



## Moduladores de fibrosis y apoptosis asociados a la disponibilidad de ON: Efecto de rosuvastatina en nefropatía obstructiva neonatal

 16 min.



Estudios básicos y clínicos sugieren que el uso de estatinas puede contribuir a disminuir la fibrosis e inflamación en enfermedades renales. Específicamente la

rosuvastatina, estatina de última generación, podría tener potencial terapéutico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar a los principales genes moduladores de apoptosis y fibrosis durante la nefropatía obstructiva neonatal murina a fin de establecer mecanismos renoprotectores relacionados al uso de Ros.



Luciana Mazzei, Isabel Mercedes García y Walter Manucha  
Área de Fisiología Patológica,  
Departamento de Patología, Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Cuyo, IMBECU-CONICET, Mendoza,

PIPETAS, QUIMICA CLINICA, TESTS RAPIDOS

REACTIVOS LIQUIDOS ESTABLES PARA QUIMICA CLINICA



Diagnosics

www.human.de

Durante más de 35 años, HUMAN ha servido al sector de asistencia sanitaria. HUMAN desarrolla y fabrica en Alemania productos de diagnóstico de laboratorio para el mercado mundial. El nombre HUMAN significa calidad y asistencia técnica en más de 160 países.



ORIGEN ALEMANIA  
LA MEJOR RELACION COSTO/BENEFICIO



  
**BG Analizadores**

**BG ANALIZADORES S.A.**  
Aráoz 86 | C1414DPB | C. A. B. A. | Argentina  
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876  
Fax: 54-11 4856-5852  
www.bganalizadores.com.ar  
bga@bganalizadores.com.ar

Argentina



E-mail:  
wmanucha@fcm.uncu.edu.ar



La enfermedad renal crónica, definida como la reducción progresiva e irreversible del filtrado glomerular, tiene una elevada incidencia a nivel mundial(1) y entre los desórdenes renales más complejos que la producen se encuentra la nefropatía obstructiva. Esta enfermedad resulta más nociva en pacientes pediátricos que en adultos y es frecuente en los primeros debido a fallas congénitas del tracto urinario, sobre todo a nivel de la unión ureteropélvica, e involucra respuestas hemodinámicas así como hidrodinámicas, las que conducen a cambios celulares en todos los compartimientos renales, fibrosis intersticial, apoptosis y atrofia tubular(2). Como consecuencia, se produce una reducción del flujo plasmático renal y del

índice de filtración glomerular con significativos cambios en la función tubular renal. Estos eventos provocan alteraciones en la capacidad de concentrar la orina(3) así como pérdida de la capacidad de acidificarla(4).

Estudios básicos y clínicos sugieren que el uso de estatinas (inhibidores de la HMCoA reductasa), podrían contribuir a disminuir la fibrosis e inflamación(5). Al respecto, se ha demostrado que rosuvastatina (Ros), una estatina de última generación, podría tener utilidad potencial como opción terapéutica en enfermedades renales que cursarían con inflamación y fibrosis. La relación entre el uso de estatinas y la expresión de Hsp70 (una de las principales proteínas de respuesta al shock térmico), podría ser útil para sugerir efectos antioxidantes de estos fármacos (conocidos como pleiotrópicos). Ros restaura la biodisponibilidad del óxido nítrico mediante la expresión de la óxido nítrico sintasa isoforma endotelial (ONSe), entre otros mecanismos, previniendo el estrés oxidativo y la muerte celular durante la obstrucción.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar a los principales genes moduladores de apoptosis y fibrosis durante la nefropatía obstructiva neonatal murina a fin de establecer mecanismos renoprotectores relacionados al uso de Ros.

#### Material y Metodología

Ratas Wistar neonatas de 48 hs de vida fueron intervenidas quirúrgicamente a fin de practicarles obstrucción ureteral unilateral (grupo experimental). Además, se estableció un grupo control sin la obstrucción. Ambos grupos fueron subdivididos en tratadas o no tratadas con Ros (10mg / kg por día) vía oral durante 14 días. Estableciéndose 4 grupos de trabajo: controles, controles con Ros, obstruidas y obstruidas con Ros. Posteriormente, se procedió a nefrectomizar y procesar las cortezas renales para determinar por RT-PCR las expresiones de genes como óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), factor promotor génico de chaperonas (hsf1), proteína de shock térmico (hsp70), bax, bcl2, wt1, p53, snail, proteína morfogénica

# CUANDO EL CUERPO NO LO RECONOCE COMO PROPIO, BIOARS LO DETECTA



Soluciones integrales para el diagnóstico  
de enfermedades autoinmunes



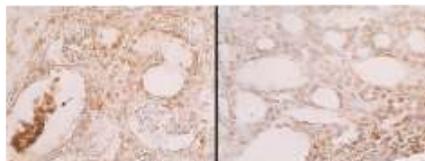
del hueso (bmp7), caderina E, factor transformador de crecimiento (tgf- ) y factor de necrosis tumoral (tnf- ).

## Resultados y Discusión

El análisis de nuestro laboratorio demostró significativos resultados cuando analizamos mediante la técnica de TUNEL al segmento cortical sometido a obstrucción y posterior tratamiento con rosuvastatina. Determinamos en cortes de cortezas renales de ratas neonatas obstruidas de 14 días, un número elevado de células positivas con intensa marca molecular de apoptosis en células del epitelio tubular. Por otro lado, animales obstruidos tratados oralmente con rosuvastatina, demostraron un significativo menor número de células positivas (Figura 1).



Figura 1: Dilatación tubular y apoptosis manifiesta en corteza de animales obstruidos durante 14 días (A). Rosuvastatina causó una sensible disminución en la apoptosis sin cambios en dilatación tubular (B)



Originariamente descrita como una droga con efecto hipolipemiante, la rosuvastatina a razón de 10 mg/Kg por día no produjo una reducción lipídica significativa en ratas neonatas, sugiriendo que la disminución en la injuria vascular y tubulointerstitial se asociaría a un mecanismo diferente al de la inhibición de la síntesis de colesterol(6). (Figura 2)

La activación de las RhoGTPasas es un paso clave en la transición epitelial mesenquimatosa (TEM) de las células tubulares renales, lo cuál contribuye con la fibrosis intersticial(7). Además, ha sido postulado que las estatinas inhiben la síntesis de isoprenoides que son esenciales para la actividad biológica de las proteínas de señalización, RhoGTPasas (RhoA y

Rac1)(6).



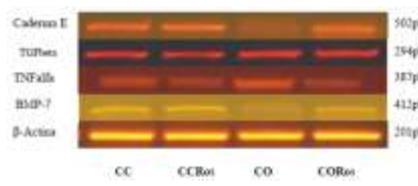
Figura 2: Perfil lipídico en ratas neonatas controles, obstruidas y tratadas con rosuvastatina



Así, las estatinas condicionarían una reducción de la activación de Rho y Rac1, la disminución de marcadores de fibroblastos y la preservación de la expresión de los marcadores de células epiteliales, caderina E y citoqueratina 196. Al respecto, nuestro laboratorio demostró que durante la obstrucción ureteral unilateral neonatal, disminuye la expresión de caderina E con respecto a los controles, lo cual podría asociarse a una pérdida en la adhesión celular y consecuente transición epitelio-mesenquimatosa. De sumo interés fue establecer que el tratamiento con rosuvastatina indujo una sensible recuperación en la expresión de caderina E, incluso colocando su nivel de expresión por encima de los controles (Figura 3). Por otro lado, existe evidencia de factores que producen una caída en la expresión de caderina E, dos de ellos son el TNF- 8 y el TGF- 9.



Figura 3: Típicos blots RT-PCR para genes de interés en homogenados de cortezas.



Las isoformas de TGF- son

citocinas multifuncionales que juegan un rol central en la reparación de tejidos. La liberación y activación de TGF- estimula la producción de proteínas de matriz extracelular e inhibe su degradación. Estas acciones contribuyen a la reparación de tejidos, que en condiciones normales conducen a la restauración de la arquitectura normal del tejido y puede además involucrar un componente de fibrosis tisular. En muchos procesos patológicos, el exceso de TGF- conlleva a fibrosis tisular, lo que compromete la función normal del órgano(10).

Recientemente, se realizaron estudios en ratas tratadas con rosuvastatina luego de haber sido uni-nefrectomizadas, utilizando a TGF- como marcador de progresión de la enfermedad, tomándolo como un mediador clave de la fibrosis(11). En total concordancia, nuestros resultados demuestran que rosuvastatina disminuyó la expresión de tgf- (Figura 3). Además, TGF- tiene un rol complementario con TNF- en la fibrogénesis(12). El TNF- es uno de los denominados receptores de muerte celular que mediarían la vía extrínseca de muerte celular y cuya función es participar en la defensa del organismo ante infecciones y agresiones externas. Por lo tanto, participa en los procesos normales relacionados con la inflamación. El mecanismo de acción de los fármacos que intentan frenar la inflamación se basa en el bloqueo de dicha sustancia inflamatoria para que se atenúe este proceso y disminuya el daño. En tal sentido, nuestros resultados demuestran claramente el incremento de tnf- durante la nefropatía obstructiva neonatal como consecuencia del proceso nefrogénico. En tanto que el uso de rosuvastatina disminuyó significativamente su expresión (Figura 3).

Por otro lado, la fibrosis inducida por TGF- puede ser inhibida por la proteína formadora de hueso 7 (BMP7), mediante la reinducción de caderina E.13. BMP7 es requerida durante la embriogénesis para el desarrollo normal del esqueleto, ojos y riñones. La expresión de BMP7 continúa en el riñón adulto y se discute que se requiere en el mesénquima metanéfrico para el desarrollo continuo del túbulo epitelial, y

# CM 250

LANZAMIENTO 2010



## Más de 1000 laboratorios en Latinoamérica tienen uno similar...

**Wiener lab.** introduce el nuevo analizador automático para Química Clínica **CM 250**, la evolución del instrumento más exitoso de los últimos años en el segmento de laboratorios medianos, el Wiener lab. Metrolab 2300 plus. (> 1000 equipos instalados)

Con un **nuevo diseño y más veloz** (hasta 230 test/hora), el **CM 250** incorpora soluciones (\*) que reducen al mínimo los tiempos de trabajo, y mejoran sensiblemente su precisión y exactitud.

**CM 250** será, como lo fue su antecesor, el equipo de elección para los profesionales que privilegien velocidad, economía y fortaleza en el momento de actualizar su instrumental.

**CM 250** será, como lo fue su antecesor, el equipo con la mejor red de soporte bioquímico y técnico de toda Latinoamérica.

**Y en poco tiempo, otros 1000 laboratorios más tendrán uno igual.**

(\*) Doble sistema de agitación, nuevo dilutor con válvula Klohen, nuevo lavador automático de cubetas de 5 pasos con secado, punta de aguja dispensadora recubierta en cerámica, diseño de desarme rápido, nuevo software.

50 Años

Haciendo posible el futuro

Wiener Laboratorios S.A.I.C  
Riobamba 2944, S2003GSD Rosario, Argentina  
Tel.: +54 341 432 91 91/6  
Moreno 1850, 2º piso, C1094ABB Buenos Aires, Argentina  
Tel.: +54 11 4375 41 51/4  
marketing@wiener-lab.com.ar  
www.wiener-lab.com.ar

 **Wiener lab**  
G R O U P

que además decrece en respuesta a la injuria(14). Nuestros resultados establecieron que BMP7 sufrió una muy significativa disminución en su expresión durante la injuria obstructiva haciéndose casi indetectable. Por su parte y apoyando el rol citoprotector de rosuvastatina en obstrucción durante la nefrogénesis, BMP7 recuperó su nivel de expresión (Figura 3).

En relación al modelo de obstrucción, se ha demostrado la importancia del óxido nítrico en la circulación cortical manteniendo un adecuado flujo plasmático renal en animales tratados con angiotensina II(15). El óxido nítrico (ON) es sintetizado desde tres isoformas enzimáticas siendo la óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) la que contribuye con mayores niveles. La formación de grandes cantidades de ON por tiempo prolongado, le confiere al gas actividad citotóxica. No obstante, la elevada producción de ON inicialmente es orientada a la protección contra la infección, por otro lado, el efecto supresor en la producción de linfocitos y el daño a la célula huésped confieren al ON una función dual protectora / destructiva(16).

Los resultados del presente trabajo permitieron establecer una significativa disminución en la expresión del mensajero de la enzima ONSi en el riñón obstruido, lo que podría condicionar una menor disponibilidad de ON en el sistema. Además, previamente ha sido demostrado que el ON desempeña un rol antiapoptótico y antifibrótico en la OUU17. Al respecto, resultados publicados en nuestro laboratorio demostraron que el ON endógeno y la expresión de ONSi estaban disminuidas durante la obstrucción ureteral unilateral neonatal, dicho evento fue asociado a la vía de señalización mitocondrial a través del incremento en el ratio *bax* / *bcl-2* y la subsecuente actividad de la caspasa 318. La inactivación de las caspasas directa o indirectamente mediada por el ON, lograría reducir la degradación de Bcl2 incrementando la concentración de su proteína. Por lo tanto, y a través de un mecanismo indirecto, el ON podría prevenir la liberación del citocromo c, frenando la peligrosa activación de las caspasas por esta

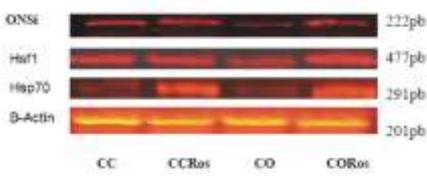
vía(19).

El ON puede oxidar el glutatión intracelular y modificar los niveles de antioxidantes dentro de la célula, resultando en estrés oxidativo. Esta acción estimula la inducción de las proteínas de shock térmico Hsp32 y Hsp70. La Hsp70 juega roles esenciales como chaperonas moleculares bajo condiciones normales o de estrés, facilitando el plegamiento de proteínas nacientes, resolubilizando agregados de proteínas y asistiendo en el reensamblaje de proteínas desnaturalizadas (20).

La acumulación de proteínas mal ensambladas produce la movilización de las Hsp70s resultando en un pool libre de Hsp70 y consecuentemente el cese de la regulación negativa sobre el Hsf que se hallaba unido a Hsps tanto constitutivas como inducibles. El Hsf1 liberado es fosforilado y se ensambla en trímeros adquiriendo actividad de unión al ADN y aumentando la cantidad de ARNm de Hsp7020. En nuestro trabajo, la expresión incrementada de ONSi con el uso de rosuvastatina, condicionaría una mayor biodisponibilidad de ON asociada directamente al incremento de *hsf1*, cuyo producto proteico actuaría como factor de transcripción modulando la expresión de *hsp70* (Figura 4).



Figura 4: Típicos blots RT-PCR para genes de interés en homogenizados de cortezas.



Por otro lado, recientemente, ha sido identificado un gen que parece ser el principal determinante del inicio en la secuencia de transformación mesenquimal a epitelial. Se trata de un gen que se identificó ausente o mutado en el cáncer de células embrionarias renales (tumor de

Wilms o wt1). Existe evidencia de que wt1 puede estar directamente implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular.

El gen wt1 codifica un producto génico supresor de tumores que es expresado en el riñón en desarrollo y en el sistema urogenital adulto.

La expresión de wt1 ocurre relativamente temprano en el tumor de Wilms. Además, ha sido postulado que es requerido para promover la transcripción de genes que proveen ventajas de supervivencia a las células tumorales. Wt1 estimula positivamente al promotor de *bcl-2* por medio de una interacción directa(21). Los resultados del presente trabajo confirman en nefropatía obstructiva neonatal, una sensible disminución en la expresión por RT-PCR de wt1. Interesantemente, rosuvastatina incrementó la expresión de wt1 lo que permitiría sugerir desde la probable regulación de wt1, su rol citoprotector. Además, se ha sugerido que WT1 estabiliza P53 y modula la muerte celular interactuando en forma directa con P53 e inhibiendo la muerte celular mediada por P53, pero no afecta el arresto celular(22). Hsf1 permite el ingreso de P53 al núcleo, de modo tal que una disminución en la expresión de Hsf1 podría regular negativamente la función de P53. Así, los efectos que producen WT1 y Hsf1 sobre P53 serían opuestos y/o complementarios.

La apoptosis modulada por el ON puede ser resultado de daño en el ADN. P53 detecta este tipo de daño y actúa como factor de transcripción de p21 y articula el arresto celular en respuesta a genotóxicos, si el daño en el ADN persiste, P53 conduce a la célula hacia la apoptosis(23). Sin embargo, P53 puede ayudar en la reparación de células dañadas mediante la inducción de p27, con el subsecuente descenso en la fosforilación de pRb24. Los resultados de nuestro trabajo demostraron un marcado descenso en la expresión de p53 durante la injuria por nefropatía obstructiva y similar al caso de *hsp70*, p53 experimentó un significativo incremento en su expresión con el uso de rosuvastatina,

tanto en corteza control como en la obstruida.

De esta manera, rosuvastatina modularia la respuesta apoptótica y oxidativa propia de la nefropatía obstructiva contribuyendo a la protección del túbulo intersticio renal durante la OUU neonatal. La protección renal que ejerce Ros durante nefropatía obstructiva neonatal estaría asociada a la interacción entre la respuesta al shock térmico y la biodisponibilidad de ON con el concomitante descenso en genes pro-apoptóticos.

#### Bibliografía

1- Campese VM and Park J. HMG-CoA Reductasa inhibitors and the kidney. *Kidney Int.*, 71 (2007): 1215-1222.  
2-Chevalier RL, Thornhill BA, Gomez RA. EDRF modulates renal hemodynamics during unilateral ureteral obstruction in the rat. *Kidney Int.* 42 (1992): 400-6.

3- Klahr S, Harris KPG, Purkerson ML. Effects of obstruction on renal function. *Pediatric Nephrol.* 2 (1988): 34-42.

4- Vallés P, Merlo V, Berón W, Manucha W. Recovery of distal nephron enzyme activity alter release of unilateral ureteral obstruction. *J. Urol.* 161 (1999): 641-648.

5- Gianella A, Nobili E, Abbate M, Zoja C, Gelosa P et al. Rosuvastatin treatment prevents progressive kidney inflammation and fibrosis in stroke-prone rats. *Am J Pathol.* 170 (2007):1165-77.

6- Patel S, Mason RM, Suzuki J, Imaizumi A, Kamimura T, Zhang Z. Inhibitory effect of statins on renal epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Nephrol.* 26 (2006):381-7.

7- Patel S, Takagi KI, Suzuki J, Imaizumi A, Kimura T, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. RhoGTPase activation is a key step in renal epithelial mesenchymal transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 16 (2005): 1977-1984.

8- Yi JY, Jung YJ, Choi SS, Chung E. TNF-alpha

Downregulates E-cadherin and Sensitizes Response to gamma-irradiation in Caco-2 Cells. *Cancer Res Treat.* 41 (2009):164-70.

9- Zheng G, Lyons JG, Tan TK, Wang Y, Hsu TT et al. Disruption of Ecadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol.* 175 (2009): 580-91.

10- Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes infect* 1(1999):1349-65.

11- Kramer S. Rosuvastatin is additive to high-dose candesartan in slowing progression of experimental mesangio-proliferative glomerulosclerosis. *American journal of physiology. Renal physiology* 63 (2008): 1931-857.

12- Yoshifumi Morimoto, Zhibo Gai, Hiroyuki Tanishima, Motohisa Kawakatsu, Shunji Itoh et al. TNF- deficiency accelerates renal tubular interstitial fibrosis in the late stage of ureteral obstruction. *Exp Mol Pathol.* 85 (2008): 207-13

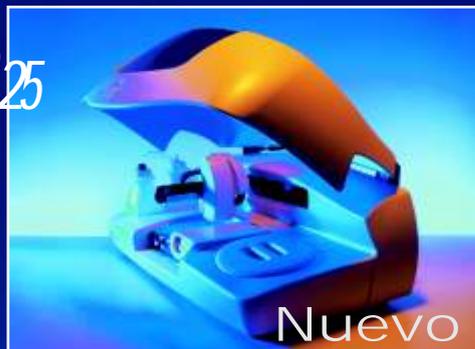
## BioSystems

REAGENTS & INSTRUMENTS

-  Electroforesis
-  Cromatografía
-  Instrumental
-  Química Clínica
-  Control de Calidad Externo
-  Autoinmunidad IFI
-  Autoinmunidad ELISA
-  Turbidimetría
-  Serología
-  Drogas de abuso

## Línea Instrumental

 25



Nuevo

### Autoanalizador Random Access Refrigerado

- 240 test/hora
- Química clínica y turbidimetría
- Hasta 30 reactivos refrigerados + 10 a temperatura ambiente
- Consumo de agua menor a 1,5 l por hora de trabajo
- Sistema abierto. Técnicas Biosystems pre programadas
- Calidad aprobada y reconocida por la comunidad europea

 15



### Autoanalizador Random Access

- 150 tests/hora
- Química clínica y turbidimetría
- Consumo de agua menor a 1 l por hora de trabajo
- Sistema abierto. Técnicas Biosystems pre programadas
- Calidad aprobada y reconocida por la comunidad europea

Con su compra: consulte importantes ventajas comerciales

 **BIOLINKER**  
Reactivos e instrumental

BIOLINKER SA

14 de julio 618 C1427CJN Buenos Aires  
Tel. 4554-4007 Fax. 4553-2141  
biolinker-sa@biolinker.com.ar  
www.biolinker.com.ar



13- Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 9 (2003): 964-8.

14- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 132 (2005): 3151-61

15- Chin SY, Wang CT, Majid DSA, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol.* 274 (1998): 876-882.

16- Kin Y, Bombeck Ch, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research.* 84 (1999):253-256.

17- Hegarty NJ, Young LS, Kirwan CN, O'Neill AJ, Bouchier-Hayes DM et al. Nitric oxide in unilateral ureteral obstruction: effect on regional renal blood flow. *Kidney Int.* 59(2001):1059-65

18- Manucha W., Vallés P. Cytoprotective role of nitric oxide associated with HSP70

expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 18 (2008):204-215.

19- Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem* 273(1998):31437-31441.

20- Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest.* 100(1997): 1089-97

21- Mayo Marty W, Wang Cun-Yu, Scott S. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl2 proto-oncogene. *The EMBO journal.* 18 (1999): 3990-4003

22- Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 9(1995): 2143-56.

23- Li KL, Du XL, Song RH, Zhao L, He YN et al. Effect of p53 on the variation of renal tubular epithelial cells after kidney ischemia/reperfusion injury. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 23 (2007):6-10

24- Freedman DA, Folkman J. Maintenance of G1 checkpoint controls in telomerase-immortalized endothelial cells. *Cell Cycle.* 3 (2004):811-6.



Analizadores para la medición de pH, gases en sangre, electrolitos,  $SO_2$ , Hb y glucosa.

**OPTI® R / OPTI® CCA-TS / OPTI® LION**



**OPTIMedical**

www.optimedical.com

**OPTI® R** Analizador de gases en sangre con cassettes reusables.

**OPTI® CCA-TS** Analizador portátil de gases en sangre.

**OPTI® LION** Analizador de electrolitos.



**OPTI® R**



**OPTI® CCA-TS**



**OPTI® LION**



**BG Analizadores**

**BG ANALIZADORES S.A.**  
 Aréoz 86 | C1414DPB | C. A. B. A. | Argentina  
 Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876  
 Fax: 54-11 4856-5652  
 www.bganalizadores.com.ar  
 bga@bganalizadores.com.ar