



UNIVERSIDAD NACIONAL **UN/M**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTO RENOPROTECTOR DEL
FIBROQUEL EN LA NEFROTOXICIDAD
CRÓNICA POR CICLOSPORINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**QFB. KATY ALEJANDRA SÁNCHEZ
POZOS**



Tutor: DRA. NORMA ARACELI
BOBADILLA SANDOVAL

MÉXICO, D. F.

Junio 2008



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.

EFEECTO RENOPROTECTOR DEL FIBROQUEL EN LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA POR CICLOSPORINA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval en el en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias y Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Dra. Victoria Chagoya de Sánchez | IFC, UNAM |
| Dr. Armando Tovar Palacio | Facultad de Medicina, UNAM |
| Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval | IIB, UNAM |

La realización de este proyecto fue apoyado por CONACYT (40182 y 48483) y la PAPIIT (IN-228206-3). Para la realización de la presente tesis de maestría me fue otorgada una beca por CONACYT

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

| | | |
|------------|-------------------------------------|-----------|
| Presidente | Dra. Victoria Chagoya de Sánchez | IFC, UNAM |
| Vocal | Dr. Gerardo Gamba Ayala | IIB, UNAM |
| Secretario | Dra. María de Lourdes Massieu Trigo | IFC, UNAM |
| Suplente | Dr. Julio Morán Andrade | IFC, UNAM |
| Suplente | Dr. Enrique Ortega Soto | IIB, UNAM |

A mis padres

Agradecimientos

Gracias a mis padres, a mi hermano Miguel y a mi hermana Liz, quienes siempre han creído en mí y en todo momento me han brindado su apoyo. Han sido mi empuje para seguir adelante.

A la Dra. Bobadilla a quien admiro, le agradezco su comprensión, sus palabras de aliento, su paciencia sobre todo. Le agradezco la oportunidad que me brindó al aceptarme en su laboratorio. En el tiempo que llevo trabajando a su lado he aprendido lo que significa hacer investigación.

Agradezco a Jazmina con mucho cariño, porque gracias a ella recuperé la confianza en mi misma y la creencia en mi capacidad para hacer ciencia. Mucho de lo aprendido, se lo debo a ella.

Agradezco a Vania, por los dos años de apoyo que me brindó, sobretodo por los momentos difíciles en los que estuvo conmigo, porque me dio valor para tomar decisiones y me contagió de alegría en mis momentos tristes.

a César, quien me ha brindado su apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio, me ha escuchado, ha estado en los momentos cruciales y quien me ha enseñado que los logros no se disfrutan igual cuando no tienes a las personas queridas a tu lado.

Agradezco también de manera especial a Caro por apoyarme, por su cariño, por sus consejos y por su amistad sincera e incondicional. Gracias por presionarme para escribir este trabajo.

A mi tía Martha y mi tío Fernando, por su apoyo y sus palabras, porque siempre están ahí para escucharme.

A mis amigos, que me apoyaron durante los momentos más difíciles Adriana, Hebe, Luisa y Alejandro, con quienes he compartido tantos años de amistad sincera.

A mis amigos del laboratorio que me brindaron su amistad y su ayuda en todo momento: Pedro, Rafa, Diana, Abi, Jonatán, Juan, Tino y Norma Vázquez.

En general a mis compañeros del laboratorio de Nefrología y Metabolismo Mineral, les agradezco su apoyo.

*De que hemos de vivir sino de una complicación:
formas de respirar distintas, creadas de múltiples formas.
Una búsqueda sin objeto (aunque ya este dicho).
La deformación de la célula en sentimientos, dolor
o en su defecto en ... amor*

Séneca Reis

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 3 |
| Ciclosporina | 3 |
| Fisiología del Riñón | 5 |
| <i>La nefrona</i> | 6 |
| Nefrotoxicidad por ciclosporina | 9 |
| <i>Nefrotoxicidad aguda</i> | 9 |
| <i>Nefrotoxicidad crónica</i> | 10 |
| <i>Modelos experimentales de nefrotoxicidad</i> | 14 |
| <i>Estrategias desarrolladas para reducir la nefrotoxicidad por CsA</i> | 15 |
| Colágena-PVP (fibroquel) | 19 |
| OBJETIVO | 22 |
| Objetivos Particulares | 22 |
| MATERIAL Y METODOS | 23 |
| Protocolo Experimental | 23 |
| Estudios Fisiológicos | 23 |
| Estudios Bioquímicos | 24 |
| Estudios Histológicos | 26 |
| Estudios Moleculares | 27 |
| Análisis Estadístico | 28 |
| RESULTADOS | 29 |
| Estudios Fisiológicos | 29 |
| Estudios Histológicos | 31 |

| | |
|---|-----------|
| Estudios Bioquímicos y Moleculares | 35 |
| DISCUSIÓN | 40 |
| CONCLUSIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA | 47 |
| INDICE DE ABREVIATURAS | 56 |

RESUMEN

En nuestro país, la insuficiencia renal terminal (IRT) constituye un problema económico y de salud pública. El tratamiento de la IRT consiste en mantener a estos pacientes en diálisis peritoneal o hemodiálisis, en lo que se consigue la donación de un riñón, ya sea de cadáver o de donador vivo relacionado. El éxito del trasplante renal y de otros órganos depende del uso de agentes inmunosupresores. En la década de los ochentas, indudablemente el principal impacto se dio con la introducción al mercado del inmunosupresor conocido como ciclosporina (CsA), lo que permitió aumentar de forma considerable la sobrevida del paciente y del injerto, la cual no se ha modificado con la introducción de nuevas estrategias inmunosupresoras que además son mucho más costosas. Sin embargo, el uso a largo plazo de la CsA es limitado debido a la nefrotoxicidad que produce, la cual se caracteriza por disfunción renal y daño estructural irreversible como, fibrosis túbulointersticial (FTI) y arteriopatía. Estudios recientes han mostrado que agentes antifibróticos pueden reducir el daño estructural inducido por CsA. El fibroquel o colágena-PVP es un medicamento producido por una industria farmacéutica mexicana y es utilizado para reducir las cicatrices queloides. Así mismo, estudios recientes en pacientes con artritis reumatoide han mostrado que la colágena-PVP posee propiedades antifibróticas y anti-inflamatorias. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar si la administración de fibroquel previene o reduce el desarrollo de fibrosis y arteriopatía, alteraciones características de la nefrotoxicidad crónica inducida por ciclosporina. Se estudiaron cuatro grupos de doce ratas Wistar macho cada uno: ratas a las que se administró aceite de oliva como vehículo (Veh, 1 ml/kg s.c.), ciclosporina (15 mg/kg/día s.c.), fibroquel (0.2 mg/día, i.p.), y CsA + fibroquel. Todos los tratamientos fueron administrados durante 15 días y el grupo control fue alimentado en forma pareada. Se evaluó la función renal y el daño estructural, éste último mediante la cuantificación de la arteriopatía y la muerte celular por apoptosis, así como el área afectada por FTI mediante morfometría. Se evaluaron los niveles de lipoperoxidación y los niveles de RNAm de enzimas antioxidantes, TGF- β , caspasa-3 y de la molécula de daño renal Kim-1.

La administración de CsA produjo disfunción renal y daño estructural que se evidenció por el desarrollo de arteriopatía y FTI. El daño renal observado se asoció con aumento de lipoperoxidación y muerte celular por apoptosis. En contraste, la administración de fibroquel mejoró la disfunción renal, disminuyó en forma significativa la arteriopatía y el área afectada por FTI, y previno la muerte celular por apoptosis en la nefrotoxicidad crónica por CsA. El efecto renoprotector del fibroquel en la nefrotoxicidad crónica inducida por ciclosporina, se asoció con una reducción de la citocina profibrótica TGF- β y con la prevención del estrés

oxidativo, lo cual correlacionó con el menor desarrollo de fibrosis túbulointersticial en este grupo. El menor estrés oxidativo observado, parece ser el resultado del restablecimiento de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa, aunque no podemos descartar una propiedad antioxidante intrínseca del fibroquel.

Nuestros resultados muestran que la administración del fibroquel resultó ser una maniobra farmacológica útil para reducir la nefrotoxicidad crónica inducida por CsA y sugieren que el efecto renoprotector conferido por el fibroquel parece resultar de su propiedades, antifibróticas y antiapoptóticas y muy probablemente también por poseer acción antioxidante.

INTRODUCCION

En nuestro país, la insuficiencia renal terminal (IRT) constituye un problema económico y de salud pública. El tratamiento de la IRT consiste en primera instancia en someter a los pacientes que la padecen a diálisis peritoneal o hemodiálisis, dando un lapso de tiempo para conseguir una donación de riñón, ya sea de cadáver o de donador vivo relacionado. Adicionalmente, estos pacientes requieren de inmunosupresión para evitar el rechazo del injerto siendo la administración de ciclosporina el tratamiento más utilizado en nuestro país por su potencia inmunosupresora y su bajo costo frente a las nuevas terapias inmunosupresoras.

Ciclosporina

La ciclosporina (CsA) es un endecapéptido cíclico e insoluble, que se obtiene del hongo *Tolypocladium inflatum*. La eficacia de la CsA la ha convertido en la terapia más utilizada en la última década para evitar el rechazo de órganos trasplantados y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Fig. 1) (1).

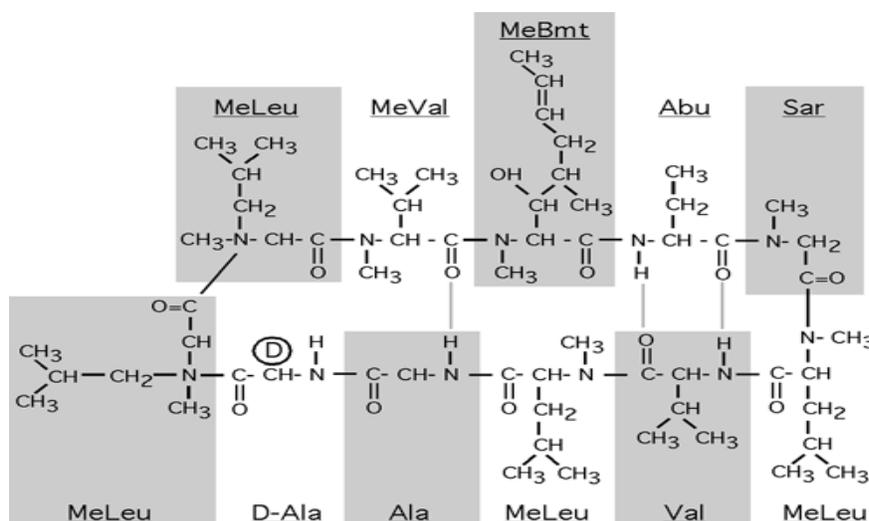


Fig. 1. Estructura química de la CsA.

La CsA ejerce su efecto por medio de la inhibición específica y reversible de la proliferación y crecimiento de células T activadas vía interleucina-2. En condiciones normales, la calcineurina que es una fosfatasa dependiente de calcio, defosforila al factor nuclear de transcripción de células T activadas (NFAT) lo que promueve la transcripción de interleucina-2 y por lo tanto, el crecimiento y la proliferación de células T. Debido a su liposolubilidad, la CsA es capaz de atravesar las membranas plasmáticas y unirse a la ciclofilina que se encuentra en el citoplasma, dicho complejo inhibe a la calcineurina, la cual es incapaz de defosforilar a NFAT, evitándose así la proliferación y maduración de células T activadas (figura 2) (2-4).

La ciclosporina tiene una vida media de seis horas y es metabolizada en el hígado por el sistema 3A del citocromo P450, generando más de 30 metabolitos. De este modo, el 90% se excreta por las heces y aproximadamente un 10% por orina (5, 6).

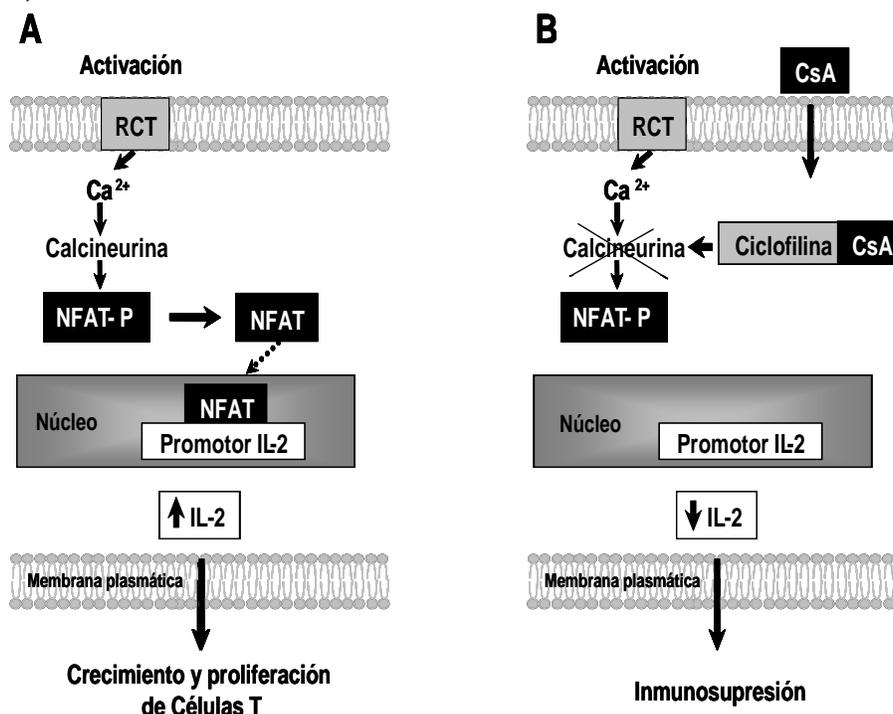


Fig. 2. Mecanismo de acción de CsA. **A)** Mecanismo de inmunosupresión celular. **B)** Mecanismo de acción de CsA para producir inmunosupresión. Receptor de células T (RCT), Factor activador nuclear de la transcripción de células T defosforilado (NFAT) y fosforilado (NFAT-P), Interleucina 2 (IL-2).

Con el surgimiento de la CsA en 1985 empezó una nueva era en la inmunosupresión, que se evidenció por el menor rechazo de órganos trasplantados y mejor supervivencia del injerto y de los pacientes trasplantados. De forma tal que, la introducción de CsA a la clínica aumentó la supervivencia del injerto de un 46% a un 78% en donador cadavérico (2,7).

Sin embargo, el uso de CsA se ha limitado debido a sus efectos adversos y al daño que produce en el tejido renal, entre los que se encuentran hipertensión, daño renal agudo y crónico, desequilibrio electrolítico, acidosis tubular y problemas para concentrar la orina (8). Para poder comprender mejor este fenómeno, a continuación se presenta una breve descripción del riñón.

Fisiología del riñón

Los riñones son órganos pares localizados en el espacio retroperitoneal a nivel de la 11va. vértebra dorsal con una longitud de 11 cm de largo y de 5 cm de ancho (9).

