



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA
EVALUAR EL CURSO TEMPORAL DE LAS ALTERACIONES EN
LA TRANSICIÓN DE LESIÓN RENAL AGUDA A ENFERMEDAD
RENAL CRÓNICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA**

P R E S E N T A:

ANDREA SÁNCHEZ NAVARRO

Facultad de Medicina



TUTOR

DRA. NORMA A. BOBADILLA SANDOVAL

Ciudad de México, Agosto de 2016



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.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval, en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El trabajo se efectuó entre Julio de 2014 y Julio de 2016.

El estudio fue apoyado financieramente por los proyectos de Conacyt: 235855, 235964 y 181267 por la DGAPA-PAPIIT-UNAM: IN223915 otorgados a la Dra. Norma A. Bobadilla

Agradezco la asesoría técnica de la QFB Rosalba Pérez Villalva durante la realización de este trabajo.

Aprovecho para agradecer a la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas y en particular a la Lic. Lucía Brito Ocampo, que me brindaron todo el material y facilidades para mis estudios.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Facultad de Medicina por todas las facilidades que se me otorgaron durante la carrera.

Durante mis estudios de licenciatura, mi tutora gestionó varios apoyos económicos. Uno fue el reconocimiento de ayudante de Investigador

Nacional III (Dra. Norma Bobadilla, No. expediente 7497) otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores-Conacyt (Feb a Sep 2014 y Ene a Jul 2016).

Recibí también la beca PROBEI, por parte de la Comisión de Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (Sep 2014 a Jun 2015).

Fui además acreedora a la beca para titulación DGAPA-PAPIIT-UNAM del proyecto IN223915, previamente citado (Ago a Dic 2015).

Los resultados del presente estudio fueron presentados en forma oral, en el Congreso ISCOMS, Groningen, Holanda (Jun 2015); también en la Reunión Anual del Instituto Mexicano de Investigaciones Nefrológicas (Dic 2015) y serán presentados en forma oral en el Congreso Americano de Nefrología que se efectuará en Chicago (Nov 2016).

Además este trabajo fue reconocido por la Universidad de Groningen, con la presea Session Winner, Oral Session Nephrology and Urology, ISCOMS, Groningen, Holanda, 2015.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por dejarme lograr una meta más en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: **Gabriela y Pedro**, que han sido un gran ejemplo a seguir, y que me han brindado su amor y apoyo incondicional, enseñándome a no rendirme para lograr mis metas y nunca dejarme vencer. Los amo.

A mis hermanas: **Brenda y Gaby** por creer en mí, cuidarme, ser mis amigas y confidentes, y siempre alentarme cuando lo necesito. Sé que siempre estamos para apoyarnos.

A **Janeth**: por ser como una hermana para mí siempre darme sus ánimos y hacerme sonreír. Eres la mejor amiga. Te quiero.

A **Norma Bobadilla**: por la confianza que me ha brindado y por alentarme a seguir creciendo como alumna y como persona; por el apoyo que he recibido durante estos años y por ser un gran ejemplo a seguir. Gracias.

A **Adrián**: por ser mi fiel compañero en las buenas y en las malas, mi conciencia cuando lo necesito y mi apoyo incondicional. Y por dejarme formar parte de su vida. Gracias.

A **Rosy**: Gracias, porque además de ser el mejor apoyo en el laboratorio, me brindo su amistad, cariño y tiempo.

A **Jonatán**: por ser una persona tan admirable y a la vez tan humilde; por ser un buen amigo y ayudarme siempre que lo necesito.

A mis amigos **Dominique, Nadyeli, Cristina y Roberto Carlos**: por los momentos compartidos, las horas de diversión y ayudarme a crear bellos momentos.

A **mis compañeros** de laboratorio y del departamento de Nefrología: porque cada uno de ustedes contribuyeron a mi crecimiento intelectual y profesional.

Al **Dr. Gerardo Gamba** por sus aportaciones durante la realización del proyecto.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Sistema urinario	7
Lesión Renal Aguda (LRA).....	11
Enfermedad Renal Crónica (ERC)	13
Mecanismos responsables de la LRA	14
Transición de LRA a ERC	16
Epigenética en la transición LRA a ERC	19
Aportaciones previas de nuestro laboratorio	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO	23
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MÉTODOS	25
RESULTADOS	34
El modelo de nefrectomía más isquemia promueve LRA.	34
El modelo de nefrectomía más isquemia aceleró la transición a ERC	38
Aumento del estrés oxidante e hipoxia crónica	40
Cambios histopatológicos en la transición de la LRA a ERC	42
Respuesta ineficiente a hipoxia en la transición a ERC.....	42
Cambios en la metilación global de DNA responsables de la transición a ERC.....	45
DISCUSIÓN.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	53

RESUMEN

La Lesión Renal Aguda (LRA) es reconocida en la actualidad como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de Enfermedad Renal Crónica (ERC). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la transición de LRA a ERC son muy poco conocidos, y aún menos conocidos son las alteraciones que ocurren temporalmente a lo largo de dicha transición. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue conocer las alteraciones temporales de la respuesta inflamatoria, del estrés oxidante, hipoxia y fibrosis, así como el papel de las modificaciones epigenéticas en la transición de LRA a ERC. Se incluyeron 52 ratas Wistar macho divididas en: 1) Cirugía falsa o Sham(n=16), 2) nefrectomía derecha(n=16) y 3) nefrectomía derecha acompañada por isquemia izquierda de 45 min(n=20). Los animales se siguieron 1, 2, 3 ó 4 meses después de la cirugía. Encontramos que los animales desarrollaron ERC que se caracterizó por un aumento progresivo de la proteinuria, disfunción renal y alteraciones histopatológicas. Además, se encontró que todos estos cambios se asociaron con una reducción temprana de HIF-1 α /VEGF, aumento del estrés oxidante, hipoxia crónica y la hipometilación global del DNA en la corteza renal, que dejan de manifiesto su papel clave en la transición de LRA a ERC.

INTRODUCCIÓN

El organismo necesita mantener un balance entre los líquidos y electrolitos que se ingieren y los que se desechan para llevar a cabo sus funciones. Por un lado, es indispensable que se reabsorban todos los nutrientes que las células requieren para llevar a cabo los procesos metabólicos y por otro, se necesita eliminar los desechos que los propios procesos generan. Para lograr este balance, el organismo cuenta con una serie de sistemas y aparatos, que de forma coordinada mantienen la homeostasis celular.

Uno de los sistemas que tiene una gran importancia en la eliminación de los desechos es el sistema urinario, ya que es capaz de filtrar toda la sangre del organismo y de esa manera eliminar selectivamente los desechos, así como reabsorber todos los nutrientes que son esenciales para el buen funcionamiento del organismo.

Sistema urinario

El sistema urinario está compuesto por dos riñones con su respectivo uréter, la vejiga y la uretra. Todos estos componentes llevan en conjunto la eliminación de los desechos a través de la

orina, pero es en el riñón en donde se llevan a cabo los procesos de filtración, secreción y eliminación de los componentes metabólicos

Los riñones se encuentran ubicados en la parte posterior del peritoneo, entre la doceava vértebra torácica y tercera vértebra lumbar. Tienen un peso de entre 125-170g en hombres y de 115-155g en las mujeres, representando con ello solo el 0.5% del peso del organismo. Son órganos que presentan una clara organización entre las células endoteliales y las células epiteliales que lo hace competente para desempeñar sus funciones. Entre estas funciones está la filtración del plasma sanguíneo, la regulación del balance de hídrico, electrolítico y ácido-base, esto al regular las concentraciones de iones. También los riñones cumplen un papel muy importante en la regulación de la eritropoyesis, generación de células sanguíneas y en la regulación del calcio, al producir hormonas como eritropoyetina y vitamina D, respectivamente. (1)

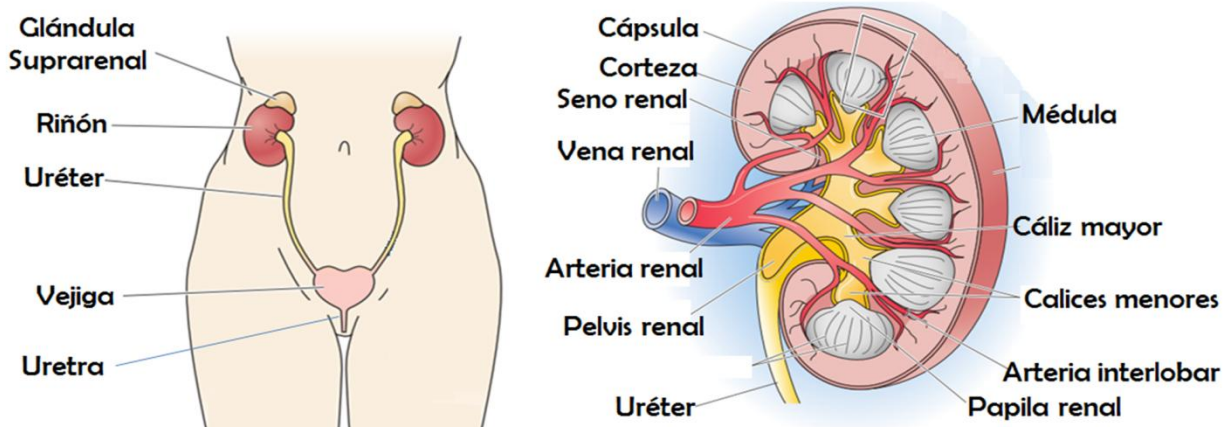


Figura 1. Sistema Urinario. Esquema de los elementos que conforman al sistema urinario y al riñón.

La anatomía de los riñones está en estrecha relación con su función debido a que cuenta con glomérulos y un área extensa de tubos de epitelio renal que le permiten realizar de forma correcta la filtración, secreción y reabsorción. El primer paso es la filtración del plasma sanguíneo. Luego para modificar el ultrafiltrado glomerular cuenta con una vasta cantidad de capilares que permiten llevar a cabo la reabsorción o secreción a lo largo de su paso por los túbulos renales.

A simple vista en un corte transversal pueden apreciarse dos zonas en el riñón; en la parte externa se encuentra la corteza renal, que es donde se encuentran los glomérulos y hacia el centro se ubica la médula renal. En la Figura 1 se muestra a detalle los componentes del riñón. Dentro de la médula se encuentran entre 8-18 pirámides renales que desembocan hacia los cálices menores en donde fluye la orina hacia el seno renal, para posteriormente ser eliminada. (1,2)

La unidad funcional del riñón es la nefrona, cada riñón presenta entre 800,000 a 1, 200,000 nefronas. Las nefronas están formadas por un penacho capilar llamado glomérulo y una serie de túbulos epiteliales que están divididos en túbulo proximal, asa de

Henle, túbulo distal y túbulo colector, Figura 2. Cada uno de estos segmentos presenta una enorme selectividad al paso de iones y metabolitos a través de sus membranas, esto es importante para que los procesos de reabsorción y secreción se lleven a cabo de forma óptima.

