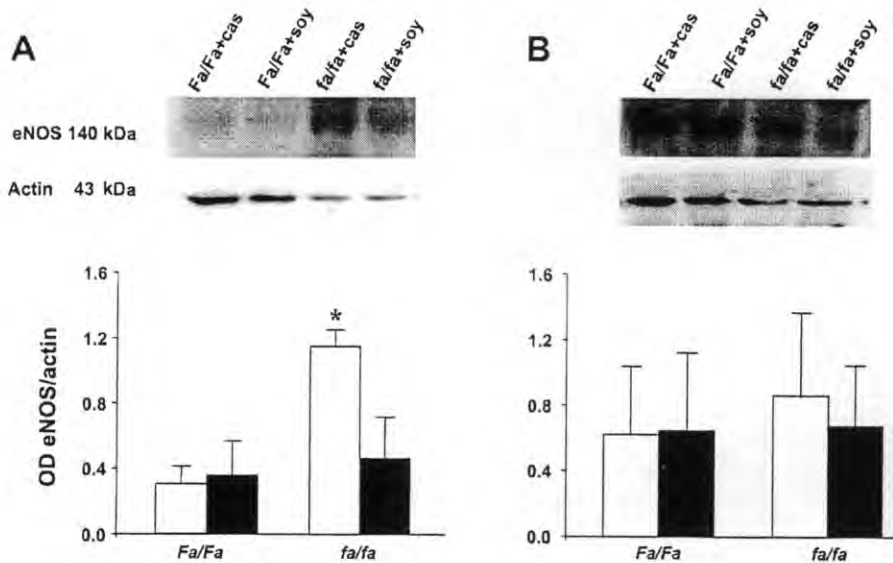


Fig. 6. Inactive form of eNOS protein was assessed by Western blot analysis in proteins isolated from renal cortex plasma membrane (A) and medulla (B) in lean and obese Zucker rats. Insets: representative images of eNOS and actin immunoblot. Charts represent optical density ratio between eNOS and actin. Open bars correspond to rats fed with casein and solid bars correspond to rats fed with soy. * $P < 0.05$ vs. all groups.

ever, an increase in medulla nNOS protein was observed in *fa/fa+cas* compared with *Fa/Fa+cas* group (1.8 ± 0.2 vs. 0.8 ± 0.1 , respectively), effect that was abrogated when rats were fed with soy diet (1.0 ± 0.1 ; data not shown).

Because it is known that eNOS activity is modulated by caveolin-1, level of expression of this protein was evaluated in renal cortex and medulla. As shown in Fig. 7, in renal cortex *Fa/Fa+cas* and *Fa/Fa+soy* groups exhibited similar caveolin-1 mRNA levels. Caveolin-1/GAPDH ratio was 1.45 ± 0.10 and 1.25 ± 0.18 , respectively. In contrast, *fa/fa+cas* group was associated with a significant caveolin-1 upregulation by almost twofold (2.60 ± 0.33 , $P = 0.008$ vs. *Fa/Fa+cas*). Intriguingly, soy protein intake in obese rats prevented this upregulation, because caveolin-1/GAPDH ratio was 1.33 ± 0.08 ($P = 0.004$). In renal medulla, similar results were observed. Casein-fed obese Zucker rats had higher caveolin-1 mRNA level than lean rats fed with casein: 2.29 ± 0.32 vs. 1.04 ± 0.04 , respectively ($P < 0.005$). This effect was prevented by soy protein diet, because the value in *fa/fa+soy* group was 1.39 ± 0.05 . In addition, caveolin-1 protein levels were assayed in plasma membrane proteins obtained from rat renal cortex and medulla by using Western blot analysis (Fig. 8). Western blot analysis confirmed our findings at mRNA level, caveolin-1 protein in isolated plasma membranes from renal cortex was significantly higher in *fa/fa+cas* than *Fa/Fa+cas* rats and the increase of these protein was normal-

ized when rats were fed with soy protein diet (*fa/fa+soy* group). A similar pattern was observed in renal medulla; however, the difference did not reach statistical significance.

DISCUSSION

In the present study, we observed that obese Zucker rats fed with casein developed a progressive renal disease characterized by proteinuria and glomerulosclerosis that were associated with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and hyperinsulinemia. Renal progressive disease, as well as the increase in cholesterol and triglycerides levels, was significantly ameliorated when the obese Zucker rats were fed with soy instead casein protein diet. These observations are consistent with a previous report (39), but little is known about the mechanism of the renal soy-protective effect. In this regard, hypertension seems not to be responsible for renal damage in this animal model, because Maddox et al. (39) observed that fatty Zucker rats exhibited only a slight increase in systolic blood pressure that cannot explain the development and progression of renal disease. Moreover, arterial pressure was not modified when rats were fed with soy. Data from this study revealed that soy diet conferring renal protection is associated with restoration of NO production.

A number of recent studies showed that NO synthesis is reduced in chronic renal disease in both humans and animals

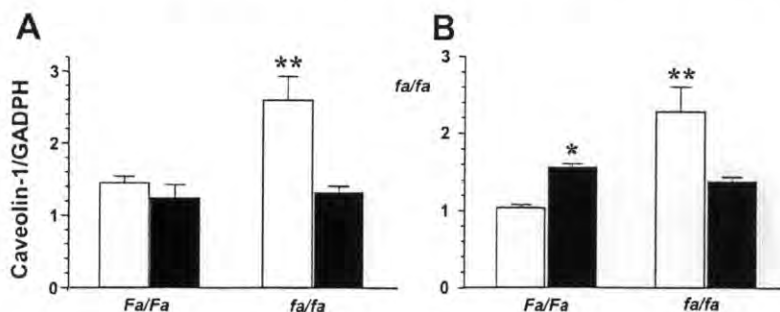


Fig. 7. Caveolin-1 mRNA levels in renal cortex (A) and medulla (B) of lean and obese Zucker rats. The open bars represent the ratio of caveolin-1 and housekeeping gene of rats fed with casein, whereas solid bars are rats fed with soy diet. * $P < 0.05$ vs. *Fa/Fa+cas*. ** $P < 0.05$ vs. all groups.