En un corte sagital de riñón se observan dos regiones, una exterior denominada corteza y una interior, mejor conocida como médula; ésta última se encuentra subdividida en regiones estriadas cónicas que dan origen a las pirámides renales. La base de cada pirámide se encuentra localizada en el extremo corticomedular extendiéndose en la pelvis renal hacia la papila (10).

La irrigación renal depende de la arteria renal que alcanza a éste por el hilio y se ramifica en dos ramas, una anterior y otra posterior, las cuales a su vez, se dividen en varias, denominadas arterias segmentarias que del parénquima renal, originan a las arterias interlobulares, las que discurren hasta la base de las pirámides, donde dan lugar a las arterias arcuatas, dispuestas en su base. Las arterias arcuatas se ramifican en las arterias interlobulillares y éstas a su vez en las arteriolas aferentes, cada una de las cuales va a irrigar a un solo glomérulo. Las arteriolas aferentes dan lugar a la formación de los capilares glomerulares, que constituyen la zona en donde se lleva a cabo la ultrafiltración del plasma sanguíneo. Los capilares glomerulares drenan hacia la arteriola eferente, por

medio de la cual la sangre abandona el glomérulo (Fig. 3). De tal modo que, las arteriolas eferentes se convierten en los capilares peritubulares, encargados de irrigar a los túbulos, suministrando oxígeno y nutrientes a las células intersticiales y tubulares (10).

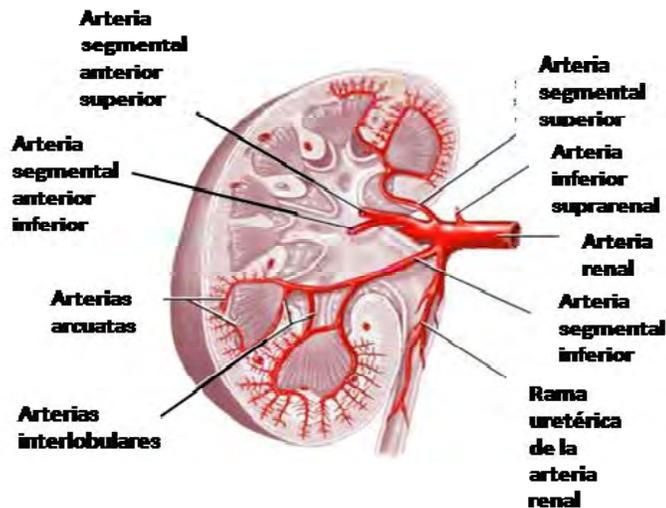


Fig. 3. Irrigación en el riñón humano

La nefrona

La nefrona es la unidad morfo-funcional del riñón que se encuentra formada por: el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal, el túbulo colector y un sistema colector. A su vez, el glomérulo está constituido por los capilares glomerulares, por una región central de células mesangiales que sirve de soporte a éstos, por células viscerales epiteliales y por la cápsula de Bowman; y su conformación lo hace responsable del ultrafiltrado sanguíneo. El túbulo proximal comienza en el polo tubular del glomérulo, es el segmento más largo de la nefrona y en conjunto, ocupa la mayor parte de la corteza; se encuentra involucrado en la reabsorción de macromoléculas como glucosa, sodio, bicarbonato, cloruro, potasio, calcio, fosfato, agua, así como en el catabolismo de algunos aminoácidos. Aproximadamente el 65% del ultrafiltrado es reabsorbido en el túbulo proximal. El segmento siguiente al túbulo proximal es

el asa de Henle, conformada por la porción delgada y la porción gruesa, cerca de la cual se encuentra la mácula densa. El asa de Henle es permeable a agua, urea y cloruro de sodio, lo que permite que se mantenga la hipertonicidad del intersticio medular. El túbulo distal se encuentra próximo a este segmento y se extiende hasta el punto de la corteza en donde dos o más nefronas se juntan para formar el conducto colector donde se lleva a cabo la secreción de potasio junto con la reabsorción de sodio, proceso regulado por la aldosterona (10,11).

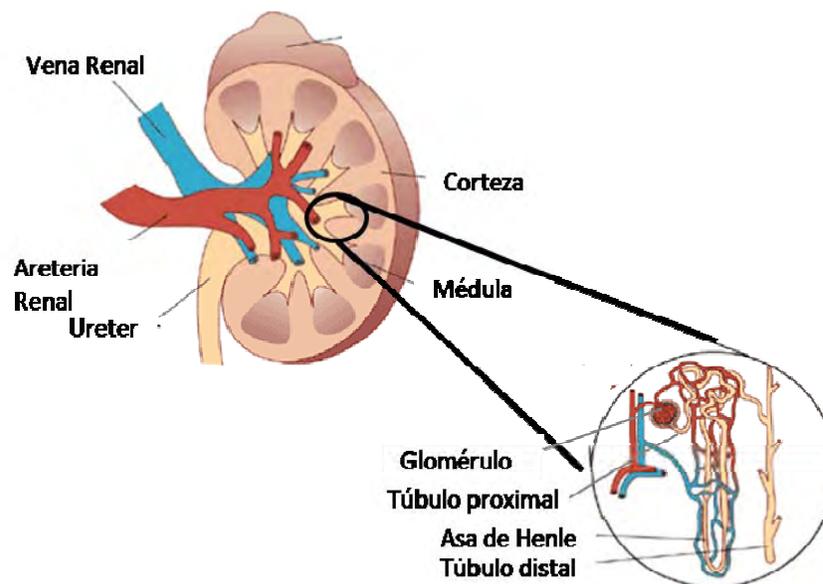


Fig. 4. Riñón humano

De esta manera, la compleja red de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios que conforman al riñón hacen que éste pueda llevar a cabo sus funciones, entre las cuales se encuentran: la excreción de productos metabólicos y sustancias extrañas, la regulación de la osmolalidad y volumen de los fluidos corporales, la regulación del equilibrio electrolítico, la regulación del equilibrio ácido-base y la producción y secreción de hormonas.

La principal función de los riñones es la excreción de productos metabólicos y sustancias extrañas, que se lleva a cabo por medio de la filtración del flujo sanguíneo. El glomérulo es el responsable de la filtración, proceso que realiza a

través de la barrera de filtración glomerular, la cual se encuentra conformada por el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular y los podocitos. Cabe mencionar que el principal componente de la membrana basal glomerular es la molécula similar a procolágeno asociada a proteínas de matriz extracelular, colágeno tipo IV y V (11). La filtración glomerular depende de la interacción de diversos factores, los cuales incluyen las presiones hidrostática y oncótica, los mecanismos de retroalimentación del sistema renina-angiotensina y por supuesto de la estructura de las paredes capilares y de la cápsula de Bowman. El control de la filtración se lleva a cabo por medio de cambios en la resistencia de la arteriola aferente y eferente, dichas resistencias están reguladas por la secreción de compuestos provenientes de diferentes estímulos, entre los que se encuentran estímulos nerviosos, estímulos provenientes de células epiteliales y de células endoteliales. Otro de los factores involucrados en la regulación de la filtración glomerular es la secreción de renina en la macula densa, la cual se lleva a cabo en presencia de hipoperfusión, hipovolemia o bajas concentraciones de sodio. La secreción de renina induce la producción de aldosterona y angiotensina II, ésta última es un potente vasoconstrictor (12, 13). A la aldosterona también se le ha asociado directamente con la producción de vasoconstricción renal, a través de las llamadas acciones no genómicas de la aldosterona (14). Asimismo, el óxido nítrico, parece estar involucrado en la retroalimentación túbuloglomerular y por lo tanto, en el mantenimiento del tono vascular y como consecuencia en la regulación de la filtración glomerular (15).

La regulación de la osmolalidad y volumen de los fluidos corporales es realizada por los riñones mediante la reabsorción y excreción de sodio y agua en los túbulos renales. Los túbulos controlan el volumen, la osmolalidad, la composición y el pH de los fluidos extra e intracelulares. Para llevar a cabo esta función, el elemento clave es la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, por lo que la absorción de cada sustancia está ligada al funcionamiento de dicha bomba (10).

La regulación del equilibrio ácido-base es realizada por los riñones contrarrestando el efecto de álcalis y ácidos producidos por el metabolismo de

ciertos alimentos en el cuerpo, esto a través del sistema $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, el cual también es regulado por pulmones (10).

Nefrotoxicidad por CsA

La primera manifestación de nefrotoxicidad por CsA es la disminución de la tasa de filtración glomerular y el incremento de creatinina plasmática. Estas alteraciones se presentan desde la primera semana de la administración de CsA. De esta manera, cuando los niveles de CsA en plasma son muy elevados (1500-2000 ng/mL), se puede observar la presencia de mitocondrias gigantes y de vacuolizaciones isométricas en el túbulo proximal (16, 17). La mayoría de los pacientes que reciben CsA como tratamiento para evitar el rechazo del injerto empiezan a presentar daño estructural irreversible característico de la nefrotoxicidad crónica por CsA aproximadamente a los seis meses, la insuficiencia renal terminal es consecuencia de dicho daño.

De esta manera, se han descrito dos formas de nefrotoxicidad inducida por ciclosporina: la nefrotoxicidad aguda y la nefrotoxicidad crónica.

Nefrotoxicidad aguda

La nefrotoxicidad aguda por CsA o nefrotoxicidad funcional se caracteriza por alteraciones hemodinámicas en donde destaca la inducción de vasoconstricción renal. El diagnóstico de nefrotoxicidad aguda es difícil de realizar, debido a que es una etiología clínica asintomática. La principal manifestación es el aumento de los valores de creatinina en plasma y una elevación en la presión arterial, que se pueden observar incluso cuando los niveles del fármaco se encuentran dentro del rango terapéutico (18). Asimismo, existe una disminución del flujo sanguíneo renal (FSR), que va acompañado con una disminución en la filtración glomerular (GFR). La vasoconstricción renal observada se ha atribuido a un desequilibrio en la liberación de factores vasodilatadores (óxido nítrico, prostaciclina) y vasoconstrictores (angiotensina II, leucotrienos), en donde predomina el efecto de factores vasoconstrictores (19). En esta nefropatía, el daño ocasionado por

CsA es reversible si se disminuye la dosis o se retira el medicamento, sin embargo estas medidas son difíciles de llevar a cabo debido a la alta probabilidad de rechazo de injerto (2, 16, 18).

Nefrotoxicidad Crónica

La nefrotoxicidad crónica se manifiesta por daño estructural, que lleva a falla crónica renal, caracterizada por vasoconstricción renal y desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial y arteriopatía (16, 20-22). A diferencia de la nefrotoxicidad aguda, la nefrotoxicidad crónica es irreversible y se ha observado que cuando el medicamento es retirado, la filtración glomerular mejora, pero la fibrosis túbulo-intersticial sigue progresando, lo cual sugiere que el daño estructural no es consecuencia de las alteraciones hemodinámicas observadas (23-25). La primera manifestación de la nefrotoxicidad crónica es la presencia de vacuolizaciones en células del músculo liso de arteriolas aferentes, las cuales se encuentran acompañadas de la acumulación de gránulos de renina. Dichas células progresan a necrosis o apoptosis y son reemplazadas por depósitos proteicos lo que lleva a engrosamiento de las paredes vasculares, resultando en mayor hipoxia y con esto, en la pérdida de la continuidad de la lámina basal y por lo tanto en arteriopatía (26). Cabe mencionar, que la arteriola aferente es la única que se ve afectada por este tipo de patología.

Antes de las manifestaciones histológicas que caracterizan al daño por fibrosis túbulo-intersticial, se ha observado la presencia de hipoxia crónica, la cual es generada en primera instancia por un desequilibrio en la producción de factores vasoactivos, que dan como resultado vasoconstricción renal y por lo tanto, hipoxia en el túbulo-intersticio, efecto mediado por CsA como se mencionó anteriormente (27). El estrés oxidativo también contribuye a la hipoxia crónica generada en la nefrotoxicidad por CsA, pues la producción de aniones superóxido favorece el desacople de consumo de energía química de la respiración mitocondrial, promoviendo hipoxia en el tejido renal (28). De esta manera, el daño ocasionado provoca la pérdida de capilares peritubulares, que

trae consigo una reducción en la eficiencia de oxigenación de las células tubulares (29). La hipoxia por lo tanto, es un estímulo profibrogénico para las células que forman a los túbulos, para los fibroblastos intersticiales y para las células endoteliales. Las células epiteliales tubulares renales por lo tanto pierden su polaridad, induciéndose marcadores de superficie mesenquimales, lo que provoca que dichas células sufran transdiferenciación epitelial-mesenquimal para convertirse en miofibroblastos, los cuales promueven la formación de tejido fibroso. Los miofibroblastos tienen propiedades tanto de fibroblastos como de células de músculo liso y son los principales productores de citocinas proinflamatorias y de proteínas de matriz extracelular (principalmente fibronectina y colágena I y IV) (30). Los fibroblastos intersticiales, también pueden ser estimulados por hipoxia, cambiando con esto su metabolismo para la formación de matriz extracelular (31), llevando todo esto, a la pérdida del epitelio tubular y por lo tanto a la progresión de daño por fibrosis. Aunado a esto, la baja disponibilidad de oxígeno inhibe la hidroxilación de la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), el cual se transloca al núcleo y se asocia con HIF-1 β , para constituir una forma activa del factor de transcripción HIF-1. Se ha demostrado que HIF-1 se encuentra involucrado en la regulación del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) y del inhibidor de metaloproteinasas de matriz-1, los cuales se encuentran involucrados en la acumulación de matriz extracelular y por lo tanto, en el proceso de fibrogénesis (32, 33).

Mecanismos de daño renal

Los mecanismos involucrados en la toxicidad crónica son diversos y se explican de manera breve a continuación.

Disminución de la producción de Oxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es un potente vasodilatador, sintetizado a partir de su precursor L-arginina por la sintasa de óxido nítrico, a través de tres isoformas: la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la tercera isoforma es la inducible (iNOS), las tres isoformas se encuentran presentes en el

riñón (34). La nNOS se expresa en macula densa y en la membrana interna del tubo colector, esta isoforma está encargada de regular el sistema de retroalimentación túbulo-glomerular. En cambio, eNOS se encuentra en capilares glomerulares, arteriolas aferentes y eferentes, en capilares medulares y en el epitelio tubular y tiene como función regular el tono de arteriolas aferentes, la presión glomerular capilar y el flujo plasmático glomerular. Respecto a iNOS, ésta se localiza en el epitelio del túbulo proximal, en condiciones normales en la pared de arteriolas aferentes y en células mesangiales inmunoestimuladas, no obstante el papel de iNOS no se conoce aún (35). De esta manera, se sabe que la administración de CsA produce un aumento en la producción de radicales libres, lo que ocasiona la inactivación de NO, sin afectar la producción de éste, ni la expresión de la eNOS, este hecho se ha mostrado en varios estudios, incluyendo uno de nuestro laboratorio (36-38). Asimismo, se ha mostrado que la administración de L-arginina (precursor de la síntesis de NO) mejora el daño producido por CsA, mientras que el inhibidor de la sintasa de óxido nítrico L-NAME empeora la nefropatía por CsA (39-41), por lo que es posible que el NO esté jugando un papel importante en contrarrestar la nefrotoxicidad por CsA.

