

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“ PARTICIPACIÓN DE LA ALDOSTERONA EN LA PROGRESIÓN
DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA ”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS
presenta

Dra. Silvia Palomo Piñón

Tutor:

Dr. José Ramón Paniagua Sierra

México, D. F.

Enero 2005

m.340009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Autores:

Dra. Silvia Palomo Piñón.

Dr. José Ramón Paniagua Sierra.

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, IMSS.

Colaboradores:

Dra. Ma. Del Carmen Ávila Casado *

Dra. Ma. Virgilia Soto Abraham*

Biol. María Del Carmen Prado Uribe**

Biol. Armando Medina Cruz ***

*Departamento de Patología Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

**Unidad de Investigación en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS

*** Laboratorio de Inmunohistoquímica. Hospital General de México

Servicio:

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas

Sede: Centro Médico Nacional Siglo XXI

Registro : 087/2001

INDICE

ANTECEDENTES.....	4
JUSTIFICACION.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
OBJETIVO.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	17
DESCRIPCION DE LAS VARIABLES.....	20
CONSIDERACIONES ETICAS.....	23
ANALISIS ESTADISTICO.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	36
REFERENCIAS.....	40
ANEXOS.....	47

L- ANTECEDENTES CIENTIFICOS:

El desarrollo y la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) están condicionados por interacciones complejas de diversos mediadores que por lo general se presentan simultáneamente y favorecen el desarrollo de esclerosis glomerular (1-10).

La ERC se define como la presencia de daño renal ó disminución de la tasa de filtración glomerular por debajo de 60 ml/minuto/1.73 m² SC por un período igual o mayor a tres meses. A su vez, el daño renal se define como anomalías en los exámenes de sangre, orina o estudios de imagen del riñón. Las causas son heterogéneas y el objetivo principal del tratamiento es disminuir la progresión de la enfermedad (1-11).

Desde 1952 Robert Platt informó que la pérdida de nefronas funcionales provoca hipertrofia de las nefronas remanentes (12-14). Los diversos estudios en modelos animales permiten entender los factores que favorecen la progresión. Se define como progresión a la velocidad con la que se presenta la esclerosis. Esta progresión parece ser independiente de la agresión inicial al parénquima renal. Es el acontecimiento final de una serie de alteraciones patológicas comunes, en donde las alteraciones en la presión y permeabilidad del capilar glomerular, el paso de proteínas y su reabsorción en el túbulo proximal provocan daño glomerular y tubulointersticial. Este daño está regulado por la activación de mecanismos dentro de la célula, por la sobreexpresión de genes que codifican mediadores inflamatorios y vasoactivos, por la producción de citocinas y de factores de crecimiento polipeptídicos, que hacen que la lesión inicial sea inexorablemente progresiva hasta la falla renal terminal sin importar cuán remota y severa haya sido aquella (11, 15, 16). Esto es, la hipertensión del capilar glomerular, la hiperfiltración compensatoria, el aumento en el metabolismo tubular y la hipertrofia de las nefronas remanentes son los factores fisiopatológicos que favorecen la progresión del daño renal (1-11, 16).

Estos mediadores del daño que participan en la progresión después que se produce la lesión inicial se clasifican en tres grandes grupos:

- 1.- los que modifican la hemodinámica glomerular normal
- 2.- los que compensan el daño glomerular

3.- los que se relacionan con la acción de los factores de crecimiento y citocinas (1-3).

La proteinuria es el resultado de la hipertensión del capilar glomerular y el daño en la permeabilidad del glomérulo. Las proteínas que atraviesan el glomérulo son captadas por las células tubulares proximales por endocitosis. Esto causa una sobrecarga de proteínas dentro del túbulo proximal, lo que activa a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) dentro del riñón así como a factores de transcripción para la producción anormal de citocinas como endotelina 1 (ET1), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MPC-1) y RANTES. Así mismo, hay una traslocación directa de algunos factores de crecimiento directamente del plasma hacia el líquido tubular, como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β -1) y factor de crecimiento de los hepatocitos, entre otros. Debido a este proceso fisiopatológico que se repite en varios modelos de enfermedad renal experimental y humana, la proteinuria es un fuerte predictor clínico de la progresión de la ERC independientemente de su causa. La rapidez con la que el filtrado glomerular declina es proporcional a la cuantía de la proteinuria (6, 15, 17)

Al producirse cambios anatómicos de las paredes del capilar glomerular, se modifica la estructura de las células mesangiales, las cuales proliferan hasta la esclerosis y favorecen la sobreexpresión de citocinas y factores de crecimiento (1, 6, 7).

EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

En un número importante de enfermedades renales la progresión hacia la falla renal terminal está mediada por los efectos de la angiotensina II (Ang II). Todos los componentes del sistema renina-angiotensina (SRA), incluyendo el sustrato (angiotensinógeno), las enzimas que participan en la síntesis y degradación de las angiotensinas, así como sus receptores, se encuentran presentes en el riñón. Las concentraciones intrarenales de Ang II son aproximadamente mil veces mayores que en la circulación sistémica (18).

El SRA está relacionado con la hemodinámica renal normal ya que mantiene la presión arterial sistémica, modula la presión y el flujo del capilar glomerular y regula el transporte trans-tubular de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺). La Ang II que se forma en los riñones se regula en forma independiente de la que actúa en forma sistémica.

En presencia de enfermedad renal, el SRA contribuye a la progresión de las lesiones a esclerosis de las nefronas remanentes, debido a que: a) cambian sus acciones sistémicas y b) cambian sus acciones locales en el riñón (\uparrow de la reabsorción tubular de Na^+ , \uparrow de la presión del capilar glomerular y \uparrow de la presión arterial sistémica). Esto cambia la estructura normal del capilar glomerular y favorece el tránsito mesangial de macromoléculas (1, 6, 7). Son muchos los factores externos que favorecen éstos cambios; entre ellos : a) la ingestión alta de proteínas en la dieta, b) los cambios propios de la edad, c) la magnitud de la pérdida de nefronas funcionales, d) el tabaquismo, e) la obesidad y f) la presencia de enfermedades subyacentes, que también alteran la hemodinámica glomerular normal (8-21).

Aunque tradicionalmente el SRA ha sido estudiado desde el punto de vista hemodinámico, en diversos modelos experimentales y humanos se ha encontrado que participa en forma importante en la progresión de la enfermedad renal hacia la esclerosis y la fibrosis tubulointersticial por medio de mecanismos diferentes a las alteraciones hemodinámicas conocidas. A estos mecanismos se les conoce como acciones no hemodinámicas del SRA (17, 22 - 26). Los niveles elevados de Ang II que se presentan en las fases tempranas de la enfermedad renal regulan a su vez la expresión de diversos factores de crecimiento como el TGF- β , el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), el TNF α , el factor nuclear kappa B (NF κ B), varias sustancias quimiotácticas y componentes vasoactivos como el tromboxano A2 endotelial y las prostaglandinas. De igual importancia es el estímulo de la Ang II para el crecimiento renal y la amoniogénesis, ambas relacionadas con la progresión de las lesiones iniciales (17, 22, 23,).

Estos hallazgos han cambiado la forma de visualizar el papel biológico del SRA. Actualmente se considera como parte de un sistema asociado con moléculas de fase aguda que se activan en presencia de daño tisular. El propósito de estas moléculas, es preservar la integridad biológica y la función del tejido dañado manteniendo su flujo sanguíneo e iniciando su compleja reparación. El paradigma de estas moléculas es que ellas mismas son estimuladas por Ang II, especialmente PAI-1 y TGF- β , e interactúan para favorecer la reparación del tejido (24,25).

CITOCINAS

Son de especial interés el TGF- β y el TNF α , ya que en modelos experimentales de daño renal como la uropatía obstructiva y el riñón remanente se ha demostrado su participación en la progresión de la enfermedad renal.

1. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β); es un potente factor fibrogénico. Durante la etapa embrionaria participa en el desarrollo del tejido y en la regulación de la reparación del mismo cuando existe daño. Se sabe que estimula la síntesis de proteínas (fibronectina, laminina y colágena) y disminuye la degradación de la matriz extracelular porque aumenta la actividad de inhibidores de proteasas y con ello la cantidad de las mismas. Estimula la producción de receptores proteínicos como las integrinas y las osteopontinas. El TGF- β es secretado en una forma inactiva o latente, se almacena en la superficie de las células y de la matriz extracelular, en donde se convierte en su forma activa por mecanismos que aún no se conocen por completo. El TGF- β activo es una proteína de 25 kD compuesta por dos subunidades unidas por un puente disulfuro. Hasta ahora, se han identificado cinco isoformas distintas del TGF- β activo; tres de ellas se han encontrado en mamíferos: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (18). El mecanismo a través del cual el TGF- β participa en la progresión de la ERC es el siguiente: la trombospondina 1 (TSP1) activa al TGF- β latente en los tejidos. La Ang II sobre regula la expresión de TSP1 y TGF- β . TSP1 precede y predice la presencia de fibrosis renal. La activación del TGF- β estimula a su vez la producción de endotelina, la cual es un estímulo potente para la glomerulosclerosis y la fibrogenesis (18, 29). El TGF- β producido localmente en las células renales o los macrófagos que infiltran al riñón pudiera ser el mediador de la fibrosis renal. Además de esto, el TGF- β circulante tiene también un papel fisiopatológico importante en el proceso de fibrosis renal. El incremento en la producción de TGF- β en el hígado de ratones transgénicos provoca fibrosis hepática, miocarditis y enfermedad renal. En este modelo, la enfermedad renal se caracteriza por acumulo de proteínas en la matriz extracelular, fibrosis intersticial y expansión del mesangio (29). En el modelo de uropatía

obstruiva y en el de riñón remanente, el TGF- β tiene un papel profibrótico debido a que aumenta la expresión de sus dos tipos de receptores (tipo 1 y 2) y del RNA mensajero (mRNA) (31,32); su producción y excreción incrementa al aumentar la ingestión de sal en la dieta (11) e interactúa con Ang II (31-34). Su papel fundamental es favorecer el depósito de nueva matriz extracelular en el tejido dañado estimulando su síntesis - y simultáneamente inhibiendo su degradación. Esto se logra por medio de la estimulación de la producción de PAI-1 y modulando la expresión de los receptores de la nueva matriz celular que facilita el depósito de matriz extracelular. El TGF β también regula la acción de otras citocinas que inducen proliferación celular y angiogénesis (23-27). La expresión de PAI-1 está a su vez incrementada por Ang II, Ang IV y aldosterona (28). Finalmente TGF β afecta a diversas proteínas presentes en la matriz extracelular, que incluyen a la colágena tipos I, II, III, IV y V, fibronectina, osteopontina, trombospondina, tenacina, elastina, ácido hialurónico, osteonectina, proteína de secreción ácida rica en cisteína (SPARC) y proteoglicanos (biglicanos y decorina). El TGF β inhibe la degradación de la matriz extracelular a través del incremento de la actividad de los inhibidores del tejido de las metaloproteinasas y en consecuencia disminuye la actividad de estas últimas. También atrae fibroblastos y estimula su proliferación. Es por ello que esta citocina tiene un papel primordial en el acumulo de proteínas en la matriz extracelular del intersticio renal. Esto incluye la proliferación de fibroblastos y la subsecuente estimulación de la producción de proteínas por los fibroblastos y las células del epitelio tubular (18).

2. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α): la activación del gen del TNF α provoca la producción de una proteína de 233 aminoácidos. La molécula madura tiene 157 aminoácidos con una masa molecular de 17 kD. A pesar de que los macrófagos son su mayor fuente de producción, es también producido por células glomerulares como las mesangiales y las del epitelio tubular del riñón en condiciones normales y patológicas. Se han descrito hasta la fecha dos tipos de receptores: TNFR1 con un peso molecular de 55 kD y TNFR2 de 75 kD. La unión de TNF α a sus receptores provoca la expresión de factores de transcripción, citocinas, factores de crecimiento, receptores, células de

adhesión molecular, mediadores del proceso de inflamación, proteínas de fase aguda y proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (28, 35-38). En el modelo de daño renal por lipopolisacáridos (LPS) se ha encontrado un incremento importante en la expresión del TNF α en las células renales. Estas células expresan el factor cuando se les estimula con interleucina-1 alfa o LPS. Los transcritos del RNA mensajero (mRNA) de TNF α se han encontrado en los túbulos corticales de los ratones inyectados con LPS. En las ratas normales el mRNA de TNF α fue más abundante en el glomérulo que en los túbulos corticales (18). Se ha medido también la expresión de TNF α en la corteza renal de ratas a diferentes tiempos después de provocar obstrucción ureteral unilateral, en el mismo experimento, se determinó también si la inhibición de Ang II ó la radiación completa del animal afectó la expresión del mRNA del factor. Se encontró que los túbulos corticales obtenidos de los animales con obstrucción tuvieron una marcada expresión del mRNA mientras que los glomérulos del mismo riñón no la tuvieron. Por estos hallazgos se ha considerado que la sobre regulación de TNF α está confinada a los túbulos cuyo uretero está obstruido. La administración de enalapril, un inhibidor de la enzima convertidora de Ang II antes y durante la obstrucción ureteral unilateral disminuyó los niveles del mRNA aproximadamente en 40% 4 horas después de haberse iniciado la obstrucción. Estos cambios no fueron detectados 120 horas después del inicio del experimento y la expresión del mRNA fue igual que la de los animales que no recibieron el medicamento. Es posible que TNF α participe en el inicio del daño tubulointersticial de los riñones con ureteros obstruidos. La infiltración leucocitaria del intersticio del riñón obstruido no parece contribuir a la expresión del mRNA de TNF α , no así de la de Ang II cuya participación en este modelo es al menos parcial, favoreciendo el incremento temprano de la expresión del mRNA de esta citocina (39). Por otro lado, en los modelos animales de daño glomerular TNF α se asocia al incremento de células inflamatorias, estimula la producción de factores quimiotácticos por las células renales y sobre regula el mRNA de MCP-1 en las células mesangiales humanas (18). Wolf y cols. encontraron que TNF α incrementa el mRNA de RANTES en una línea de células mesangiales murinas y en las ratas perfundidas con

TNF α in vivo (40). Finalmente se ha descrito que el anti-TNF α o el TNFR1 soluble recombinante humano, bloquea la sobre regulación de las moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), las moléculas de adhesión endotelial de leucocitos-1 (ELAM-1) y moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en las nefritis tóxicas. Todos estos datos sugieren que el TNF α contribuye al incremento en la migración de macrófagos dentro del intersticio del riñón afectado. Un incremento del TNF α en fases tempranas sobre regula la producción de monocitos y contribuye a la infiltración por leucocitos de los riñones con ureteros obstruidos. La unión del TNF α a su receptor en la superficie de la célula, provoca cambios en el metabolismo intracelular que median la apoptosis y la necrosis celular. Aunque los mecanismos de activación citosólica del TNF α no se conocen por completo, su receptor 1 (TNFR1) tiene un dominio de secuencia citoplásmica similar al receptor del antígeno Fas, el cual se considera como un mediador de apoptosis (18).

Los aspectos descritos del TGF β y del TNF α , que protegen al tejido dañado y favorecen su reparación a través de las moléculas de fase aguda, tienen también efectos dañinos con implicaciones clínicas importantes:

a) Si la sobre expresión de ambos no se interrumpe, se produce acumulación anómala de matriz extracelular, infiltración importante de células inflamatorias, cambios en el metabolismo de la célula y activación de otras citoquinas que favorecen la esclerosis glomerular, la fibrosis intersticial y la apoptosis (25).

b) Aunque la Ang II puede activar y perpetuar la respuesta de TGF β y TNF α , el bloqueo selectivo con medicamentos de la primera, aún a dosis altas, tiene efectos parciales sobre las segundas (41-51).

BENEFICIO DEL BLOQUEO SELECTIVO DE SRA CON MEDICAMENTOS:

La supresión intrarenal del SRA con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (ACEI) o con inhibidores del receptor de Ang II (ARA II) está indicada en clínica ya que se atenúa la progresión de la ERC. Este beneficio se logra porque se modifican las alteraciones hemodinámicas y no hemodinámicas del SRA previamente mencionadas (41-51). Los efectos clínicos se han demostrado en diferentes poblaciones de enfermos renales, incluyendo diabéticos y no diabéticos. Aún en presencia de enfermedad renal avanzada los beneficios de estos medicamentos han sido proporcionales a la magnitud de la proteinuria (15, 41-51). Estos fármacos dilatan la arteriola eferente y con ello disminuyen la hipertensión capilar glomerular y la proteinuria. Otro mecanismo que puede explicar la disminución de la proteinuria es que estos fármacos también preservan la integridad de las proteínas de la membrana basal y de los poros de filtración (28).

Además, varios experimentos han encontrado que estos medicamentos también disminuyen la infiltración de monocitos-macrófagos, la expresión de TGF β y TNF α , la proliferación de fibroblastos y su diferenciación en miofibroblastos y el desarrollo de fibrosis intersticial (28). La inhibición de al menos algunas de las citocinas mediadas por Ang II posiblemente se debe a disminución de la expresión de TGF β , lo cual se ha demostrado en enfermos tratados con estos medicamentos (15, 52-54).

Existen diversos ACEI y ARA II. Losartán es un ARA II específico para los receptores tipo 1 (AT $_1$) de Ang II activo por la vía oral. Los AT $_1$ existen en muchos tejidos: músculo liso vascular, glándulas suprarrenales, riñones y corazón. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que tanto losartán como su metabolito, el ácido carboxílico (que es farmacológicamente activo), bloquean todas las acciones de importancia fisiológica de la Ang II, independientemente del origen o de la vía a través de la cual se sintetice la Ang II. Debido a que es selectivo para los AT $_1$, bloquea las respuestas a la angiotensina I (Ang I) y a la Ang II, sin afectar las respuestas a la bradicinina, esto es, no inhibe a la cinasa II (ECA), enzima que degrada a la bradicinina. Losartán y sus metabolitos se eliminan principalmente por vía biliar y urinaria.

En contraste con los ARA II, los ACEI, bloquean las respuestas a la Ang I y aumentan las respuestas a la bradicinina, sin alterar la respuesta a la Ang II, lo cual proporciona una distinción farmacológica importante (42, 51, 55). Es amplia la experiencia clínica y experimental con ambos grupos de medicamentos, en diferentes modelos de enfermedad renal humana y experimental (41-49).

A pesar de disminuir significativamente la progresión de la enfermedad renal con el bloqueo medicamentoso de SRA, la enfermedad no se detiene. Es por ello que la investigación científica continúa en búsqueda del resto de los elementos que participan en la progresión del daño renal con el fin de modificarlos (7, 49, 50).

PARTICIPACIÓN DE LA ALDOSTERONA EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La aldosterona es un potente mineralocorticoide que forma parte del SRA. Sus efectos biológicos se producen al unirse a sus receptores localizados en el epitelio de la nefrona distal, colon y recto así como en sitios no epiteliales de los vasos sanguíneos, cerebro y corazón (56). Uno de los más importantes es el aumento de la transcripción de mRNA de la Na⁺-K⁺ ATPasa en el riñón, lo que incrementa el transporte transtubular de K⁺, (H⁺) y (Mg⁺⁺). Esto se traduce en kaliuresis y retención de Na⁺ (57-59).

En los últimos 10 años la aldosterona ha generado interés por los efectos dañinos que tiene en una gran variedad de enfermedades. Esto se debe a que se han documentado mecanismos no clásicos de acción, de la evidencia de que se produce en sitios extra-adrenales y de que favorece la inflamación y la fibrosis. El interés ha aumentado debido a que con el bloqueo selectivo de su receptor se han obtenido beneficios clínicamente comprobados (60).

Se sabe que con ACEI y ARA II, la producción de aldosterona no se inhibe completamente, ya que existen otros factores importantes para su producción como Ang II y III, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos alfa (α-MSH), prolactina, vasopresina, la ingestión de Na⁺ y K⁺, H⁺, amonio, serotonina, histamina y algunas prostaglandinas

(57, 60, 62). Los sitios extra adrenales de formación de aldosterona son las células endoteliales y vasculares del músculo liso humano, y las células miocárdicas en estudios experimentales (63).

Hay evidencia científica reciente que sugiere que la aldosterona participa en la progresión de la ERC en forma independiente de la Ang II.

- Los niveles plasmáticos de aldosterona están incrementados en los enfermos con enfermedad renal avanzada y no se modifican con la dieta normal y baja en Na⁺. Correlacionan en forma lineal con el grado de enfermedad renal (56, 64, 65).
- La aldosterona incrementa la presión arterial sistémica, la excreción urinaria de proteínas, el mRNA del TGFβ y la glomeruloesclerosis en el modelo experimental de riñón remanente de ratas sin bloqueo medicamentoso del SRA. En este modelo, el bloqueo del SRA redujo los niveles plasmáticos de aldosterona, la proteinuria y la glomeruloesclerosis 10 veces. Sin embargo, la infusión selectiva de aldosterona produjo nuevamente proteinuria y glomeruloesclerosis en magnitud semejante a la observada en el grupo de ratas no tratadas (30, 58)
- El riñón remanente de la rata Wistar-Furth, resistente al efecto de los mineralocorticoides comparada con la rata normal, no desarrolla proteinuria ni glomeruloesclerosis (68).
- En las ratas "stroke-prone" con hipertensión arterial espontánea grave (SPSHR) así como en el modelo del riñón remanente, la elevación de la presión arterial sistémica y la proteinuria son también dependientes de aldosterona. Durante el bloqueo del SRA la infusión exógena de aldosterona provocó glomeruloesclerosis y acumulo del mRNA de TGFβ1. En este modelo, la infusión continua de espironolactona disminuyó la proteinuria, la presión arterial y la glomeruloesclerosis (69,71).
- Los niveles incrementados de aldosterona inducen daño renal, cardíaco y vascular en pacientes con hiperaldosteronismo primario. En estos estudios se comparó el grado de hipertrofia ventricular izquierda con el de un grupo de enfermos con hipertensión esencial. Se encontró que a pesar de controlar factores como la edad, género, duración de la hipertensión y su gravedad, los enfermos con hiperaldosteronismo primario mostraron un

mayor grado de hipertrofia ventricular izquierda y mayores alteraciones en la perfusión miocárdica que los enfermos con hipertensión esencial (72).

- La aldosterona incrementa la producción de colágena tipo IV en estudios *in vitro* de células mesangiales (69, 73).
- Existe evidencia en otros órganos de las acciones no benéficas de la aldosterona: causa fibrosis miocárdica y vascular (45, 46), daño vascular directo (71), disfunción de baroreceptores (75), altera la actividad de los sistemas nerviosos simpático y parasimpático, aumenta la masa ventricular izquierda y aumenta la presión arterial de sujetos con hipertensión arterial esencial de diferentes grupos étnicos con y sin obesidad (57).
- El bloqueo selectivo del receptor de aldosterona ha probado sus efectos benéficos en sujetos con insuficiencia cardíaca congestiva (56, 59, 66, 67). El beneficio que han tenido éstos enfermos en la disminución del riesgo de mortalidad (RR: 0.780, IC 95%) y en la frecuencia de hospitalizaciones por causa cardíaca hasta en un 35%, no se debe solamente al efecto de la espironolactona sobre la retención de Na⁺ y el volumen. Estos beneficios se han atribuido a la disminución de la fibrosis miocárdica por bloqueo de los efectos de la aldosterona sobre la formación de colágena, la cual juega un papel importante en reducir el riesgo de muerte de causa cardíaca; la fibrosis miocárdica puede predisponer a los pacientes a variaciones en el tiempo de conducción ventricular y causar arritmias ventriculares (56).

Los mecanismos potenciales a través de los cuales la aldosterona circulante favorece la fibrosis y la formación de colágena en el riñón y a nivel sistémico son:

- a) Aumento en la regulación de los receptores de Ang II
- b) Potenciación de la respuesta presora de la Ang II
- c) Aumento en el flujo de Na⁺ en las células vasculares del músculo liso.
- d) Inhibición de la captación de norepinefrina en las células miocárdicas y en las células vasculares del músculo liso.
- e) Participación en la hipertrofia de la célula vascular del músculo liso (56)

La espironolactona es un antagonista farmacológico específico para la aldosterona. Su principal mecanismo de acción es a través de la unión competitiva a los receptores de la aldosterona por el sitio de intercambio dependiente de Na^+ - K^+ en el túbulo contorneado distal. Su conocido efecto antihipertensivo en el hiperaldosteronismo y en hipertensión arterial esencial, se debe a que provoca aumento en la excreción de Na^+ y agua por el riñón, con retención de K^+ . La espironolactona y sus metabolitos están unidos a las proteínas plasmáticas en más de 90%. Sus metabolitos se excretan principalmente por la orina y la vía biliar (55).