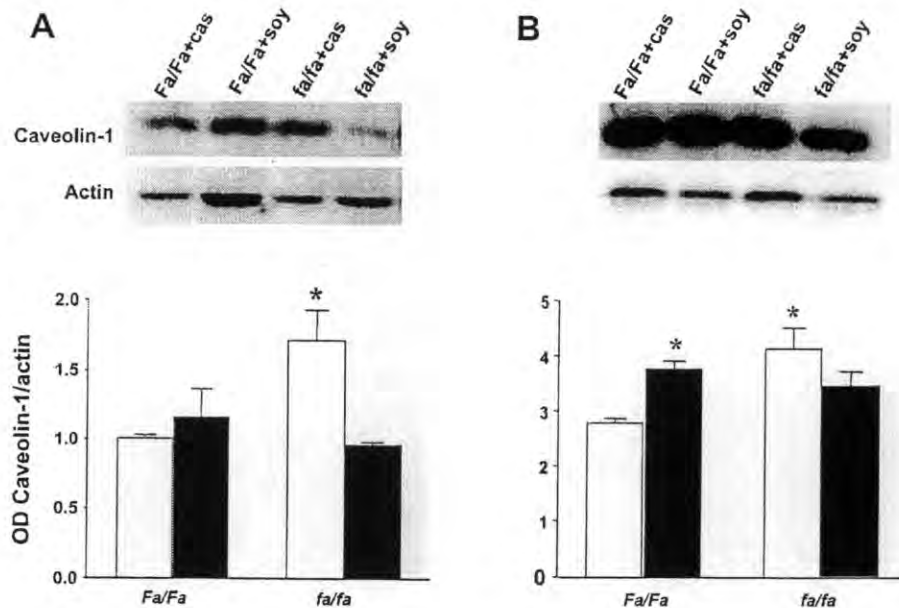


Fig. 8. Caveolin-1 Western blot analysis. Top insets: representative autoradiographs of caveolin-1 and actin from plasma membrane proteins extracted from renal cortex and medulla in lean and obese Zucker rats. Graphic representation of optical density showing the ratio between caveolin-1 and actin in renal cortex (A) and medulla (B). Open bars represent rats fed with casein and solid bars represent rats fed with soy. * $P < 0.05$ vs. *Fa/Fa+cas*.

(2, 48, 55, 60), suggesting that availability of NO in kidney is an important factor in defining the rate of progression injury in renal disorders. To explore the role of NO in renal protection conferred by soy protein diet, we evaluated the expression pattern of nNOS and eNOS in renal cortex and medulla, as well as NO metabolites excretion. We observed that both nNOS and eNOS expression pattern in obese rats fed with casein (*fa/fa+cas*) was different to that observed in lean animals fed with the same diet. At mRNA levels, there was an upregulation of nNOS in cortex and a downregulation of eNOS in medulla, these changes were normalized by soy diet. At protein level, *fa/fa+cas* group presented a significant increase of nNOS in total proteins from renal medulla. Physiological significance of this observation is unclear because the role of nNOS in renal medulla is different. However, upregulation of nNOS was prevented in obese rats fed with soy diet. Interestingly, *fa/fa+cas* group had a greater amount of eNOS in membrane proteins fraction, an effect that was also reverted in *fa/fa+soy* rats. Although eNOS expression was higher in *fa/fa+cas* group, it is unlikely that eNOS in this animal model is active because most of this enzyme was located in plasma membrane, a location in which it is known that association with caveolin-1 precludes its activity. In addition to these findings, we observed an unexpected small, but significant, increase in caveolin-1 mRNA and protein expression in renal medulla from lean animals fed with soy. Because the physiological role of caveolin-1 in renal medulla is not known, interpretation of this finding is difficult. Interestingly, a recent study demonstrated that caveolin-1 knockout mouse develops hypercalciuria and urolithiasis, suggesting that caveolin-1 is a critical determinant of urinary calcium homeostasis (7).

Supporting that changes in the NO synthetic pathway are altered in the fatty Zucker rats and that it is corrected by soy diet, we found that $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ urinary excretion in *fa/fa+cas* rats was considerably depressed and soy protein intake was associated with restoration of NO systemic production. In addition, recent studies showed that obese Zucker strain has an

impairment in NO-mediated dilation of skeletal muscle arterioles, suggesting a deficient NO availability (16a, 24).

NO biosynthesis is tightly regulated by a variety of mechanisms ranging from transcriptional to posttranslational level (37). Recent studies indicate that some proteins directly interact with NOS-forming complexes that regulate NOS activity or spatial distribution in the cell. For instance, eNOS is regulated by proteins residing in or recruited to plasmalemmal caveolae of endothelial cells. Caveolins, the resident scaffolding proteins of caveolae, and calmodulin undergo reciprocal Ca^{2+} -dependent association and dissociation with eNOS in the caveolar membrane that inhibits (caveolins) and activates (calmodulin) eNOS activity (10, 13, 21, 32). Thus it has been suggested that association of eNOS to the caveolae through caveolin-1 maintains eNOS in its inactive form; on the contrary, the release of eNOS from caveolae is thought to facilitate the synthesis of NO (13, 21, 32). In support to this, it has been demonstrated that the mice with targeted disruption of caveolin-1 exhibit enhanced eNOS activity (10). Given the caveolin importance in regulating NO generation, we evaluated the expression of this protein. We observed that in normal lean rats, caveolin-1 is more abundant in medulla than in cortex plasma membrane proteins and that caveolin-1 mRNA and protein levels were significantly upregulated in cortex and medulla of fatty Zucker rats fed with casein, suggesting that increased expression of caveolin-1, together with greater amount of eNOS in plasma membrane, further decreases NO production in renal tissue. An interesting observation of this study is that soy protein diet significantly reduced caveolin-1 expression and eNOS abundance in plasma membranes in the kidney of these animals, suggesting that another mechanism by which soy diet improves NO generation is by decreasing the expression of caveolin-1, a natural inhibitor of NO synthesis (10, 13, 18, 21).

Several studies in humans and animals have revealed that soy protein intake ameliorates proteinuria and progression of renal disease (9, 27, 30, 39, 46, 52, 53, 61). There are several

possible mechanisms to explain this effect of soy. 1) Isoflavones. A component of soy that is believed to be involved in this protective effect is the isoflavones, by mechanisms that are still unclear, but include the following possibilities. Isoflavones comprise the most common class of phytoestrogens present mainly in soybean products. After ingestion, isoflavones are hydrolyzed in the intestine by bacterial β -glucosidases and converted to the bioactive aglicones: genistein and daidzein. Because isoflavones possess an important hypocholesterolemic effect observed in this study (Table 1), this is one of the mechanisms that have been suggested to be involved in renal protection induced by these compounds (34, 39, 46). Renoprotection also could result from antioxidant properties of isoflavones, which not only could avoid formation of free radicals (45) but also might result in enhancing NO availability (29). Finally, preliminary evidence suggests that daidzein directly downregulates caveolin-1 protein expression in rat aorta, which in turn was associated with twofold increase in NO metabolites (61a). 2) Amino acid content in soy protein. Although both soy and casein protein sources contain the same amount of total amino acids, there are differences in the proportion of certain residues. For instance, L-arginine, precursor of NO, is more abundant in soy than in casein protein (7.6 vs. 3.7%, respectively) and glycine, another residue that has been shown to produce vasodilation (28), is also more abundant in soy protein (4.2 vs. 1.8%, respectively). Therefore, soy-fed rats received a greater proportion of two residues that could be directly involved in vasodilatory processes. 3) Soy-induced hypocholesterolemia. It is possible that caveolin-1 downregulation results from hypocholesterolemic effect of soy diet, because Fielding and Fielding (15) postulated that caveolae behave as sensors of free cholesterol content of the cell and that depletion of caveolar cholesterol leads to downregulation of caveolin-1 at mRNA and protein levels (14). Moreover, Feron et al. (12) observed that exposure of bovine endothelial cells to serum from hypercholesterolemic patients resulted in upregulation of caveolin-1, an effect that was associated with an impairment of basal NO release, together with an increase in formation of inhibitory caveolin-eNOS complex; thus these studies suggest that cholesterol level regulates caveolin-1 expression.