Aumento en la producción de Radicales Libres

Se ha observado la participación de los radicales libres en la nefrotoxicidad crónica por CsA, que derivan de la hipoxia generada por la vasoconstricción renal inducida por la CsA y como consecuencia mayor generación de radicales libres, éstos últimos intervienen neutralizando los efectos de vasodilatación de NO y promueven muerte celular por apoptosis, lo que resulta en mayor daño tisular (42-44).

Activación del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

El efector principal del sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA) es la angiotensina II, la cual es formada a partir de la activación por renina, ésta última secretada por las células yuxtglomerulares del riñón. Los principales estímulos

para la liberación de renina son: la disminución de la concentración de sodio en el túbulo distal, la disminución en la presión de perfusión renal y la estimulación de receptores β_1 -adrenérgicos (45). Publicaciones recientes han revelado la participación de SRAA en el desarrollo de nefrotoxicidad crónica. En estudios realizados a pacientes trasplantados bajo tratamiento con CsA se observó que éstos tenían niveles elevados de renina en plasma, lo cual ocasionó una mayor producción de angiotensina II y como consecuencia un aumento en la vasoconstricción renal y en el desarrollo de procesos fibróticos (46). Por otro lado, también se ha relacionado a la angiotensina II con la infiltración y la activación de macrófagos, éstos últimos amplifican la respuesta profibrogénica e inflamatoria por medio del reclutamiento de células inmunocompetentes y de una mayor producción de colágeno (47).

Aumento en la expresión del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)

La principal fuente de producción de TGF- β proviene de la infiltración de macrófagos, fibroblastos intersticiales y de la transición a miofibroblastos de células epiteliales (48-50). Estudios recientes han demostrado que la CsA aumenta los niveles de TGF- β , lo que promueve el desarrollo de nefrotoxicidad crónica, llevando con esto a la producción de fibrosis túbulo-intersticial (48, 51). El TGF- β a su vez, ocasiona una sobreproducción de proteínas de matriz extracelular y una disminución de metaloproteinasas, éstas últimas se encuentran encargadas de la degradación de proteínas de matriz extracelular, lo que trae como consecuencia la formación de depósitos de colágena, y por lo tanto desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial. No obstante, en un estudio reciente realizado con anticuerpos anti-TGF- β se observó que, aunque éste tenía un papel importante en el desarrollo de fibrosis no era el único participante ya que, el uso de estos anticuerpos ocasionaba una reducción en la fibrosis túbulo-intersticial, pero no la revertía (52).

Aumento en la muerte celular (apoptosis)

La apoptosis es llevada a cabo en condiciones normales durante el desarrollo y el envejecimiento de cualquier organismo, sin embargo, también puede ser activada como mecanismo de defensa ante enfermedades o agentes nocivos (53). Existen dos vías por las cuales se puede inducir apoptosis, la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca implica interacciones mediadas por receptores de membrana a los cuales se asocian ligandos como FasL y TNF- α . La vía intrínseca es activada a través de estímulos que incluyen: la ausencia de factores de crecimiento, hormonas o citocinas, así como, hipoxia, radiación o toxinas. Estos estímulos ocasionan cambios en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, lo que produce la liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma, capaces de activar la muerte celular programada por medio de la vía mitocondrial dependiente de caspasas. La vía intrínseca es regulada por la familia de proteínas Bcl-2, las cuales a su vez son reguladas por el gen supresor de tumores p53 (54, 55). Este último está implicado en la regulación positiva de genes pro-apoptóticos como Bax, al mismo tiempo que regula de manera negativa al gen anti-apoptótico Bcl-2 (56, 57). A este respecto, Shihab y col. demostraron en ratas a las que se les indujo nefrotoxicidad crónica por CsA, que ésta produce un aumento en los niveles de RNAm y de expresión de Bax, mientras que disminuye la expresión de Bcl-2. En dicho estudio demostraron que estos cambios en genes pro y anti-apoptóticos estaban asociados con un aumento en la expresión de procaspasa-3. (58). De tal manera, que en la nefrotoxicidad por CsA se observa una respuesta en la que la pérdida de células por apoptosis excede a la respuesta proliferativa para reemplazar las células dañadas (59, 60).

Modelos experimentales de nefrotoxicidad por CsA

En décadas pasadas se desarrollaron modelos experimentales en ratas en los que fue posible reproducir la nefrotoxicidad por CsA con características y manifestaciones muy similares a las observadas en el humano. El modelo de nefrotoxicidad moderada o aguda por CsA fue obtenido con la administración de dosis repetidas de CsA (37, 61, 62). Debido a que las ratas son resistentes a

desarrollar las alteraciones estructurales que se observan en el humano, Rosen y col. (63) pensaron en activar el sistema renina angiotensina con una dieta baja en sodio, con lo cual lograron observar los cambios funcionales y estructurales que caracterizan a la nefrotoxicidad crónica por CsA en el humano (64-66). Por lo tanto, el modelo experimental de nefrotoxicidad crónica por CsA se induce con la administración de CsA a ratas alimentadas con dieta baja en sodio. Estos dos modelos han sido muy útiles para estudiar los mecanismos por los cuales la CsA produce toxicidad renal.

Estrategias desarrolladas para reducir la nefrotoxicidad por CsA

La CsA es el inmunosupresor más utilizado en nuestro país, principalmente por su eficacia y por su bajo costo comparado con otros inmunosupresores, por lo que se han evaluado diferentes terapias con la finalidad de prevenir la nefrotoxicidad que produce. De esta forma, la mayoría de los fármacos elegidos bloquean alguna de las diferentes vías mencionadas anteriormente involucradas en la fisiopatología por CsA. En una revisión reciente de nuestro laboratorio se clasificaron los tratamientos en tres grupos: el primer grupo incluye a aquellos compuestos que reducen la vasoconstricción producida por CsA, el segundo a agentes con acción antiinflamatoria y el tercero a compuestos con propiedades antifibróticas; finalmente, en esta misma revisión se menciona un grupo que incluye a antagonistas de los receptores mineralocorticoides (Tabla 1) (67).

Compuestos que reducen la vasoconstricción producida por CsA

Una estrategia para reducir la vasoconstricción por angiotensina II, es el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), así como antagonistas de los receptores de angiotensina II. A este respecto se ha observado que el tratamiento con losartan, antagonista de los receptores de angiotensina II, produce una disminución de la fibrosis túbulo-intersticial, aunque éste no mejoró la disfunción renal producida por CsA, e incluso el grupo tratado con CsA y losartan presentó niveles de depuración de creatinina más bajos. En dichos estudios se observó una reducción en la expresión de TGF- β y aunque

ésta no fue absoluta (losartan 60% y enalapril 40%), se pensó que este hecho podría ser en parte responsable de la disminución de la arteriopatía y fibrosis túbulo-intersticial (43, 65, 68). Resultados similares se han observado con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (69).

También se han probado antagonistas de los receptores de endotelina, que como el BQ123 bloquea a dichos receptores. Como resultado se obtuvo una mejora de la función renal aproximadamente del 30%, sin embargo no hubo cambios en el daño producido por CsA a nivel estructural (70).

Con respecto a la administración de L-arginina, precursor de NO este mejoró la disfunción renal de manera significativa, lo cual se asoció con una disminución del factor endotelial vascular (VEGF) y una mayor biodisponibilidad de NO. Aunado a esto, el precursor de NO redujo el daño estructural en un 50%, aunque cabe mencionar que éste no fue capaz de revertir el daño renal por completo (39, 40, 83). De este modo, la mayoría de estos compuestos fueron útiles para prevenir la disfunción renal, pero tuvieron poco efecto en el daño estructural.

Agentes anti-inflamatorios

Dentro del segundo grupo, se encuentran los agentes anti-inflamatorios como el polisulfato de pentosan (PPS) y el micofenolato de mofetilo. El PPS es un compuesto con un peso molecular de 4-6 KDa conformado por unidades de β -D-glucopiranosas, que al igual que la heparina inhibe la formación de trombos. Estudios realizados en dos modelos de enfermedad renal progresiva en ratones, demostraron que la administración de PPS disminuye la proliferación celular mesangial, la producción de colágena tipo I y IV, al mismo tiempo que produjo un aumento en la producción de metaloproteasa (MMP) 2, con la consecuente prevención en el desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial (71, 72). En un estudio previo de nuestro laboratorio observamos que la administración de PPS, redujo la arteriopatía y el área dañada por fibrosis túbulo-intersticial crónica, sin prevención de la caída en la depuración de creatinina en ratas Sprague Dawley con nefrotoxicidad crónica por CsA (64).

El micofenolato de mofetilo, también se ha utilizado como una estrategia terapéutica para reducir la inflamación, sin embargo, este agente no fue capaz de prevenir la disfunción renal, ni el daño estructural en la nefrotoxicidad por CsA. Por lo que, los fármacos con acción anti-inflamatoria tuvieron poco efecto sobre el daño inducido por CsA (73).

Compuestos con propiedades antifibróticas

En el tercer grupo se encuentran los fármacos antifibróticos. Se ha descrito al factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) como una molécula profibrótica, es por esto que se han realizado experimentos con anticuerpos dirigidos contra TGF- β , en los cuales se observó que el daño estructural inducido por CsA disminuía de manera significativa (74).

La administración de pirfenidona otro agente antifibrótico, fue capaz de prevenir y revertir la fibrosis túbulo-intersticial. El mecanismo de acción de pirfenidona no está bien dilucidado, pero al parecer involucra la inhibición de TGF- β (75). En efecto, en un estudio Shihab y col. observaron que la pirfenidona disminuye la expresión de TGF- β 1 a niveles normales, aunque sólo redujo la fibrosis túbulo-intersticial en un 50%, lo que sugiere que existen otros mecanismos involucrados en el desarrollo de la fibrosis, independientes de la acción de TGF- β . Cabe mencionar que la pirfenidona también inhibió la expresión de pro-caspasa-3, que es una proteasa involucrada en las etapas finales de muerte celular por apoptosis y que previamente se mostró es sobre-regulada por CsA.

La pravastatina es un hipocolesterolemia que tiene propiedades antiinflamatorias y antifibróticas y que también fue probado para reducir la nefrotoxicidad crónica por CsA. En dicho estudio se observó una disminución de la inflamación y de la fibrosis túbulo-intersticial, lo cual se atribuyó a la disminución de la expresión de ciertos mediadores de inflamación como osteopontina y de la proteína C reactiva intrarenal, así como a un aumento en la expresión de eNOS (76).

Otra estrategia utilizada fue el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que consiste en un polipéptido multifuncional heterodimérico, formado por una

cadena alfa de 69 kDa y una cadena beta de 34 kDa asociadas por un puente disulfuro (potente mitogénico y con actividad antiapoptótica). Estudios recientes han sugerido que HGF podría actuar como agente antifibrótico y antiapoptótico (77). En un estudio en el que se utilizaron ratas Sprague Dawley a las que se les produjo nefrotoxicidad crónica por CsA y se administró HGF por medio de inyecciones subcutáneas, se observó que este factor reduce la fibrosis túbulo-intersticial inducida por CsA, la apoptosis tubular epitelial, la infiltración de macrófagos y la alteración fenotípica de miofibroblastos, lo que fue acompañado de disminución en los niveles de RNAm de TGF- β . No obstante, el HGF no fue capaz de mejorar la disfunción renal (78).

De este modo, aunque los compuestos con propiedades antifibróticas, son capaces de disminuir el daño estructural de manera significativa, éstos prácticamente no tienen efecto sobre la disfunción renal, (tabla 1).

Finalmente, Miura y col. describieron que la hipomagnesemia era una manifestación en la nefropatía por CsA (79). En un estudio realizado por el mismo grupo, la suplementación de magnesio disminuyó los niveles de expresión de moléculas fibrogénicas, la infiltración de macrófagos y de moléculas quimioatrayentes. Del mismo modo, hubo una mejoría en la disfunción renal ocasionada por CsA, específicamente en la filtración glomerular, dicha mejoría se atribuyó a la inhibición de la expresión del gen de endotelina-1 (ET-1) vasoconstrictor importante (80). Sin embargo estos resultados no fueron reproducibles, ya que en un estudio realizado por Bennett y col. la administración de magnesio no produjo cambios en el daño producido por CsA (81). Asimismo, en nuestro laboratorio nos dimos a la tarea de determinar los niveles de magnesio en plasma en ratas normales y en ratas tratadas con CsA, sin embargo no hubo diferencias significativas entre los grupos (2.1 ± 0.1 vs. 2.6 ± 0.1 mg/dL). Por lo que concluimos que en ratas Wistar con nefrotoxicidad crónica por CsA no hay presencia de hipomagnesemia.

En resumen, con los tratamientos mencionados anteriormente solo se previene el daño estructural o el funcional, pero en la mayoría de los casos no se evitan ambas alteraciones. Estudios realizados en nuestro laboratorio (82, 83)

mostraron que el bloqueo de los receptores de aldosterona con espironolactona revierte la nefrotoxicidad aguda y reduce la nefrotoxicidad crónica por CsA. En dichos estudios se observó que la espironolactona prevenía la caída de la filtración glomerular y reducía la expresión de TGF- β , colágena, fibronectina y el desarrollo de arteriopatía y fibrosis túbulo-intersticial de manera significativa, lo que sugiere que la aldosterona participa en la fisiopatología de la nefrotoxicidad por CsA.

| Tratamiento | Mejora Disfunción renal | Reducción de fibrosis | Referencia |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|
| Losartan | No | 50% | 43 |
| BQ123 | 30% | No | 70 |
| L-arginina | 70 % | 50 % | 39, 40 |
| Polisulfato de Pentosan | No | 45% | 64 |
| Micofenolato de mofetilo | No | No | 73 |
| Anti-TGF β | ND | 40 % | 74 |
| Pirfenidona | No | 50% | 75 |
| Pravastatina | 75 % | 55 % | 76 |
| Factor de Crecimiento de hepatocitos | No | 25% | 78 |
| Suplementación con Magnesio | 82 % (No) | 80 % (ND) | 79-81 |
| Espironolactona | 100 % | 50 % | 82, 83 |

ND, no determinada.

Tabla 1. Estrategias desarrolladas en modelos de nefrotoxicidad crónica por CsA (*Am J Physiol Renal Physiol* 293: F000-F000, 2007).

Colágena-PVP (fibroquel)

La colágena-PVP o mejor conocida comercialmente como fibroquel es un medicamento que es llevado al mercado por Aspid, empresa 100% mexicana y que se utiliza para reducir las cicatrices queloides e hipertróficas en donde actúa como un fibrolítico. El fibroquel es un tipo de colágena I de cerdo que incorpora

polivinilpirrolidona (figura 4) y que es utilizada para el tratamiento de cicatrices queloides (84).