ALTERACIONES HISTOLOGICAS

Todos los cambios hemodinámicos y no hemodinámicos descritos favorecen que el glomérulo desarrolle esclerosis. En el riñón, la esclerosis es el resultado de las lesiones (fibrosis) y representa el estadio final de un proceso patológico. Morfológicamente la esclerosis puede ser segmentaria (áreas de un glomérulo afectadas), focal (algunos glomérulos afectados) o generalizada. Estudios morfométricos han demostrado que los glomérulos no afectados aumentan de tamaño y volumen (1). Microscópicamente las lesiones segmentarias se caracterizan por pérdida de la arquitectura normal del glomérulo, con obsolescencia de los capilares y de uno ó más lóbulos del ovillo capilar. Este proceso de obliteración (esclerosis) es más frecuente en la periferia que en la parte central del ovillo y cercana al hilo vascular (44%), o puede ser indeterminada (78%). La esclerosis periférica produce sinequias con la cápsula de Bowman debido a la combinación del colapso de los capilares glomerulares con un exceso en la producción de colágena tipo IV y laminina en la matriz mesangial. Tanto la colágena tipo IV como la laminina son componentes normales de la matriz extracelular del glomérulo. Cuando las lesiones son focales hay producción y depósito de colágena tipo III. Conforme el daño progresa, mayor cantidad de glomérulos se afectan hasta que la mayor parte de los ellos (lesión difusa) o todos (global) se esclerosan. Además de la lesión glomerular hay fibrosis del intersticio y atrofia de los túbulos (26).

II.- JUSTIFICACIÓN:

La ERC es un problema de salud cuya incidencia y prevalencia se ha incrementado en forma importante en los últimos años. La prevalencia en el IMSS es de 1300 pacientes / millón de habitantes y no hay datos publicados en relación a la incidencia, pero se estima que hay 500 nuevos pacientes /año / millón de habitantes (70). En los Estados Unidos de Norteamérica hubo una incidencia de 79,000 y una prevalencia de 304,000 en 1997 (63). La prevención de la enfermedad renal y su tratamiento requieren de la identificación de los mecanismos que participan en su desarrollo y progresión.

El SRA participa en la progresión de la ERC a través de mecanismos celulares y no celulares (hemodinámicos y no hemodinámicos ó humorales). Los medicamentos que inhiben selectivamente su acción disminuyen la progresión de la fibrosis, pero no la detienen. Existen razones por las que las acciones no hemodinámicas descritas de SRA no se detienen con el control de los efectos hemodinámicos. Es posible que la respuesta no hemodinámica del SRA sea biológicamente muy importante como para ser fácilmente detenida con el bloqueo de una sola vía, sin olvidar que la enfermedad de base, puede continuar activando el sistema a través de mecanismos diferentes.

Las acciones hemodinámicas y humorales de la aldosterona han proporcionado suficiente evidencia clínica y experimental que sugiere su participación, posiblemente independiente del SRA. El bloqueo selectivo de la aldosterona proporciona beneficio clínico en la progresión de otras enfermedades. Es posible que la combinación con bloqueo del SRA pueda detener las alteraciones no hemodinámicas de la aldosterona y perpetuar el beneficio hemodinámico que proporciona el bloqueo del SRA.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

1.- ¿Cuál es el efecto del losartán en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6?

2.- ¿Cuál es el efecto de la espironolactona en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6?

3.- ¿Cuál es el efecto de la combinación de ambos fármacos en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6?

4.- ¿Cuál es el efecto de la dieta normal y baja en sodio además del losartán y la espironolactona solas ó combinadas en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6?

IV.- HIPÓTESIS:

1.- El losartán mejora las alteraciones hemodinámicas de la función renal e histológicas y reduce la expresión de factor de crecimiento y citocinas en un modelo de nefrectomía 5/6.

2.- La espironolactona mejora las alteraciones hemodinámicas de la función renal e histológicas y reduce la expresión de factor de crecimiento y citocinas en un modelo de nefrectomía 5/6.

3.- El uso combinado de losartán y espironolactona se potencian.

4.- La dieta baja en sodio favorece la mejoría de las alteraciones hemodinámicas de la función renal e histológicas y la reducción de la expresión de factor de crecimiento y citocinas en un modelo de nefrectomía 5/6.

V.- OBJETIVO:

1.- Estudiar el efecto de losartán en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6

2.- Estudiar el efecto de espironolactona en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6

3.- Estudiar el efecto del uso combinado de losartán y espironolactona en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6

4.- Estudiar el efecto de la dieta normal y baja en sodio en las alteraciones hemodinámicas de la función renal (*depuración de creatinina y proteinuria en orina de 24 h*), alteraciones histológicas (*fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (EG)*), factor de crecimiento (*TGF β -1*) y citocinas (*TNF α*) en un modelo de nefrectomía 5/6

VI.- MATERIAL Y METODOS:

-DISEÑO DEL ESTUDIO:

Experimental, factorial 2 x 2 x 2.

- ANIMALES DE EXPERIMENTACION: ratas macho Sprague-Dawley, de 2-3 meses de edad, con peso de 250-300 g a las que se les realizó nefrectomía 5/6. Una vez cumplidos los criterios de inclusión, se dividieron en ocho grupos de 10 ratas:

GRUPOS DE ESTUDIO	DIETA NORMAL	DIETA HIPOSODICA
1 y 5	Control	Control
2 y 6	Losartán 30 mg/kg/día	Losartán 30 mg/kg/día
3 y 7	Espironolactona 25 mg/kg/día	Espironolactona 25 mg/kg/día
4 y 8	Losartán + Espironolactona a las dosis mencionadas	Losartán + Espironolactona a las dosis mencionadas

Las dosis recibidas de los medicamentos se verificaron por el registro diario de la ingestión de agua en donde se disolvieron. Para el desarrollo del modelo experimental los animales se anestesiaron con xilacina (rompur) a dosis de 10 mg/kg peso y ketamina a dosis de 90 mg/kg peso intramuscular, para realizar isquemia 2/3 del riñón izquierdo, ligando las arterias correspondientes a través de una incisión abdominal media. Una semana después se realizó la nefrectomía del riñón derecho + ligadura ureteral, utilizando la misma técnica anestésica y abordaje abdominal. Para fines de estudio, este riñón se fijó en formol al 10% y se envió a análisis histopatológico.

Una semana después de la segunda cirugía, se colocaron en las jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 h y medir proteinuria, volumen urinario y creatinina urinaria. Simultáneamente se obtuvo sangre de la cola con lo que se determinó creatinina (CrS) y nitrógeno de la urea séricos (BUN). Estas son las mediciones basales. A partir de entonces, los animales recibieron durante las siguientes 8 semanas el tratamiento médico y la dieta a la que fueron asignados.

Concluido el tiempo de seguimiento, los animales se colocaron por segunda vez en la jaula metabólica para recolectar la segunda muestra de orina y proceder al sacrificio. Para el sacrificio se anestesiaron con tiopental sódico (pentobarbital) a dosis de 30 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal. La sangre se obtuvo por punción de la arteria aorta, a través de la cual se insertó un catéter para perfundir y fijar el tejido con formol *in vivo* utilizando la técnica correspondiente. El riñón izquierdo se envió al servicio de anatomía patológica, en donde se incluyó en parafina para hacer cortes de 2 μ m de espesor con un micrótopo convencional. Se hicieron 9 cortes para

realizar las siguientes tinciones: 3 cortes para tinción de hematoxilina–eosina, 3 cortes para tinción con ácido periódico de Schiff (PAS), 1 corte para tinción tricrómica de Mallory, 1 corte para tinción de plata y 1 corte para estudio histoquímico.

-DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES:

1.-Variable independiente: losartan, espironolactona, sodio.

2.-Variable dependiente: alteraciones hemodinámicas, histológicas, de factor de crecimiento y de citocinas.

-DESCRIPCIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES:

1.- Variable independiente:

- **Losartán potásico y espironolactona.** Ambos fármacos fueron proporcionados en polvo puro por Merck Sharp & Dome y Sigma respectivamente. Para obtener la dosis deseada se tomó en cuenta el peso semanal de los animales durante todo el experimento y la cantidad de agua que ingirieron por día. Se encontró una ingesta promedio de 60ml/día.
- **Dieta:** se utilizó la preparación comercial (Harlan) con dos contenidos de sodio: normal y bajo.

2.- Variables Dependientes:

- **Alteraciones hemodinámicas:**

El animal se colocó dentro de una jaula metabólica, con el fin de recolectar la orina de 24 h. Esta se depositó en un recipiente diseñado especialmente para dicho fin, que forma parte de la estructura de la jaula. La medición urinaria de las proteínas se hizo mediante los métodos de Bradford y de absorbanza de onda. Para ambos métodos se utiliza un espectrofotómetro. El resultado final se expresa en mg /24 h. La variable descrita es cuantitativa continua con escala de razón.

La depuración de creatinina en orina de 24 h (Dcr) se obtuvo a través de la fórmula convencional de UV/P, en donde se toma en cuenta la creatinina urinaria multiplicada por el

volumen urinario de 24 h y dividida entre la creatinina plasmática y los minutos de un día. Es una variable cuantitativa continua con escala de razón, cuyo resultado final se expresa en ml/min.

- **Alteraciones Histológicas:**

- a) La fibrosis intersticial se evaluó utilizando un método morfométrico basado en un análisis computarizado de imágenes. Para cada tejido se tomaron 10 campos no cruzados (770 x 580 micras aumentados por 100 en el microscopio de luz) (*microscopio de campo claro Olympus BX 51, objetivo 40X y oculares 10X (Olympus American, Melville, NY)*) lo que introduce aproximadamente un 80% de la parte cortical de la muestra. La imagen se capturó con una cámara de video digital (*Cool Snap-Plus*) y se procesó en una computadora (*Image-Pro-Plus*) usando Photoshop 4 y un software procesador de imágenes (*Image-Pro Inc, Media Cybernetic*). Utilizando la capacidad de reconocimiento de color del software y la especificidad hacia el azul verdoso de la colágena de los cortes teñidos con tricómico de Mallory, las áreas de fibrosis se seleccionaron sin dificultad. Una vez seleccionadas se cuantificaron en píxeles usando el software para histogramas del analizador de imágenes. Para cada campo la fibrosis se expresa como una fracción del área túbulointersticial. Finalmente para cada biopsia la fibrosis cortical se obtuvo por los resultados de 10 campos. Los resultados se expresan en grados: grado I: 10 - 25%; grado II: 26 - 40%; grado III > 40% del tejido cortical. Es una variable cualitativa ordinal, escala ordinal.
- b) La esclerosis glomerular (EG) se obtuvo dividiendo el número de glomérulos esclerosados entre el número de glomérulos totales en un corte de tejido de 3 micras y multiplicado por 100. Normalmente no hay esclerosis glomerular, por lo que cualquier valor es positivo. El resultado se expresa en porcentajes. Es una variable cualitativa ordinal, escala ordinal.

- **Factor de crecimiento y citocina:**

El tejido fue fijado en formalina con amortiguador al 10% e incluido en parafina; se hicieron cortes de 3 micras de espesor y a través de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional y utilizando el sistema espreptavidina-biotina-peroxidasa (ABC), se incubaron con anticuerpos primarios dirigidos contra TGF β -1 y TNF α . La técnica de la inmunoperoxidasa que se utilizó es la

siguiente: el tejido se lavó con 20 ml de extracto ExtrAvidin, 2.5 mg/ml (*Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA*) y con 30 ml de biotina al 0.001% en un amortiguador salino de fosfato (PBS). Después se incubó por 2 h a una temperatura de 37°C con 50 ml del anticuerpo primario correspondiente, dilución 1:30 en solución amortiguadora salina Tris (TSB), pH 7.8. Después de lavarlo durante 15 minutos, el tejido se incubó por segunda vez durante 1 h con 30 ml de inmunoglobulina G (IgG) contra ratón para finalmente incubarlo por tercera vez con 60 ml de ABC durante 30 minutos. Después del lavado final los tejidos se incubaron nuevamente por 15 minutos en diaminobenzidina y agua en TBS (80). De las laminillas marcadas se fotografiaron 50 campos de corteza renal tomados al azar, con un microscopio Olympus BX51 (*Olympus American, Melville, NY*) a 400x de aumento a través de una cámara digital Cool-SNAP-Pro y utilizando un software para imagen (*Image-Pro-Plus*) se efectuó la cuantificación de la expresión en unidades pixel en el intersticio, en los vasos y en los túbulos. Es una variable cuantitativa continua, con escala de razón.