In summary, our data show that nephropathy associated with obesity in the obese Zucker rat model could be reduced by feeding animals with soy, instead casein protein diet. The protective effect of soy diet was associated with reduction in cholesterol and triglyceride levels, as well as correction of a marked reduction in NO generation, that was associated with restoration of a normal pattern of NOS expression in the kidney and reduction of eNOS, together with a downregulation of caveolin-1 in plasma membrane proteins.

GRANTS

This work was supported by research Grants G34511M and CO1-40182A-I from the Mexican Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Tecnológica IN208602-3 of National University of Mexico (to N. A. Bobadilla) and American Soybean Association. Part of this work was presented at the EB Meeting in San Diego, CA, 2003, and Washington, DC, 2004.

REFERENCES

- Abassi Z, Gurbanov K, Rubinstein I, Better OS, Hoffman A, and Winaver J. Regulation of intrarenal blood flow in experimental heart failure: role of endothelin and nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F766-F774, 1998.
- Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A, Corna D, Zoja C, Cavallotti D, and Remuzzi G. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 52: 171-181, 1997.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, and Herrera-Acosta J. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F791-F798, 1998.
- Bobadilla NA, Herrera JP, Merino A, and Gamba G. Semiquantitative PCR: a tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch Med Res* 28: 55-60, 1997.
- Bobadilla NA, Tapia E, Jimenez F, Sanchez-Lozada LG, Santamaria J, Monjardin A, Bolio A, Gamba G, and Herrera-Acosta J. Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F464-F471, 1999.
- Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 36: 148-153, 1977.
- Cao G, Yang G, Timme TL, Saika T, Truong LD, Satoh T, Goltsov A, Park SH, Men T, Kusaka N, Tian W, Ren C, Wang H, Kadmon D, Cai WW, Chinnault AC, Boone TB, Bradley A, and Thompson TC. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am J Pathol* 162: 1241-1248, 2003.
- Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, and Thiemermann C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 61: 862-871, 2002.
- Djuric Z, Chen G, Doerge DR, Heilbrun LK, and Kucuk O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett* 172: 1-6, 2001.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, and Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452, 2001.
- Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, Gonzalez MA, Uribe N, Garcia-Torres R, Lopez-Casillas F, Gamba G, and Bobadilla NA. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63: 43-52, 2003.
- Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, and Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 103: 897-905, 1999.
- Feron O, Michel JB, Sase K, and Michel T. Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 37: 193-200, 1998.
- Fielding CJ, Bist A, and Fielding PE. Caveolin mRNA levels are upregulated by free cholesterol and downregulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3753-3758, 1997.
- Fielding PE and Fielding CJ. Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* 35: 14932-14938, 1996.
- Frisbee JC and Stepp DW. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1304-H1311, 2001.
- Fulton J, Harris MB, Venema RC, and Stepp DW. Altered expression of endothelial NO synthase in the microcirculation of the obese Zucker rat (Abstract). *FASEB J* 17: 4861, 2003.
- Gades MD, Van Goor H, Kaysen GA, Johnson PR, Horwitz BA, and Stern JS. Brief periods of hyperphagia cause renal injury in the obese Zucker rat. *Kidney Int* 56: 1779-1787, 1999.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, and Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271: 27237-27240, 1996.
- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, and Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272: 25437-25440, 1997.

20. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, and Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6448–6453, 1996.
21. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, and Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275: 22268–22272, 2000.
22. Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 41: 625–633, 2003.
23. Hattori M, Nikolic-Paterson DJ, Miyazaki K, Isbel NM, Lan HY, Atkins RC, Kawaguchi H, and Ito K. Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. *Kidney Int Suppl* 71: S47–S50, 1999.
24. Hayashi K, Kanda T, Homma K, Tokuyama H, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Kumagai H, and Saruta T. Altered renal microvascular response in Zucker obese rats. *Metabolism* 51: 1553–1561, 2002.
25. Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK, Tyagi SC, and Hall JE. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol* 12: 1211–1217, 2001.
26. Henry RJ, Sobel CH, and Segalove M. Turbidimetric determination of proteins with sulfoalicylic and trichloroacetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 92: 748–751, 1956.
27. Hermansen K, Sondergaard M, Hoie L, Carstensen M, and Brock B. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 24: 228–233, 2001.
28. Herrera-Acosta J, Tapia E, Bobadilla NA, Romero L, Cermeno JL, Alvarado JA, and Gabbai FB. Evaluating hyperfiltration with glycine in hypertensive rats with renal ablation. *Hypertension* 11: 133–137, 1988.
29. Hwang J, Wang J, Morazzoni P, Hodis HN, and Sevanian A. The phytoestrogen equal increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radic Biol Med* 34: 1271–1282, 2003.
30. Jibani MM, Bloodworth LL, Foden E, Griffiths KD, and Galpin OP. Predominantly vegetarian diet in patients with incipient and early clinical diabetic nephropathy: effects on albumin excretion rate and nutritional status. *Diabet Med* 8: 949–953, 1991.
31. Johnson PR, Stern JS, Horwitz BA, Harris RE Jr, and Greene SF. Longevity in obese and lean male and female rats of the Zucker strain: prevention of hyperphagia. *Am J Clin Nutr* 66: 890–903, 1997.
32. Ju H, Zou R, Venema VJ, and Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272: 18522–18525, 1997.
33. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, and D'Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int* 59: 1498–1509, 2001.
34. Kasiske BL, O'Donnell MP, Cleary MP, and Keane WF. Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats. *Kidney Int* 33: 667–672, 1988.
35. Kim H, Peterson TG, and Barnes S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor- β signaling pathways. *Am J Clin Nutr* 68: 1418S–1425S, 1998.
36. Klahr S and Morrissey J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 41: S3–S7, 2003.
37. Kone BC, Kunczewicz T, Zhang W, and Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F178–F190, 2003.
38. Maddox DA, Alavi FK, Santella RN, and Zawada ET Jr. Prevention of obesity-linked renal disease: age-dependent effects of dietary food restriction. *Kidney Int* 62: 208–219, 2002.
39. Maddox DA, Alavi FK, Silbernack EM, and Zawada ET. Protective effects of a soy diet in preventing obesity-linked renal disease. *Kidney Int* 61: 96–104, 2002.
40. Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, and McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 103: 1860–1867, 1978.
41. Matsuda S, Arai T, Iwata K, Oka M, and Nagase M. A high-fat diet aggravates tubulointerstitial but not glomerular lesions in obese Zucker rats. *Kidney Int Suppl* 71: S150–S152, 1999.
42. Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Velhaskari M, Montani D, and Klahr S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int* 45: 998–1005, 1994.
43. Munoz-Fuentes RM, Vargas F, and Bobadilla NA. Assay validation for determining nitrites and nitrates in biological fluids. *Rev Invest Clin* 55: 670–676, 2003.
44. Noris M and Remuzzi G. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in chronic renal disease. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 602–610, 1999.
45. Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Hernandez-Pando R, Medina-Campos ON, Cruz C, Murguía F, Juárez-Nicolas C, Correa-Rotter R, Torres N, and Tovar AR. Soy protein diet ameliorates renal nitrotyrosine formation and chronic nephropathy induced by puromycin aminonucleoside. *Life Sci* 74: 987–999, 2004.
46. Sakemi T, Ikeda Y, and Shimazu K. Effect of soy protein added to casein diet on the development of glomerular injury in spontaneous hypercholesterolemic male Imai rats. *Am J Nephrol* 22: 548–554, 2002.
47. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
48. Schmidt RJ and Baylis C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 58: 1261–1266, 2000.
49. Schmitz PG, O'Donnell MP, Kasiske BL, Katz SA, and Keane WF. Renal injury in obese Zucker rats: glomerular hemodynamic alterations and effects of enalapril. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 263: F496–F502, 1992.
50. Tamai O, Oka N, Kikuchi T, Koda Y, Soejima M, Wada Y, Fujisawa M, Tamaki K, Kawachi H, Shimizu F, Kimura H, Imaizumi T, and Okuda S. Caveolae in mesangial cells and caveolin expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 59: 471–480, 2001.
51. Tham DM, Gardner CD, and Haskell WL. Clinical review 97: potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2223–2235, 1998.
52. Tomobe K, Philbrick DJ, Oghorn MR, Takahashi H, and Holub BJ. Effect of dietary soy protein and genistein on disease progression in mice with polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 31: 55–61, 1998.
53. Tovar AR, Murguía F, Cruz C, Hernandez-Pando R, Aguilar-Salinas CA, Pedraza-Chaverri J, Correa-Rotter R, and Torres N. A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome. *J Nutr* 132: 2562–2569, 2002.
54. Velasquez MT and Bhatena SJ. Dietary phytoestrogens: a possible role in renal disease protection. *Am J Kidney Dis* 37: 1056–1068, 2001.
55. Wagner L, Riggleman A, Erdely A, Couser W, and Baylis C. Reduced nitric oxide synthase activity in rats with chronic renal disease due to glomerulonephritis. *Kidney Int* 62: 532–536, 2002.
56. Warnke RA and Kempson RL. The nephrotic syndrome in massive obesity: a study by light, immunofluorescence, and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 102: 431–438, 1978.
57. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, and Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 124–130, 1995.
58. Weisinger JR, Kempson RL, Eldridge FL, and Swenson RS. The nephrotic syndrome: a complication of massive obesity. *Ann Intern Med* 81: 440–447, 1974.
59. Wesson DE, Kurtzman NA, and Frommer JP. Massive obesity and nephrotic proteinuria with a normal renal biopsy. *Nephron* 40: 235–237, 1985.
60. Wever R, Boer P, Hijmering M, Stroes E, Verhaar M, Kastelein J, Verluis K, Lagerwerf F, van Rijn H, Koomans H, and Rabelink T. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1168–1172, 1999.
61. Williams AJ and Walls J. Metabolic consequences of differing protein diets in experimental renal disease. *Eur J Clin Invest* 17: 117–122, 1987.
- 61a. Woodman L and Boujaoude M. The isoflavone daidzein enhances nitric oxide synthesis by decreasing expression of caveolin-1 and increasing expression of calmodulin (Abstract). *FASEB J* 17: 5015, 2003.
62. Zhu Y, Lin JH, Liao HL, Friedli O Jr, Verna L, Marten NW, Straus DS, and Stemberman MB. LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 473–480, 1998.
63. Zhu Y, Lin JH, Liao HL, Verna L, and Stemberman MB. Activation of ICAM-1 promoter by lysophosphatidylcholine: possible involvement of protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1345: 93–98, 1997.

Low calorie commercial sugar is a sensitive marker of glomerular filtration rate

JAZMIN M. PÉREZ-ROJAS, JORGE A. BLANCO, GERARDO GAMBA, and NORMA A. BOBADILLA

Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México

Low calorie commercial sugar is a sensitive marker of glomerular filtration rate.

Background. Glomerular filtration rate (GFR) in humans and animals might be determined with precision by measuring the clearance of an ideal marker, such as inulin. However, the use of inutest, an inulin analog, is limited by its cost and accessibility. The present study tested whether low calorie commercial sugar (LC sugar) can be used to measure GFR during normal and renal dysfunction.

Methods. Two groups of 6 male Wistar rats weighing 300 to 350 g were included. One group was treated with a daily dose of cyclosporine (CsA) 30 mg/kg subcutaneously for 7 days and the other group was formed by nontreated control rats. In one half of each group, GFR was evaluated by using inutest and in the other half by using LC sugar. GFR was also evaluated by using a wide LC sugar plasma concentration range in an additional group.

Results. In nontreated rats, the mean GFR evaluated with LC sugar was 2.2 ± 0.1 mL/min. This value is equal to that obtained with inutest: 2.3 ± 0.1 mL/min. CsA administration produced a significant reduction of renal blood flow and renal function. The GFR reduction induced by CsA was similarly determined by both LC sugar and inutest to be at 1.0 ± 0.2 and 1.1 ± 0.2 mL/min ($P = NS$), respectively. In addition, GFR did not change when LC sugar plasma concentration gradually increased.

Conclusion. Our results show that in both normal and pathophysiologic conditions, LC sugar is a good marker of GFR similar to the gold standard inutest.