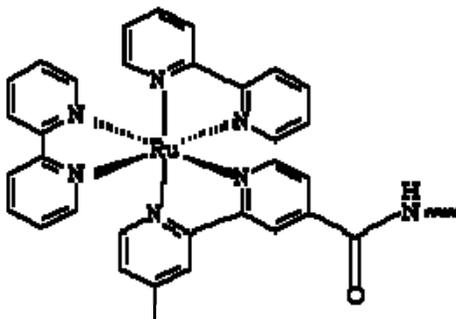


Fig. 5. Estructura química de N-vinil-2-pirrolidona.

Aunado a sus propiedades antiqueloides, Furuzawa-Carballeda y col. observaron que la administración de colágena-PVP disminuía la inflamación en pacientes con artritis reumatoide. Este estudio fue realizado en cultivos de tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y lo que ellos mostraron fue que la colágena-PVP actúa sobre fibroblastos y macrófagos al disminuir factores proinflamatorios como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral α , (TNF- α), la interleucina 1 β (IL-1 β), así como moléculas de adhesión celular como son la molécula de adhesión de los leucocitos al endotelio (ELAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), hasta alcanzar niveles semejantes a los normales (85).

La colágena-PVP también ha sido probada en lesiones por esclerosis sistémica y en cicatrices hipertróficas (86, 87). En estos estudios la administración de fibroquel disminuyó la expresión de citocinas como IL-1 β , TNF- α y TGF- β , así como de moléculas de adhesión (VCAM-1 y ELAM-1), esto fue demostrado en pacientes con esclerosis sistémica y en cultivos en los que se indujeron lesiones muy similares a las cicatrices hipertróficas. Debido a que en ambas lesiones, la administración de fibroquel produce un patrón de distribución de colágena similar al observado en la piel normal, se sugirió que la colágena-PVP puede estar regulando la conversión de matriz extracelular, principalmente

colágeno y que este proceso es el responsable del bloqueo de la progresión del proceso fibrótico.

En otro estudio se observó que la colágena-PVP es capaz de disminuir las adhesiones en la cavidad peritoneal en conejos que fueron apendicectomizados a través de reducir la cantidad de colágena y la fibrosis (88). Así mismo, en un proyecto que se está realizando en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, han observado que la administración de colágena-PVP a cobayos asmáticos reduce la fibrosis observada en este modelo (comunicación personal). Estos dos estudios sugieren que este medicamento posee también acción antifibrótica. Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar los mecanismos de las acciones antifibróticas y anti-inflamatorias de la colágena-PVP.

El uso de colágena-PVP en fracturas de cráneos inducidas en ratas, también mostró que ésta era capaz de acelerar la regeneración ósea, lo que se atribuyó a que la colágena-PVP formara una matriz adecuada para la invasión y migración de células osteoprogenitoras (89).

Finalmente, en pacientes con úlceras ileocolónicas se observó la remisión de la úlcera con la administración de colágena-PVP (90). Asimismo, en úlceras por de cubito, la administración de colágena-PVP redujo el tamaño de la lesión en los pacientes que las padecían (91).

La ventaja del uso de la colágena-PVP es que al ser un fármaco biológico, prácticamente no tiene efectos secundarios, según lo reportado en voluntarios sanos y en pacientes con cicatrices hipertróficas que han sido sometidos por un largo periodo de tiempo al tratamiento con colágena-PVP (92). Por lo tanto, el presente proyecto pretende evaluar el posible papel renoprotector de la colágena-PVP como fármaco antifibrótico en la nefrotoxicidad crónica inducida por CsA.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la administración del fibroquel en ratas con nefrotoxicidad crónica inducida por ciclosporina.

Objetivos Particulares

- ♣ Evaluar el efecto del fibroquel sobre la disfunción renal inducida por CsA.
- ♣ Estudiar si el fibroquel reduce la arteriopatía y la fibrosis túbulo-intersticial observados en la nefrotoxicidad por CsA.
- ♣ Evaluar si la administración de fibroquel reduce la formación de radicales libres.
- ♣ Estudiar posibles mecanismos de renoprotección del fibroquel como compuesto antifibrótico.
- ♣ Determinar si el efecto renoprotector de fibroquel se asocia con reducción de la muerte celular por apoptosis.
- ♣ Correlacionar los estudios moleculares con los hallazgos histopatológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo Experimental

Se estudiaron cuatro grupos de 12 ratas Wistar macho cada uno (seis animales de cada grupo fueron utilizados para estudios fisiológicos y los otros seis se utilizaron para los estudios bioquímicos y moleculares). Para inducir la nefrotoxicidad crónica los animales fueron alimentados con dieta baja en sodio. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos: el grupo al que se le administró aceite de oliva como vehículo (V, 1ml/Kg s.c.), el grupo de ratas tratadas con CsA (15 mg/Kg/día s.c.), los animales que recibieron fibroquel (0.2mg/día, i.p.), y las ratas que recibieron simultáneamente CsA y fibroquel. Los grupos que recibieron aceite de oliva y fibroquel fueron alimentados de forma pareada y los tratamientos se administraron por 15 días.

Estudios Fisiológicos

Filtración glomerular (GFR): Al término del periodo experimental, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal i.p.). La preparación quirúrgica se realizó por medio de microcirugía para lo cual, se mantuvo a la rata a 37 °C por medio de una mesa térmica monitoreando la temperatura de manera constante. Se cateterizó tráquea con un tubo de polietileno PE-240, las venas yugulares y la arteria femoral con un tubo de polietileno PE-50 y la vejiga con tubo de polietileno PE-90. Cabe mencionar que durante todo el experimento se registró la presión arterial media por medio de un transductor modelo PB23 conectado a un polígrafo de presión. Una vez cateterizadas venas y arterias se tomó una primera muestra de sangre de la arteria femoral y el volumen se repuso con la sangre de una rata donadora. Las ratas se mantuvieron en

condiciones de euvolemia por la infusión de 10 ml/kg de plasma durante la cirugía a una velocidad de 7 ml/hr, seguida de una infusión de azúcar baja en calorías (azúcar BC) al 5% como marcador de filtración glomerular (93) a una velocidad de 1.7 ml/hr. Después de un periodo de equilibrio de aproximadamente 45 min se recolectó la orina durante 30min; al inicio y al final de ésta se tomaron muestras de sangre. Se realizó una segunda recolección de orina de 30 min y se tomó una cuarta muestra de sangre. El volumen de sangre que se recolectó, se reemplazó con sangre de una rata donadora por la vena yugular.

Flujo sanguíneo renal (FSR): Para medir el FSR se disecó la arteria renal izquierda y se colocó una sonda conectada a un Flujómetro Transonic System.

Estudios Bioquímicos

Azúcar BC: La determinación de azúcar BC se realizó en plasma y orina por el método de Davidson (Davidson, 1963). Los plasmas fueron desproteinizados mediante la adición de 250 µL de ATC 1N (ácido Tricloroacético) y posterior centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. Las orinas se diluyeron, dependiendo de la concentración de la muestra.

La reacción se llevó a cabo utilizando antrona la cual es utilizada para determinar la concentración de carbohidratos, por medio de la cuantificación espectrofotométrica del complejo colorido formado. De esta manera, se colocaron 200 µL de cada muestra en un vial, y se les adicionó 1 ml de la solución de antrona, se agitaron e incubaron a 45° C durante 50 min. Finalmente se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Se preparó una curva estándar con un rango de concentración de 20-100 µg/mL. La Filtración glomerular se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Filtración Glomerular} = \frac{\text{Flujo plasmático X [azúcar BC en orina]}}{\text{[azúcar BC en suero]}}$$

Niveles de CsA: Esta determinación se llevó a cabo mediante un kit de radioinmunoensayo monoclonal comercial y se realizó de acuerdo a las especificaciones.

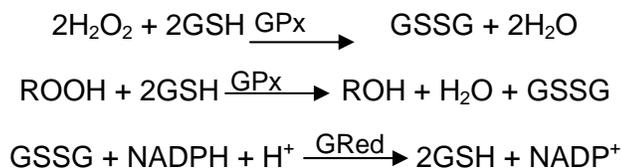
Actividad enzimática de catalasa. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sustrato de la catalasa, absorbe a 240 nm. Su descomposición por catalasa sigue una cinética de primer orden, por lo que la descomposición del H_2O_2 puede seguirse directamente por la disminución de la densidad óptica a 240 nm, lo cual representa una medida indirecta de la actividad de la catalasa (94).



Actividad enzimática de superóxido dismutasa. La determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) también fue realizada de manera indirecta. La enzima cataliza la conversión de dos radicales superóxido a H_2O_2 y O_2 . El ensayo consiste en la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio con xantina oxidasa, este último utilizado como generador de superóxido. El ensayo se mide a 560 nm (95).



Actividad enzimática de glutatión peroxidasa. La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la descomposición del H_2O_2 a agua, utilizando glutatión reducido (GSH) como cofactor. El glutatión oxidado (GSSG) producido es regenerado nuevamente a GSH por la glutatión reductasa (GRed) la cual utiliza NADPH como cofactor. El NADPH absorbe a 340 nm, por lo que la determinación de GPx es indirecta, basada en la disminución de la absorbancia a 340 nm, disminución producida por el consumo de NADPH en la reacción de regeneración de GSH (Lawrence, 1976).



Estudios Histológicos

Al finalizar el experimento, la aorta se ligó por arriba de las arterias renales y los riñones se perfundieron con solución salina por la arteria femoral a una presión constante y similar a la tensión arterial que tenía previamente la rata. Uno de los catéteres de las arterias femorales se utilizó para pasar tanto la solución salina como el formaldehído, y el otro para monitorear en forma continua la presión. Una vez perfundidos se extrajo uno de los riñones, se incluyó en parafina y se hicieron cortes de tres micras, para posteriormente teñirlos con PAS (periyodic acid Schiff, con esta tinción se demuestra el engrosamiento de la arteriola aferente); y Masson (con la cual se tiñen las fibras de colágena). Para los estudios de microscopía de luz se utilizó un microscopio Nikon eclipse conectado a una cámara digital, las imágenes digitalizadas se evaluaron en el programa eclipse net. La arteriopatía se analizó en los tejidos teñidos con PAS (400X), para lo cual se contaron al menos 100 glomérulos por cada rata, a partir de los cuales se obtuvo el número de glomérulos con arteriolas dañadas y se calculó el porcentaje de arteriopatía.

Se evaluó el grado de fibrosis túbulo-intersticial en las laminillas teñidas con Masson, para ello se realizó un análisis morfométrico computarizado de cinco campos por riñón cuantificando el área afectada (100X). La proporción de fibrosis se calculó dividiendo el área con fibrosis entre el área total.

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick 3' End Labeling): Para la detección de apoptosis fue utilizado el kit de ApopTag Plus Peroxidase In Situ. Las secciones de tejido fijadas y que se encuentran en parafina, fueron desparafinizadas, rehidratadas y lavadas en PBS. Una vez lavadas, las secciones fueron incubadas con proteinasa K. A esta incubación le siguió una incubación con deoxinucleotidil terminal tranferasa (Tdt) y con digoxigenin-dNTP. Para la detección de los nucleotidos incorporados se utilizó un anticuerpo antidigoxigenin el cual se encuentra conjugado con una molécula reportera de peroxidasa utilizada para la detección de cuerpos apoptóticos.

Estudios Moleculares

Se obtuvieron los riñones y mediante un corte sagital se dividió macroscópicamente la médula y la corteza renal para la extracción de RNA, los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

Extracción de RNA: El RNA se extrajo de los tejidos almacenados a -80°C mediante homogenización en tiocianato de guanidina y ultracentrifugación a través de cloruro de cesio. Para determinar la calidad del RNA se midió su concentración por espectrofotometría de UV (280 nm/260 nm).

RT-PCR (Transcripción Reversa): La transcripción reversa (RT) se llevó a cabo con 10 μg de RNA total del tejido. Primero se llevó el RNA a 65°C por 10 min. La reacción se realizó 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 MgCl_2 ; 10 mM DTT, pH 8.3), se incubó a 37°C por 60 min, a un volumen final de 20 μl . Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las muestras se llevaron a 95°C por 5 min para inactivar la transcriptasa reversa.

PCR en tiempo real: Se utilizaron sondas TaqMan específicas para amplificar fragmentos de DNAc de Applied Biosystems marcadas con FAM (6-carboxyfluoresceína) o VIC, para el análisis de TGF- β , enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa, así como para caspasa-3. 18S RNAr como se utilizó como control. FAM y VIC son colorantes fluorescentes utilizados para detectar la amplificación de productos. De esta forma la cantidad de FAM o VIC, liberada por la degradación de la sonda TaqMan por exonucleasa en la reacción de PCR, es medida en función de cada ciclo de amplificación por reacción PCR mediante el uso de un termociclador en tiempo real ABI 7000 Prism (Applied Biosystems). La expresión de cada gene se cuantificó en forma relativa usando el método comparativo de Ct (96).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar. Para realizar las comparaciones de más de tres grupos los datos se analizaron por ANOVA de dos vías, cuando la p fue menor que 0.05, las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de Student-Neumann-Kuels para mediciones repetidas. En el caso de comparaciones de dos grupos, el análisis se realizó con t de student no pareada y para la comparación de una variable en el mismo grupo en dos periodos diferentes se utilizó una t de student pareada.

RESULTADOS

Estudios fisiológicos

Para este estudio se incluyeron cuatro grupos: el grupo control (Veh, aceite de oliva 1ml/Kg), el grupo tratado con fibroquel (Fib) (0.2mg/día), las ratas que recibieron CsA (15 mg/Kg/día) y el grupo que recibió de manera simultánea CsA+Fib, como se mencionó en material y métodos. Todos los animales, excepto los pertenecientes al grupo Veh perdieron peso a lo largo del experimento (tabla 2).

| | Veh | Fib | CsA | CsA+Fib |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Peso corporal al inicio (g) | 306.0 ± 17.8 | 317.1 ± 29.6 | 312.5 ± 9.7 | 316.3 ± 19.2 |
| Peso corporal al final (g) | 313.3 ± 17.0 | 277.6 ± 21.4 | 259.5 ± 12.2 | 250.3 ± 13.2 |

Tabla 2. Pesos promedios al inicio y final del tratamiento de los grupos incluidos en el estudio.

La figura 6A muestra la tensión arterial media monitoreada durante todo el experimento, como se puede observar la administración de CsA y la administración de fibroquel de manera independiente o combinada, no produjeron cambios significativos sobre este parámetro.

Como se ha descrito previamente por nuestro laboratorio y por otros grupos (48, 82), la administración de CsA produjo una reducción significativa del flujo sanguíneo renal con respecto al grupo Veh (2.85 ± 0.70 vs. 6.30 ± 2.34 mL/min), la cual se previno con la administración de fibroquel (2.85 ± 0.70 vs, 4.37 ± 1.40 ml/min, respectivamente) (figura 6B).