Los niveles séricos de aldosterona se midieron por radioinmunoensayo y sus valores se expresan en ng/ml (*ALDOCTK-2*). Es una variable cuantitativa continua, con escala de razón. Su medición se hizo para corroborar los valores aumentados en el modelo experimental descrito. De igual forma, la actividad de renina plasmática (ARP) se obtuvo en forma cuantitativa por radioinmunoensayo a través de la generación de angiotensina I (*GammaCoat Plasma Renin Activity* ¹²⁵I RIA Kit). Los valores se expresan en ng/ml/h. Es una variable cuantitativa continua, con escala de razón. Ambos kits son de los laboratorios DiaSorin.

La variación de la dieta de los animales se hizo con el único fin de asegurar que hay activación del SRA. La dieta normal en Na⁺ es una dieta estándar (*Lab Diet 5006*) que contiene los siguientes elementos: proteína cruda: 23%, grasa cruda: 6.5%, fibra cruda: 4%, cenizas máximo: 8%, minerales agregados máximo: 2.5%, Na⁺: 0.28% y K⁺: 1.10%. La dieta hiposódica es distribuida por el grupo Hartan y contiene los mismos elementos, pero una concentración de Na⁺ menor de 0.28%.

VII.- CONSIDERACIONES ETICAS:

Los animales se trataron de acuerdo a las normas éticas internacionales e institucionales. El proyecto fue aprobado por el comité local de investigación con el número 087/2001 en el año 2001.

VIII.-ANALISIS ESTADISTICO:

Los datos con una distribución normal se presentan como promedios y desviaciones estándar (DE). Se utilizó ANOVA para medir los efectos principales. Para el análisis de la fibrosis intersticial, se utilizó un software para análisis de imagen (*Image-Pro- INC, Media Cybernetics*), con tinción de tricrómico de Massón, analizando 50 campos no cruzados de corteza renal, a un aumento de 40x.

En las variables con una DE muy amplia, se utilizó a la mediana como medida de dispersión. Con la Prueba de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney como prueba post-hoc se mostraron las diferencias entre grupos, con la dieta y con los diferentes tratamientos.

X.- RESULTADOS:

Resultados basales.

El modelo fue reproducible y estable. En la tabla 1 se muestran los datos de las variables principales en cada grupo después de dos semanas desde la segunda cirugía y antes de recibir los tratamientos. No hay diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 1. Características basales.

Grupo	Control (1) Φ	Losartán (2) Φ	Espironolactona (3) Φ	Ambos (4) Φ	Control (5) Ω	Losartán (6) Ω	Espironolactona (7) Ω	Ambos (8) Ω
Peso (g)	286 \pm	288 \pm	279 \pm	276 \pm	271 \pm	275 \pm	289 \pm	283 \pm
CrS (mg/dl)	1.54 \pm	1.54 \pm	1.54 \pm	1.52 \pm	1.55 \pm	1.54 \pm	1.53 \pm	1.52 \pm
BUN (mg/dl)	78.0 \pm	71.4 \pm	78.8 \pm	78.5 \pm	78.4 \pm	78.4 \pm	78.1 \pm	77.7 \pm
Diuresis (ml/24 h)	38.8 \pm	39.2 \pm	39.0 \pm	39.2 \pm	38.3 \pm	38.8 \pm	38.6 \pm	38.4 \pm
DCr (ml/min)	3.96 \pm	3.96 \pm	3.96 \pm	3.96 \pm	3.95 \pm	3.96 \pm	3.96 \pm	3.96 \pm
Proteinuria (mg/24 h)	386 \pm	388 \pm	392 \pm	384 \pm	380 \pm	382 \pm	382 \pm	386 \pm
	3.6	5.3	5.9	7.0	6.1	8.1	8.1	2.4

Los datos están expresados como media \pm DE

CrS = creatinina sérica

BUN = nitrógeno de la urea sanguíneo

DCr = depuración de creatinina en orina de 24 h

No hay diferencias significativas entre los grupos.

Φ = dieta normal en sodio.

Ω = dieta baja en sodio

Cambios físicos y bioquímicos.

Los tratamientos tuvieron el efecto esperado en relación a la ARP y aldosterona. Estos datos se muestran en la tabla 2. La dieta hiposódica indujo aumentos significativos tanto en ARP como en aldosterona ($p < 0.05$).

TABLA 2. Aldosterona sérica y actividad plasmática de renina

Grupo	Control (1) Φ	Losartán (2) Φ	Espironolactona (3) Φ	Ambas (4) Φ	Control (5) Ω	Losartán (6) Ω	Espironolactona (7) Ω	Ambas (8) Ω
Aldosterona (pg/ml)	1779	477	163	245	1804*	2068*	2271*	1582*
	±	±	±	±	±	±	±	±
	328	51	55	52	325	281	256	321
ARP (pg/ml)	7.5	5.1	4.1	15.3	37.3 *	25.0	35.2	28.8*
	±	±	±	±	±	±	±	±
	8.4	0.6	0.5	2.0	1.9	2.0	3.0	4.6

Los datos están expresados como media ± DE

ARP = actividad plasmática de renina

Φ = dieta normal en sodio.

Ω = dieta baja en sodio.

*P < 0.05 análisis entre grupos.

El efecto de la dieta y los medicamentos sobre el modelo experimental es el siguiente: en relación al peso, los animales que recibieron dieta hiposódica tuvieron menor peso que los animales que recibieron dieta normal (387.5 ± 62 vs 363.7 ± 40 g; $p = 0.05$). No hubo diferencias importantes en relación a la CrS ni tampoco en los niveles de BUN (1.39 ± 0.03 vs 1.40 ± 0.02 y 117 ± 0.30 vs 114 ± 0.27 mg/dl respectivamente, $p = \text{NS}$). Sin embargo, el efecto individual y combinado de losartán y espironolactona fue más evidente en los grupos que recibieron dieta hiposódica: los animales que recibieron losartán o espironolactona tuvieron menores concentraciones de creatinina y se presentó interacción con la dieta. En los animales con dieta hiposódica, el efecto de losartán fue menor y el de espironolactona mayor que en los animales con dieta normal. Los resultados de BUN fueron similares a los de creatinina. Los datos se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. Efecto de la dieta sobre el modelo experimental (promedio \pm DE)

Grupo	Control	Losartán	Espironolactona	Ambos	Control	Losartán	Espironolactona	Ambos
	(1) Φ	(2) Φ	(3) Φ	(4) Φ	(5) Ω	(6) Ω	(7) Ω	(8) Ω
Peso (g)	377	386	411	376	381	360	344*	370
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	74	51	65	59	27	21	51	64
CrS (mg/dl)	1,95	1,25	1,25	1,14	1,96	1,41	1,06	1,19
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
BUN (mg/dl)	169	169	69 [*]	61 [*]	164	152	73 [*]	70 [*]
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0.30	0.43	0.33	0.16	0.39	0.38	0.16	0.16

CrS = creatinina sérica

BUN = nitrógeno de la urea sanguíneo

Φ = dieta normal en sodio.

Ω = dieta baja en sodio.

*P < 0.05 análisis entre grupos

Cambios funcionales.

En la figura 1 se muestran los volúmenes urinarios. Tanto la dieta como los medicamentos tuvieron efecto con interacción significativa. En los animales con dieta hiposódica, la espironolactona no incrementó el volumen urinario, efecto que se presentó con la dieta normal en sal, sobre todo cuando se utilizó la combinación de los medicamentos. El losartán disminuyó la diuresis, particularmente en combinación con espironolactona y dieta hiposódica.

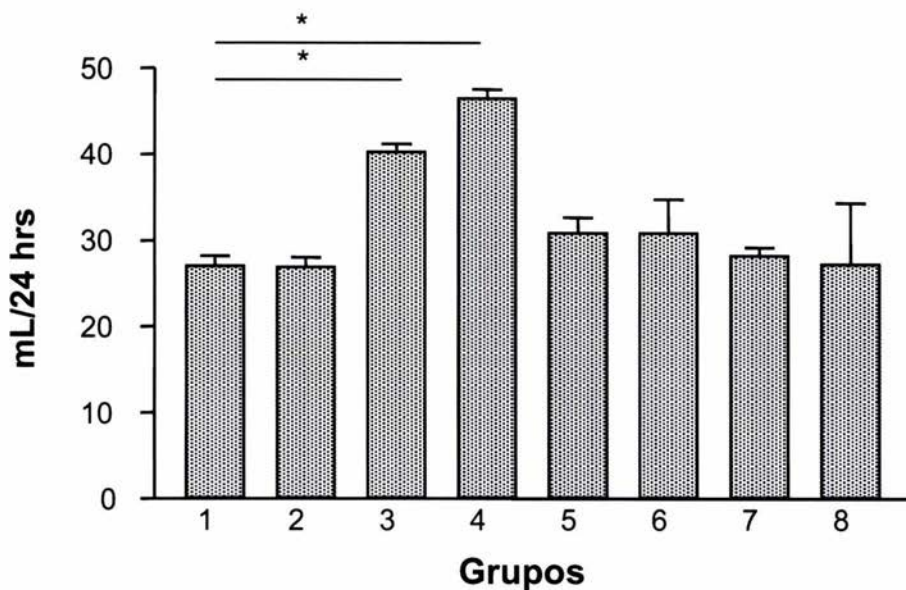


Figura 1. La gráfica representa el volumen urinario (ml/24 horas) (promedio \pm DE) por grupo de estudio al final del experimento. El volumen urinario más elevado fue el de los animales que recibieron dieta normal en sodio + espirolactona sola ó combinada con losartán

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espirolactona + dieta normal

4= losartán + espirolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espirolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espirolactona + dieta hiposódica

* $P < .05$

En la figura 2 se muestran los resultados en Dcr. La dieta y los medicamentos tuvieron efectos importantes e interacciones. La Dcr fue mayor en los animales con dieta hiposódica comparado con los que tomaron dieta normal. En los animales que recibieron espirolactona sola y la combinación con losartán, la Dcr fue mayor con la dieta normal. Los animales que recibieron únicamente losartán, independientemente de la dieta, tuvieron la menor depuración. La combinación de los medicamentos aumentó la Dcr, independientemente de la dieta administrada.

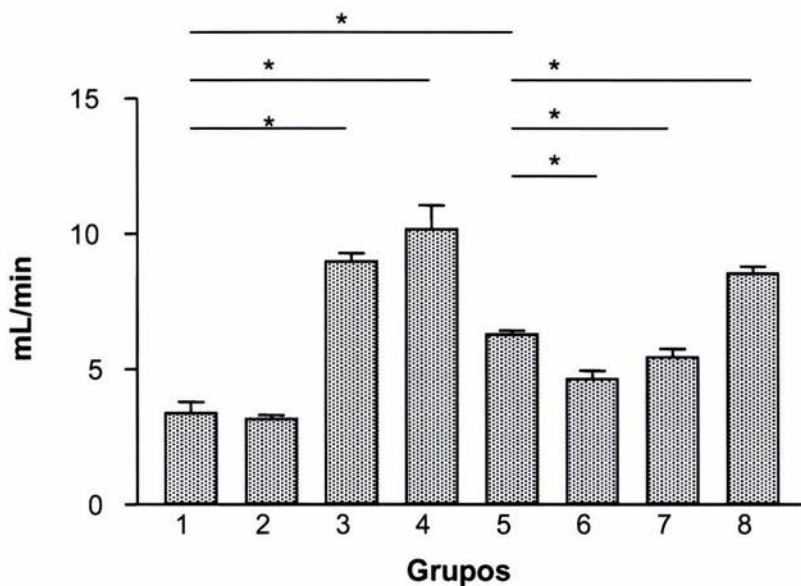


Figura 2.- Depuración de creatinina (ml/minuto) en orina de 24 h por grupo de estudio al final del experimento (promedio \pm DE). Los grupos que recibieron dieta normal en sal con espironolactona sola ó combinada con losartán tuvieron la Dcr más elevada. De los animales que recibieron dieta baja en sal, la combinación de los fármacos incrementó la Dcr aunque sus volúmenes urinarios no hayan aumentado. La DE fue pequeña en el modelo de enfermedad renal.