Quantifying glomerular filtration rate (GFR) with sensitive and specific techniques allows testing the extent and prognosis of renal dysfunction and contributes substantially to our understanding of a variety of renal disease mechanisms, as well as potentially increasing the accuracy of diagnosis and directing appropriate therapy. Moreover, GFR estimation is a powerful tool in experimental

models of renal disease that not only evaluates renal viability or success of new therapies, but also for studying mechanisms of renal injury.

Accurate renal function is evaluated through the measurement of the renal clearance of an ideal filtration marker. Inulin, an exogenous marker, is the only compound that is neither toxic nor metabolized, the excretion of which occurs exclusively by glomerular filtration, with no tubular reabsorption or secretion. Therefore, inulin clearance provides the most accurate method to measure GFR, as well as for evaluating single nephron GFR by micropuncture techniques, and is considered as the “gold standard” of renal function evaluation [1–6]. However, inulin solubility is low and tends to form precipitates in urine and plasma, complicating samples handling and inulin concentration determination [7, 8]. The introduction of polyfructosan (inutest), a more soluble compound, avoided this problem [6, 9–13]; nevertheless, the use of inutest is limited due to its high cost and because it is only produced in some European countries. Finally, a third alternative to accurately evaluate GFR is the use of radiolabeled markers, such as [3 H]inulin, [51 Cr]EDTA, and p-aminohippurate [10, 14–17], but these strategies have also a number of disadvantages associated with their cost and safety issues that are inherent to the use of radioisotopes, including the fact that in the case of [3 H], isotope concentration declines, resulting in underestimation of GFR [18].

In order to have an inexpensive and accessible exogenous GFR marker, we reasoned that the artificial sweetener LC sugar (<http://www.metco.com.mx/azucarbc2.html>); a low calorie sugar made of sucrose, that is widely available at very low cost, could be a GFR marker if possessing similar inulin properties such as being freely eliminated, nonsecreted, or tubular reabsorbed, as well as being neither toxic nor metabolized. To test this hypothesis, glomerular filtration rate in nontreated rats and in rats with certain degree of renal failure induced by acute CsA nephrotoxicity was evaluated by using LC sugar and compared with inutest as a gold standard. Our results show that LC sugar is an accessible, sensitive, and inexpensive

Key words: gold standard, inutest, renal dysfunction.

Received for publication February 4, 2005
and in revised form April 12, 2005, and April 28, 2005
Accepted for publication May 23, 2005

© 2005 by the International Society of Nephrology

marker of GFR similar to inutest or inulin markers, in both normal and pathophysiologic conditions.

METHODS

In order to evaluate if low calorie sugar (LC sugar) is a sensitive marker of glomerular filtration rate, LC sugar GFR was determined in nontreated rats and in rats with renal dysfunction induced by cyclosporine administration. The values were compared with GFR determined by inutest. Two groups of 6 or 7 male Wistar rats weighing 300 to 350 g fed with standard chow diet were included in the study. One was treated with a daily dose of CsA 30 mg/kg subcutaneously for 7 days and the other group was formed by nontreated rats. In one half of each group, GFR was evaluated by using inutest and in the other half by using LC sugar. In addition, one group of 6 rats was included to evaluate the linearity of LC sugar excretion by using different concentrations that ranged from 5% to 12.5%. All procedures followed were in accordance with our institutional guidelines.

Functional studies

All animals were placed in metabolic cages and urine that was spontaneously voided during every 24 hours was collected. Serum and urine creatinine concentration was measured with an autoanalyzer (Technicon RA-1000; Bayer Co., Tarrytown, NY, USA).

After urine collection, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30 mg/kg) and placed on a homeothermic table to maintain core body temperature at 37°C, by means of a rectal probe attached to a homeothermic blanket. Trachea, both jugular veins, femoral arteries, were catheterized with polyethylene tubing PE-240 and PE-50. Rats were maintained under euvoletic conditions by infusing 10 mL/kg of body weight of isotonic rat plasma during surgery, followed by an infusion of 5% polyfructosan, (Inutest; Laevosan-Gesellschaft, Linz, Austria) or 5% LC sugar (METCO; Mexico City, Mexico) diluted in 0.9% saline solution at 1.6 mL/hr. Mean arterial pressure was monitored with a pressure transducer (Model p23 db; Gould, Hato Rey, Puerto Rico) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA, USA). Via a midline abdominal incision, the left renal artery was exposed. An ultrasound transit-time flow probe (1RB, Transonic, Ithaca, NY, USA) was placed around the left renal artery and filled with ultrasonic coupling gel (HR Lubricating Jelly; Carter-Wallace, New York, NY, USA) for recording renal blood flow (RBF). After an equilibrium period of 60 minutes, urine was drained from the bladder by gravity via PE-50 tube and collected for 30 to 60 minutes and blood samples were taken at the beginning and at the end of the urine collection period.

In order to determine that LC sugar is neither reabsorbed nor secreted, the LC sugar linearity of excretion over a wide plasma concentration range was studied. After the surgery, rats were maintained in euvoletic conditions, as was detailed before. Four determinations of GFR were performed in the same rat by infusing increased concentrations of LC sugar that were 5%, 7.5%, 10%, and 12.5%. For each concentration, an equilibrium period of 30 to 45 minutes was allowed and thereafter urine was drained from the bladder by gravity and collected for 30 to 45 minutes and blood samples were taken at the beginning and at the end of each urine collection period.

GFR evaluation by inutest or LC sugar

Inutest and LC sugar concentrations in urine and plasma were determined by the Davidson et al [19] modified technique, which requires the use of anthrone reagent for determination of fructose. Briefly, anthrone is freshly prepared at final concentration of 0.08% in diluted sulfuric acid and stored at 4°C in a dark bottle until its use.

Standard solutions

Stock solutions containing 1 mg per mL of inutest and LC sugar were prepared. Different dilutions of these stock solutions were used as standards of inutest and LC sugar, respectively. The standard set concentrations of LC sugar were between 10 and 100 µg per milliliter.

Protein-free plasma samples were prepared by adding 250 µL of water and 125 µL of 1.0 N TCA to 20 µL of plasma. The mixture was shaken, centrifuged, and protein free supernatant isolated for subsequent analysis. Urines were diluted for maintaining LC sugar concentrations within analytical range (10 to 100 mg per mL). Anthrone reagent aliquots of 500 µL were placed in Eppendorff tubes, maintained on ice, and 100 µL of each sample (standard solution, protein-free plasma or urine) was added. All tubes were shaken vigorously and incubated on a water bath at 38°C for 50 minutes. The tubes were cooled and the absorbance at 620 nm was recorded by using a Beckman spectrophotometer. Appropriate plasma and urine blanks, collected before inutest or LC sugar infusion, were run in each determination. All samples from normal and CsA treated rats were run in duplicate and a set of standards was included in each determination.

Inutest, LC sugar, and creatinine clearances were calculated by the standard formula $C = U * V/P$, where U is the marker concentration in urine, V is urine flow rate, and P is the marker concentration in plasma.

Statistical analysis

Linear regression and correlation were calculated by the least-squares method and the values represent mean

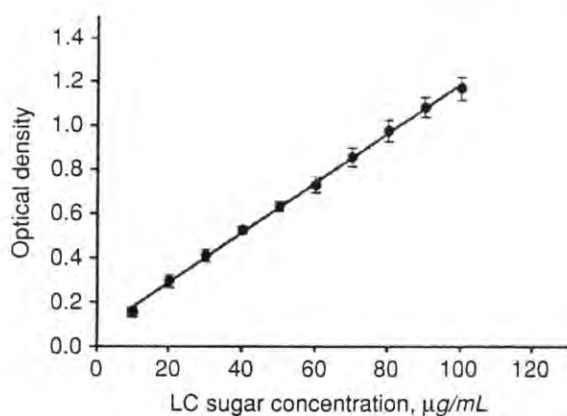


Fig. 1. Representative standard curves for LC sugar concentrations by using anthrone reagent. Two sets of standards were made. Linear regression and correlation were calculated by the least-squares method and the values represent the mean value of each concentration \pm standard deviation.

value \pm standard deviation. Results of the quantitative traits are expressed as mean \pm standard error. Statistical comparisons among experimental groups were performed by using analysis of variance (ANOVA), and for comparing different experimental periods in the same group, repeated measures ANOVA was used. When ANOVA showed a statistically significant difference, Student–Newman–Keuls test was performed. Statistical significance for all tests was judged at $P < 0.05$.

RESULTS

Figure 1 depicts the LC sugar standard concentration curve. Ten different concentrations varying from 10 to 100 $\mu\text{g/mL}$ were analyzed. Each point represents the mean of absorbance \pm standard deviation of 6 different determinations and shows minimal fluctuations among the performed analysis. LC sugar determined by Davidson et al [19] technique by using anthrone gives a linear and highly reproducible standard curve. The correlation coefficient was 0.9939 and r squared 0.9879. Increased LC sugar concentrations showed a linear pattern with respect to absorbance values. Thus, LC sugar concentration could be determined by Davidson's technique by using anthrone reagent.

LC sugar infusion modified neither MAP nor RBF when they were compared with their respective controls infused with inutest. Although CsA treated rats infused with inutest or LC sugar tended to present minor values of MAP than nontreated rats (96.4 ± 3 and 92 ± 3.4 mm Hg, vs. 112.6 ± 2.8 and 109.0 ± 2.4 , respectively), there were no significant differences among the studied groups. These results can be also seen in Figure 2.

The fall of RBF evidenced that both groups that received CsA presented renal dysfunction. In inutest infused rats, RBF for CsA-treated rats was 2.9 ± 0.5 ver-

sus 6.1 ± 0.6 mL/min for nontreated rats. In the same way, in LC sugar infused rats it was 2.9 ± 0.5 versus 5.9 ± 0.6 mL/min, respectively. Thus, similar reduction was recorded in CsA treated rats infused with inutest or LC sugar. These results showed that LC sugar infusion did not alter these physiologic parameters and evidenced that both groups of CsA presented nephrotoxicity.

Renal creatinine clearance is shown in Figure 3. Nontreated and CsA treated rats that were used for inutest infusion had similar renal function that those used for LC sugar infusion assessed by creatinine clearance. The values of creatinine clearance in nontreated and CsA treated rats that were used for inutest infusion were 1.8 ± 0.2 and 0.6 ± 0.1 mL/min, respectively, and for LC sugar infusion were 1.7 ± 0.3 and 0.7 ± 0.2 mL/min, respectively. These results also show that CsA-treated rats present renal dysfunction.

Figure 4 shows the estimation of glomerular filtration rate by using LC sugar as a marker of GFR compared with inutest. In nontreated rats, the mean GFR evaluated with LC sugar was 2.2 ± 0.1 . This value was similar to that obtained with inutest: 2.3 ± 0.1 mL/min. The GFR values normalized by body weight (BW) were 0.72 ± 0.04 and 0.73 ± 0.05 mL/min/100 BW, respectively.

CsA administration produced a significant reduction of GFR that was equally determined by both LC sugar and inutest. GFR in LC sugar infused rats was 1.1 ± 0.2 and in inutest infused rats was 1.0 ± 0.2 mL/min ($P = \text{NS}$). The GFR normalized by body weight was 0.36 ± 0.06 and 0.35 ± 0.05 mL/min/100 BW, respectively. In addition, as we detailed before, the GFR assessed by creatinine clearance was lower than inutest and LC sugar. All these results indicate that LC sugar is a GFR marker comparable to the "gold standard" inulin.

Figure 5 depicts the assessment of GFR by using different LC sugar concentrations, ranging from 5% to 12.5%. At the beginning and at the end of each urine recollection, blood samples were taken to evaluate LC sugar plasma concentration, and the mean value was used to estimate GFR in each urine recollection. As expected, LC sugar plasma concentration gradually raised with increased concentration of LC sugar infusion, as shown Figure 5A. Each point represents the mean value of the LC sugar plasma concentrations at the beginning and at the end of each urine recollection. For LC sugar infusion at 5% the concentration was 0.4 ± 0.05 mg/mL, for 7.5% it was 0.7 ± 0.07 mg/mL, for 10% the value was 0.9 ± 0.12 mg/mL, and for 12.5% it was 1.2 ± 0.05 mg/mL. All these differences were statistically different.

Figure 5B shows that in spite of increased LC sugar plasma concentration the GFR remained unaltered. The GFR value obtained with 5% LC sugar infusion was 2.3 ± 0.2 mL/min, with 7.5% it was 2.1 ± 0.1 mL/min, with 10% the value was 2.1 ± 0.1 mL/min, and finally, the GFR with 12.5% was 2.3 ± 0.5 mL/min. No statistical differences were observed among the different used concentrations.

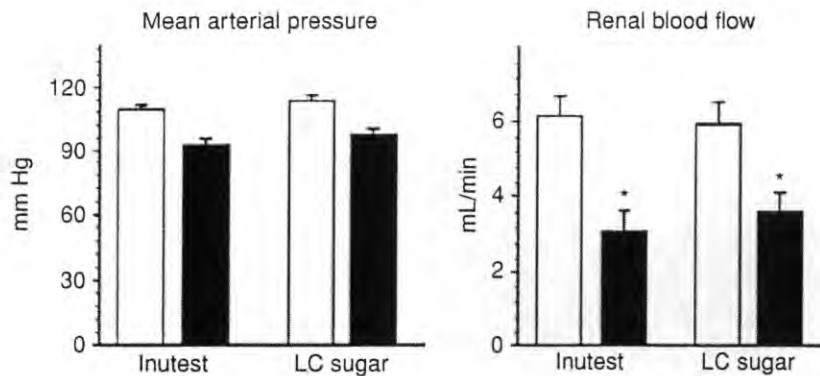


Fig. 2. Mean arterial pressure and renal blood flow was recorded in nontreated rats (white bars) and in CsA treated rats (black bars) infused with inutest or LC sugar as markers of glomerular filtration rate. The results are expressed as means \pm standard error. Statistical comparisons between experimental groups were performed by using ANOVA and Student–Newman–Keuls test. * $P < 0.05$ vs. their respective nontreated groups.

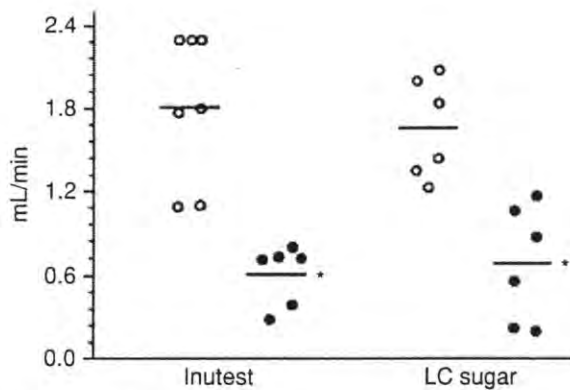


Fig. 3. Creatinine clearance in nontreated rats (white circles) and in CsA treated rats (black circles) that were used in inulin or LC sugar groups. Individual values are shown in the graph. Horizontal lines represent the mean value for each group. Statistical comparisons between experimental groups were performed by using ANOVA and Student–Newman–Keuls test. * $P < 0.05$ vs. their respective nontreated groups.

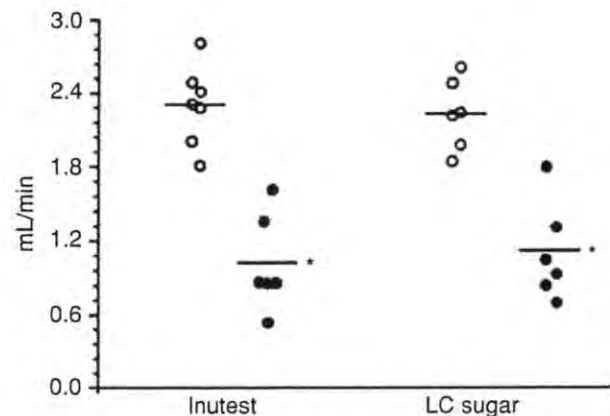


Fig. 4. Inutest and LC sugar were used as markers of glomerular filtration rate, white circles represent the values of GFR in nontreated rats and the black circles the GFR values in CsA treated rats. Horizontal lines represent the mean value for each group. Statistical comparisons between experimental groups were performed by using ANOVA and Student–Newman–Keuls test. * $P < 0.05$ vs. their respective nontreated groups.

DISCUSSION

Here we present an alternative marker of glomerular filtration rate by using low calorie sugar. Our results indicate that measurement of LC sugar concentration in plasma and urine is a useful and accurate marker to estimate GFR in normal conditions and during renal dysfunction. The estimation of GFR with LC sugar and inutest was virtually identical, suggesting that LC sugar is a sensitive marker of GFR with the advantages that it is easy to acquire together with its very low cost.

The assessment of glomerular filtration rate (GFR) is the most commonly used test of renal function. Endogenous markers that are widely used for the estimation of GFR, such as serum creatinine, are suitable to estimate renal function in the clinical setting and in subjects with normal renal function, but are not ideal to determine GFR in patients with reduced renal function or when an accurate GFR is required (i.e., experimental models of renal disease). In consequence, inulin clearance provides the most accurate method to measure GFR, as well as

for evaluating single nephron GFR in experimental models of renal disease by using micropuncture techniques. Thus, inulin is considered as the “gold standard” of renal function evaluation [1–6], but its use is limited for the requirement of IV infusion.

Inulin concentration is detected through colorimetric assay by the action of anthrone reagent, which reacts mainly with fructose and in much lesser proportion with glucose [20]. The glucose interference was solved by the modification made by Davidson et al [19], under the condition proposed by these authors; glucose did not react with anthrone and is almost undetectable by this method. The present study was undertaken to evaluate the application of LC sugar as a new marker of GFR by using Davidson et al [19] technique.

LC sugar is a patented formula of a food industry from Mexico (METCO; <http://www.metco.com.mx/azucarbc2.html>) isolated from sugar cane. LC sugar contains mainly sucrose processed with sweeteners.

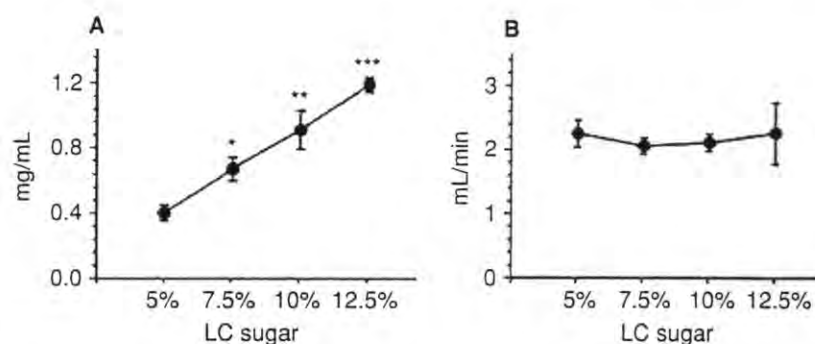


Fig. 5. Effect of increasing LC sugar concentrations infusion on (A) LC sugar plasma concentration and (B) glomerular filtration rate in nontreated rats. Each point represents mean value from 6 different rats \pm standard error. Statistical comparison was performed by using repeated measures ANOVA and Student–Newman–Keuls test. * $P < 0.05$ vs. 5% LC sugar infusion period, ** $P < 0.05$ vs. 7.5% LC sugar infusion period, and *** $P < 0.05$ vs. 10% LC sugar infusion period.

Because sucrose is composed by fructose, we reasoned that LC sugar could be detected by the Davidson's modified technique and that LC sugar in plasma will be freely filtrated and neither reabsorbed nor secreted. The fact that LC sugar standard curve showed to be reproducible and highly lineal, together with the observation that GFR values detected with LC sugar in rats were similar to those estimated with inutest, indicate that LC sugar could be indeed accurately analyzed with anthrone reagent. In order to know if another sweetener such as Splenda® (Splenda, McNeil Nutritionals, Washington, PA, USA), which contains maltodextrin and sucralose, but not sucrose, could be also a GFR marker, some experiments were performed (data not shown). We observed that anthrone did not react with the components of Splenda.