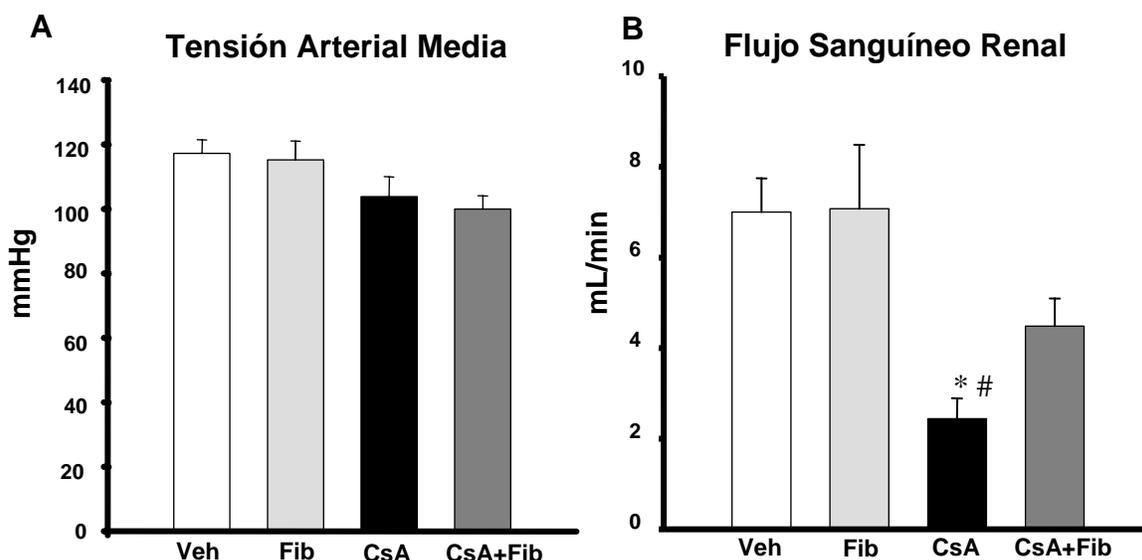


Fig 6. Efecto de la administración de colágena-PVP en la nefrotoxicidad crónica en parámetros fisiológicos importantes como tensión arterial media y flujo sanguíneo renal. Dicho efecto fue evaluado en los cuatro grupos: vehículo (Veh), colágena-PVP (Fib), CsA y CsA+Fib. * $p < 0.05$ vs. Veh, # $p < 0.05$ vs. Fib.

En la Fig. 7 se muestran los resultados de la evaluación de la función renal, que se realizó mediante la determinación de la tasa de filtración glomerular utilizando como marcador azúcar BC. Como era de esperarse, la administración de CsA produjo una reducción significativa en la filtración glomerular con respecto al grupo control (CsA 0.57 ± 0.20 vs. Veh 1.80 ± 0.76 mL/min) (82). Asimismo, la administración de fibroquel mejoró la caída producida por CsA de manera significativa (0.57 ± 0.20 vs. 0.88 ± 0.30 mL/min), no obstante la diferencia con respecto al grupo control Veh continuó siendo significativa (0.88 ± 0.30 vs. 1.80 ± 0.76 mL/min).

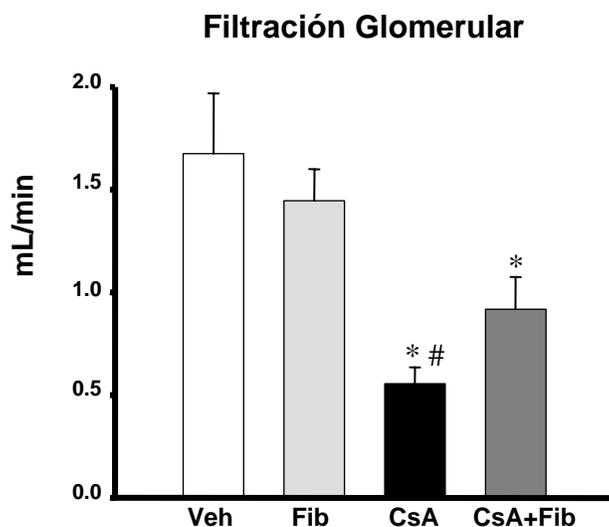


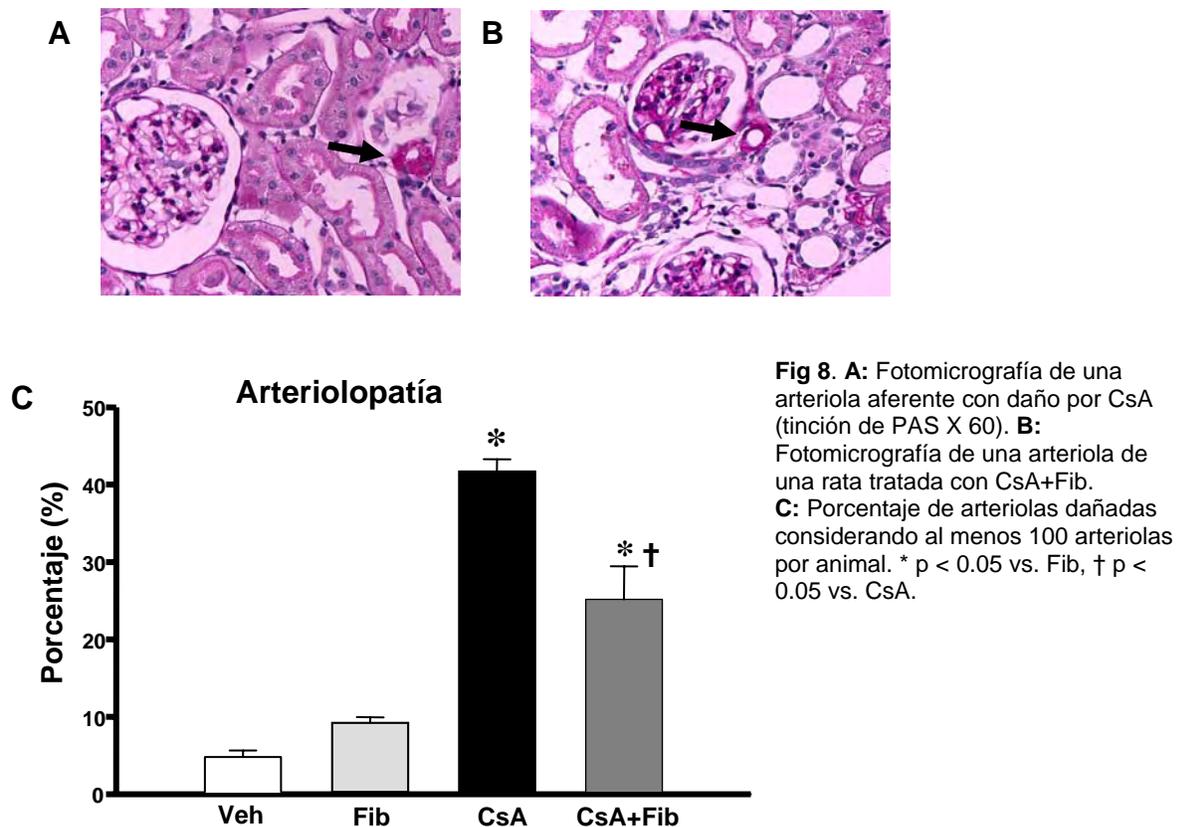
Fig 7. Efecto del fibroquel en la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina. Filtración glomerular determinada mediante azúcar BC. Todos los grupos fueron alimentados con dieta baja en sodio, y los grupos control (vehículo y fibroquel) fueron pareados con los grupos problema (CsA y CsA+Fib). * $p < 0.05$ vs. Veh, # $p < 0.05$ vs. Fib.

Estudios Histológicos

Para evaluar el daño estructural producido por CsA y el posible efecto renoprotector de fibroquel, se determinó el grado de arteriopatía y fibrosis túbulo-intersticial, alteraciones estructurales características de la nefrotoxicidad crónica por CsA (8).

El porcentaje de arteriopatía se obtuvo por medio del conteo de arteriolas dañadas en los cortes histológicos de riñón teñidos con PAS. Se consideraron al menos 100 arteriolas por rata. En la figura 8A se muestra una imagen representativa del engrosamiento y hialinosis de una arteriola aferente característica del daño producido en la nefrotoxicidad crónica por CsA y en la figura 8B se puede observar la disminución del engrosamiento de la arteriola aferente en el grupo tratado con fibroquel. Como era de esperarse según estudios previos incluyendo los de nuestro laboratorio (51, 66, 82), el grupo tratado con CsA presentó un alto porcentaje de arteriolas dañadas, alrededor del 43%, diferencia significativa comparada con el grupo control (6%). La administración de

fibroquel produjo una disminución significativa del desarrollo de arteriopatía, lo cual se observa claramente en la figura 8C, pues mientras el grupo de CsA presentó mas de un 40% de arteriolas dañadas, fibroquel redujo en un 15.6% el daño ocasionado.



Para la determinación de la fibrosis túbulo-intersticial se llevó a cabo un estudio morfométrico, el cual consiste en la determinación del área dañada por acumulación de matriz extracelular y colágena mediante la tinción de Masson. En la figura 9A se muestra una imagen representativa del daño producido por CsA en nefrotoxicidad crónica y en la figura 9B se muestra una fotomicrografía representativa de un corte de riñón perteneciente a un animal del grupo de CsA+Fib. El análisis morfométrico se muestra en la figura 9C, y como se puede apreciar el grupo que fue tratado con CsA presentó un alto porcentaje de fibrosis túbulo-intersticial con respecto al grupo control de Fib (8.87 ± 1.80 vs. $1.22 \pm$

0.08%), mientras que la administración de fibroquel redujo la fibrosis producida por CsA de manera significativa (8.87 ± 1.80 vs. $3.36 \pm 1.12\%$).

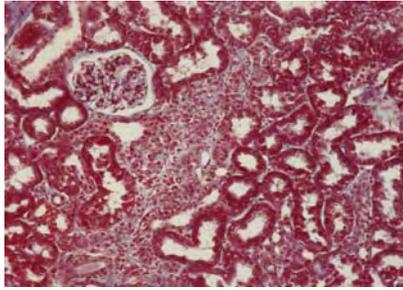
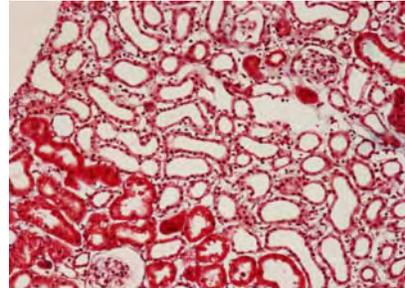
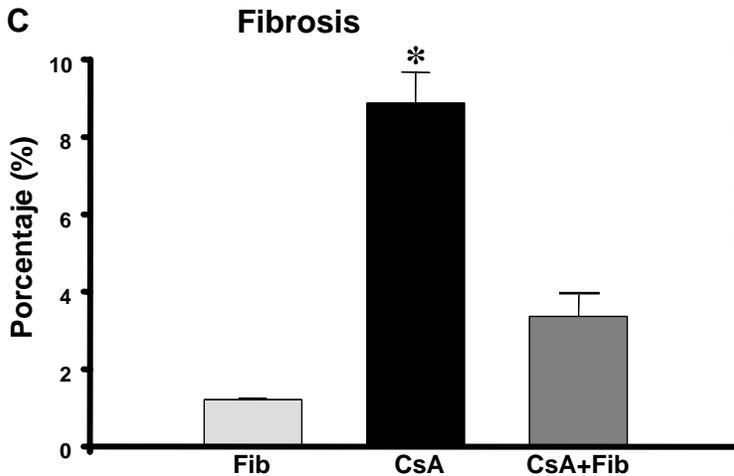
A**B****C**

Fig 9. A: Fotomicrografía de un corte sagital de corteza de una rata tratada con CsA (tinción de Masson X200).
B: Fotomicrografía de un corte sagital de una rata a la que se le administró CsA+Fib.
C: Porcentaje de área dañada por fibrosis túbulo-intersticial. Considerando al menos diez campos. * $p < 0.05$

En la figura 10 se observan los resultados correspondientes al índice de apoptosis determinado mediante la técnica de TUNEL, en donde se pueden observar imágenes representativas de cortes de riñón de rata pertenecientes tanto al grupo tratado con CsA (Fig. 10A) como al grupo de animales tratados con CsA+Fib (Fig. 10B). En la figura 10C se observa en forma gráfica la cuantificación de núcleos positivos para los grupos de Fib, CsA y CsA+Fib. Observándose una diferencia significativa entre el grupo tratado con CsA con respecto a los grupos de Fib y CsA+Fib, ya que dicho grupo mostró un alto número de núcleos positivos apoptóticos. En contraste, la administración de colágena-PVP previno completamente la muerte celular por apoptosis.

Nuestros resultados hasta este momento muestran que la administración de colágena-PVP reduce el daño funcional y estructural inducido por la ciclosporina y previene la muerte celular por apoptosis

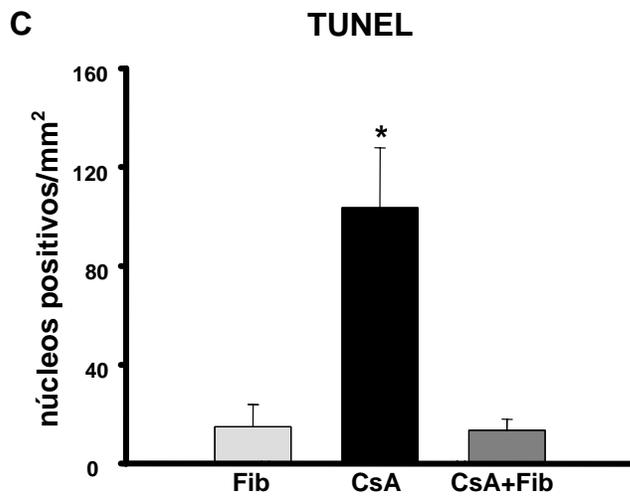
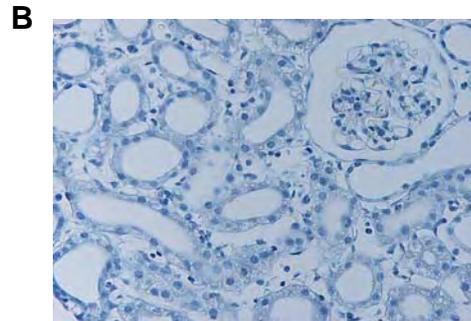
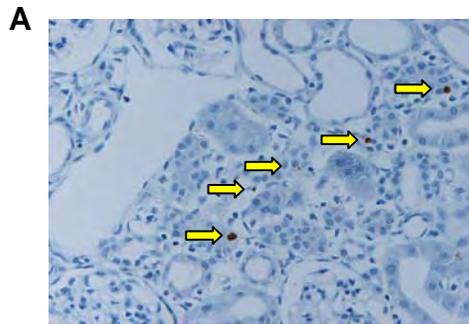


Fig 10. Apoptosis en nefrotoxicidad crónica por CsA.
A: Fotomicrografía de un corte sagital de una rata a la que se le administró CsA (TUNEL). Las flechas amarillas señalan los núcleos apoptóticos.
B: Fotomicrografía de un corte sagital de corteza de una rata a la que se le administró CsA + Fib
C: Determinación de núcleos apoptóticos/mm². * p < 0.05

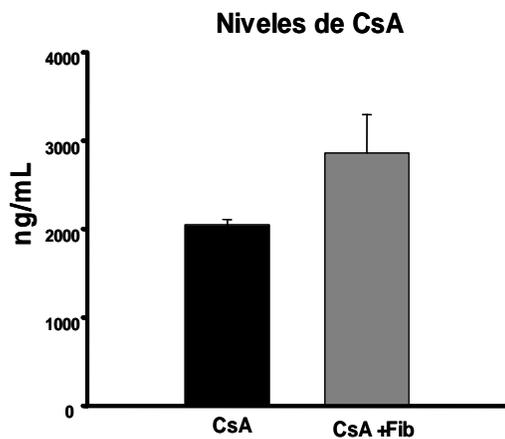


Fig 11. Determinación de los niveles de CsA en plasma para los grupos de CsA y de CsA+Fib, mediante radioinmunoensayo.