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espironolactona + dieta normal

4= losartán + espironolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espironolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espironolactona + dieta hiposódica

* $P < .05$

La proteinuria expresada en mg/Dcr se muestra en la figura 3. Hubo efecto de la dieta, los medicamentos e interacciones. El losartán mostró el efecto conocido en el grupo de dieta hiposódica. La espironolactona tuvo efecto sólo con dieta normal. La combinación losartán + espironolactona disminuyó la proteinuria independientemente de la dieta.

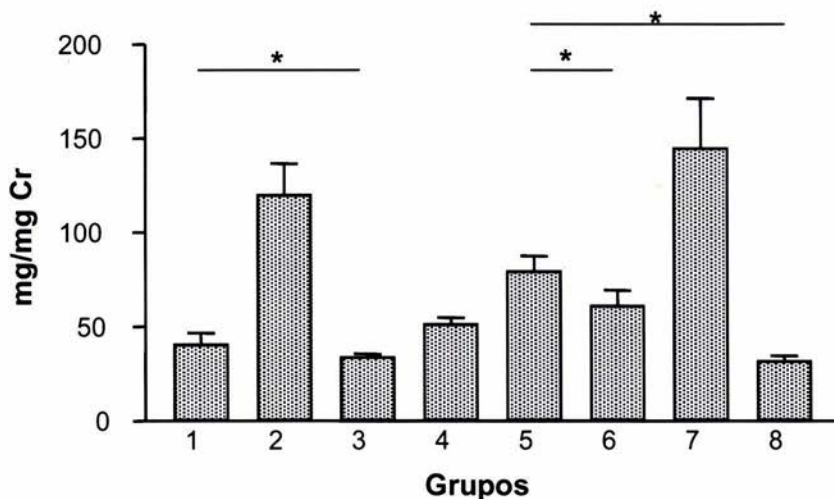


Figura 3.- Proteinuria en mg/ Dcr por grupo de estudio (promedio \pm DE) al final del experimento. Hubo una reducción significativa de la proteinuria en los grupos que recibieron fármacos solos ó combinados. Cuando se utilizaron combinados, la proteinuria disminuyó independientemente de la dieta.

1= control con dieta normal

5= control con dieta hiposódica

2= losartán + dieta normal

6= losartán + dieta hiposódica

3= espirolactona + dieta normal

7= espirolactona + dieta hiposódica

4= losartán + espirolactona + dieta normal

8= losartán + espirolactona + dieta hiposódica

$P < .05$

Cambios histológicos.

En la figura 4 se muestran los resultados de esclerosis glomerular. Aunque hay disminución en el porcentaje de glomérulos esclerosados en los animales que ingirieron espirolactona y la combinación con losartán en el grupo de dieta baja en sal, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los datos sugieren que el uso de espirolactona sola aumenta la esclerosis cuando se ingiere una dieta normal en sal. En el caso del losartán no hubo ningún impacto con la dieta, ya que ambos grupos la esclerosis fue similar.

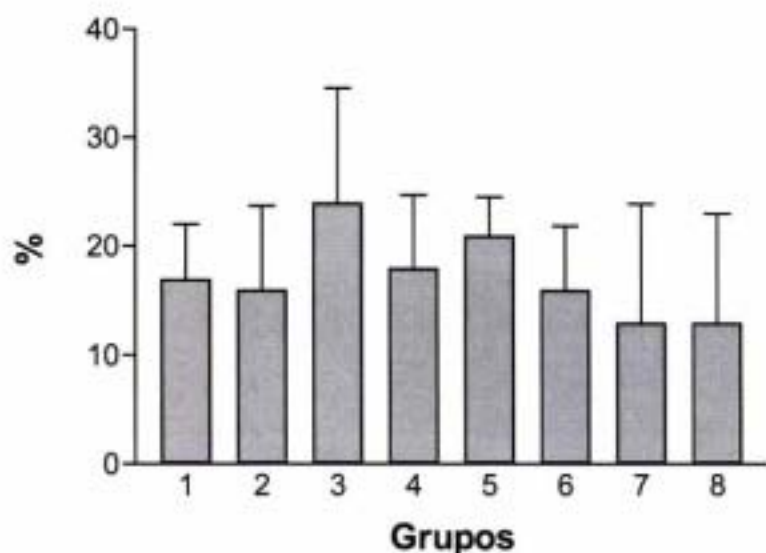


Figura 4.- Porcentaje de glomérulos esclerosados por grupo de estudio. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espironolactona + dieta normal

4= losartán + espironolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espironolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espironolactona + dieta hiposódica

P = NS

En la figura 5 y en el anexo 1 se muestran los datos y las imágenes obtenidas de la fibrosis intersticial. La dieta atenuó significativamente la aparición de fibrosis. Es importante hacer notar que aún con dieta normal, la combinación de los medicamentos disminuye en forma significativa las alteraciones tubulointersticiales (grupo 4). Los medicamentos aislados tuvieron poco impacto con la dieta normal, pero con la dieta baja en sal la espironolactona tuvo menor cantidad de fibrosis. Esta cantidad es comparable a la obtenida cuando se usa la combinación de los medicamentos.

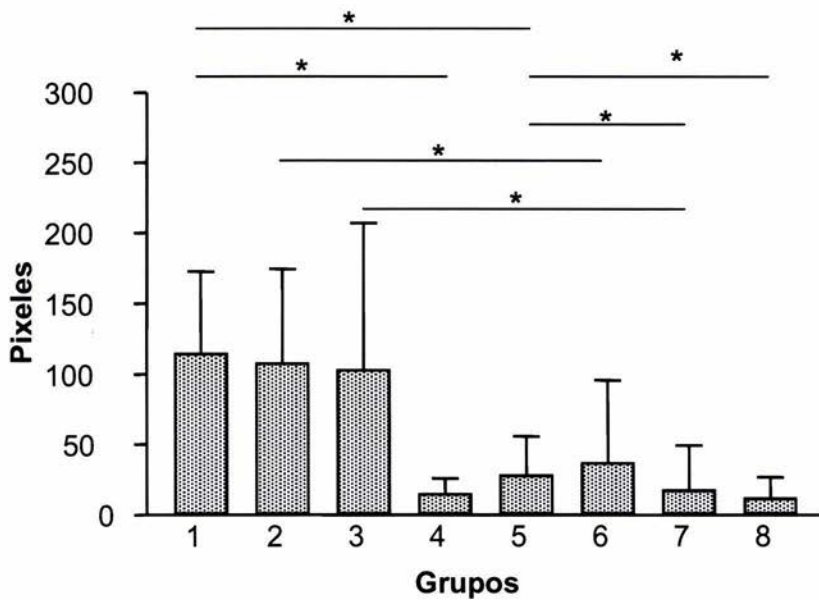


Figura 5.- Fibrosis intersticial (percentil) por grupo de estudio. Se observa en beneficio de la dieta hiposódica sobre la cantidad de fibrosis intersticial en 10 campos no cruzados de tejido. La combinación de los fármacos disminuye la cantidad de fibrosis independientemente de la dieta.

1= control con dieta normal

5= control con dieta hiposódica

2= losartán + dieta normal

6= losartán + dieta hiposódica

3= espironolactona + dieta normal

7= espironolactona + dieta hiposódica

4= losartán + espironolactona + dieta normal

8= losartán + espironolactona + dieta hiposódica

* $P < .05$

Factor de crecimiento y citocina:

En la figura 6 y en el anexo 2 se encuentran los resultados de la inmunohistoquímica de TGF β 1. Los efectos de la dieta y la combinación de medicamentos son evidentes. Considerando los medicamentos en aplicación única, sólo la espironolactona tuvo efecto en los animales con dieta hiposódica. En la figura 7 y en el anexo 3 se encuentran los resultados en TNF α . Los efectos de la

dieta y los medicamentos fueron similares a los observados en TGFβ1, aunque la diferencia estadística se presentó con el uso de espironolactona.

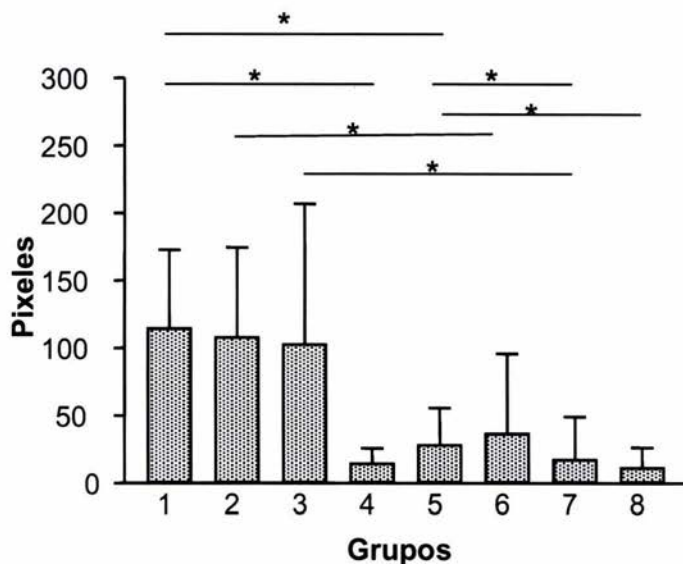


Figura 6.- Expresión tisular de TGFβ por inmunohistoquímica (promedios ± DE) por grupo de estudio. La dieta hiposódica disminuyó la expresión de esta citocina. La combinación de los fármacos disminuyó en forma importante la expresión del mismo, independientemente de la dieta.

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espironolactona + dieta normal

4= losartán + espironolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espironolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espironolactona + dieta hiposódica

* P < .05

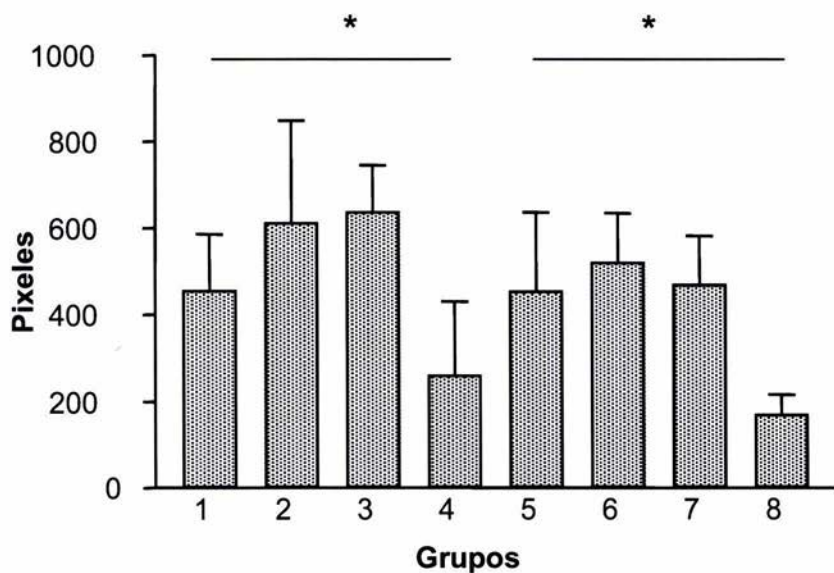


Figura 7.- Expresión tisular del $TNF\alpha$ por inmunohistoquímica (promedio \pm DE) por grupo de estudio. Al igual que con $TGF\beta$, se observa una disminución no significativa de la expresión de esta citocina en los animales que recibieron dieta baja en sal. Sin embargo, las diferencias significativas están dadas por el uso de losartán y espirolactona juntos.