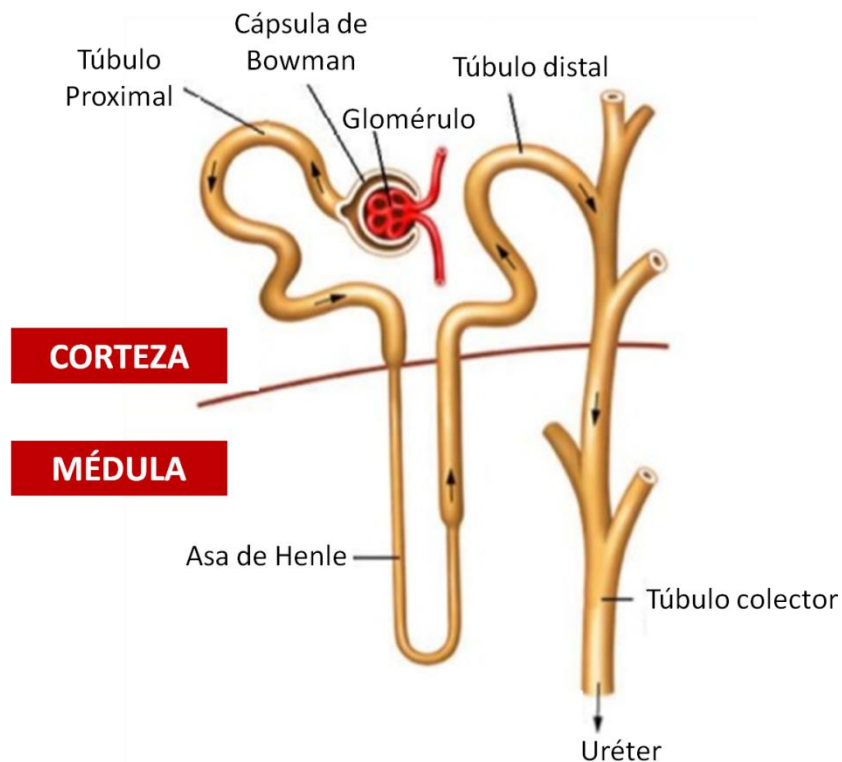


Figura 2. Componentes de la nefrona en donde se muestra la ubicación de cada uno de las partes del túbulo renal.

La función renal comienza con la filtración del plasma sanguíneo a través de glomérulo generando un ultrafiltrado libre de proteínas, posteriormente al pasar por las distintas zonas de los túbulos renales, se van reabsorbiendo iones y sustancias como glucosa, que el organismo necesita y al mismo tiempo se secretan

otros desechos que no fueron filtrados al inicio. Al final tenemos un concentrado de desechos llamado orina que se excretará a través del túbulo colector. Al volumen de filtrado que se genera por unidad de tiempo se le llama Tasa de Filtrado Glomerular, la cual es de 180 litros al día. Es por esta razón que el riñón recibe aproximadamente el 20% del gasto cardiaco, esto indica lo metabólicamente activo que es este órgano, es por ello que incluso períodos leves de hipoxia, son capaces de generar un gran daño. (1, 2)

Lesión Renal Aguda (LRA)

Durante mucho tiempo se tuvieron problemas para diagnosticar la LRA debido a que no existían consensos de la definición clínica de LRA. A la fecha se han establecido algunos parámetros clínicos y se ha unificado la definición de LRA. Sin embargo, hasta ahora no existen parámetros clínicos que sean capaces de detectar de forma oportuna este suceso, ya que el parámetro más utilizado en la clínica es la elevación de la creatinina plasmática, que no ocurre, sino hasta 48h después de que se presentó la lesión. Esto ha traído como consecuencia que la incidencia de LRA no haya disminuido en los últimos 40 años (3, 4).

La LRA se caracteriza por la caída abrupta y transitoria del flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona una reducción de la función y

el consecuente daño endotelial y epitelial por hipoxia (5). Se conoce que la LRA afecta al 15% de los pacientes hospitalizados, siendo la mayor la incidencia en los pacientes en terapia intensiva que es entre el 30 al 60% y con una tasa de mortalidad de alrededor del 40% (3). En la clínica este fenómeno se puede presentar por diversas causas como es la sepsis, el uso de medicamentos nefrotóxicos o medios de contraste, la hipovolemia generada por hemorragias, deshidratación o por una disminución en la presión arterial y cirugías mayores (5, 6, 7), lo que trae como consecuencia que ocurran procesos de isquemia/reperfusión (IR). La isquemia causa un proceso de hipoxia, que puede llevar a la muerte de las células epiteliales proximales por apoptosis y necrosis, ya que el oxígeno es indispensable para la fisiología de la célula. Aunado a este fenómeno, el proceso de reperfusión incrementa la generación de especies reactivas, generando daño oxidante en macromoléculas como los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (5). En la clínica la LRA se presenta como una caída de la función renal dentro de las primeras 48 horas, esto se ve reflejado en la elevación de la creatinina sérica, la disminución del volumen urinario y una depuración de creatinina disminuida.

La LRA constituye uno de los más grandes problemas de salud, generando costos de hasta 9 mil millones de dólares para el

sistema de salud norteamericano (3). En la actualidad la búsqueda de la temporalidad de los mecanismos involucrados en este episodio (8,9), así como la generación de estrategias en la clínica que sean capaces de prevenir el desarrollo de LRA resulta indispensable para promover la reducción de muertes y costos para los sistemas de salud.

Durante mucho tiempo se especuló que los pacientes que sobrevivían a un episodio de LRA no tenían ninguna repercusión posterior y que el epitelio era capaz de regenerarse y regresar a su estado normal. Sin embargo, estudios epidemiológicos y modelos experimentales recientes han demostrado que la LRA es un factor de riesgo independiente para desarrollar Enfermedad Renal Crónica (ERC). Además, se ha demostrado que la severidad de la LRA es proporcional a la probabilidad de desarrollar ERC (10, 11, 12).

Enfermedad Renal Crónica (ERC)

La ERC se caracteriza por la pérdida progresiva de las nefronas y de la función renal. A largo plazo habrá una pérdida total de la función y para este punto la única forma de que el paciente sobreviva es con terapias de remplazo renal, como diálisis peritoneal y hemodiálisis, o bien el trasplante renal. Ambas posibilidades terapéuticas generan enormes costos a los sistemas

de salud. En las últimas dos décadas, la incidencia de la ERC ha aumentado más de tres veces y según la OMS, será una de las primeras tres causas de muerte y de discapacidad en el mundo para el 2020 (14). Esto sin duda impactará a los sistemas de salud alrededor del mundo.

Mecanismos responsables de la LRA

En la actualidad se tiene noción de algunos de los mecanismos involucrados en la LRA, sin embargo no se ha terminado de entender a este fenómeno del todo. Se conoce que durante un episodio de LRA hay un ambiente de hipoxia, que lleva a la muerte de muchas células principalmente del epitelio tubular por procesos tanto de apoptosis, que es una muerte celular

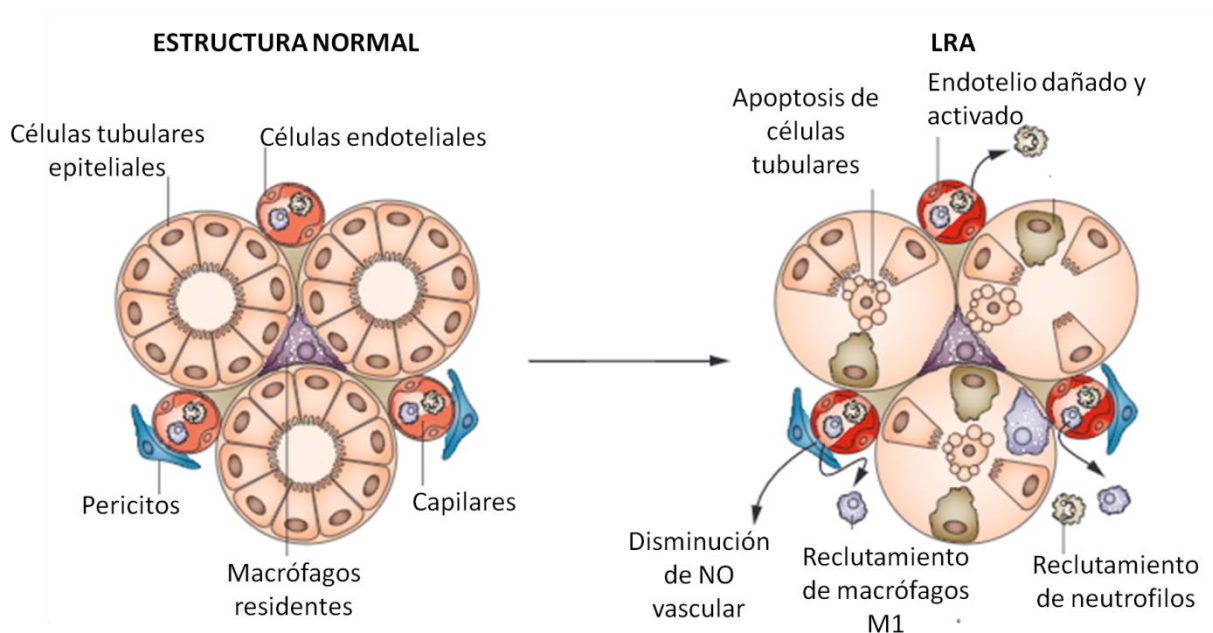


Figura 3. Efectos de un episodio de LRA en el riñón, responsables de causar el daño. Modificada de Ferenbach et al 2015.

programada, como procesos de necrosis, muerte celular que promueve la liberación del material celular. Ambos mecanismos generan una pérdida muy importante de epitelio tubular renal, que se desprende y las células epiteliales se pueden encontrar en la orina de los pacientes con este tipo de lesión. Se ha demostrado que las células epiteliales más dañadas son las del túbulo proximal, específicamente, el segmento S3 (7) y se cree que esto se debe a su alta tasa metabólica.

Durante la LRA, las células de este segmento sufren un cambio de polaridad debido a que la bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$, que normalmente se encuentra en el lado basolateral se relocaliza al lado apical, así como cambios en el citoesqueleto que producen la pérdida del borde en cepillo, una estructura especializada que presenta este tipo epitelial. Los dos procesos antes mencionados se relacionan con una disminución en la capacidad de reabsorción del epitelio. Otro componente que sufre daño durante este proceso, es la microcirculación, que no es capaz de responder a la hipoxia e incluso se ha reportado que hay una pérdida de la microvasculatura, proceso denominado rarefacción vascular (7,8). En la Figura 3 se esquematiza algunos de los procesos celulares que se alteran durante la LRA.