Para descartar que la mejoría observada en la filtración glomerular y en el flujo sanguíneo renal no fuera debida a alguna interacción o reducción de los niveles de CsA, se determinaron los niveles de CsA en sangre de los animales tratados con CsA y CsA+Fib. En la Fig 11 se muestran los resultados obtenidos. No se observó una diferencia significativa en los niveles de CsA entre

ambos grupos e incluso en el grupo CsA+Fib los niveles de CsA fueron mayores en un 28%, lo que indica que el efecto renoprotector de la colágena-PVP no fue mediado por una reducción de los niveles tóxicos de la ciclosporina.

Estudios bioquímicos y moleculares

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de estrés oxidativo mediante la evaluación de la lipoperoxidación de membranas celulares por la técnica de TBARS. El grupo que recibió CsA presentó un aumento marcado en el nivel de lipoperoxidación con respecto al grupo Veh. Interesantemente, la administración de colágena-PVP previno completamente el aumento de la lipoperoxidación producido por la CsA.

Para poder determinar que mecanismo pudiera estar participando en la disminución de los niveles de lipoperoxidación con la administración de fibroquel, se evaluaron los niveles de RNAm de enzimas antioxidantes: catalasa y superóxido dismutasa, enzimas que juegan un papel importante en la disminución del estrés oxidativo. En el panel A de la figura 13 se puede observar que la administración de CsA disminuyó los niveles de RNAm de catalasa de manera significativa con respecto a los grupos control. En contraste, la administración de fibroquel normalizó los niveles de RNAm de dicha enzima. En el panel B y C se muestran los resultados obtenidos de la determinación para superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, CsA no modificó la expresión de estas enzimas y fibroquel solo disminuyó los niveles de RNAm de la superóxido dismutasa en el grupo control.

Lipoperoxidación

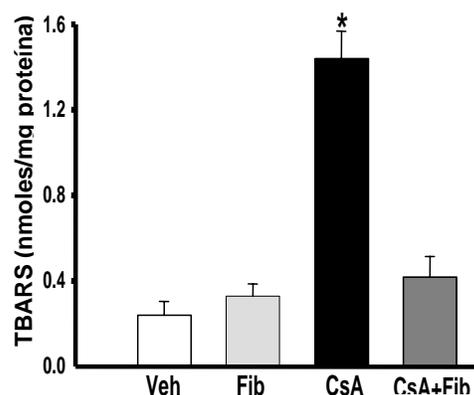


Fig 12. Efecto de la administración de colágena-PVP sobre el estrés oxidativo observado en la nefrotoxicidad crónica por CsA. * $p < 0.05$.

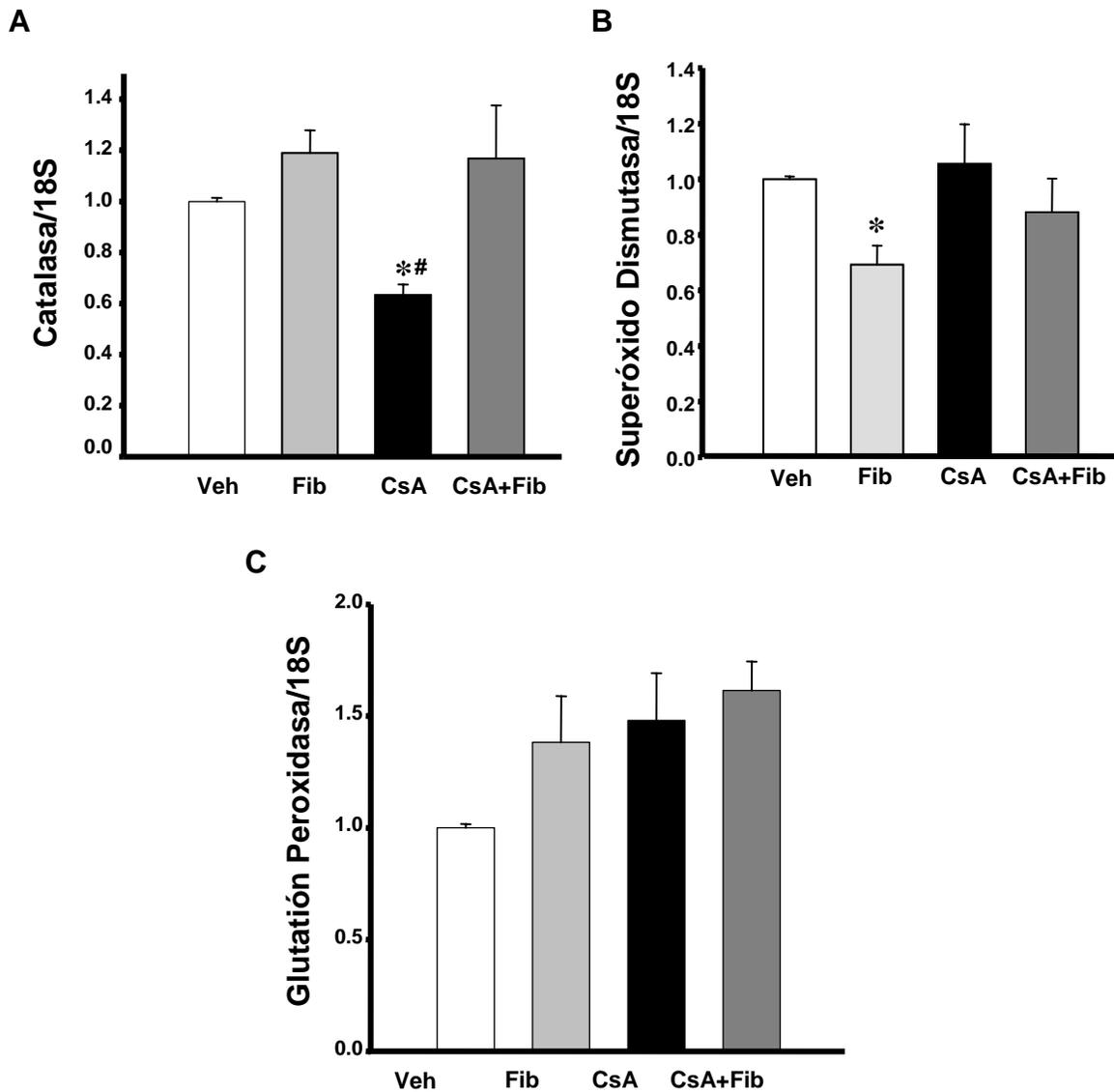


Fig 13. Determinación de los niveles de RNAm de enzimas antioxidantes. **A:** Catalasa. **B:** Superóxido Dismutasa. **C:** Glutación Peroxidasa en tejido renal. Los niveles de RNAm fueron normalizados entre los del gene control 18S. * $p < 0.05$ vs. Veh, # $p < 0.05$ vs. Fib.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos de la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa, superóxido dismutasa y glutación peroxidasa. Como se puede observar la actividad de catalasa y de glutación peroxidasa no cambia de manera importante en ninguno de los grupos. Como se puede observar la actividad de catalasa tendió a ser mayor en el grupo de CsA+Fib con respecto al

grupo tratado solo con CsA, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. En cambio, la actividad de la superóxido dismutasa fue significativamente menor en los animales que recibieron CsA, y este efecto fue prevenido por la administración de colágena-PVP. Finalmente, no observamos cambios en la actividad de la glutatión peroxidasa entre los grupos estudiados. Estos resultados nos permiten sugerir que la normalización de la actividad de la superóxido dismutasa contribuyó a prevenir el aumento en la lipoperoxidación inducida por CsA. También nos permiten proponer que la colágena-PVP pueda tener una propiedad antioxidante intrínseca.

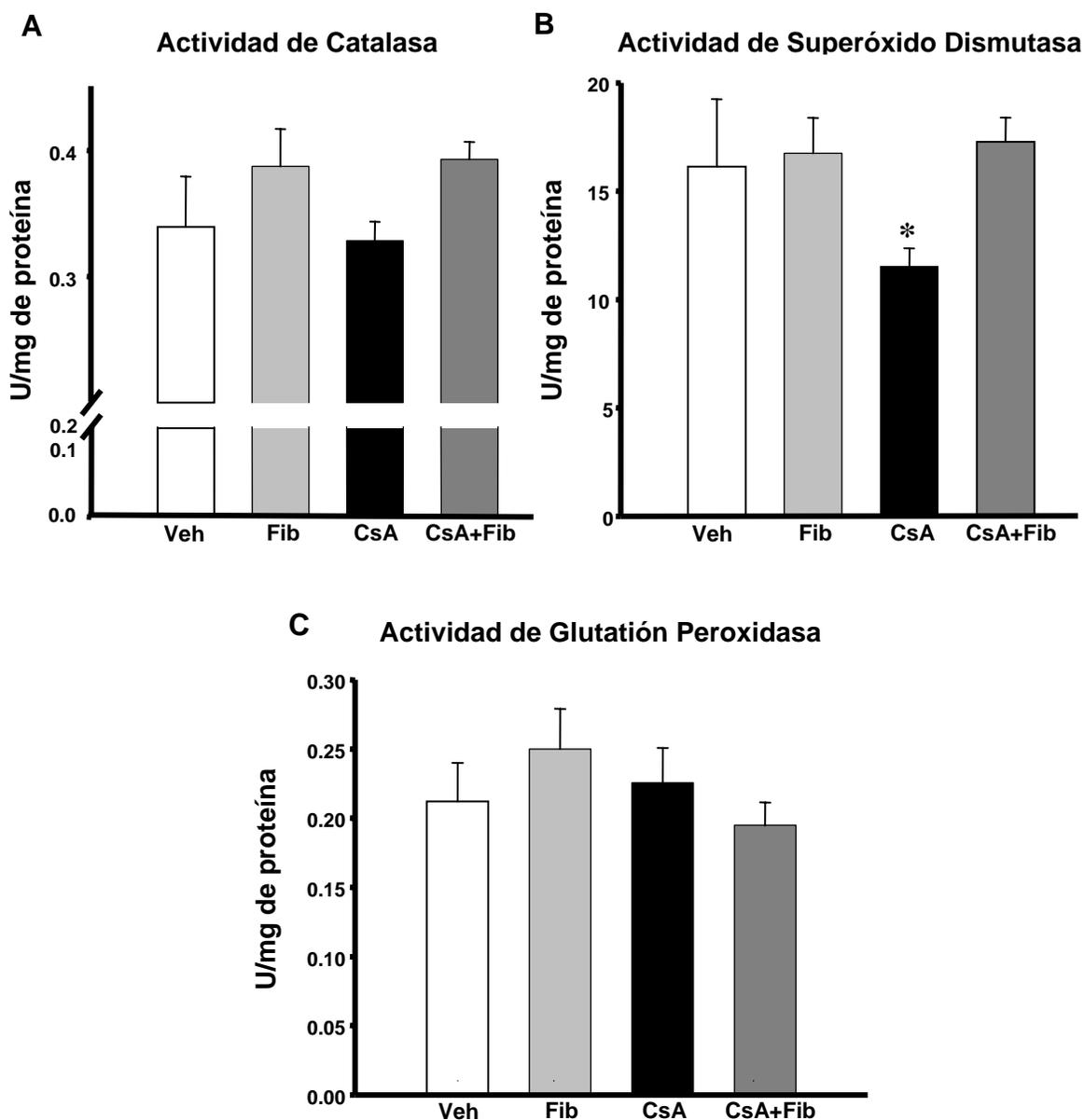


Fig 14. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes en tejido renal. **A:** Catalasa. **B:** Superóxido Dismutasa. **C:** Determinación de la actividad de de Glutación Peroxidasa. * p < 0.05 vs. Veh.

Debido a la disminución del daño estructural observado con la administración de fibroquel y a que previamente se reportó que este medicamento puede tener acción atifibrótica, se determinaron los niveles de RNAm de TGF- β (84, 85). En la figura 15 se muestran los resultados de dicha determinación. La administración de CsA produjo un aumento en los niveles de esta molécula de manera significativa comparados con los del grupo Veh. De forma interesante la administración de fibroquel fue capaz de disminuir los niveles de esta citocina profibrótica en el tejido renal.

Del mismo modo, se determinaron los niveles de la molécula de daño renal KIM-1 como marcador de daño tubular (98). Como se puede apreciar en la figura 15B, la nefrotoxicidad crónica por CsA se asoció con un aumento de mas de 100 veces en los niveles de RNAm de KIM con respecto a los grupos control, y el efecto renoprotector de fibroquel se asoció con una disminución significativa de esta proteína.

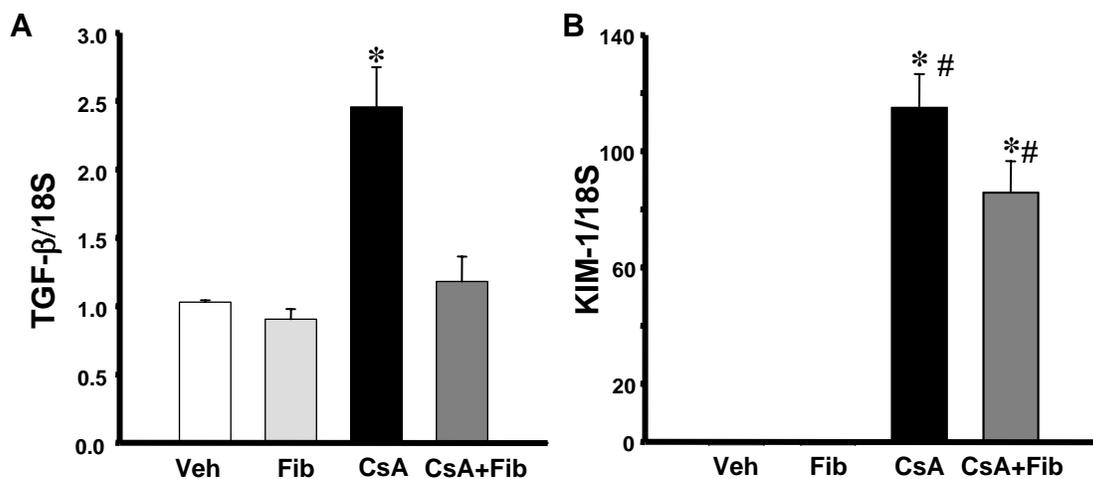


Fig 15. Determinación de los niveles de mRNA de TGF- β y KIM-1. **A:** Determinación de los niveles de mRNA de TGF- β . **B:** Determinación de los niveles de mRNA de KIM-1. Los niveles del grupo de Veh fueron normalizados con 18S. * $p < 0.05$ vs. Veh, # $p < 0.05$ vs. Fib.