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espirolactona + dieta normal

4= losartán + espirolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espirolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espirolactona + dieta hiposódica

* $P < .05$

En las figuras 8 y 9 se muestran las correlaciones entre las dos citocinas y la fibrosis intersticial. En los dos casos la correlación fue positiva y significativa. Sin embargo, la correlación de fibrosis fue más importante con $TGF\beta 1$ ($R^2 = 0.421$; $p < .05$) que con $TNF\alpha$ ($R^2 = 0.227$; $p < .05$)

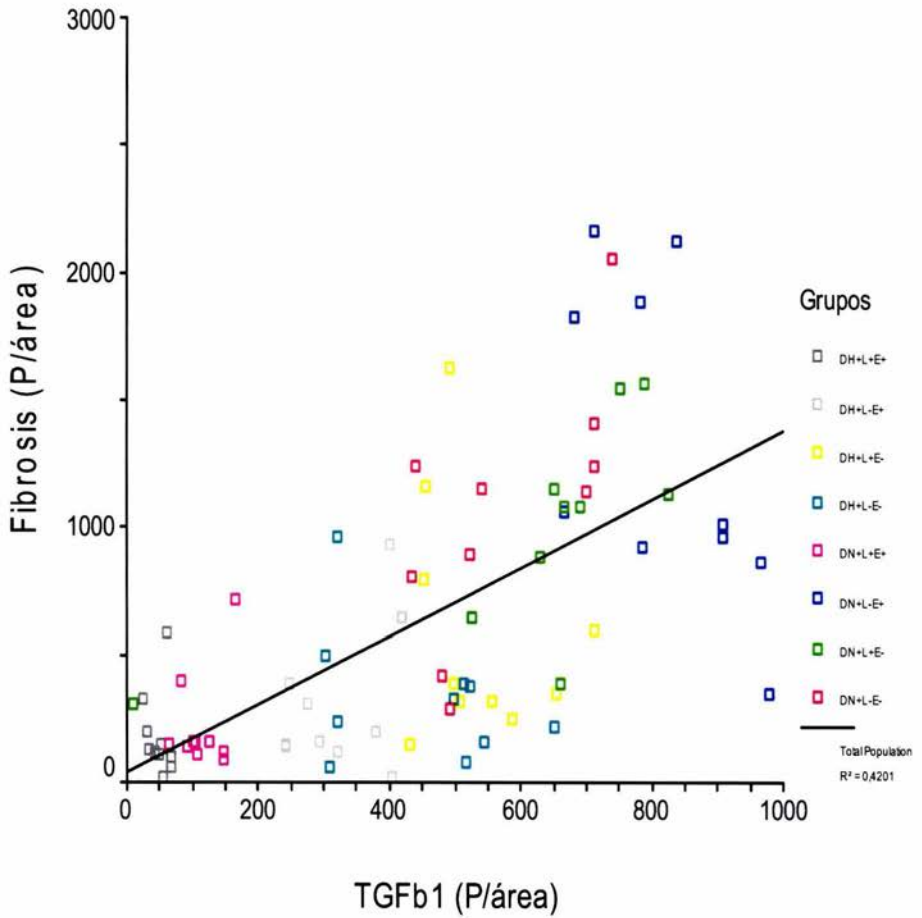


Figura 8. Correlación entre la expresión tisular del TGFβ-1 con la fibrosis intersticial por grupo de estudio.

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espirolactona + dieta normal

4= losartán + espirolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espirolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espirolactona + dieta hiposódica

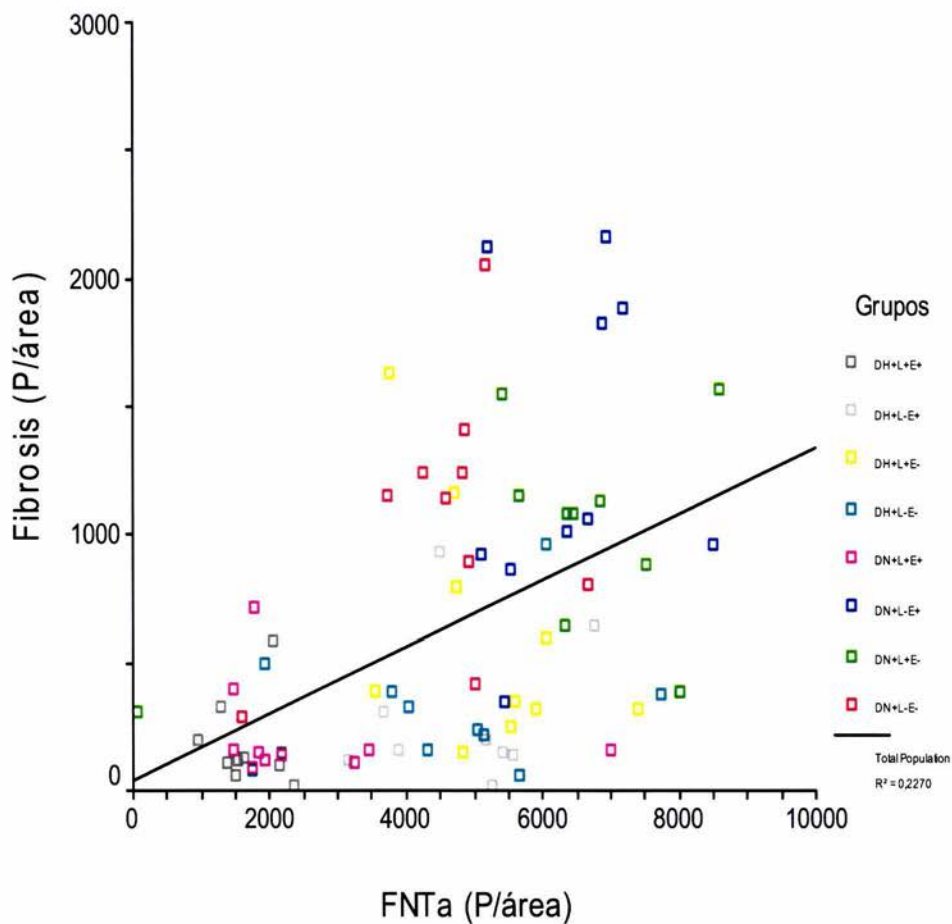


Figura 8. Correlación entre la expresión tisular de $TNF\ \alpha$ con la fibrosis intersticial por grupo de estudio.

1= control con dieta normal

2= losartán + dieta normal

3= espironolactona + dieta normal

4= losartán + espironolactona + dieta normal

5= control con dieta hiposódica

6= losartán + dieta hiposódica

7= espironolactona + dieta hiposódica

8= losartán + espironolactona + dieta hiposódica

Discusión

Los resultados del presente estudio muestran que la proteinuria, la expresión del TGF β -1 y del TNF α disminuyen con el uso combinado de losartán y espironolactona independientemente de la dieta.

Un número importante de estudios clínicos y experimentales han puesto en evidencia la importancia del SRA en la progresión del daño renal (41-51). Con mucho, estos estudios se han enfocado al efecto directo de Ang II o bien al efecto farmacológico de IECA o de ARA II. Sólo recientemente se han aportado datos de la participación de la aldosterona en la generación de daño cardiovascular y renal (57, 58, 62, 64, 65, 72).

Los datos que se presentan en este estudio muestran que la nefrectomía 5/6 provocó elevación de la ARP que se acentuó con la dieta hiposódica y la administración de losartán. Los niveles séricos de la aldosterona también se encontraron elevados y al igual que con ARP, la dieta hiposódica indujo incrementos adicionales que no fueron suprimidos completamente con la administración de losartán. Aunque en la literatura las evidencias en humanos sugieren que el SRA-aldosterona está activado (7, 9), se acepta que la actividad se manifiesta *in situ* (23), puesto que la ARP y la Ang II circulante por lo general se encuentran normales o disminuidas y la ingestión alta de sodio las reduce aún más (60). A diferencia de lo que ocurre con ARP y Ang II, la aldosterona plasmática se encuentra elevada. Ésta elevación es notoria cuando la tasa de filtración glomerular desciende por debajo de los 70 ml/min en sujetos humanos y aunque disminuye por efecto de IECA o ARA II, la supresión no es completa (64). Ésta elevación de la aldosterona también se ha descrito en el modelo de ablación renal en ratas. Este incremento parece depender de mayor síntesis más que del descenso en el catabolismo de la aldosterona debido a que se ha encontrado hipertrofia de la zona glomerulosa en ratas con nefrectomía subtotal (58).

El efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la Dcr y sobre los cambios histológicos estuvo significativamente influenciado por la ingestión de sodio. Los animales que recibieron dieta normal, losartán, espironolactona y la combinación, tuvieron efectos similares en la concentración de CrS, pero el volumen urinario y la Dcr fueron más altos sólo en los animales que recibieron

espironolactona sola o en combinación con losartán. El resultado es explicable por el efecto diurético de la espironolactona.

La dieta hiposódica no tuvo efectos importantes en la CrS y tampoco afectó el volumen urinario. En cambio, los animales con menor ingestión de sal hubo mayor Dcr cuando no hubo tratamiento farmacológico adicional o cuando éste fue con losartán. Por otra parte el efecto protector de losartán sólo fue evidente en el grupo de animales que recibió dieta baja en sodio. Comparativamente, los animales con dieta baja en sodio más losartán tuvieron menor Dcr que las ratas con sólo dieta hiposódica. Estos resultados son congruentes con información previa disponible. En diversos estudios se ha señalado que el sodio interviene de manera directa en la progresión del daño renal ya sea por la presencia de hipertensión sistémica o por acción directa (76). Particularmente se ha mostrado en ratas Dahl sensibles a sal que las dietas altas en sodio pueden causar fibrosis perivascular aún en ausencia de hipertensión (77). La menor Dcr en las ratas con dieta hiposódica que recibieron losartán es compatible con hallazgos clínicos y experimentales que indican menor resistencia de las arteriolas eferentes cuando se elimina el efecto de Ang II y se disminuye la hipertensión glomerular, particularmente cuando este sistema está estimulado por la dieta hiposódica. En los grupos de animales con dieta hiposódica, la espironolactona sola no afectó el volumen urinario ni la Dcr, el efecto fue evidente sólo en combinación con losartán. La contracción del volumen extracelular secundario a la restricción en la ingestión de sodio atenúa el efecto diurético. Los cambios en la Dcr inducidos por la combinación de losartán + espironolactona son explicables no sólo por cambios estructurales y efectos no hemodinámicos como se discute más adelante.

Los resultados de la albuminuria son complejos. Están bajo la influencia de los efectos hemodinámicos y fibrogénicos de los tratamientos utilizados, que pueden ser divergentes. En los animales con dieta normal en sal, el grupo de animales con losartán tuvo un incremento paradójico de la proteinuria no explicable por mayor Dcr o volumen urinario. En estos grupos de dieta normal, la espironolactona no tuvo efecto. En los animales con dieta hiposódica y por tanto con mayor actividad del SRA-aldosterona, el losartán solo o combinado tuvo un notable efecto en la albuminuria, no así la espironolactona.

Ninguno de los tratamientos tuvo efecto en la esclerosis glomerular. Sin embargo, la combinación de losartán + espironolactona disminuyó significativamente el porcentaje de glomérulos esclerosados en los animales con dieta normal. El efecto protector de la dieta hiposódica fue evidente y oscureció la acción de los tratamientos farmacológicos.

Son conocidos los efectos protectores que se obtienen al utilizar medidas que inhiben las acciones hemodinámicas y estimulantes de la esclerosis glomerular e intersticial de Ang II (78). Sin embargo, no se conocen los de la aldosterona. Es aún causa de controversia si la aldosterona actúa en forma independiente de sus efectos sobre la presión arterial sistémica, o si tiene efecto directo. Existen pruebas de que el efecto es directo. Se han detectado receptores de mineralocorticoides en varios tipos de células renales como las células de músculo liso vascular, células mesangiales, tubulares proximales y distales. Las acciones incluyen tanto las genómicas como las no genómicas (60, 76). Es interesante señalar que en modelos de ablación renal más adrenalectomía y suplementación con mineralocorticoides la hipertensión, la albuminuria y el daño estructural renal fueron menores, lo que sugiere el efecto directo de la aldosterona (60).

Los datos presentados indican que en el mecanismo renoprotector de la dieta hiposódica, el losartán y la espironolactona intervienen citocinas como el TGF β y el TNF α . En los animales con dieta normal, sólo la combinación de losartán y espironolactona disminuyó la expresión tisular del TGF β y del TNF α . La dieta hiposódica sola disminuyó la expresión de los factores y este efecto se potenció con la combinación de fármacos. La correlación entre la expresión del TGF β y del TNF α y la fibrosis sugiere la participación de éstos como mediadores del efecto de la aldosterona.

Existen datos sugestivos de que el efecto de la aldosterona en la fibrosis renal está mediado por factores como el TGF β , el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o la endotelina, pero la presencia de efectos hemodinámicos dificulta la interpretación de los resultados (16). Entre los mecanismos profibróticos conocidos, la aldosterona incrementa la expresión de otros componentes del SRA y la expresión de PAI-1 (28). En estudios agudos se ha encontrado que la administración de aldosterona incrementa al doble la expresión del TGF β sin modificar la presión arterial (26) En otros modelos de fibrosis (79) como por ejemplo en la nefrotoxicidad por ciclosporina A, se ha encontrado que el bloqueo farmacológico de aldosterona se asocia a menor

expresión del TGF β y menor fibrosis. En ratones deficientes de integrina se ha encontrado que esta molécula es necesaria para la activación del TGF β , pero se ha sugerido la existencia de un mecanismo alternativo de inducción de fibrosis diferente al del TGF β también dependiente de Ang II. Esta última es probablemente la explicación de porqué la combinación de tratamientos utilizados fue la más efectiva.

La participación del TNF α en la progresión del daño renal ha sido previamente documentada (16, 35). En los datos aquí presentados, el TGF β y el TNF α tienen correlación en su expresión, pero no es posible establecer la forma en que interactúan. Se ha establecido que el TGF β incrementa la expresión del TNF α (18, 26). Sin embargo, también hay información que sustenta el efecto directo de la aldosterona u otros mineralocorticoides en la expresión del TNF α . No tenemos información acerca del efecto prioritario de alguno de estos factores en el daño inducido por aldosterona.

CONCLUSIÓN: los resultados muestran que la espironolactona, el losartán y la dieta hiposódica tuvieron un efecto protector en la progresión del daño renal y fibrosis en el modelo de nefrectomía 5/6; los tratamientos tuvieron además un efecto sinérgico importante. El efecto protector estuvo asociado a la disminución en la expresión del TGF β y del TNF α en el intersticio renal.

Referencias:

- 1.- Fogo A. Glomerular hypertension, abnormal glomerular growth and progression of renal diseases. *Kidney Int* 2000;57(Suppl 75):S-15-S-21
- 2.- Anderson S; Meyer TW; Rennke HG, et al. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 1985;76:612-619
- 3.- Fogo A.; Ichikawa I. Glomerular growth promoter- the common channel to glomerular sclerosis. *Semin Nephrol* 1990;4:213-225
- 4.- Blaifox. Evaluation of renal function and disease with radionuclides: the upper urinary tract. 2a. edición 1989:12-59
- 5.- Rodríguez-Iturbe B; Herrera J; Garcia R. Response to acute protein load in kidney donors and in apparently normal postacute glomerulonephritis patients: evidence for glomerular hyperfiltration. *Lancet* 1985;31:461-464.
- 6.- Ruggenenti P; Remuzzi G The role of protein traffic in the progression of renal diseases. *Annu Rev Med* 2000;51:315-327
- 7.- Rosenberg ME; Smith LJ; Correa-Roter R; et al. The paradox of the renin-angiotensin system in chronic renal disease. *Kidney Int* 1994;45:403-410.
- 8.- Brenner BM; Meyer TW; Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease. The role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 1982; 307:652-659
- 9.- Hakim RM; Goldzer RC; Brenner BM. Hypertension and proteinuria: long-term sequelae of uninephrectomy in humans. *Kidney Int* 1984;25:930-936
- 10.- Hostetter TH; Olson JL; Rennke HG; et al: Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981;241:F85-F93.
- 11.- Giuseppe Remuzzi, Piero Ruggenenti, Norberto Perico. Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin-system inhibition. *Ann Intern Med* 2003;136:604-615
- 12.- Novick AC; Gephardt G; Guz B; et al: Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney. *N Engl J Med* 1991;325:1058-1062

- 13.- Smith S; Lapard P; Grantham J. Long-term effect of uninephrectomy on serum creatinine concentration and arterial blood pressure. *Am J Kidney Dis* 1985;6:143-148
- 14.- Fontino S. The solitary kidney: a model of chronic hyperfiltration in humans. *Am J Kidney Dis* 1989;13:88-98
- 15.- Amgad E, El-Agroundy, Nabil A, Asan, et al. Effect of angiotensin II receptor blocker on plasma levels of TGF- β 1 and interstitial fibrosis in hypertensive kidney transplant patients. *Am J Nephrol* 2003;23:300-306
- 16.- Fabiola Terzi, Martine Burtin and Gérard Friedlander. Early molecular mechanisms in the progression of renal failure: role of growth factors and protooncogenes. *Kidney Int* 1998;53(supl 65):568-573.
- 17.- Klahr S. Mechanisms of progression of chronic renal damage. *J Nephrol* 1999;12(Supl 2):S53-S62.
- 18.- Klahr Saulo, Morrissey Jeremiah. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int* 2000;57(suppl 75):S7-S14.
- 19.- Akitoshi A; Tetsuya K; Yoko H; et al. Effect of dietary protein intake on renal function in humans. *Kidney Int* 1989;36(Suppl 27):S-64-S67.
- 20.- Bernardi A; Biasia F; Piva M; et all. Dietary protein intake and nutritional status in patients with renal transplant. *Clin Nephrol* 2000;53:3-5
- 21.- Rodriguez A; Martin A; Oterino JA; et all. Renal function in compensated hepatic cirrhosis: effects of an amino acid infusion and relationship with nitric acid. *Dig Dis* 1999;17:235-240.
- 22.- Fern RJ; Yesko CM; Thornhill BA; et all. Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *J Clin Invest* 1999;103:39-46
- 23.- Nguyen G; Delarue F; Berrou J et all. Specific receptor binding of rennin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator-1 antigen. *Kidney Int* 1996;50:1897-1903.
- 24.- Border WA; Noble NA. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1996;31:181-188
- 25 (21) .- Border WA; Noble NA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-1292.

- 26.- Noble NA; Border WA: Angiotensin II in renal fibrosis: should TGF- β rather than blood pressure be the therapeutic target?. *Sem Nephrol* 1997;17:455-466.
- 27.- Peters H; Border WA; Noble NA. Targeting TGF- β overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 1998;54:1570-1580.
- 28.- Henry T.Yu. Progression of chronic renal failure. *Arch Intern Med* 2003;163:1417-1429
- 29.- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle hypertrophy. Autocrine transforming growth factor beta expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992;90:451-461
- 30.- Coimbra TM, Carvalho J, Faltoni A, et al. Transforming growth factor-beta production during the development of renal fibrosis in rats with subtotal renal ablation. *Int J Exp Pathol* 1996; 77:167-73.
- 31.-Junaid A, Rosenberg ME, Hosteter TH. Interaction of angiotensin II and TGF-beta 1 in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:154
- 32.- Sutarja PM, Ohebshalom M, McCaffrey TA, et al. Transforming growth factor-beta receptor types I and II are expressed in renal tubules and are increased after chronic unilateral ureteral obstruction. *Life Sci* 1998;62:1965-1972
- 33.- Muchaneta-Kubara EC, Sayed-Ahmed N, el Nahas AM. Subtotal nephrectomy: a mosaic of growth factors. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:320-327
- 34.- Russell F, Husted, Rita D, Sigmund and John B. Stokes. Mechanisms of inactivation of the action of aldosterone on collecting duct by TGF- β . *Am J Physiol. Renal Physiol* 2000;278:F425-F433.
- 35.- Wolf G, Arbeire S, Thaiss F. TNF alpha induces expression of chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int* 1993;44:795-804
- 36.- Guo G, Morrissey J, McCracken R, et al. Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha to the development of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F777-F785
- 37.- Egido J, Gómez-Chiarri M, Ortiz A, et al. Role of tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of glomerular diseases. *Kidney Int* 1993;43(suppl 39):S59-S64

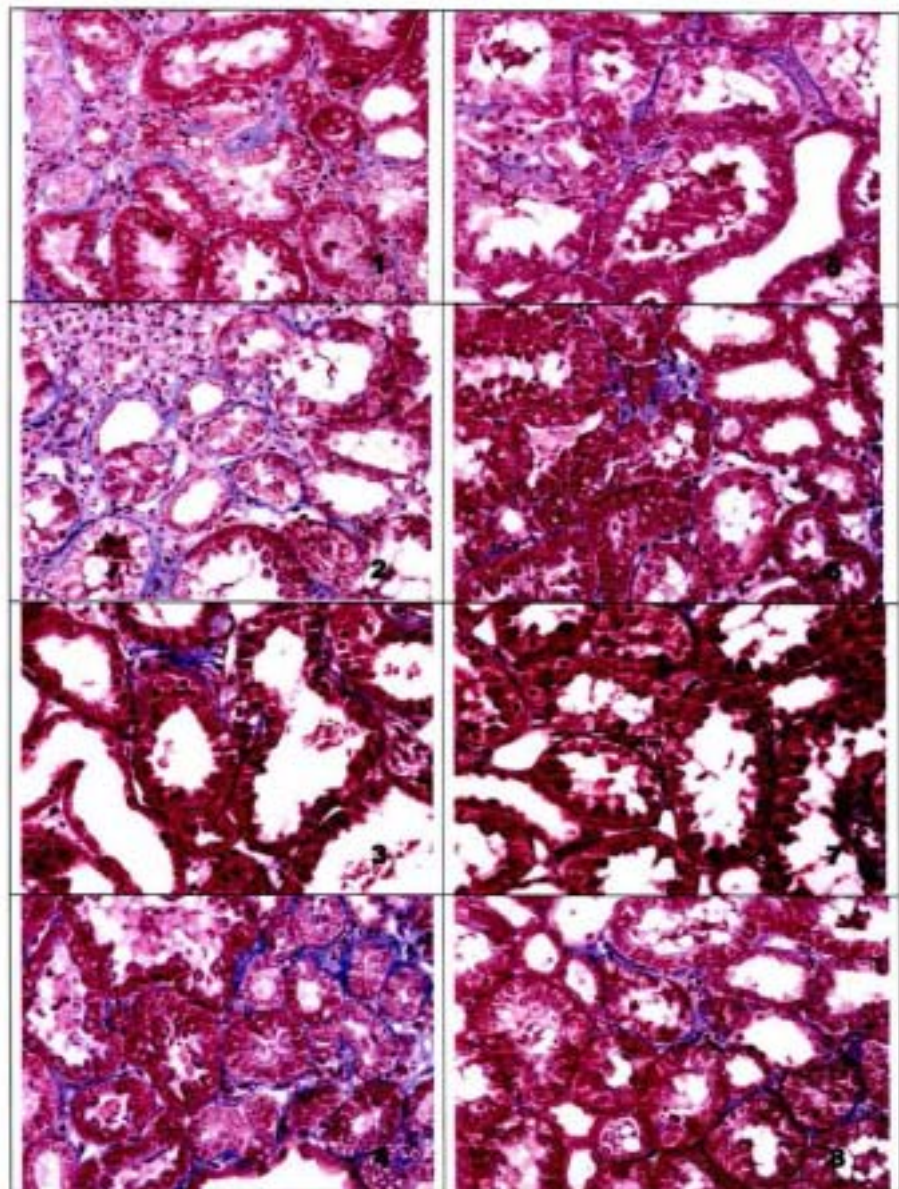
- 38.- Wuthrich RP, Glimcher LH, Yui MA, et al. MHC class II antigen presentation and tumor necrosis factor in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 1990;37:783-792.
- 39.- Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, et al. The expression of mRNA for tumor necrosis factor alpha increases in the obstructed kidney of rats soon after unilateral ureteral ligation. *Nephrology* 1996;2:161-166
- 40.- Wolf G, Aberle S, Thaiss F, et al. TNF α induces expresión of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int* 1993;44:795-804.
- 41.- Linz W, Heitsch H, Scholkens BA, et al. Long-term angiotensin II type 1 receptor blockade with losartan doubles lifespan of hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35:908-913.
- 42.- Oparil S. Newly emerging pharmacologic differences in angiotensin II receptor blockers. *Am J Hypertens* 2000;31(1 Pt 2):18S-24S
- 43.- Burnier M; Rocha-Ramel F; Brunner HR. Renal effects of angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects. *Kidney Int* 1996;49:1787-1790
- 44.- Brunier M; Hagman M; Nussberger J; et al. Short-term and sustained renal effects of angiotensin II receptor blockade in healthy subjects. *Hypertension* 1995;26:602-609
- 45.- Maarten W, Taal; Barry M. Brenner. Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 2000;57:1803-1817
- 46.- McInnes GT. Angiotensin II antagonism in clinical practice: experience with valsartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33(suppl 1):S29-S32
- 47.- Plum J; Buntan B; Nmeth R; et al. Effects of the angiotensin II antagonist valsartan on blood pressure, proteinuria and renal hemodynamics in patients with chronic renal failure and hypertension. *J Am Nephrol* 1998;9:2223-2234
- 48.- Gajdos M; Krivosikova Z; Sebakova K; et al. Enalapril inhibits growth and proliferation of various tissues in rat normotensive four-sixths kidney ablation nephropathy . *Kidney Blood Press Res* 2000;23:106-112
- 49.- Lewis EJ; Hunsicker LG; Bain RP, et al. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1993;329:1456-1462