Our results also suggest that LC sugar is not secreted or reabsorbed at tubular level, because if this were the case, GFR values might be lesser or greater than inutest GFR. We observed that when LC sugar plasma concentration gradually rises, the GFR did not change (Fig. 5). These results suggest that LC sugar is a solely GFR-dependent excretion.

It is known that endogenous creatinine can be used to estimate GFR with reasonable degree of certain in animal or subjects with normal renal function, but reduction in renal function is associated with increased tubular secretion of creatinine. Therefore, as renal dysfunction progresses, assessment of GFR by creatinine clearance is less accurate. Thus, to determine if LC sugar could be used to estimate GFR during renal dysfunction, we used an animal model of renal failure induced by CsA administration [6, 12, 21–23]. In the present study we found a significant increased of LC sugar plasma concentrations and reduction of LC sugar renal clearance in these animals. The similitude of GFR by LC sugar and inutest in normal and pathologic conditions suggests that LC sugar is also a gold standard method for the detection of glomerular filtration rate.

Assessment of GFR using LC sugar provides 3 distinctive advantages. One is the incredible low cost per experiment. In our experience with rats, a typical inulin experiment costs approximately \$10.00, whereas the cost

per rat using LC sugar is \$0.002 dollars. Thus, for example, a regular manuscript that reports experiments made on 6 groups of 8 rats each (i.e., 48 rats, without considering the animals lost along the study) represents a cost of \$480.00 dollars to determine GFR using inutest, in contrast with 10 cents using LC sugar. This represents about a 5000-fold lesser cost per experiment, which certainly would be convenient in most of the renal research laboratories throughout the world. Second, LC sugar is a safe compound that does not present the inconveniences associated with dealing with radioactive compounds. Third, LC sugar is widely available.

Our results also suggest that LC sugar can potentially be used in the clinical setting once it will be manufactured for intravenous administration. This assumption, however, will have to wait until LC sugar is adequately prepared and proven for use in humans.

CONCLUSION

The data presented here demonstrate that LC sugar clearance is a convenient, accurate, and accessible marker to estimate the glomerular filtration rate.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to members of the Molecular Physiology Unit for suggestions and discussion. This work was supported by research grants C01-40182 and IN208602 from the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and National University of Mexico (DGAPA), respectively, to N.A.B.

Reprint requests to Norma A. Bobadilla, Ph.D., Unidad de Fisiología Molecular, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 14000 México City, México.

E-mail: nab@biomedicas.unam.mx or nabs@quetzal.innsz.mx

REFERENCES

- CAMPENS D, BUNTINX F: Selecting the best renal function tests. A meta-analysis of diagnostic studies. *Int J Technol Assess Health Care* 13:343–356, 1997
- PREVOT A, MARTINI S, GUIGNARD JP: [Glomerular filtration markers in pediatrics]. *Rev Med Suisse Romande* 122:625–630, 2002
- RAHN KH, HEIDENREICH S, BRUCKNER D: How to assess glomerular function and damage in humans. *J Hypertens* 17:309–317, 1999

4. THOMSON SC, DENG A, KOMINE N, et al: Early diabetes as a model for testing the regulation of juxtaglomerular NOS I. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F732-F738, 2004
5. FUJIHARA CK, AVANCINI COSTA MALHEIROS DM, DE LOURDES NORONHA I, et al: Mycophenolate mofetil reduces renal injury in the chronic nitric oxide synthase inhibition model. *Hypertension* 37:170-175, 2001
6. BOBADILLA NA, TAPIA E, FRANCO M, et al: Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 46:773-779, 1994
7. HERRERA-ACOSTA J, TAPIA E, BOBADILLA NA, et al: Evaluating hyperfiltration with glycine in hypertensive rats with renal ablation. *Hypertension* 11:133-137, 1988
8. GABBAI FB, TAPIA E, CERMENO JL, et al: Evaluation of renal functional reserve of contralateral kidney of two-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats. *J Hypertens* 4(Suppl):S279-S281, 1986
9. ZHANG XZ, ARDISSINO G, GHIO L, et al: L-arginine supplementation in young renal allograft recipients with chronic transplant dysfunction. *Clin Nephrol* 55:453-459, 2001
10. CLARIS-APPIANI A, TIRELLI AS, ARDISSINO G, et al: Hypotonic saline infusion alters the renal response to amino acids in men. *Am J Physiol Renal Physiol* 276:F137-F142, 1999
11. WILKINS BH: A reappraisal of the measurement of glomerular filtration rate in pre-term infants. *Pediatr Nephrol* 6:323-327, 1992
12. BOBADILLA NA, GAMBA G, TAPIA E, et al: Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: Effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:F791-F798, 1998
13. FRANCO M, BOBADILLA NA, SUAREZ J, et al: Participation of adenosine in the renal hemodynamic abnormalities of hypothyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 270:F254-F262, 1996
14. COLE M, PRICE L, PARRY A, et al: Estimation of glomerular filtration rate in pediatric cancer patients using ⁵¹Cr-EDTA population pharmacokinetics. *Br J Cancer* 90:60-64, 2004
15. ESTORCH M, TEMBL A, ANTONJOAN R, et al: Evaluation of renal graft haemodynamics by ⁵¹Cr-EDTA and o-[¹³¹I]iodohippurate: Its use in the early diagnosis of glomerular hyperfiltration. *Nucl Med Commun*. 24:679-682, 2003
16. DARLING IM, MORRIS ME: Evaluation of "true" creatinine clearance in rats reveals extensive renal secretion. *Pharm Res* 8:1318-1322, 1991
17. SHALMI M, LUNAU HE, PETERSEN JS, et al: Suitability of tritiated inulin for determination of glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Physiol* 260:F283-F289, 1991
18. WINDFELD S, JONASSEN TE, CHRISTENSEN S: [³H]Inulin as a marker for glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F575-F576, 2003
19. DAVIDSON DW, SACKNER MA: Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62:351-356, 1963
20. YOUNG MK, Jr., RAISZ LG: An anthrone procedure for determination of inulin in biological fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 80:771-774, 1952
21. SCHWEDLER SB, BOBADILLA N, STRIKER LJ, et al: Pentosan polysulfate treatment reduces cyclosporine-induced nephropathy in salt-depleted rats. *Transplantation* 68:1583-1588, 1999
22. BOBADILLA NA, TAPIA E, JIMÉNEZ F, et al: Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F464-F471, 1999
23. FERIA I, PICHARDO I, JUAREZ P, et al: Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63:43-52, 2003