En la figura 16 se muestran los niveles de RNAm de pro-caspasa 3, uno de los genes principales involucrado en la inducción de apoptosis en el daño producido por CsA. El aumento en la apoptosis inducido por CsA, correlacionó con un aumento significativo en los niveles de RNAm de la pro-caspasa 3 con respecto a los grupos control (Veh y Fib). Dicho aumento se revirtió con la administración de fibroquel, efecto también correlacionado con la reducción de la muerte celular por apoptosis observada en la figura 10.

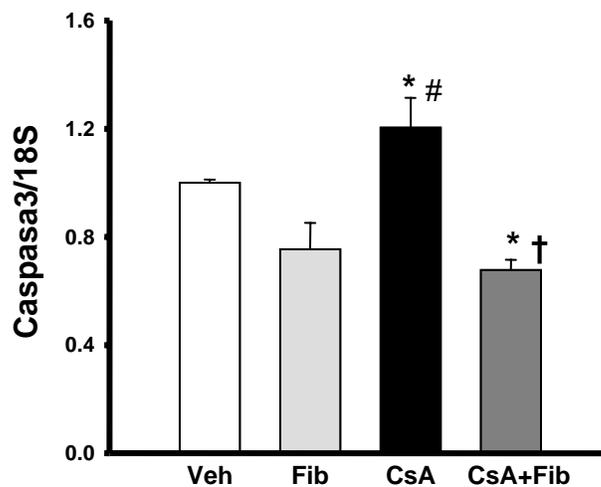


Fig 16. Determinación de los niveles de RNAm del gen proapoptótico caspasa3. Los niveles del grupo de Veh fueron normalizados con 18S. * $p < 0.05$ vs. Veh, # $p < 0.05$ vs. Fib, † $p < 0.05$ vs. CsA.

DISCUSIÓN

La ciclosporina (CsA) es un inmunosupresor muy eficaz, ampliamente utilizado en enfermedades autoinmunes y en trasplantes para evitar el rechazo del injerto. Sin embargo, su uso a largo plazo se encuentra limitado por la nefrotoxicidad crónica que produce. La nefrotoxicidad crónica por CsA se caracteriza por disfunción renal y por la presencia de fibrosis túbulo-intersticial y arteriopatía, que ocasionan la pérdida de nefronas funcionales en forma progresiva y por lo tanto, insuficiencia renal crónica terminal. Debido a lo anterior, se han explorado diversas estrategias para disminuir o retardar el daño producido por la ciclosporina (4, 5, 8, 16, 67, 99).

El fibroquel es una colágena irradiada con rayos gamma, cuya incorporación a la polivinilpirrolidona (PVP) le confiere propiedades antihemostáticas y anti-inflamatorias (88). El fibroquel es producido por Aspid, siendo el tratamiento de cicatrices queloides el uso patentado para este medicamento. Sin embargo, Krötzsch-Gómez y col. en 1998 mostraron por primera vez que el fibroquel puede también reducir la inflamación de las articulaciones en pacientes con artritis reumatoide (86). Es así como surge una serie de estudios en los que se exploran las propiedades del fibroquel como anti-inflamatorio, así como los mecanismos involucrados en este efecto. Los estudios realizados a la fecha con fibroquel revelan que aunado a sus propiedades anti-inflamatorias también posee propiedades antifibróticas.

En estudios realizados con modelos experimentales se ha mostrado que la administración de fibroquel a conejos apendicectomizados disminuye la formación de adhesiones intraperitoneales y mejora la arquitectura del tejido (88). En otro estudio realizado en ratas a las que se les indujo lesión craneal, el fibroquel aceleró el proceso de la reparación de fracturas comparado con el grupo que sólo recibió el placebo (89).

En la práctica clínica, el fibroquel se ha utilizado para el tratamiento de cicatrices queloides. De esta manera, el fibroquel es capaz de reducir las

cicatrices queloides, efecto que se ha atribuido a la acción que ejerce por la disminución de TGF- β y de moléculas pro-inflamatorias, como demostró el estudio de Kröttsch-Gómez y col (86). En pacientes con artritis reumatoide y en lesiones de esclerosis múltiple, el fibroquel también fue capaz de disminuir los niveles de moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , así como de las moléculas de adhesión VCAM-1 y ELAM-1 (84-86).

Por lo tanto, estos hallazgos nos hicieron suponer que el fibroquel podría ser una estrategia antifibrótica, que podría ser útil para reducir la fibrosis túbulo-intersticial que se observa en la nefrotoxicidad crónica por CsA.

Primero evaluamos si el fibroquel era capaz de prevenir el daño funcional renal ocasionado por la CsA. La administración de CsA produjo insuficiencia renal caracterizada por una caída en la filtración glomerular lo cual concuerda con los trabajos previos (48, 82). El fibroquel fue capaz de mejorar la disfunción renal producida por la administración de CsA, pues observamos un aumento en la filtración glomerular con el tratamiento de fibroquel. La CsA también produjo una caída en el flujo sanguíneo renal, la cual mejoró con la administración de fibroquel de manera significativa. Resultados similares han sido reportados con la administración de pirfenidona como agente antifibrótico, en los que no se observó mejoría en la disfunción renal en este modelo (75, 100, 101).

La nefrotoxicidad crónica por CsA también se manifestó por un aumento de arteriolas dañadas, así como incremento en el área afectada por fibrosis túbulo-intersticial. La administración de fibroquel disminuyó significativamente el porcentaje de arteriopatía y redujo el área dañada por fibrosis túbulo-intersticial de manera significativa, lo cual se compara con el efecto reportado con el uso de antifibróticos como la pirfenidona, que del mismo modo que el fibroquel fueron capaces de disminuir el daño estructural ocasionado por CsA (75, 100, 101). Es importante señalar, que al igual que en los estudios efectuados por nuestro laboratorio y por otros investigadores, nosotros también observamos que la disminución del daño estructural producido por CsA fue independiente de la corrección de la disfunción renal (24, 82, 102).

Es importante recalcar que este efecto renoprotector no se asoció con una disminución en los niveles de CsA sérica. Esto fue revelado por la determinación de los niveles de CsA en plasma, tanto del grupo de animales que recibieron el inmunosupresor como del grupo de animales a los que se coadministró fibroquel, estos resultados sugieren que no hay una interacción de fibroquel con CsA, y que el fibroquel no aumentó el metabolismo de este inmunosupresor.

Se ha asociado el daño producido por CsA en la nefrotoxicidad crónica con un aumento en la producción de radicales libres, por lo que se decidió determinar el índice de lipoperoxidación por medio de la determinación de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Como se reportó previamente, el grupo que recibió CsA presentó niveles significativamente elevados de lipoperoxidación renal comparados con el vehículo. El fibroquel fue capaz de reducir los niveles de lipoperoxidación producidos por CsA a niveles similares a los observados en el grupo vehículo (44, 61, 103). Por lo que, para elucidar parte de esta acción se determinaron tanto los niveles de RNAm, como la actividad de las tres principales enzimas antioxidantes encargadas de mantener reducidos los niveles de estrés oxidativo como son la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Se ha descrito que la administración de la CsA produce una disminución de los niveles de RNAm de las enzimas antioxidantes (103, 104), produciendo un desequilibrio en la producción y eliminación de radicales libres. En este estudio se corroboró una disminución significativa de los niveles de RNAm de catalasa, que se previno con la administración de fibroquel. Lo cual sugiere que el restablecimiento de los niveles de RNAm de catalasa podría ser en parte responsable de la disminución de los niveles de lipoperoxidación observados en el grupo que recibió CsA y fibroquel. Se ha reportado también que en la nefrotoxicidad crónica por CsA se presenta una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes (106), lo cual fue confirmado en el presente estudio, pues el grupo tratado con CsA presentó una actividad en superóxido dismutasa significativamente menor cuando se comparó con el grupo vehículo. El fibroquel fue capaz de aumentar la actividad antioxidante de esta enzima, a lo que también se atribuyó la disminución de los niveles de lipoperoxidación. Aunado a esto, es

posible que el fibroquel pueda funcionar como una molécula atrapadora de radicales libres, sin embargo, se requieren otros estudios para elucidar este efecto.

De forma interesante en este estudio encontramos que el fibroquel fue capaz de reducir el número de núcleos positivos determinados por la técnica de TUNEL, indicador de muerte celular por apoptosis. Diversos estudios han reportado que en la nefrotoxicidad crónica por CsA se presenta un aumento en la muerte celular debido a la hipoxia de las células tubulares como resultado de la vasoconstricción renal que induce la CsA. Del mismo modo, en este estudio el grupo de animales a los que se les administró CsA presentó un aumento significativo de núcleos positivos marcados por TUNEL, mientras que en el grupo al que se le coadministró fibroquel el marcaje por TUNEL se disminuyó de manera significativa. También determinamos los niveles de RNAm de pro-caspasa 3. La caspasa 3 es una proteasa efectora de la vía de apoptosis, por lo tanto es una proteína proapoptótica que se ha demostrado se encuentra sobre-regulada en la nefrotoxicidad crónica por CsA (100). De esta manera, el grupo de animales tratados con CsA presentó niveles elevados de RNAm de pro-caspasa 3, lo cual concuerda con el estudio previo de Shihab y col. Estos resultados sugieren que fibroquel podría evitar o reducir la muerte celular por apoptosis.

Se ha demostrado que fibroquel es capaz de disminuir y bloquear la progresión de fibrosis en lesiones de la piel por esclerosis sistémica y en cicatrices hipertróficas a través de la disminución de TGF- β (86, 87). En estudios realizados en pacientes con artritis reumatoide y en cicatrices queloides como se mencionó anteriormente, se demostró que fibroquel es capaz de disminuir los niveles de RNAm de TGF- β , a lo cual se atribuye su capacidad protectora (84, 85, 105). En el presente estudio, también observamos una disminución de los niveles de RNAm de TGF- β cuando se administró fibroquel, a lo que se atribuyó la mejora del daño estructural observada.

Por lo tanto, el presente estudio muestra por primera vez que el fibroquel fue capaz de reducir el daño renal estructural observado en la nefrotoxicidad crónica

por CsA. El efecto renoprotector parece ser el resultado de al menos tres mecanismos como se detalla en la figura 11. El primero involucra sus propiedades antifibróticas, manifestadas por la disminución de los niveles de RNAm de la molécula profibrótica TGF- β ; el segundo se relaciona con su propiedad antioxidante, como se demostró por la reducción en la producción de radicales libres, y finalmente, el tercer mecanismo, es que el fibroquel parece poseer propiedades antiapoptóticas. Por todo lo anterior sugerimos que el fibroquel puede ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades renales en las que se encuentren involucrados procesos fibróticos.

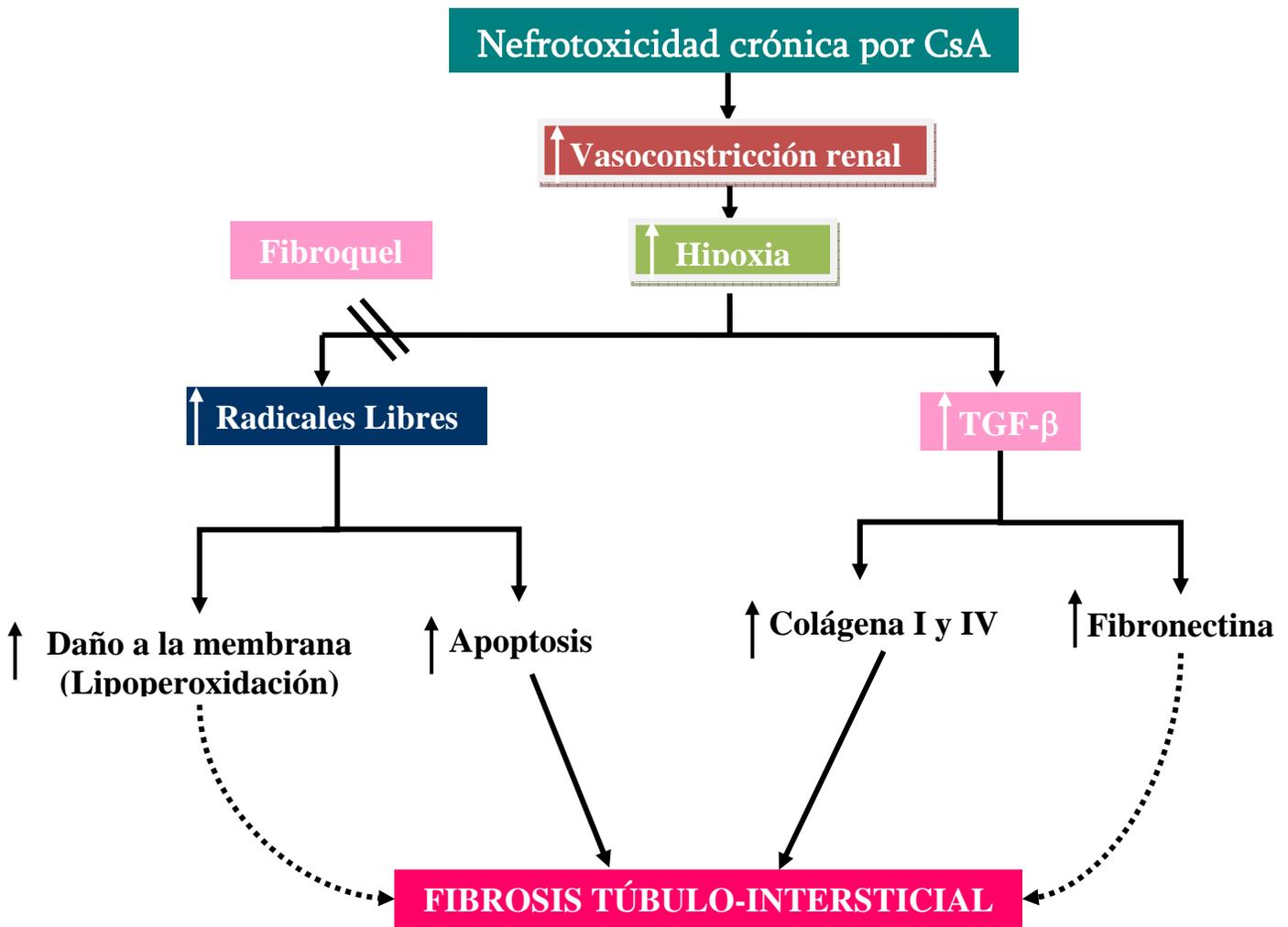


Fig. 17. Mecanismos implicados en el desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial por CsA.