- 50.- Maschio GLG; Alberti D; Janin G; et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 1996;334:939–945.
- 51.- Andrea Remuzzi; Stefania Puntorier; Cristina Battaglia et al. Angiotensin converting enzyme inhibition ameliorates glomerular filtration of macromolecules and water and lessens glomerular injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85:541–549.
- 52.- Sharma K, Eltayeb BO, McGowan TA, et al. Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor- β 1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients. *Am J Kid Dis* 1999;34:818-823.
- 53.- Shin GT, Kim SJ, Ma KA, et al. ACE inhibitors attenuate expression of renal transforming-growth factor- β 1 in humans. *Am J Kidney Dis* 2000;36:894-902
- 54.- Ji Ma, Taiji Matsusaka, Hsichun Yang, et al. Local actions of endogenous angiotensin II injured glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1268-1276
- 55.- PDR Electronic Library™ 2000.
- 56.- Bertram Pitt; Faiez Zannad; Willem J. Remme; et al. The Effect of Spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *New Eng J Med* 1999;2:341-350
- 57.- Areeg H; El-Gharbawy; Vishwanatha S. Nadig; et al. Arterial pressure, left ventricular mass and aldosterone in essential hypertension. *Hypertension* 2001;37:845–850.
- 58.- Greene EL; Kren SK; Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney. *J Clin Invest* 1996;98:1063–1068.
- 59.- Barr CS; Lang CC; Hanson J; et al. Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995;76:1259-65.
- 60.- Honathan S. Williams , Gordon H. Williams. 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2364-2372.
- 61.- Robert G. Dluhy, Gordon H. Williams. Aldosterone – villain or bystander ?. *N Engl J Med* 2004;351:33-34
- 62.- Struthers AD. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail* 1996;2:47-54.

- 63.-Epstein Murray. Aldosterone as a mediator of progressive renal disease: pathogenetic and clinical implications. *Am J Kidney Dis* 2001;37:677-688
- 64.- Hené RJ; Boer; P. Koomans; et al. Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease. *Kidney Int* 1982;21:98-101.
- 65.- Berl T; Katz FH; Henrich WL, et al. Role of aldosterone in the control of sodium excretion in patients with advanced chronic renal failure. *Kidney Int* 1978;14:228-235.
- 66.- Duprez DA; De Buyzere ML; Rietzschel ER; et al. Inverse relationship between aldosterone and large artery compliance in chronically treated heart failure patients. *Eur Heart J* 1998;19:1371-1378.
- 67.- MacFadyen RJ; Barr CS; Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997;35:30-34.
- 68.- Fitzgibbon WR; Greene EL; Grewal J; et al. Resistance to remnant nephropathy in the wistar – furth rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999;10:814-822.
- 69.- Rocha R; Chander PN; Zuckerman A, et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke prone hypertensive rat. *Hypertension* 1999;33:232-237.
- 70.- Amato D, Paniagua R. Prevalencia de insuficiencia renal crónica en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social. En: *Las múltiples facetas de la investigación en salud: Proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social*. García Peña MC, Reyes Morales H, Viniestra Velázquez L (Eds) 2001, Sestante, México, D. F., pp 153-170.
- 71.- Rocha R; Chander PN; Khanna K; et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998;31:451-458.
- 72.- Nishimura M; Uzu T; Fujii T; et al. Cardiovascular complications in patients with primary aldosteronism. *Am J Kidney Dis* 1999;33:261-266.
- 73.- Brilla CG; Pick R; Tan LB; et al. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990;67:1355-1364.

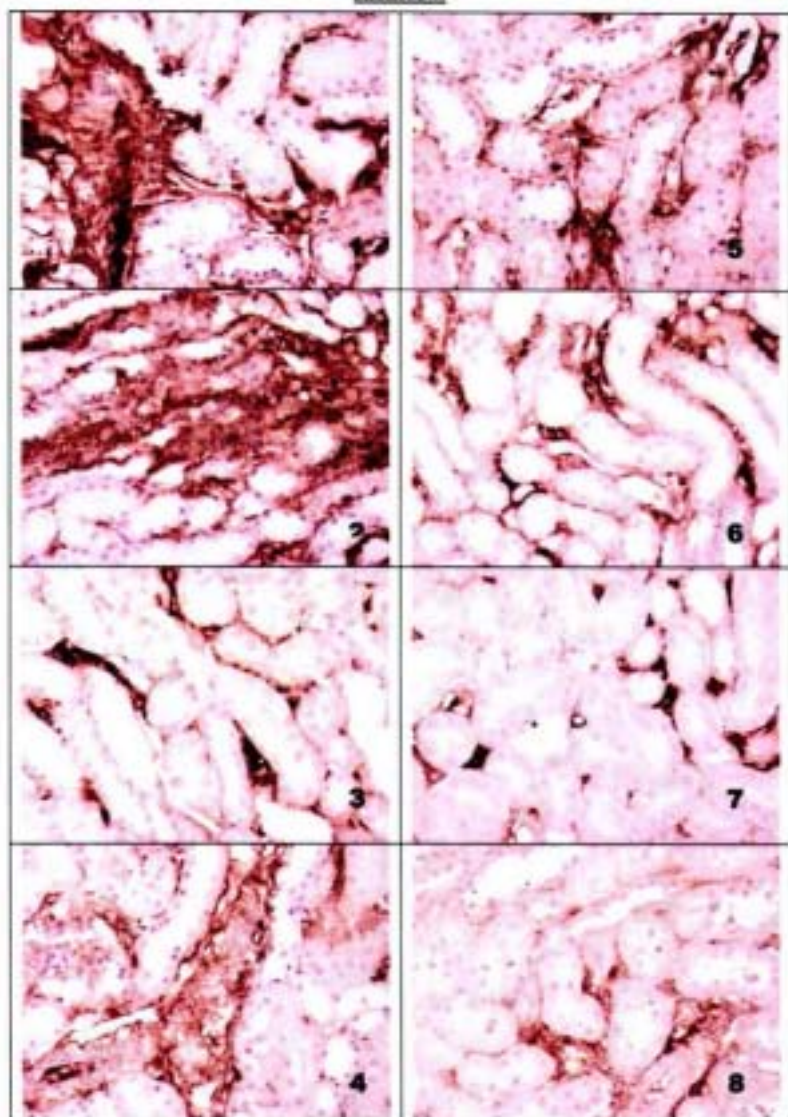
- 74.- Weber KT; Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin- aldosterone system. *Circulation* 1991;83:1849-1865.
- 75.- Wang W. Chronic administration of aldosterone depresses baroreceptor reflex function in the dog. *Hypertension* 1994;24:571-575.
- 76.- Blasí Eileen R; Rocha Ricardo, Rudolph Amy E. Aldosterone salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003;63:1791-1800.
- 77.- Jeroen P. Kooman, Frank M van der Sande and Karel M.L. Leunissen. Sodium, blood pressure and cardiovascular pathology: is it all volaemia?. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1046-1049.
- 78.- R.E. Gilbert, H. Krunt, J. Wilkinson-Berka et al. The rennin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabet Med* 2003;20:607-621.
- 79.- Amgad E. el-Agroundy, Nabil A. Asan, Mohamed A. Foda, et al. Effect of angiotensin II receptor blocker on plasma levels of TGF- β -1 and interstitial fibrosis in hypertensive kidney transplant patients. *Am J Nephrol* 2003;23:300-306.
- 80.- Edilia Tapia, Martha Franco, Laura G. Sánchez-Lozada et al. Mycophenolate mofetil prevents arteriopathy and renal injury in subtotal ablation despite persistent hipertensión. *Kidney Int* 2003;63:994-1002.

ANEXO 1



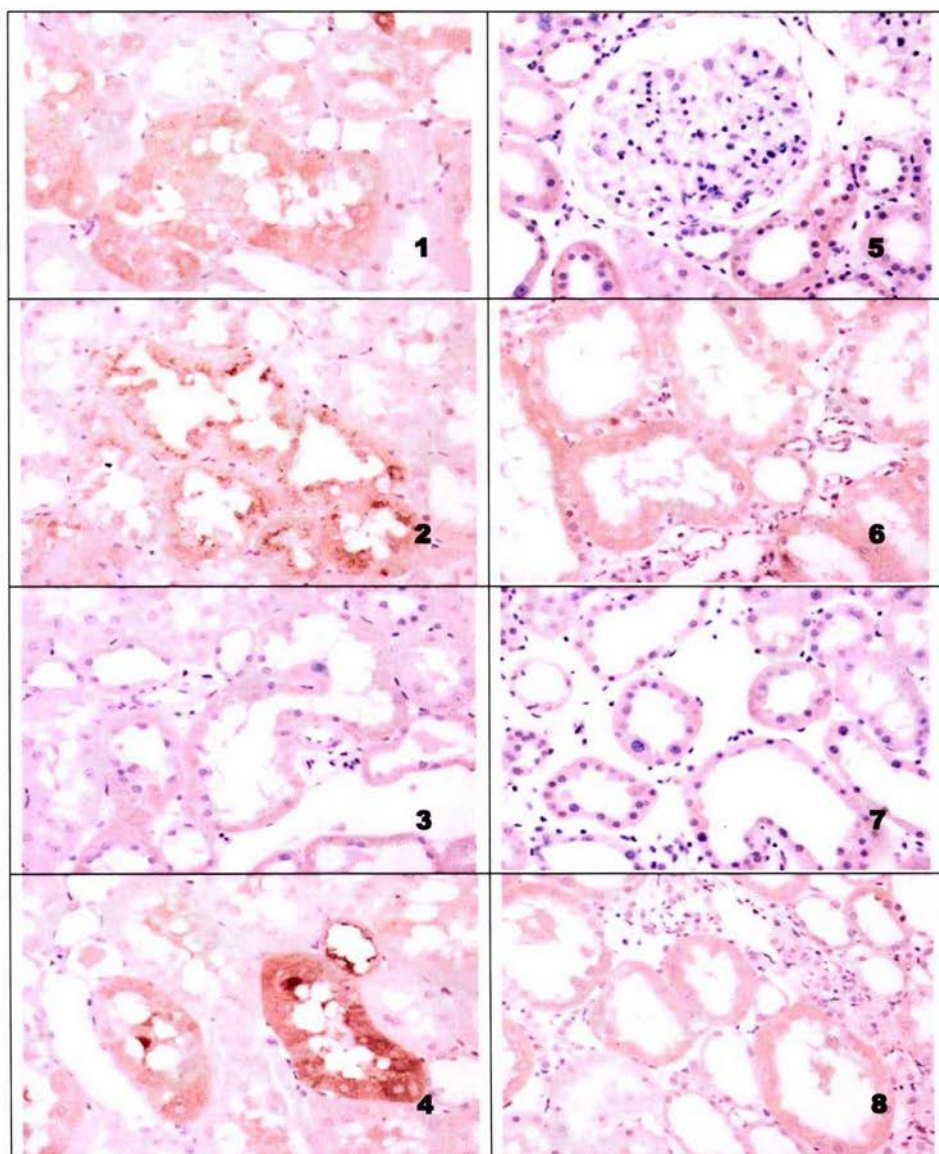
Fibrosis intersticial por grupo de estudio (1-8), teñida con tricrómico de Masson a 40 x (400 aumentos).

ANEXO 2



Expresión de TGF β -1 por grupo de estudio en el intersticio renal (1-8) con técnica de inmunoperoxidasa indirecta a un aumento de 40x (400 aumentos).

ANEXO 3



Expresión de TNF α por grupo de estudio (1-8) principalmente en los túbulos renales. Técnica de inmunoperoxidada indirecta, 40 x (400 aumentos)