Transición de LRA a ERC

Como se mencionó previamente, durante mucho tiempo se especuló que los pacientes que sobrevivían a un episodio de LRA no tenían ninguna repercusión posterior y que el epitelio era capaz de regenerarse y regresar a su funcionamiento normal. Sin embargo, estudios clínicos y modelos experimentales recientes han demostrado que la LRA es un factor de riesgo independiente para desarrollar ERC (10, 11, 12).

Resulta evidente que cada vez existe mayor conocimiento sobre los mecanismos involucrados en un evento de LRA; sin embargo, como se comentó la LRA se ha convertido en un reto aún mayor debido al riesgo inminente que tiene el paciente de desarrollar ERC en un futuro no lejano. Lo anterior demuestra que a pesar de que el tejido renal tiene la habilidad de recuperarse del daño celular letal o subletal, lo cual se observa de manera funcional cuando los pacientes son egresados de la hospitalización con cifras de creatinina en parámetros normales, los procesos celulares del endotelio y del túbulo renal no se recuperan totalmente, lo que condicionan al desarrollo de disfunción renal progresiva (10).

En los últimos años se han propuesto varias teorías tratando de explicar cómo un episodio de LRA puede conducir al desarrollo de ERC dentro las que destacan: ciclos de daño/reparación/regeneración continuos a lo largo del tiempo (8), rarefacción de los capilares peri-tubulares con el desarrollo subsecuente de hipoxia crónica (11,15) y la activación de las vías de señalización en donde están involucrados factores como HIF-1 α , MAP cinasas, citocinas pro-fibróticas y pro-inflamatorias (16; 17).

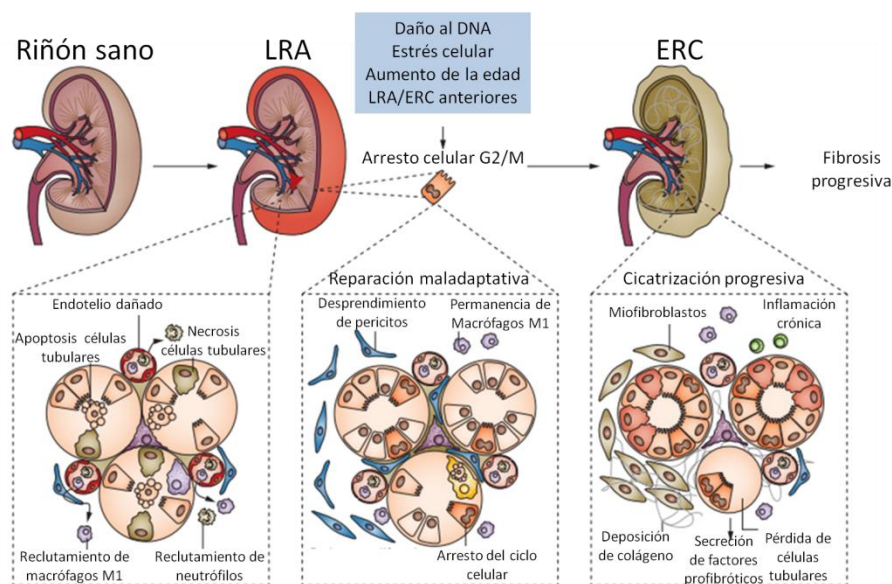


Figura 4. Transición de LRA a ERC. La inflamación crónica, muerte celular y procesos fibróticos, son algunos de los mediadores de este proceso. Modificada de Ferenbach et al 2015.

También se ha mostrado que después de la I/R no sólo no hay proliferación de las células endoteliales, sino que se presenta una transición del endotelio a mesénquima. Es decir, la disminución en la densidad vascular que ocurre después de la LRA resulta en parte por la transición fenotípica que sufren las células endoteliales

que se combina con la capacidad impedida de regeneración (17). Además, Conger et al. (18) mostraron que el riñón post-isquémico pierde la capacidad de autorregular adecuadamente el flujo sanguíneo renal. Estas condiciones en conjunto perpetúan los ciclos continuos de daño por hipoxia e inflamación que eventualmente conducen al desarrollo de ERC (18). Aunque es esencial que las células tubulares proliferen para restablecer la estructura tubular normal, dos estudios recientes sugieren que las células epiteliales de los túbulos renales también juegan un papel crítico en el desarrollo de la fibrosis túbulo intersticial característica de la ERC, a través de inducir un arresto en el ciclo celular y modificaciones epigenéticas (15,16). Yang L. et al. (19) demostraron que después de daño renal por I/R o por nefrotóxicos o por obstrucción ureteral, las células epiteliales sufren un arresto en el ciclo celular en la fase G2/M, lo que resulta en un fenotipo que facilita la producción de factores pro-fibróticos como el TGF- β . Esto se debe a que en las células del túbulo proximal que se encuentran arrestadas, la cinasa JNK se activa y sobre-regula la producción de citocinas pro-inflamatorias (20). En la Figura 4 se resumen los mecanismos descritos que están involucrados en la transición de LRA a ERC.

Desde hace varios años, nuestro laboratorio ha estado interesado en el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de ERC inducida por un episodio de LRA así como en la búsqueda de la temporalidad de los mecanismos que nos ayuden a encontrar moléculas clave que sirvan como blancos para prevenir la transición de LRA a ERC.

Epigenética en la transición LRA a ERC

En los últimos años el papel de los mecanismos epigenéticos ha tomado gran relevancia en el desarrollo de diversas patologías. El daño renal no es la excepción, pero para el caso de la LRA y la ERC poco se conoce al respecto. La metilación global del DNA (21, 22), es uno de los mecanismos que recientemente se han propuesto, como responsable del desarrollo de ERC.

Bechtel W et al. (21) infirieron que el mantenimiento de la fibrosis puede representar que los fibroblastos activados no pueden regresar a su estado basal debido a que sufren alteraciones únicas en la metilación de los fibroblastos. Este estudio sugiere que en la progresión de la ERC ocurren cambios epigenéticos (21). Además, estudios recientes han sugerido que los procesos inflamatorios y de reparación, tienen un componente de regulación epigenética muy importante (23, 24). Se ha demostrado, por ejemplo, que cambios

en la metilación de regiones promotoras de los genes de TNF- α , IL-6 y MCP-1 promueven la llegada de remodeladores de la cromatina como Brahma-related gene-1 y Pol II que

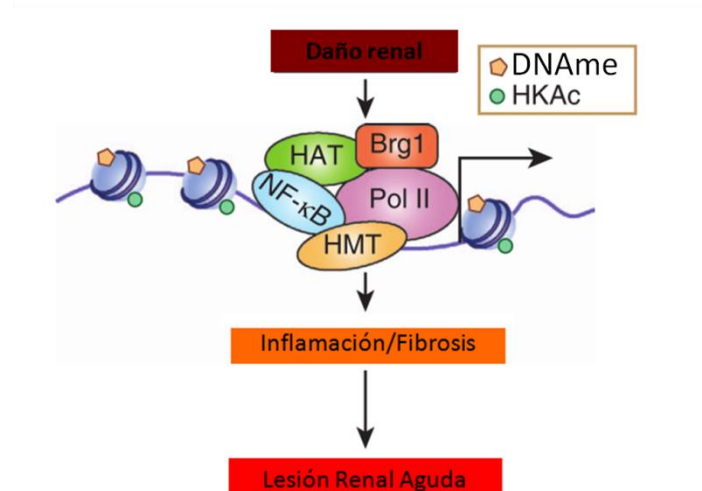


Figura 5. Regulación epigenética de la LRA. La metilación de DNA (DNAm) y otras modificaciones de la cromatina promueven la llegada de remodeladores de la cromatina. Modificada de Marpadga A. R et al 2015.

generan la transcripción de dichos genes en la LRA, como se detalla en la Figura 5 (25).

A pesar de estos avances, aún no se comprende cómo la regulación epigenética contribuye a la transición de LRA a ERC, ni cuál es la temporalidad de dichos cambios. Por lo tanto, resulta interesante conocer si hay procesos dinámicos en la metilación de DNA a lo largo de la transición, además que se ha sugerido que pudiera ser uno de los mediadores del desarrollo de ERC.

Aportaciones previas de nuestro laboratorio

En un estudio realizado previamente por nuestro laboratorio, se demostró que un episodio de LRA inducido por IR bilateral es suficiente para que los animales progresen a ERC después de 9

meses (26). La transición de la LRA a ERC después de 9 meses se caracterizó por el desarrollo de hipertrofia renal, disfunción renal, hipertrofia glomerular, glomeruloesclerosis, atrofia tubular y fibrosis túbulo-intersticial.

Debido a que la ERC se desarrolló después de nueve meses, resulta importante tener un modelo que sea eficiente, en cuanto a tiempo y costos, que permita estudiar los procesos involucrados en la transición a ERC inducida por un episodio de LRA en periodos de tiempo menores.

Se han establecido otros modelos más severos para lograr el desarrollo de ERC inducida por un episodio de LRA, sin embargo la mayoría resultan en eventos que generan cambios en la presión arterial o son tan severos que no permiten el estudio de los mecanismos temporales, como es el caso de la nefrectomía 5/6 o la obstrucción unilateral (28).

Por todo lo anteriormente descrito, resulta relevante conocer con exactitud los mecanismos que desencadenan la transición de LRA a ERC, así como, determinar la temporalidad de los mecanismos fisiopatológicos a lo largo de la transición, lo cual permitirá no solo entender este proceso de transición, sino también poder incidir con tratamientos efectivos en el curso temporal de la enfermedad.

HIPÓTESIS

El modelo de nefrectomía unilateral e isquemia contralateral acelerará la progresión a Enfermedad Renal Crónica, además el estudio de las alteraciones temporales implicados en la transición de la LRA a ERC, nos mostraran mecanismos clave en dicha transición.

OBJETIVO

Evaluar si el modelo de nefrectomía unilateral e isquemia contralateral acelera la progresión a Enfermedad Renal Crónica y analizar la implicación y el curso temporal de moléculas inflamatorias, profibróticas y la respuesta a hipoxia, así como, cambios epigenéticos durante este proceso.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el modelo de nefrectomía derecha e Isquemia contralateral en la rata a largo plazo.
2. Determinar si este modelo acelera la transición de la LRA a ERC.
3. Evaluar el curso temporal de la función renal y el daño estructural durante la transición de la LRA a ERC.
4. Analizar el curso temporal de moléculas inflamatorias, pro-fibróticas y la respuesta a hipoxia, así como su implicación en la transición de Lesión Renal a Enfermedad Renal Crónica.
5. Evaluar la participación de mecanismos epigenéticos en la transición.

MÉTODOS

Nefrectomía derecha e isquemia contralateral.

Se incluyeron tres grupos de ratas Wistar macho de entre 300-350g. Los animales se dividieron en tres grupos, el grupo de cirugía falsa (sham n=16), el grupo de nefrectomía derecha (UNx n=16) y el grupo con nefrectomía derecha e isquemia renal izquierda simultánea de 45 minutos en el riñón izquierdo (IR+UNx n=20). El protocolo experimental se muestra en la Figura 6. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg) y se mantuvieron en una cama termoregulada para realizar la cirugía a 37°C. Bajo anestesia se realizó una incisión abdominal para exponer los dos riñones; primero se realizó la nefrectomía del riñón derecho, disecando la grasa peri-renal, así como, separando la glándula suprarrenal del riñón con sutileza para evitar dañarla. Para el grupo con IR+UNx, además de la nefrectomía se colocó un clip en el riñón izquierdo durante 45 minutos, con la finalidad de provocar el proceso isquémico y la reperusión se logró al retirar el clip, usando la recuperación de la coloración del riñón, como indicador. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, con ciclos 12-12h de luz-oscuridad y acceso libre a comida y agua.

Los animales se sacrificaron y estudiaron a las 24 horas, 1, 2, 3 ó 4 meses dependiendo del grupo.

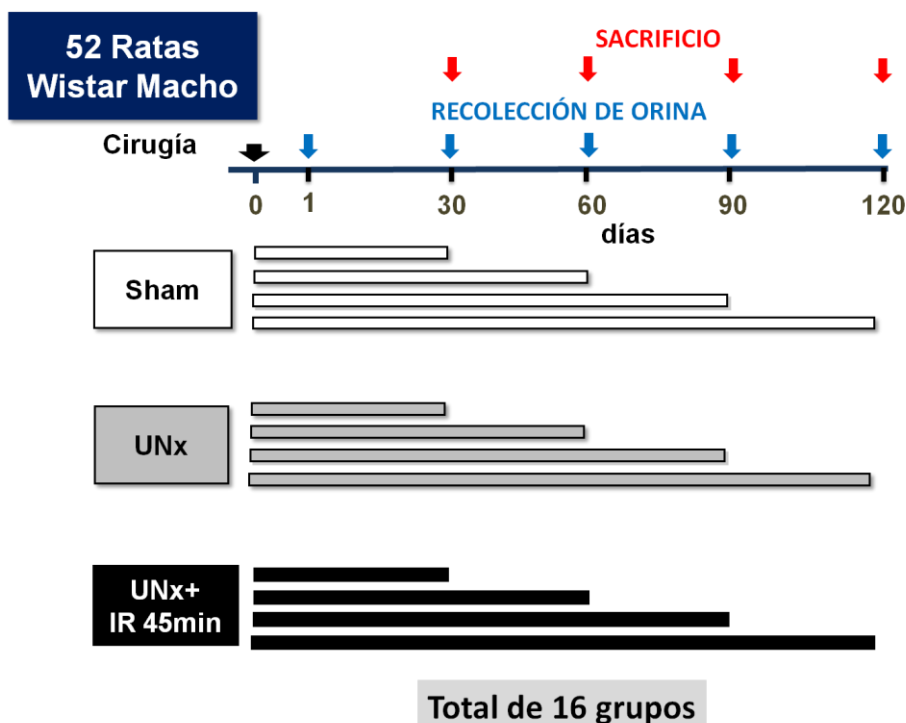


Figura 6. Modelo experimental. Las flechas superiores indican los tiempos en donde se realizaron las recolecciones, y las flechas inferiores indican los tiempos en que se realizó la eutanasia. Sham, n=16; UNx, n=16, IR+UNx n=20

Medición de parámetros fisiológicos

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas cada mes, para recolectar la orina durante 24 horas para determinar el volumen urinario, la excreción urinaria de proteínas y la depuración de creatinina, para la cual también se recolectó una muestra de sangre de forma mensual. Para la determinación de creatinina sérica y urinaria se utilizó el método colorimétrico de ácido pícrico y se cuantificó a 510 nm en espectrofotómetro. Para calcular la depuración de creatinina se utilizó la fórmula de $C = (U \cdot V) / S$, en

donde U es la creatinina urinaria multiplicada por el volumen urinario, y S corresponde a la creatinina sérica. La excreción urinaria de proteínas se determinó por el método turbidimétrico de ácido tricloroacético (TCA) y cuantificado a 420 nm en espectrofotómetro.

Para los estudios fisiológicos, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (30 mg/kg), se colocaron en cama de termo regulación, la tráquea se entubó con un tubo de polietileno PE-240 y se cateterizaron las arterias femorales con un tubo de polietileno PE-90 y se realizó la medición de la presión arterial media por uno de los catéteres colocado en la arteria femoral, usando un transductor de presión (Modelo p23 db, Gould. Puerto Rico). Posteriormente se realizó una incisión abdominal para exponer el riñón izquierdo en donde se separó la arteria renal, después se colocó una sonda de ultrasonido (1RB, Transonic, Ithaca, NY) para determinar el flujo sanguíneo renal.

Histopatología y Análisis Morfométrico

Después de las mediciones hemodinámicas, el riñón derecho se ligó con sutura y se retiró para separar médula y corteza renal, enseguida se congeló a -70°C para posterior análisis molecular, en el caso de los animales controles y en el caso de los animales

uninefrectomizados, se escindió el polo superior y el inferior. Después, el riñón izquierdo se perfundió a través del catéter de la arteria femoral con 20 ml de solución salina, y después se fijó con 20 ml de formaldehído al 4%, siempre manteniendo la presión que tenía previamente la rata. El riñón se incluyó en parafina con el fin de realizar cortes de 4 μm de grosor. Los cortes se colocaron en laminillas y se tiñeron con ácido periódico de Schiff (PAS) o rojo de Sirio.

Se realizó el análisis ciego de las lamillas teñidas con PAS, tomando 10 microfotografías de diferentes campos de la corteza renal de cada riñón, usando una cámara Nikon incorporada al microscopio y se cuantificó el diámetro glomerular en al menos 40 glomérulos por animal. También se usaron estas microfotografías para determinar los anchos tubulares. En las laminillas teñidas con rojo de Sirio se capturaron cinco campos subcorticales del riñón para cuantificar la fibrosis túbulo-intersticial usando un software Eclipse Net de morfometría, se consideró fibrosis las zonas con deposición de colágeno que se tiñen de rojo.

Determinación de parámetros bioquímicos

-Peróxidos de Hidrógeno

En la orina recolectada durante el tiempo de seguimiento que se mantuvo a -70°C se realizó la determinación de peróxidos de hidrógeno de orina como marcador de estrés oxidante, se utilizó el kit comercial Amplex Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Assay (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación se basa en la presencia de peroxidasa que al reaccionar con el peróxido de hidrógeno, produce un compuesto rojo-fluorescente, que se cuantificó en espectrofotómetro a 560 nm y se extrapoló con una curva estándar. Se utilizaron 50 μL de muestra que se incubaron en buffer del kit durante 30 min a temperatura ambiente.

Extracción de RNA y PCR Tiempo Real para TGF- β , HIF-1 α , VEGF, IL-6, IL-10, TNF- α

Para la extracción de RNA se utilizó el tejido previamente almacenado a -70°C y usando un homogeneizador y el reactivo TRIzol (Invitrogen). Con el fin de conocer la calidad y concentración de RNA se realizó una medición por espectrofotometría de UV (280/260nm) y se analizó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para realizar la transcripción reversa (TR) se utilizó 1 μg de RNA total de tejido. Se calentó el RNA a 65°C durante 10 min, se utilizó 200 U de transcriptasa reversa (MMLV, Stratagene), 100

pmol de hexámeros al azar (Life Technologies), 0.5 mM de cada Dntp (SIGMA) y buffer 1X de TR (75mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3mM MgCl₂; 10mM DTT, pH: 8.3), se incubó durante una hora a 37°C, en un volumen final de 20 µL. Al final se calentaron las muestras durante 5 min a 95°C para inactivar a la enzima.

Para la PCR en tiempo real se utilizaron sondas TaqMan (Applied Biosystems) específicas para amplificación de DNA complementario. Se utilizaron sondas específicas para amplificar TGF-β, HIF-1α, VEGF, IL-6, IL-10, TNF-α (FAM) y 18S RNAr (VIC) como control de amplificación. FAM y VIC son colorantes fluorescentes para detectar la amplificación de productos, la cantidad liberada por la son TaqMan depende de la actividad exonucleasa de la reacción de PCR. La amplificación se detectó en un termociclador en tiempo real ABI 7000 Prism (Applied Biosystems). Se utilizó el método relativo al gen control mediante la fórmula comparativa de Ct.

Niveles de Hsp72 en orina

Se utilizó 1 µl de orina para someterlos a electroforesis en un gel de acrilamida al 8.5% desnaturizante con SDS. Las muestras se prepararon con buffer de carga en relación 1:1 con un volumen final de 20 µL. Después se transfirieron a membranas de difloruro

de polivinilo (PVDF, Millipore) previamente equilibrada con buffer de transferencia 1x (190mM glicina, 2Mm Tris base, SDS 0.1%) en un transblot (SD cell, BioRad) durante 60 minutos a 9 volts. Posteriormente se bloqueó 90 min con TBS buffer con 5% de agente bloqueante (BioRad) y al terminar el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario HSP72 (1:5000) ENZO durante toda la noche a 4°C. Al terminar la incubación se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-1x Tween, para después incubar con el anticuerpo secundario acoplado a HRP, anti ratón IgG (1:5000) Santa Cruz.

Extracción de DNA y cuantificación de metilación global de DNA.

Para la extracción del DNA, se utilizaron 50 mg de tejido y se homogenizaron con 200µL de PBS 1X (10 mM PO₄, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl), se agregó 60 µL de buffer de digestión, para después agregar 26 µL de proteinasa K (SIGMA, 10 mg/mL) y se mantuvo en hielo por 5 min. Posteriormente, la mezcla se dejó toda la noche a 56°C, después las muestras se trataron con 3 µL de RNAasa A (10 mg/mL) y se incubaron durante 3 h a 37°C. Al final se agregaron 250 µL de fenol-cloroformo-isoamil alcohol, se centrifugaron por 20 minutos a 4°C a 14,000rpm. Se tomó solo la

fase superior, se agregó 83 μL de acetato de amonio (7.5M) y 250 μL de etanol absoluto. Las muestras se incubaron a -20°C durante toda la noche, se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. Se hicieron dos lavados con 250 μL de etanol 70%. El pellet se re-suspendió en 200 μL de agua libre de DNAasas. Finalmente, se hizo una medición por espectrofotometría de UV (280/260nm) para determinar la pureza y la concentración del DNA y se analizó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para analizar la metilación global de DNA se utilizó el estuche comercial de metilación de DNA 5-mC (Zymo Research), se usaron 100 ng de DNA de cada muestra y se llevó a un volumen de 100 μl con 5-mC de Coating Buffer, se incubó a 98°C por 5 minutos y después se dejó en hielo durante 10 min. Se agregaron a la placa y se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente se desechó el excedente y se lavó con 200 μl de 5-mC Elisa Buffer. Se añadieron 200 μl de 5-mC Elisa Buffer a cada pozo, y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se agregó una mezcla de anticuerpo primario anti 5-metil citosina (dilución 1:2,000) y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a HRP (diución 1:1,1000). Para finalizar se agregó 100 μl de HRP Developer a cada pozo, se incubó 1 hora y se midió en espectrómetro a 405-450nm. Los resultados se extrapolaron con

una curva estándar y se hizo la corrección por el porcentaje de islas de citocinas y guaninas (CpGs), que se han reportado previamente están presentes en el genoma de la rata.

RESULTADOS

El modelo de nefrectomía más isquemia promueve LRA.

Como se mencionó en la introducción diversos estudios han demostrado que sufrir un episodio de LRA es una causa que predispone a la generación de ERC. En nuestro laboratorio se han utilizado modelos animales que han permitido conocer algunos de los mecanismos que se encienden durante la transición a ERC, sin embargo, los modelos que se tienen hasta el momento son de periodos de seguimiento muy largos, en el caso de la rata se requieren 9 meses, lo que convierte el estudio de los mecanismos de la transición a ERC con un seguimiento muy prolongado, así como ineficiente para la búsqueda de moléculas terapéuticas. Por ello evaluamos la inducción de un modelo de LRA capaz de acelerar la transición a ERC. Para esto utilizamos el modelo de nefrectomía unilateral acompañada por un episodio de isquemia contralateral de 45 min, además de incluir a dos grupos más que sirvieron de controles: ratas operadas en forma falsa y ratas con uninefrectomía derecha.

Primero evaluamos la LRA inducida por isquemia/reperfusión, para lo cual, todos los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de la orina 24 h después de la cirugía.

Encontramos que todos los animales con IR+UNx asignados a diferentes periodos (1, 2, 3 ó 4 meses) de estudio presentaron una elevación significativa en los niveles de proteína en la orina (Figura 7A), así como una disminución significativa en la función renal, evidenciada por la disminución de la depuración de creatinina y el aumento de la creatinina sérica, como se muestran en las Figuras 7B y 7C; estas alteraciones no se observaron en el grupo Sham ni en el grupo sometido a uninefrectomía derecha.

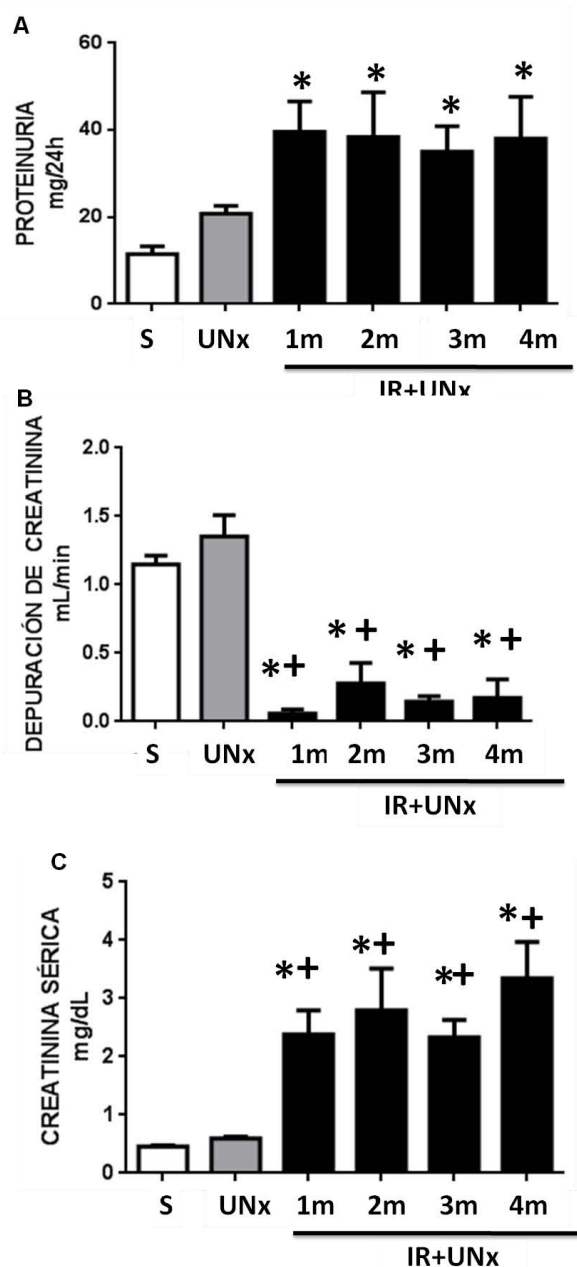


Figura 7. Inducción de LRA. Se muestran los parámetros a las 24 horas después de la cirugía. Para los grupos Sham (S) y Uninefrectomía (UNx) se muestran los promedios, y para el grupo de Nefrectomía+Isquemia (IR+UNx) se muestran los 4 grupos de los posteriores meses (m) de progresión señalados, demostrando la misma severidad de daño. S, n=16 (blanco), UNx, n=16 (gris) y grupos de IR+UNx, n=5 (negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

También analizamos los niveles de proteína en la orina del biomarcador Hsp72, debido a que este biomarcador fue previamente descrito por nuestro grupo como un biomarcador sensible para la detección oportuna y severidad de la LRA. Encontramos que todos los grupos de IR+Nx tuvieron un aumento significativo y similar de Hsp72 en la orina. Esto no se observó en ninguno de los grupos control (Figura 8A). También evaluamos los niveles de peróxido de hidrógeno en orina en los diferentes grupos 24 h post-isquemia. Encontramos que los animales con IR+Nx presentaron un aumento significativo en los niveles de peróxido de hidrógeno en la orina, comparado con los grupos controles y el aumento fue similar en todos los grupos sometidos a isquemia bilateral de 45 min (Figura 8B).

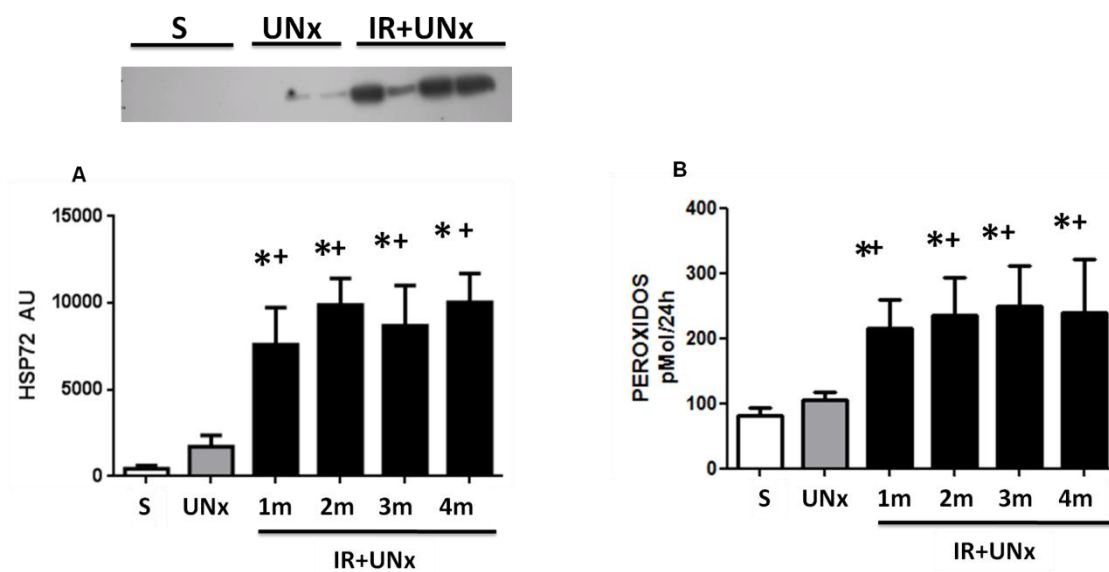


Figura 8. Misma severidad del LRA. A) Biomarcador del daño renal (HSP72) y B) generación de estrés oxidante. S= Sham, n=16 (blanco), UNx, n=16 (gris) y grupos de IR+UNx, n=5 (negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

Por lo tanto, el aumento en la proteinuria, en el estrés oxidante y en la cantidad de Hsp72 en la orina, así como, la reducción de la función renal de la misma magnitud en todos los grupos sometidos a isquemia indican que todas las ratas presentaron el mismo grado de severidad de LRA; esto era importante de demostrar con el fin de asegurar que los cambios observados a largo plazo habían sido dependientes del mismo insulto inicial y al tiempo de progresión y no por diferencias en la severidad del daño ocasionado inicialmente.

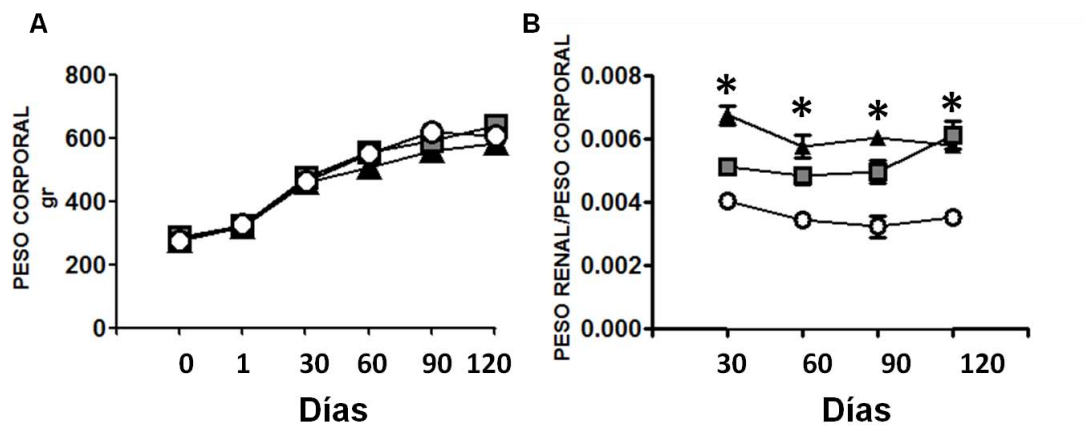


Figura 9. Evolución del peso corporal y renal. A) Ganancia normal del peso corporal. B) Hipertrofia renal de los grupos con UNx e IR+UNx. Sham, n=4 (círculo blanco), UNx, n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx, n=5 (triángulo negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

El modelo de nefrectomía más isquemia aceleró la transición a ERC

Los animales se estudiaron y sacrificaron 1, 2, 3 y 4 meses después de la cirugía. Se registró el peso de forma mensual y encontramos que durante todo el seguimiento los animales

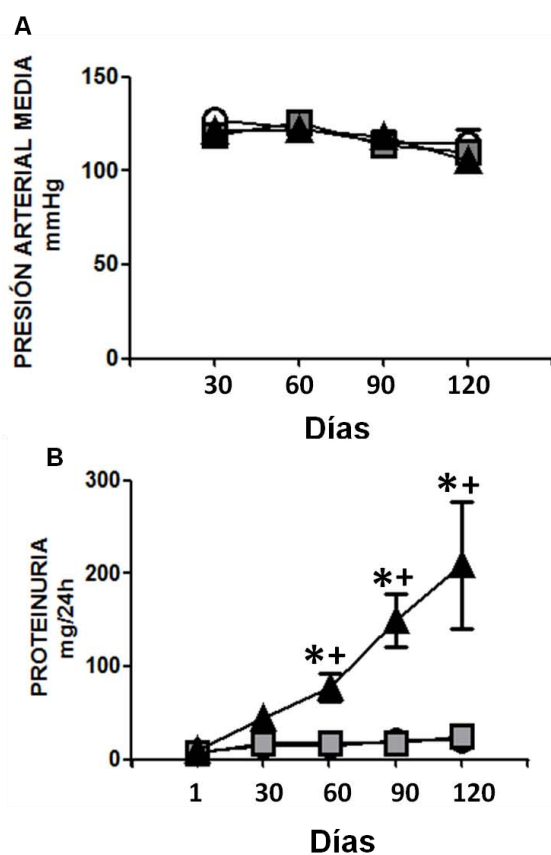


Figura 10. Evaluación de parámetros fisiológicos al seguimiento. A) Presión arterial media similar entre grupos. B) Proteinuria de los animales en seguimiento. Sham, n=4 (círculo blanco), UNx n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx n=5 (triángulo negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

crecieron de la forma esperada y no existieron diferencias entre los tres grupos (Figura 9A). De manera interesante encontramos que los grupos UNx e IR+UNx presentaron un aumento significativo del peso renal (Figura 9B) desde el primer mes con respecto al grupo

Sham, lo cual deja de manifiesto que el riñón tuvo que hipertrofiarse para compensar la falta de la funcionalidad del otro riñón.

Al finalizar los periodos experimentales que fueron de un mes y hasta 4 meses después, encontramos que todos los animales eran normotensos (Figura 10A), lo que demuestra que los cambios observados en la función y estructura renal están mediados por el proceso de isquemia y no por un aumento en la presión arterial.

Observamos que el grupo IR+UNx, presentó un aumento progresivo de la proteinuria desde el segundo mes de seguimiento (Figura 10B). Así mismo, observamos que nuestro modelo fue capaz de acelerar la transición, ya que los valores de proteinuria encontrados al cuarto mes, fueron similares a los valores obtenidos al noveno mes en el modelo de isquemia-reperfusión bilateral (25).

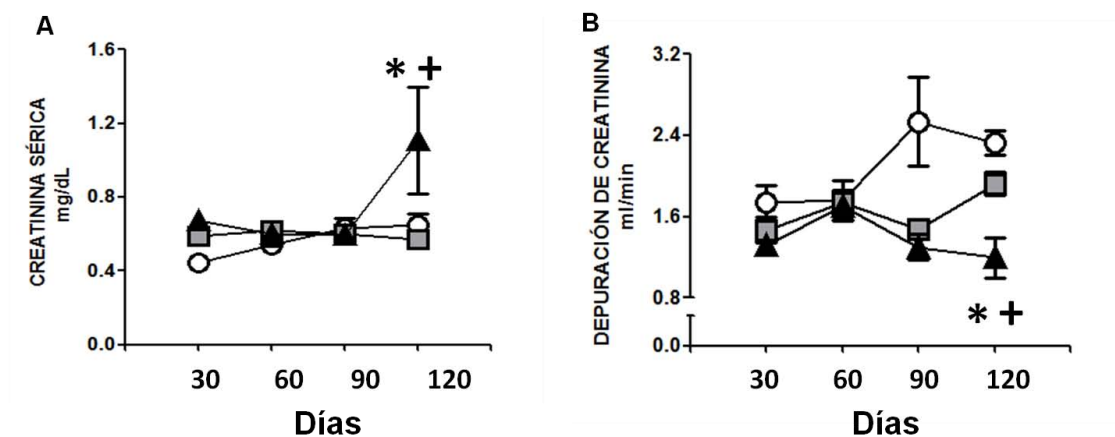


Figura 11. Caída de la función renal. A) Aumento de la creatinina sérica. B) Caída de la depuración de creatinina. Sham, n=4 (círculo blanco), UNx, n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx, n=5 (triángulo negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

Aunado a la proteinuria, encontramos que a los 4 meses de seguimiento, el grupo sometido a un episodio de LRA presentó una elevación de la creatinina sérica (Figura 11A), lo que reflejó la disfunción renal y por lo tanto la disminución significativa de la depuración de creatinina (Figura 11B).

Aumento del estrés oxidante e hipoxia crónica.

Con el fin de caracterizar el curso temporal y la significancia del estrés oxidante en promover la transición a ERC, evaluamos el curso temporal del peróxido de hidrógeno en las muestras de orinas en diferentes periodos de la evolución a ERC, que es un indicador de la generación de especies reactivas de oxígeno.

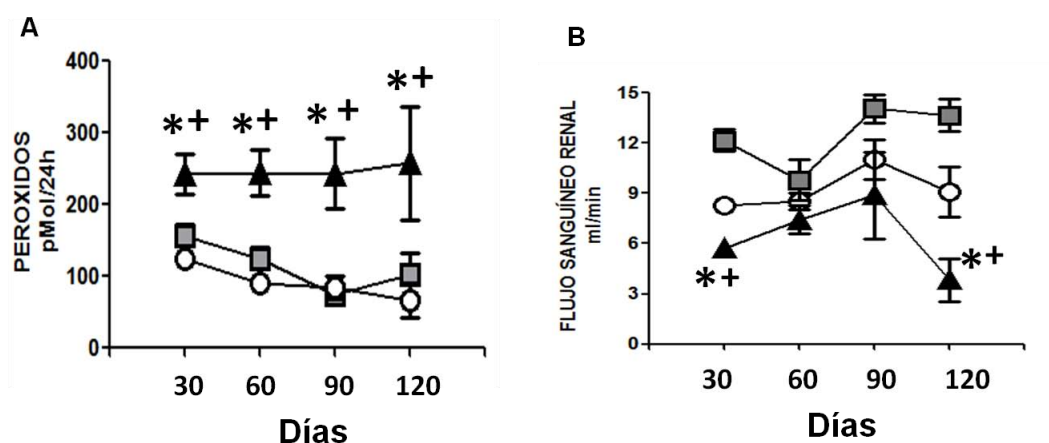


Figura 12. Procesos de estrés oxidante e hipoxia crónica. A) Aumento de las especies reactivas de oxígeno en orina. B) Disminución del flujo sanguíneo renal en el grupo con isquemia. Sham, n=4 (círculo blanco), UNx, n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx n=5 (triángulo negro). Promedio ± ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

Como se muestra en la Figura 12A, encontramos que en todos los animales que sufrieron un episodio de LRA presentaron

un aumento significativo en los niveles de peróxido de hidrógeno en la orina y que el incremento en el estrés oxidante se evidenció desde una etapa muy temprana, un mes post-isquemia y permaneció elevado durante todo el seguimiento del estudio, es decir, el estrés oxidante jugó un papel preponderante desde el inicio de la transición de la LRA a ERC, diferencia que no se observó en los grupos controles.

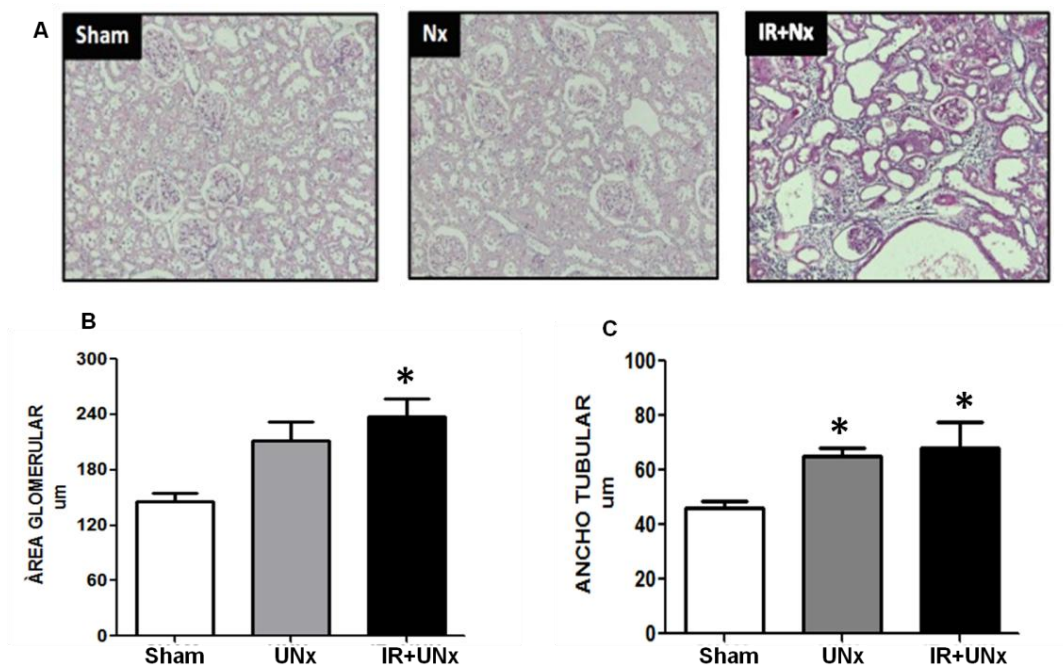


Figura 13. Cambios histológicos en la transición a ERC. A) Microfotografías representativas de cada grupo. B) Aumento del área glomerular. C) Aumento del ancho tubular renal. Sham, n=4 (blanco), UNx, n=4 (gris) y IR+UNx, n=5 (negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

Además, encontramos que los animales con isquemia, tuvieron una reducción del flujo sanguíneo renal, es decir, estos animales tuvieron procesos de hipoxia crónica (Figura 12B). En cambio, los animales con uninefrectomía, presentaron una

hiperperfusión renal; este dato tiene sentido si consideramos que estos animales deben suplir la falta de un riñón, aumentando la función del riñón remanente.

Cambios histopatológicos en la transición de la LRA a ERC

Como mencionamos previamente, la un nefrectomía provocó una hipertrofia compensatoria; sin embargo, la adición de un episodio de LRA resultó en una mayor hipertrofia glomerular al cuarto mes, como lo muestra el aumento significativo de el área glomerular en este grupo y que se evidencia en la Figura 13B. La hipertrofia renal también se evidenció por el aumento significativo del tamaño de los túbulos corticales, como se aprecia en la Figura 13C. Estos cambios se vieron acompañados por la generación de cilindros e infiltración de células del sistema inmune, como se muestra en las microfotografías representativas (Figura 13A).

Además de los cambios estructurales, también encontramos que el grupo con IR+UNx presentaba fibrosis túbulo-intersticial, que se muestra en la Figura 14. Todas estas alteraciones no se encontraron en los animales control.

Respuesta ineficiente a hipoxia en la transición a ERC

Para investigar el papel de la respuesta a hipoxia, que se conoce juega un papel importante durante el proceso de isquemia,

así como en el desarrollo de ERC, analizamos el RNAm de el Factor Inducible por Hipoxia 1alfa (*HIF-1α*) y uno de sus genes blanco, el factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*, por sus siglas en inglés).

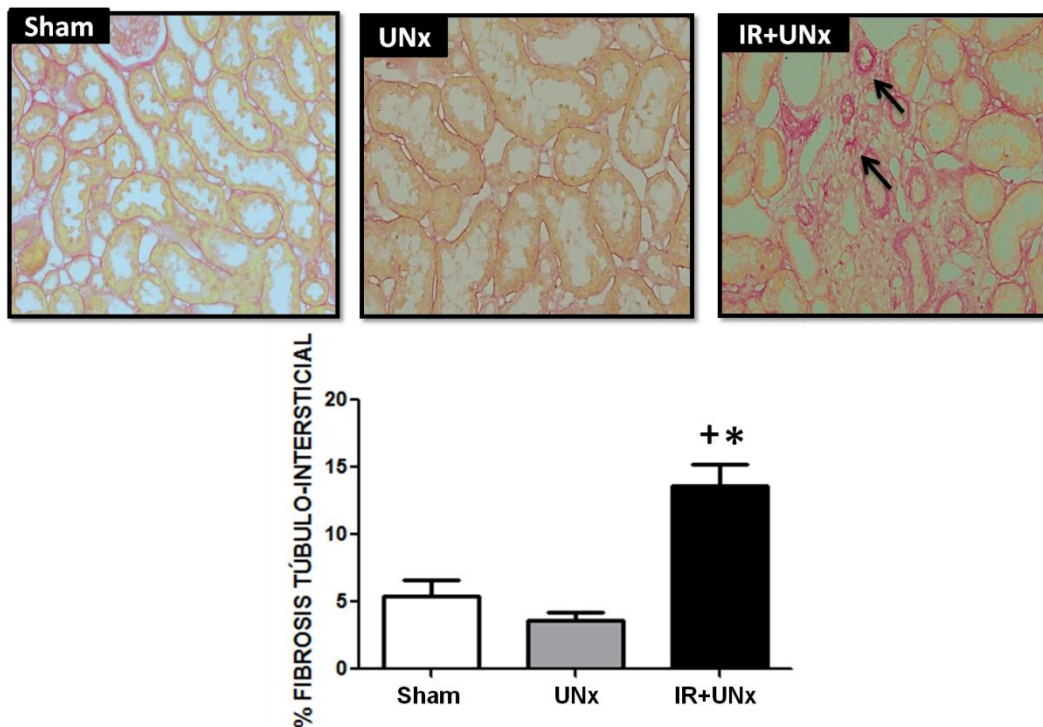


Figura 14. Desarrollo de fibrosis en la transición a ERC. Tinción de rojo de sirio. Las flechas señalan la fibrosis túbulo-intersticial. Sham, n=4 (blanco), UNx, n=4 (gris) y IR+UNx, n=5 (negro). Promedio ± ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

Encontramos que existió una respuesta ineficiente a la hipoxia, ya que hubo una disminución en los niveles de ambos mensajeros en los dos primeros meses después de la IR+UNx (Figura 15A y 15B). De manera interesante encontramos un panorama similar en el grupo UNx, aunque creemos que esto se debe a la hiperperfusión renal encontrada en este grupo (Figura 12B), ya que esperaríamos que existan niveles de oxígeno elevados

y que esto inhiba la expresión de HIF-1 α . Sin embargo queda pendiente evaluar que ocurre a largo plazo en este grupo en particular.

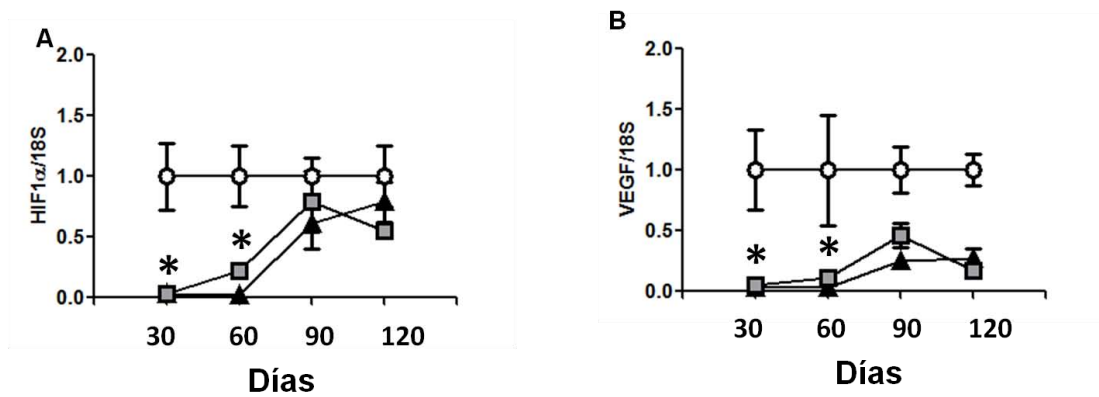


Figura 15. Respuesta ineficiente a hipoxia en la transición a ERC. A) Reducción de HIF-1 α (Factor inducible por hipoxia). B) VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular) Sham, n=3 (círculo blanco), UNx, n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx n=5 (triángulo negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

También analizamos los niveles de RNAm del factor de crecimiento transformante (TGF- β , por sus siglas en inglés), y a los 4 meses se encontró un aumento significativo de este RNAm en los animales con IR+UNx (Figura 16A). Este hallazgo es concordante con la aparición de fibrosis túbulo-intersticial en este grupo (Figura 14).

Para analizar el papel de vías de inflamación, medimos los niveles de RNAm de interleucina 6 (*IL-6*), una citocina proinflamatoria, que se ha demostrado involucrada en el proceso de LRA y en la transición a ERC (15, 25), así como los niveles de Interleucina 10 (*IL-10*), una citocina antiinflamatoria. Encontramos

que los niveles de mensajero de *IL-6* se encontraban aumentados de forma significativa a los 4 meses (Figura 16B), lo que nos habla

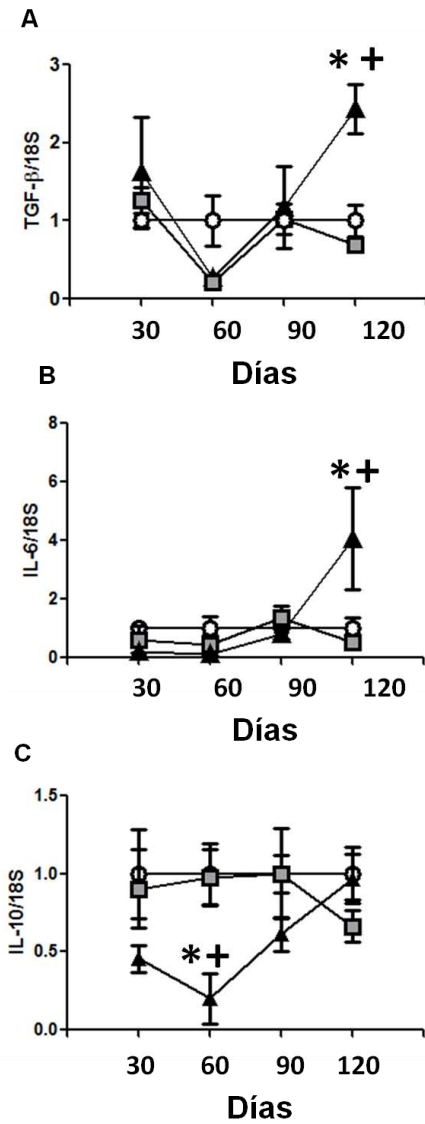


Figura 16. Vías profibróticas e inflamatorias promovieron la transición a ERC. A) TGF-β (Factor de crecimiento transformante), B) IL-6 (Interleucina-6), C) IL-10 (Interleucina-10). Sham, n=3 (círculo blanco), UNx, n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx, n=5 (triángulo negro). Promedio ± ES. ANOVA p<0.05 * vs Sham; + vs UNx.

de la inflamación crónica que se presenta en el desarrollo de ERC.

Por otro lado los niveles de *IL-10* se encontraban disminuidos desde el primer mes, haciéndose significativos al segundo mes; pero que volvieron a niveles normales para el tercer y cuarto mes (Figura 16C). Estos cambios solo se observaron en el grupo con IR+UNx y no estuvieron presentes en ninguno de los grupos control.

Cambios en la metilación global de DNA responsables de la transición a ERC.

Por último, en la búsqueda de los mecanismos que se encendieron de forma temprana y que pudieran ser los

responsables de la transición a ERC, analizamos los niveles de metilación global del DNA. Encontramos que existió un proceso importante de hipometilación en los animales con LRA, que comenzó desde el primer mes y se mantuvo a lo largo del seguimiento (Figura 17A). Estos cambios se vieron en corteza renal, mientras que en médula renal no se observaron diferencias (Figura 17B). Observamos también que, en general, la médula presenta niveles más bajos de metilación en comparación con los niveles encontrados en la corteza renal.

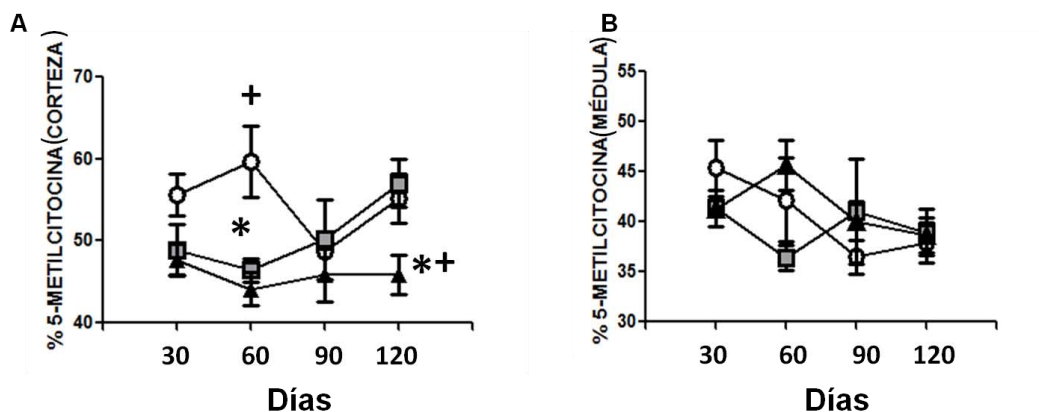


Figura 17. Hipometilación global del DNA. A) Disminución en la metilación del DNA en la corteza renal. B) No se observaron cambios en la metilación en médula renal. Sham, n=4 (círculo blanco), UNx, n=4 (cuadrado gris) y IR+UNx, n=5 (triángulo negro). Promedio \pm ES. ANOVA $p < 0.05$ * vs Sham; + vs UNx.

DISCUSIÓN

La LRA es un problema de salud pública, que acaba con la vida de millones de personas cada año y que a pesar de los avances en la medicina moderna, no ha disminuido su frecuencia en las últimas décadas. Además, recientemente se evidenció que la LRA es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la ERC. Particularmente en México, las estadísticas de padecimientos renales son alarmantes y de acuerdo con datos de la Federación Mexicana de Enfermos y Trasplantados Renales A. C., aproximadamente 12 millones de personas padecen ERC, 160 mil se encuentran en fases avanzadas de la enfermedad y lamentablemente, solo cerca de 7% recibe tratamiento por parte de alguna dependencia pública del sector salud (29).

Es por ello que resulta imperativa la búsqueda de los mecanismos involucrados en la transición de LRA a ERC, con la finalidad de conocer cuáles son los puntos clave en donde se puede contar con blancos terapéuticos para prevenir dicha transición. De este hecho surge la importancia de contar con modelos experimentales que resulten eficientes para el estudio de todas estas alteraciones.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que un episodio de LRA inducido por isquemia/reperfusión bilateral en roedores genera el desarrollo progresivo de ERC (25, 26) sin embargo, como se mencionó anteriormente, para lograr la progresión a ERC se requiere un período de seguimiento de 9 meses, lo que se convierte en un modelo poco eficiente y con la generación de mayor costo. Es por esta razón que el presente trabajo abordó la caracterización de un modelo de LRA que fuese capaz de acelerar la transición a ERC.

En este estudio encontramos que un episodio de I/R acompañado por una nefrectomía unilateral, indujo LRA, caracterizada por la elevación de proteinuria, caída de la función renal, daño del epitelio tubular y la generación de estrés oxidante después de 24 h. De acuerdo a nuestra hipótesis inicial, éste modelo fue capaz de acelerar el desarrollo de ERC, ya que a los cuatro meses estos animales ya presentaban un aumento progresivo de la proteinuria y una caída significativa de la función renal, hallazgos que en el modelo de IR bilateral requirieron 9 meses de seguimiento (25).

Se conoce que uno de los mecanismos iniciadores de la disfunción renal, es la hipo-perfusión renal (12, 15), en este trabajo

encontramos que los animales que sufrieron el episodio de LRA presentaron hipo-perfusión sostenida, ya que a pesar que en otros modelos el flujo sanguíneo renal se restablece en el primer mes de seguimiento (25, 26, 27), en este modelo hubo una disminución del flujo que se presentó desde el primer mes, y se potenció este efecto aún más al cuarto mes. Además, encontramos que estos animales, tenían un proceso de estrés oxidante activo, ya que al evaluar la generación de peróxido de hidrógeno en orina, este se encontró elevado desde el primer mes y se mantuvo durante todo el seguimiento.

Al encontrar que había un proceso de hipoperfusión y por lo tanto de hipoxia crónica, decidimos analizar la respuesta a hipoxia mediada por HIF-1 α y su gen blanco VEGF. En coincidencia con otros reportes en la literatura (17), encontramos que existía una respuesta ineficiente de HIF-1 α , y su gen blanco, ya que los niveles de RNAm se encontraban disminuidos en el primero y segundo mes de seguimiento. Esto fue de llamar la atención ya que trabajos recientes (11, 15) han reportado que la respuesta tardía de este factor pudiera estar relacionada con la activación de procesos inflamatorios y la generación de fibrosis. Por otro lado se ha visto que la disminución de VEGF es la responsable de la rarefacción vascular (15), que promueve a la hipoxia crónica. En este escrito

también detectamos que la reducción de Hif1 α impactó en su gen blanco VEGF, lo cual puede en parte encender una respuesta de daño temprano sobre la vasculatura renal.

Aunado a los cambios antes mencionados encontramos que la activación de moléculas pro-inflamatorias, como la interleucina 6, se presentó al cuarto mes de seguimiento y esto se asoció con las alteraciones estructurales encontradas en este periodo de tiempo, en donde se encontró una gran cantidad de infiltración de células inflamatorias, fibrosis túbulo-intersticial, dilatación tubular y un aumento significativo de los diámetros glomerulares. La fibrosis túbulo-intersticial observada en los riñones del grupo de IR+Nx se asoció además, con un aumento del RNAm del factor pro-fibrótico TGF- β .

Para determinar si existía una alteración en las modificaciones epigenéticas, que cada vez están tomando más relevancia en la patología renal, como primer acercamiento evaluamos la temporalidad de los cambios en la metilación global de DNA. Encontramos que el grupo IR+Nx presentó una disminución significativa de los niveles de metilación del DNA en la corteza renal, misma que se mantuvo a lo largo del seguimiento. Un hecho interesante fue que los cambios sólo se observaron en corteza, que

es donde se presentó la mayor cantidad de alteraciones fisiológicas e histológicas, mientras que para el caso de la médula renal no se encontraron cambios. Creemos que estos cambios en la metilación son los responsables de la expresión diferencial que ocurrió en este grupo y que podrían estar acompañados por otras modificaciones epigenéticas, pudiendo ser una pieza clave en la transición a ERC.

En este estudio mostramos que la nefrectomía más un proceso de isquemia/reperfusión aceleró la transición de la LRA a ERC comparado con el modelo de isquemia bilateral renal. Por lo que consideramos que podría ser un excelente modelo para la búsqueda de blancos terapéuticos para la prevención del desarrollo inducido por un episodio de LRA. La ERC se caracterizó por alteraciones funcionales y estructurales características de esta enfermedad como lo fue: el aumento progresivo de la proteinuria, la caída del FSR, la disminución de la depuración de creatinina, el desarrollo de hipertrofia renal y fibrosis túbulo-intersticial.

El estudio del curso temporal de algunas vías de daño renal, nos permitió elucidar que el estrés oxidante, la menor señalización de Hif1 α y la disminución de la metilación global en corteza renal toman lugar desde una etapa incipiente de la ERC.

Estos resultados abren una nueva línea de investigación en donde definir la significancia de la hipometilación del DNA y el uso de antioxidantes y de inductores de HIF1 α podrían tener una gran relevancia para evitar o reducir la progresión de la ERC inducida por un insulto isquémico.

BIBLIOGRAFIA

1. Boron Walter F. *Medical Physiology*, 2nd Ed. Edinburgh, Scotland, Elsevier Saunders, 2015
2. Hall JE, Guyton AC: *Tratado de Fisiología Médica*, 12va Ed. Edinburgh, Scotland, Elsevier Saunders, 2011.
3. Lewington, et al. (2013). Raising Awareness of Acute Kidney Injury: A Global Perspective of a Silent Killer, 84(3), 457–467.
4. Kelly KJ. et al. (2006). Acute renal failure: much more than a kidney disease. *Semin Nephrol*; 26: 105–113.
5. Zuk, A., & Bonventre, J. V. (2016). Acute Kidney Injury. *The Annual Review of Medicine*. 67:293–307
6. Eltzschig H. et al. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*. 7(11), 1391-1401.
7. Bonventre, J. V, & Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4210–21.
8. Wasung M. et al (2015) Biomarkers of renal function, which and when? *Clinical Chemical Acta*. 438(1): 350-357.
9. Barrera-Chimal J. et al (2011). Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Molecular Medicine*. 3: 5-20.

10. Chawla, L. S., et al (2011). The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney International*, 79(12), 1361–9.
11. Chawla, L. S., et al. (2014). Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *New England Journal of Medicine*, 371(1), 58–66.
12. Heung M. et al. (2012). Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 21(6): 628-634.
13. Sesso, R. (1996) Late diagnosis of chronic renal failure and mortality on maintenance dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 11(12), 2417-2420.
14. Lozano, R., et al (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2095–2128
15. Ferenbach, D. A., & Bonventre, J. V. (2015). Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nature Reviews. Nephrology*, 11(5), 264–276.
16. Grgic, I. et al. (2012) Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 82, 172–183.

17. Basu RK. et al. (2011) Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F898-F905.
18. Conger, J. D., et al. (1991) Differences in vascular reactivity in models of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 39, 1087–1097.
19. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, et al. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med.* 2010;16:535–543.
20. de Borst, M. H. et al. (2009) C-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331, 896–905.
21. Bechtel W, et al. (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med.* 16(5):544–550.
22. Tang, C., & Dong, Z. (2015). Epigenetic regulation in acute kidney injury: new light in a dark area. *Kidney International*, 88(4), 665–668.
23. Salant, D. J., Müller, C. A., Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2010). Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney, *16(5)*, 544–550.
24. Rodríguez-Romo, et al. (2015). Epigenetic regulation in the acute kidney injury (AKI) to chronic kidney disease transition (CKD). *Nephrology (Carlton)*, 20, 736–743.

25. Reddy, M.A., & Natarajan, R. (2015). Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int*, 1–12.
26. Barrera-Chimal, J., et al. (2012). Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney International*, 93–103.
27. Rodríguez-Romo, R., et al (2015). AT1 receptor antagonism before ischemia prevents the transition of acute kidney injury to chronic kidney disease. *Kidney International*, 1–11.
28. Yang, H.-C., et al (2010). Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models*, 7(1-2), 13–19.
29. INEGI, Estadísticas de Mortalidad, 2013.