CONCLUSIONES

- } El fibroquel redujo la arteriopatía y prácticamente previno la fibrosis túbulo intersticial, lo que sugiere que este fármaco posee acción antifibrótica en éste modelo de daño inducido por ciclosporina.
- } Al igual que otros antifibróticos, el fibroquel no tuvo efecto sobre la disfunción renal.
- } El fibroquel redujo la lipoperoxidación lo que podría sugerir un papel de éste como antioxidante, al parecer asociado parcialmente al mantenimiento de los niveles de catalasa y de la actividad de superóxido dismutasa. Sin embargo este mecanismo no es suficiente para revertir los niveles de lipoperoxidación, por lo que habría que explorar el posible mecanismo mediante el cuál está actuando, y si este mecanismo es responsable también de la reducción de los daños estructurales producidos por CsA.
- } Asimismo, el fibroquel redujo o previno la apoptosis, lo cual puede ser debido a la disminución de los niveles de lipoperoxidación y a la disminución de los niveles de mRNA de caspasa3, gen que se sabe está involucrado en la inducción de apoptosis.
- } Todo lo anterior sugiere que el efecto renoprotector de fibroquel está asociado con la disminución de la lipoperoxidación y del índice apoptótico.

BIBLIOGRAFIA

1. Naveen T, Gaganjit K, Garima V, Kanwaljit C. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacology* 5:15, 2005.
2. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal diseases and transplantation. *Am J Kidney Dis* 28: 631-667, 1996.
3. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin-a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45: 953, 1993.
4. Campistol JM, Sacks SH. Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation* 69: SS5, 2000.
5. Li C, Lim SW, Sun BK, Yang CW. Chronic cyclosporine nephrotoxicity: New insights and preventive strategies. *Yonsei Med J* 45: 1004, 2004.
6. Hardman Joel G, Limbird Lee E, Molinoff Perry B, Ruddon Raymond W, Goodman Gilman A. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9a edición. McGraw-Hill Interamericana. 1996.
7. Tilney NL, Milford EL, Araujo JL, Strom TB, Carpenter CB, Kirkman RL. Experience with cyclosporine and steroids in clinical renal transplantation. *Ann Surg* 200: 605, 1984.
8. Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Remuzzi G. Nephrotoxic aspects of cyclosporine. *Transplant Proc* 36 (Suppl 2S): 234S, 2004.
9. Hernando L, Aljama P, Arias M, Caramelo C, Egido J, Lamas S. *Nefrología Clínica*. 2a edición. Editorial Panamericana. 2003.
10. Koeppen Bruce M, Stanton Bruce A. *Renal Physiology*. 2a edición. Mosby. 1997.
11. Brenner BM, Rector FC. *The Kidney*. Volumen I. 4a edición. WB Saunders Company. 1991.
12. Navar LG. Aldosterone and the Vasculature: Mechanisms Mediating Resistant Hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:433-444, 1998.
13. Conger, JD, SA Falk. KCl and angiotensin responses in isolated rat renal arterioles: effects of diltiazem and low calcium medium. *Am J Physiol* 264 (Renal Fluid ElectrolytePhysiol. 33): F134-F140, 1993.
14. Arima S. Rapid non-genomic vasoconstrictor actions of aldosterone in the renal microcirculation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5):170-4, 2006.
15. Eaton DC, Pooler JP. *Fisiología renal de Vander*. 6a edición. McGraw-Hill. 2006.

16. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 20: 759, 1988.
17. Nast CC, Blifeld C, Danovitch GM, Fine RN, Ettenger RB. Evaluation of cyclosporine nephrotoxicity by renal transplant fine needle aspiration. *Mod Pathol* 2: 577-582; 1990.
18. 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, 2001.
19. 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, 1986.
20. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 49: 356, 1998.
21. Antonovych TT, Sabnis SG, Austin HA, Palestine AG, Balow JE, Nussenblatt RB, Helfrich GB, Foegh ML, Alijani MR. Cyclosporine A-induced arteriopathy. *Transplant Proc* 20 (Suppl 3): 951-958, 1988.
22. Andoh TF, Bennett WM. Chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 265-270, 1998.
23. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: The Achille's heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 50: 1089-1100, 1996.
24. Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: Role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol* 4: 214-221, 1993.
25. 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* 284: F389-F398, 2003.
26. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int* (Suppl 52): S263, 1995.
27. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Physiol* 17: 17-25, 2006.
28. Adler S, Huang H. Impaired regulation of renal oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 13: 1788-1794, 2002.
29. Choi YJ, Chakraborty S, Nguyen V, Nguyen C, Kim BK, Shim SI, Suki WN, Truong LD. Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: Altered expression of vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol* 31: 1491-1497, 2000.

30. Takeji M, Moriyama T, Oseto S, Kawada N, Hori M, Imai E, Miwa T. Smooth muscle alpha-actin deficiency in myofibroblasts leads to enhanced renal tissue fibrosis. *JBC* 2006.
31. Norman JT, Orphanides C, Garcia P, Fine LG. Hypoxia induced changes in extracellular matrix metabolism in renal cells. *Exp Nephrol* 7: 463–469, 1999
32. Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F1223–F1232, 2004.
33. Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* 94:4177–4185, 1999.
34. Kone BC. Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol* 19: 230-241, 1999.
35. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 272: F561-F578, 1997.
36. López-Ongil S, Saura 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 Physiol* 271: H1072-H1078, 1996.
37. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, López P, Mendoza S, García-Torres R, Alvarado JA, Herrera-Acosta J. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 46: 773-779, 1994.
38. Stroes SG, Lüscher TF, De Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporin A increases nitric oxide activity *in vivo*. *Hypertension* 29: 570-575, 1997.
39. Andoh TF, Gardner MP, Bennett WM. Protective effects of dietary L-arginine supplementation on chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 64: 1236-1240, 1997.
40. 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* 58:1174-1185, 2000.
41. 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 Physiol* 274 (Renal Physiol 43): F791-F798, 1998.
42. 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.

43. 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.
44. 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.
45. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52: 11-34, 2000.
46. Julien J, Farge D, Kreft-Jais C, Guyene TT, Plouin PF, Houssin D, Carpentier A, Corvol P. Cyclosporine-induced stimulation of the rennin-angiotensin system after liver and heart transplantation. *Transplantation* 56: 885, 1993.
47. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 59: 1626-1640, 2001.
48. Vieira JM Jr., Noronha IL, Malheiros DL, Burdmann EA. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* 68: 1746-1753, 1999.
49. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-b and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 62: 2257, 2002.
50. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ Andoh T, Bennett WM, Couser WG, Alpers CE. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 48: 439-448, 1995.
51. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, Andoh TF, Burdmann EA, Shankland SJ, Alpers CE, Bennett WM, Couser WG, Johnson RJ. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: Roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol* 6: 1186-1196, 1995.
52. Islam M, Burke JF, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, Kanalas J, Sharma K. Effect of antitransforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int* 59: 498, 2001.
53. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-401, 2001.
54. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501, 2001.
55. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-56, 2002.
56. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299, 1995.

57. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326, 1998.
58. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int* 56: 2147-2159, 1999.
59. Savill J, Mooney A, Hughes J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney int* 49: S14-S17, 1996.
60. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:301-308, 2002.
61. Conger JD, Kim GE, Robinette JB. Effects of ANG II, ETA, and TxA2 receptor antagonists on cyclosporin A renal vasoconstriction. *Am J Physiol* 267:F443-F449, 1994.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, Alpers CE: Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* 48:431-438, 1995.
67. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F2-F9, 2007.
68. Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, Lindsley J, Bennett WM. Prevention of experimental cyclosporine-induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am Physiol* 269: F491-F499, 1995.
69. Keane WF, Anderson S, Aurell M, De Zeeuw D, Narins G, Povar G. Angiotensin converting enzyme inhibitors and progressive renal insufficiency. *Ann Intern Med* 118: 577-581, 1993.
70. 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.

71. Elliot SJ, Striker LJ, Stetler-Stevenson WG, Jacot TA, Striker GE. Pentosan polysulfate decreases proliferation and net extracellular matrix production in mouse mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10(1):62-8, 1999.
72. Striker GE, Lupia E, Elliot S, Zheng F, McQuinn C, Blagg C, Selim S, Vilar J, Striker LJ. Glomerulosclerosis, arteriosclerosis, and vascular graft stenosis: treatment with oral heparinoids. *Kidney Int Suppl* 63:S120-3, 1997.
73. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO, Andoh TF. Mycophenolate mofetil ameliorates arteriopathy and decreases transforming growth factor-beta 1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 3: 1550-1559, 2003.
74. 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, 2003.
75. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor-beta1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 2:111-119, 2002.
76. 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 Renal Physiol* 286:F46, 2004.
77. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 59: 1304-1314, 2001.
78. Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, Mizuno S, Nakamura T, Ito T, Imai E, Hori M. Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 65:2041-2053, 2004.
79. Miura K, Nakatani T, Asai T, Yamanaka S, Tamada S, Tashiro K, Kim S, Okamura M, Iwao H. Role of hypomagnesemia in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 73: 340, 2002.
80. 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, 2002.
81. Andoh TF, Burdmann EA, Fransechini N, Houghton DC, Bennett WM. Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int* 50:1110, 1996.
82. 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.
83. Perez-Rojas J, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martinez dIM, Gamba G, Bobadilla NA. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1020-F1030, 2005.
84. Furuzawa-Carballeda J, Alcocer-Varela J, Diaz de Leon L. Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann N Y Acad Sci* 878:598-602. 1999.
85. Furuzawa-Carballeda J, Rodriquez-Calderon R, Diaz de Leon L, Alcocer-Varela J. Mediators of inflammation are down-regulated while apoptosis is up-regulated in rheumatoid arthritis synovial tissue by polymerized collagen. *Clin Exp Immunol* 130(1):140-9, 2002.
86. Furuzawa-Carballeda J, Kröttsch E, Barile-Fabris L, Alcalá M, Espinosa-Morales R. Subcutaneous administration of collagen-polyvinylpyrrolidone down regulates IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta1, ELAM-1 and VCAM-1 expression in scleroderma skin lesions. *Clin Exp Dermatol* 30 (1) : 83-86, 2005.
87. Kröttsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiroz-Hernández E, Díaz de León L. Cytokine expression is downregulated by collagen- polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 75 (1) : 828-834, 1998.
88. Cervantes-Sánchez CR, Olaya E, Testas M, García-López N, Coste G, Arrellin G, Luna A, Kröttsch FE. Collagen-PVP, a collagen síntesis modulator, decreases intraperitoneal adhesions. *J Sur Res* 110: 207-210, 2003.
89. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruíz T, Furuzawa-Carballeda GJ, Lira JM, de la Cruz JC, Almazán A, Kröttsch-Gómez FE, Arrellín G, Díaz de León L. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. *Ann N Y Acad Sci* 857: 232-236, 1998.
90. Dé Hoyos Garza A, Aguilar EA, Richards GC. Ileocolonic ulcer treated by endoscopic application of collagen-polyvinylpirrolidone. *Can J Gastroenterol* 21 (8): 513-515, 2007.
91. Zerón HM, Kröttsch-Gómez FE, Muñoz RE. Pressure ulcers: a pilot study for treatment with collagen polyvinylpirrolidone. *Int J Dermatol* 46(3): 314-317, 2007.
92. Furuzawa-Carballeda J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Díaz de León L, Kröttsch E. Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpirrolidone administered during short and long periods in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 81(11): 1029-1035, 2003.

93. Perez-Rojas JM, Blanco JA, Gamba G, Bobadilla NA. Low calorie commercial sugar is a sensitive marker of glomerular filtration rate. *Kidney Int* 68(4):1888-93, 2005.
94. Aebi HE. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie. 1982.
95. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzimol* 105: 457, 1984.
96. Livak KJ, 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.
97. Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YO, Kim YS, Kim J, 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.
98. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 286(3):F552-63, 2004.
99. McNally PG, Feehally J. Pathophysiology of cyclosporine A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol Dial Transplant* 7: 791-804, 1992.
100. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Effect of pirfenidone on apoptosis-regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 79(4):419-26, 2005.
101. Brook NR, Waller JR, Bicknell GR, Nicholson ML. The novel antifibrotic agent pirfenidone attenuates the profibrotic environment generated by calcineurin inhibitors in the rat salt-depletion model. *Transplant Proc* 37(1):130-3, 2005.
102. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, Trujillo J, Vaidya VS, Uribe N, Bonventre JV, Gamba G, Bobadilla NA. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1):F131-9, 2007.
103. Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martinez de la Maza L, Gamba G, Bobadilla NA. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(5):F1020-30, 2005.
104. Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T, Hata S, Iwasaki Y, Nemoto M, Shirai K, Yamauchi S, Margolin SB, Shimizu F, Kurokawa K. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. *Kidney Int* 52: S239, 1997.
105. Furuzawa-Carballeda J, Fenutria-Ausmequet R, Gil-Espinosa V, Lozano-Soto F, Teliz-Meneses MA, Romero-Trejo C, Alcocer-Varela J.

- Polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Rheumatol* 24(5):514-20, 2006.
106. Durak I, Karabacak HI, Büyükkoçak S, Cimen MY, Kaçmaz M, Omeroglu E, Oztürk HS. Impaired antioxidant defense system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. Protective effects of vitamins E and C. *Nephron* 78(2):207-11, 1998.

INDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| IRT | Insuficiencia renal terminal |
| CsA | Ciclosporina |
| FTI | Fibrosis tubulointersticial |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| KIM | Molécula de daño renal |
| TGF-β | Factor transformante de crecimiento |
| NFAT | Factor nuclear de células T activadas |
| RCT | Receptor de células T |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| FSR | Flujo sanguíneo renal |
| GFR | Tasa de filtración glomerular |
| HIF-1 | Factor inducible por hipoxia |
| CTGF | Factor de crecimiento de tejido conectivo |
| PAI-1 | Inhibidor del activador de plasminógeno-1 |
| NO | Óxido nítrico |
| eNOS | Sintasa de óxido nítrico endotelial |
| nNOS | Sintasa de óxido nítrico neuronal |
| iNOS | Sintasa de óxido nítrico inducible |
| L-NAME | L-N- Nitroarginina metil éster |
| SRAA | Sistema renina-angiotensina-aldosterona |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |

| | |
|-------------------------------|---|
| PPS | Polisulfato de pentosan |
| MMP | Metaloproteasa |
| HGF | Factor de crecimiento de hepatocitos |
| ET-1 | Endotelina |
| IL-1β | Interleucina-1b |
| ELAM-1 | Molécula de adhesión de los leucocitos al endotelio |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión celular vascular |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| Fib | Fibroquel |
| Veh | Vehículo |
| TBARS | Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico |