

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS



**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN UN MODELO DE
INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA”**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR

ALEJANDRO ÁLVAREZ PRATS

Bajo la dirección de los Doctores:

Octavio Hernández Perera.

José Carlos Rodríguez Pérez.

Los directores

El doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, 2010

D. OCTAVIO HERNÁNDEZ PERERA, INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.”, ha sido realizado por D. Alejandro Álvarez Prats, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo su dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentra apta para su defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 10 de Diciembre de 2010.

Fdo: Dr. Octavio Hernández Perera.

D. JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ PÉREZ, INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE GRAN CANARIA DR. NEGRÍN Y PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.”, ha sido realizado por D. Alejandro Álvarez Prats, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, bajo su dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentra apta para su defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 10 de Diciembre de 2010.

Fdo: Dr. José Carlos Rodríguez Pérez.

*“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación,
de corregir errores”.*

Julius Robert Oppenheimer.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a los Drs. Octavio Hernández Perera y José Carlos Rodríguez Pérez por su dirección, ayuda y continuo estímulo en la elaboración del presente proyecto de tesis doctoral.

También me gustaría agradecer a todos los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín la ayuda prestada durante estos años, especialmente a Aránzazu Anabitarte Prieto, cariñosamente Aranza, por haber compartido desinteresadamente sus conocimientos de cirugía experimental conmigo con tanto humor y disposición.

A la Dra. Pilar Díaz Herrera por su ayuda y entrega en los análisis histológicos.

Al Dr. Gregorio Carretero Hernández por haberme contagiado su entusiasmo y haber influido de forma muy positiva en mi formación como investigador.

A toda mi familia por su apoyo y su capacidad para soportar estos años de trabajo y sacrificio.

RESUMEN

La inflamación y la fibrosis son características fundamentales de las enfermedades renales. Nuestro objetivo fue evaluar las ventajas de diferentes tratamientos farmacológicos y su relación con la activación de NF- κ B y AP-1. Las ratas sometidas a 5/6 de nefrectomía fueron utilizadas como controles o tratadas con losartán, cerivastatina, losartán más cerivastatina, carvedilol, o el antagonista no selectivo de los receptores ET_A/ET_B, Ro 48-5695, desde el día 7 hasta el día 42 de la nefrectomía. En contraste con el grupo Sham, a los 7 días las ratas nefrectomizadas no mostraron lesiones renales pero sí albuminuria y aumento de la presión arterial sistólica (PAS). Por otra parte, no se detectaron cambios en la expresión génica de TGF- β pero sí reducción de BMP7 y de KCP. Estos resultados contrastaron con los niveles de transcrito de diferentes colágenos, fibronectina 1, laminina B1 y MCP-1, que experimentaron un claro incremento, lo que sugiere que la reducción de los niveles de BMP7 y KCP podría jugar un papel importante en la génesis de la enfermedad renal crónica (ERC).

A las 6 semanas, las ratas nefrectomizadas sin tratamiento mostraron albuminuria, incremento de la PAS y lesiones renales. Los extractos nucleares aislados de la corteza renal de las ratas sometidas a ablación renal, presentaron niveles aumentados de la subunidad NF- κ B p65 y de c-Fos, miembro principal de la familia AP-1. También, se observó aumento de expresión génica de TGF- β 1, varios tipos de colágeno, fibronectina 1, pre-proendotelina-1 y MCP-1. Cuando las ratas recibieron la terapia combinada de losartán y cerivastatina, la expresión de los mediadores moleculares de la fibrosis renal, así como las actividades de AP-1 y NF- κ B, fueron muy parecidas a las del grupo Sham; sin embargo, la eficacia del resto de tratamientos fue claramente más limitada. Tanto la actividad de NF- κ B como de AP-1 mostraron asociación con las tasas de daño renal y con la expresión del RNAm de fibronectina 1, pre-proendotelina-1 y MCP-1. Sin embargo, la falta de correlación entre las actividades de AP-1 y NF- κ B sugiere que ambos factores de transcripción podrían contribuir independientemente al desarrollo de la fibrosis renal en el modelo de 5/6 de nefrectomía, y que la combinación farmacológica de un ARAII y una estatina podría ofrecer mayor renoprotección por su capacidad para normalizar las actividades de NF- κ B y AP-1 simultáneamente.

SUMMARY

Inflammation and fibrosis are the main characteristics of renal diseases. Our aim was to evaluate the advantages of different pharmacological approaches and their relation with the activation of NF- κ B and AP-1. Subtotally nephrectomized (Nx) rats were used as controls or were treated with losartan, cerivastatin, losartan plus cerivastatin, carvedilol, or the ET_A/ET_B receptor antagonist Ro 48-5695 from day 7 to day 42 after nephrectomy. In contrast to the Sham group, at seven days Nx rats showed no kidney damage, but albuminuria and increases in systolic blood pressure (SBP) were observed. BMP7 and KCP genes were downregulated, whereas no change in the expression of TGF- β was detected. Furthermore, transcript levels of several collagen molecules, fibronectin 1, laminin B1 and MCP-1 were increased suggesting that downregulation of BMP7 and KCP could be playing an important role in the genesis of chronic kidney disease (CKD).

At 6 weeks, untreated Nx rats displayed albuminuria, increases in SBP and renal lesions. Nuclear extracts from renal cortex of Nx rats given vehicle exhibited increased levels of NF- κ B p65 subunit and c-Fos, a main AP-1 family member. Transcript levels of TGF- β 1, several collagen molecules, fibronectin 1, pre-proendothelin-1 and MCP-1 were also raised. When rats received adjunctive therapy with losartan plus cerivastatin, expression of the molecular mediators of renal fibrosis and the activity of AP-1 and NF- κ B closely resembled that of the sham group, whereas the effectiveness of other treatments was much more limited. Activity of both NF- κ B and AP-1 was associated with renal injury scores and with mRNA expression of fibronectin 1, pre-proendothelin-1 and MCP-1. However, values of NF- κ B activity were not correlated with those of AP-1, suggesting that both nuclear factors could contribute independently to the renal disease progression and that combination therapy with an angiotensin II receptor antagonist and a statin could confer advantages on kidney protection through simultaneous normalization of NF- κ B and AP-1 activity.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Panorámica general.....	8
2. Mecanismos moleculares de la enfermedad renal.....	9
2.1 TGF- β y BMP7.....	10
2.2 MCP-1.....	16
2.3 ET-1.....	17
3. Sistema Renina-Angiotensina y la regulación transcripcional en la ERC.....	18
4. NF- κ B y AP-1: Factores de transcripción implicados en la ERC.....	19
5. Modelo de 5/6 de nefrectomía: características moleculares.....	25
6. Estrategias renoprotectoras.....	25
6.1 Bloqueadores de los canales de calcio.....	27
6.2 Bloqueo del SRA.....	27
6.3 Betabloqueantes.....	29
6.4 Estatinas.....	30
6.5 Inhibidores de NF- κ B.....	32
6.6 Antagonistas de los receptores de la ET.....	34
6.7 Tratamiento combinado.....	35
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. Modelo experimental y seguimiento de la enfermedad.....	44

2. Aislamiento de RNA y determinación de la expresión génica.....	47
3. Análisis Bioquímico.....	53
4. Análisis Histológico.....	53
5. Preparación de los extractos nucleares.....	54
6. Ensayo de unión de factores de transcripción.....	54
7. Análisis Inmunohistoquímico.....	58
8. Análisis Estadístico.....	58
RESULTADOS.....	62
1. NEFRECTOMÍA: 7 días.....	63
1.1 Parámetros sistémicos.....	63
1.2 Análisis Histológico y Morfológico.....	64
1.3 Expresión génica.....	64
2. NEFRECTOMÍA: 42 días.....	68
2.1 Parámetros sistémicos.....	68
2.2 Análisis Histológico y Morfológico.....	70
2.3 Expresión génica.....	71
2.4 Actividad de NF- κ B y AP-1.....	73
3. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS A LOS 42 DÍAS	79
3.1 Parámetros sistémicos.....	79
3.2 Análisis Histológico y Morfológico.....	83
3.3 Efectos de los fármacos en la regulación de la expresión génica..	85

3.3.1 Actividad de NF- κ B y AP-1.....	85
3.3.2 Expresión génica.....	87
3.3.3 Efectos de un antagonista no selectivo de ET _A y ET _B en la regulación de la expresión génica.....	99
3.4 NF- κ B y AP-1 en el perfil de expresión génica de los animales con ablación renal.....	99
DISCUSIÓN.....	110
1. La ablación renal. 7 y 42 días.....	110
2. Efectos de los tratamientos farmacológicos a los 42 días de la ablación renal..	114
CONCLUSIONES.....	126
BIBLIOGRAFÍA.....	130

ABREVIATURAS

AMPc	AMP cíclico
anti-Thy-1	glomerulonefritis proliferativa por inyección de suero antitimocito
AP-1	Proteína Activadora-1
APS	Ácido Peryódico de Schiff
ARAII	Antagonista de los Receptores tipo1 de la angiotensina II
AT1	Receptores tipo 1 de la angiotensina II
BCC	Bloqueador de Canales de Calcio
BMPs	Proteínas Morfogénicas Óseas
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CTGF	Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
CV	Coefficiente de variación
CVI	Constrictor Vasoactivo Intestinal
DHMEQ	Dihroximetil-epoxiquinomicina
DM	Diabetes Mellitus
DTI	Daño tubulointersticial
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECE	Enzima Conversora de Endotelina
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ET-1	Endotelina-1
EVR	Enfermedad Vasculat Renal
FG	Filtrado Glomerular
FN-1	Fibronectina 1
FPP	farnesil pirofosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
GIS	Indicador de daño glomerular
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular-1
IECA	Inhibidor del Enzima Conversor de Angiotensina
IKK	IkappaB quinasa
IL	Interleucina
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
KCP	Proteína análoga a Kielina/Cordina

Lam-β1	Laminina-β1
LAP	Péptido Asociado a Latencia
LPS	Nefritis inducida por lipopolisacáridos
MAPK/ERK	Proteína kinasa activada por mitógenos-kinasa regulada por estímulos extracelulares
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MDA	Malonildialdehído
MMLV-RT	Transcriptasa Reversa del virus de la Leucemia Murina de Moloney
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NAG	N-Acetilglucosaminidasa
NF-κB	Factor Nuclear κB
NO	Óxido Nítrico
NPH	Nefritis Pasiva de Heymann
PA	Presión Arterial
PAI-1	Inhibidor de Activador de Plasminógeno-1
PAS	Presión Arterial Sistólica
PGI₂	Prostaciclina
RANTES	Quimiocina Regulada tras Activación de células Normales, Expresada y Secretada
RhoK	Quinasa dependiente de Rho
RNA_m	RNA mensajero
RNA_t	RNA transferente
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
SLGAII	Sistema Local Generador de Angiotensina II
Sp-1	Factor de Transcripción Ubicuo
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-β
TGF-β R	Receptor de TGF-β
TIMPs	Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas
TME	Transición Mesénquima-Epitelio
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

TRE	Elemento de respuesta a ésteres de forbol
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
USAG-1	Gen Asociado a Sensibilización Uterina-1
VCAM-1	Molécula de Adhesión de Células Vasculares-1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Panorámica general.

La insuficiencia renal crónica (IRC) es una de las enfermedades con más prevalencia en occidente. Sólo en España la cifra de pacientes en diálisis supera los 30.000; un valor similar de otros tantos ha sido sometido a trasplante renal. El envejecimiento de la población general, así como el incremento de la incidencia de la diabetes mellitus (DM) y de la enfermedad vascular renal (EVR), han influido en el aumento tan espectacular del número de pacientes sometidos a diálisis en los últimos veinte años. Entre el 6.2 y el 7.8% de la población mundial presenta algún grado de enfermedad renal crónica (ERC). Los costes anuales estimados para el tratamiento sustitutivo con diálisis son aproximadamente de unos 600 millones de euros, mientras que para el trasplante renal son de unos 150 millones.

El síndrome de hiperfiltración glomerular o de la nefrona remanente es el mecanismo patogénico común del desarrollo final de la ERC terminal, independientemente de la etiología que tenga lugar. Su desarrollo comienza a partir de una pérdida de nefronas por parte del riñón, de manera que las nefronas remanentes se ven obligadas a compensar el trabajo de las lesionadas. Seguidamente, tiene lugar un proceso de hipertrofia compensatoria con un aumento de la presión en el capilar glomerular y de la fracción de filtración glomerular. Este proceso se ve fielmente reproducido en el modelo experimental de 5/6 de nefrectomía utilizado en este trabajo, y en el que profundizaremos más adelante.

Existen dos conceptos bien definidos en la actualidad enfocados sobre todo a la clínica, que deben quedar aclarados en este apartado: enfermedad renal crónica (ERC) e insuficiencia renal crónica (IRC). Si bien el primero se viene definiendo como la existencia de lesión renal o filtrado glomerular (FG) < 60 ml/min/1,73 m² durante un período ≥ 3 meses, el segundo se define como la existencia de lesión renal o filtrado glomerular (FG) < 60 ml/min/1,73 m² correspondientes a las fases 3, 4 y 5 de la ERC publicadas por la National Kidney Foundation, en sus correspondientes guías clínicas (ver Tabla1), actualmente en revisión.

Tabla 1. Estratificación de la enfermedad renal crónica NKF- K/DOQI

Fase	Descripción	FG (ml/min/1,73m ²)	Actuación
1	Lesión renal con FG normal o aumentado	> 90	Diagnóstico y tratamiento Tratamiento de la comorbilidad Ralentizar la progresión Reducir el riesgo cardiovascular
2	Lesión renal con ↓ FG leve	60-89	Estimar la progresión
3	↓ FG moderada	30-59	Evaluar y tratar complicaciones
4	↓ FG severa	15-29	Preparación para el tratamiento sustitutivo
5	Insuficiencia o fallo renal	< 15	Tratamiento sustitutivo (si uremia)

2. Mecanismos moleculares de la enfermedad renal.

Desde un punto de vista molecular, la ERC es una patología compleja. En la evolución de la misma se van a cumplir de forma genérica, toda una serie de acontecimientos, independientemente de que el proceso desencadenante pueda ser de origen diverso. Brevemente, la expresión de moléculas de adhesión y de factores quimiotácticos y activadores específicos de monocitos en el lugar de origen del daño renal, conducirá a la infiltración de monocitos y a su activación a macrófagos. Las propias células renales (mesangiales, endoteliales, intersticiales o tubulares) y los macrófagos residentes e infiltrados, actuarán de forma concertada en la generación de diversos factores de crecimiento, mediadores de inflamación y citocinas, provocando proliferación celular y expansión de matriz. El resultado final de estos procesos es la aparición de glomerulosclerosis y fibrosis intersticial.

Aunque aún no se conocen con exactitud los mecanismos de progresión de la enfermedad renal, ha quedado demostrada la participación de ciertas moléculas mediadoras como la endotelina-1 (ET-1), el Factor de Crecimiento Transformante- β 1 (TGF- β 1), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α). Este último puede ser secretado en el riñón por las propias células renales y por los

fagocitos infiltrados. Sus acciones proinflamatorias incluyen muerte celular, quimiotaxis y modulación de la secreción de otros mediadores de inflamación y componentes de matriz extracelular (Ortiz, A. y col., 1995). La expresión de su RNAm se encuentra aumentada en los glomérulos y la médula durante el estadio nefrótico del daño renal agudo provocado por aminonucleósidos en ratas. En la obstrucción unilateral de uréter también se ha observado una expresión elevada de TNF- α , concretamente en los túbulos de la porción cortical del riñón obstruido, pero no en los glomérulos. Sin embargo, la inducción de la síntesis de TNF- α no parece constituir un mecanismo general de activación de las vías que conducen al daño renal. Mediante análisis de Northern no ha podido detectarse expresión de TNF- α en el modelo de reducción de masa renal, mientras que el TGF- β 1 y el MCP-1 sí parecen desempeñar un papel preponderante en la resolución de la enfermedad en este modelo experimental (Lee, L.K. y col., 1995; Schiller, B. y Moran, J., 1997). Es por ello, que los esfuerzos de este trabajo se han centrado en el análisis de los mecanismos y mediadores moleculares que se exponen a continuación.

2.1 TGF- β y BMP7.

La superfamilia del TGF- β engloba un gran grupo de polipéptidos extracelulares con grandes similitudes estructurales, que participan en procesos de crecimiento, desarrollo, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores de la membrana celular (Massagué, J., 1990; Sporn, M.B. y Roberts, A.B., 1990). Dentro de esta superfamilia existen cuatro subfamilias claramente definidas: i) la del TGF- β , ii) la de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), iii) la de la proteína Nodal y sus derivados, y iv) la de las activinas. En este trabajo nos centraremos en las dos primeras, y específicamente, en dos isoformas concretas: TGF- β 1 y BMP7.

De forma general, el TGF- β es una citocina con propiedades antiinflamatorias e inmunoregulatoras que a niveles fisiológicos está implicado en el correcto desarrollo y funcionamiento de algunos órganos como el riñón, así como en la reparación tisular; sin embargo, cuando tienen lugar procesos de fibrosis se sobreexpresa de manera significativa.

De las cinco isoformas conocidas pertenecientes a la subfamilia del TGF- β , las tres primeras, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, están presentes en mamíferos y presentan una alta homología entre sí, mientras que el TGF- β 4 se ha aislado en pollo y el TGF- β 5 en *Xenopus*.

Se ha observado que, *in vitro*, las tres primeras isoformas tienen funciones muy parecidas; sin embargo, *in vivo*, la primera de ellas ha destacado sobre el resto por su mayor implicación en los procesos de fibrosis renal (Ketteler, M. y col., 1995; MacKay, K. y col., 1990; Ando, T. y col., 1995; Wilson, H.M. y col., 2000).

El TGF- β lleva a cabo sus acciones a nivel renal al interactuar con sus correspondientes receptores (TGF- β RI, TGF- β RII y TGF- β RIII). Estos son proteínas integrales con un único dominio transmembrana con actividad serina-treonina kinasa, que al unirse a sus correspondientes ligandos desencadenan una cascada de señalización en la que la participación de proteínas Smad es fundamental. Estas proteínas actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de ciertos genes, principalmente de TGF- β , de manera que en los procesos de fibrosis, algunas como Smad2 y Smad3 forman un complejo con Smad4, que se transloca al núcleo e interactúa con diferentes factores de transcripción, regulando la actividad del promotor de distintos genes profibróticos (Blobe, G.C. y col., 2000).

El TGF- β 1 regula la composición y arquitectura de la matriz extracelular en glomérulo e intersticio gracias a su habilidad para modificar la expresión de gran número de genes. Éste estimula la síntesis de proteínas de matriz (laminina, colágenos y fibronectina) y bloquea la degradación de las mismas disminuyendo la expresión de proteasas y aumentando los niveles de algunos de sus inhibidores, como por ejemplo, el Inhibidor de Activador de Plasminógeno-1 (PAI-1) y los Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (TIMPs) (Laiho, M. y col., 1987; Tomooka, S. y col., 1992; Ziyadeh, F.N. y Sharma, K., 1995).

A nivel experimental numerosos trabajos han puesto de manifiesto la existencia de aumento de expresión de TGF- β en varios modelos animales que recrean distintas patologías renales: modelo de glomerulonefritis proliferativa por inyección de suero antitimocito (anti-Thy-1) en rata, glomerulonefritis de la membrana basal glomerular en conejos, glomerulonefritis de Habu-venom y nefropatía asociada con obstrucción ureteral (Border, W.A. y Noble, N.A., 1994; Bitzer, M. y col., 1998; Miyajima, A. y col., 2000; Ma, L.J. y col., 2000; Kaneto, H. y col., 1993). En el caso concreto del modelo utilizado en este trabajo se ha encontrado un incremento paulatino de expresión de TGF- β 1 y de proteínas de matriz como fibronectina y laminina en los riñones de las ratas nefrectomizadas, inicialmente en el endotelio y posteriormente también en células mesangiales, particularmente en las regiones con mayor grado de esclerosis (Lee, L.K. y col., 1995). Asimismo, se ha demostrado

sobreexpresión de TGF- β en estadios tempranos (14 días), y de forma más clara una vez establecida la proteinuria en los animales nefrectomizados (Abbate, M. y col., 2002a). Se han realizado transfecciones *in vivo* del gen que codifica para TGF- β 1 en riñones de ratas normales con el consiguiente aumento de la producción de TGF- β en glomérulo que se acompañó de una glomeruloesclerosis “galopante” (Isaka, Y. y col., 1993). Diferentes trabajos en cultivo de células tubulares expuestas a sobrecarga proteica han experimentado aumento en la producción de diferentes moléculas proinflamatorias como endotelina-1, MCP-1, RANTES (Zoja, C. y col., 1995; Zoja, C. y col., 1998; Wang, Y. y col., 1997) y TGF- β (Yard, B.A. y col., 2001). Por otra parte, se ha observado en cultivos de podocitos expuestos a albúmina, caída de la expresión de sinaptopodina, una proteína de diferenciación celular presente en podocitos, y aumento de TGF- β 1 (Abbate, M. y col., 2002b).

Numerosos trabajos en distintos modelos experimentales tanto de diabetes tipo 1 como tipo 2 han demostrado una clara sobreexpresión de esta citocina a nivel renal (Bollineni, J.S. y Reddi, A.S., 1993; Erman, A. y col., 2004; Riser, B.L. y col., 2000; González-Albarrán, O. y col., 2003; Shinomiya, K. y col., 2002). En el proceso de fibrogénesis relacionado con la nefropatía diabética se sabe que el TGF- β juega un papel fundamental. Igualmente, se ha demostrado la estrecha y directa relación existente entre la glucemia y la expresión de TGF- β en ensayos tanto *in vitro* (Ziyadeh, F.N. y col., 1998) como *in vivo* (Yang, C.W. y col., 1994; Zhou, G. y col., 2004; Yamamoto, T. y col., 1993). Por otro lado, en pacientes diabéticos y con nefropatía membranosa se han encontrado niveles aumentados de TGF- β en orina, así como correlación de los mismos con los valores obtenidos de proteinuria (Rivarola, E.W. y col., 1999; Honkanen, E. y col., 1997).

El bloqueo de TGF- β , y por tanto, su establecimiento como diana terapéutica, es algo que se viene investigando desde hace algún tiempo, y los resultados que se han obtenido son bastante esperanzadores. La acumulación de proteínas de matriz extracelular a nivel renal así como las manifestaciones histológicas de la patología provocada en un modelo de glomerulonefritis proliferativa por inyección de suero antitimocito en rata se han visto atenuadas al hacer uso de anticuerpos específicos contra TGF- β (Border, W.A. y col., 1992). Algo similar se ha observado en el modelo murino de diabetes db/db (Ziyadeh, F.N. y col., 2000; Chen, S. y col., 2003). Sin embargo, la comunidad científica está de acuerdo en que este abordaje terapéutico todavía necesitará de mucho trabajo de investigación para lograr efectos beneficiosos sin comprometer las funciones básicas de esta citocina.

BMP7 pertenece a la subfamilia de las Proteínas Morfogénicas Óseas (BMPs), cuyos miembros están implicados de forma muy importante en el desarrollo a nivel embrionario de diferentes órganos. Así, BMP7 está involucrada en el desarrollo de huesos, ojos y riñones, entre otros órganos, y desde un punto de vista molecular se encuentra en la naturaleza en forma dimérica. Cuando tiene lugar el nacimiento del individuo, los niveles de ésta BMP disminuyen en la mayoría de los órganos y tejidos, sin embargo, en el riñón se mantienen, sobre todo, en podocitos, túbulos distales y en los túbulos colectores (Wang, S.N. y col., 2001; Wetzel, P. y col., 2006; De Petris, L. y col., 2007). Esta proteína ha suscitado un alto interés por sus propiedades antifibróticas y su capacidad para neutralizar la fibrogénesis renal (Hruska, K. A y col., 2000; Klahr, S. y col., 2002; Mitu, G. y Hirschberg, R., 2008). En diferentes modelos animales que provocan daño renal se ha comprobado que la expresión de esta proteína decae considerablemente (Wang, S.N. y col., 2001; Wang, S. y col., 2003; Morrissey, J. y col., 2002). Por último, trabajos recientes sugieren que los efectos antiapoptóticos de BMP7 podrían proteger frente a la podociturgia (Mitu, G.M. y col., 2007).

Un concepto que cada día va adquiriendo mayor importancia en el estudio de los procesos de fibrosis, y en especial del riñón, es la llamada Transición Epitelio-Mesénquima (TEM) (Iwano M. y col., 2002). Este concepto, como su nombre indica, contempla la transición de células epiteliales a mesenquimatosas que se transforman en miofibroblastos productores de matriz en condiciones patológicas (Yang, J. y Liu, Y., 2001). Existen evidencias que demuestran que el eje TGF- β /BMP7 juega un papel modulador fundamental en este proceso (Lin, J. y col., 2005). En términos generales, la activación de los receptores de TGF- β en la célula epitelial induce la fosforilación de Smad2 y Smad3, y su translocación al núcleo junto con Smad4. Una vez dentro, estas proteínas Smad operan concertadamente con varios factores de transcripción promoviendo la TEM. Por otra parte, la activación de ciertos receptores de BMP7 induce la fosforilación de Smad1, Smad5 y Smad8, que al formar sus respectivos complejos con Smad4 se translocan al núcleo teniendo lugar el proceso inverso. Así, mientras TGF- β favorece la formación de fibroblastos y por tanto la fibrosis, BMP7 tiende a preservar el fenotipo epitelial (figura 1). En todo este proceso participan una serie de proteínas capaces de unirse a ligandos específicos que denominaremos en este documento como **Proteínas Trampa de Ligando (PTL)**. Éstas pueden actuar como moduladores positivos o negativos de cada uno de los componentes del binomio TGF- β /BMP7, favoreciendo o dificultando la unión de los mismos a sus correspondientes receptores (Lin, J. y col., 2005; Tanaka, M. y col., 2008). En la siguiente tabla (Tabla 2) exponemos las más estudiadas:

Tabla 2. Proteínas Trampa de Ligando implicadas en el binomio TGF- β /BMP7.

Ligando	PTL negativas	PTL positivas
TGF- β	Decorina, LAP, α -2 Macroglobulina, Endoglina, KCP .	CTGF.
BMP7	Nogina, Cordina, Folistatina, CTGF, USAG-1, Esclerostina.	KCP .

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante; BMP7: Proteína Morfogénica Ósea-7; LAP: Polipéptido Asociado de Latencia; KCP: Proteína análoga a Kielina/Cordina; USAG-1: Gen Asociado a Sensibilización Uterina-1; CTGF: Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo.

Dentro de éstas PTL, una de reciente descubrimiento, KCP, llama poderosamente la atención. Los últimos trabajos en torno a ella apuntan a que podría jugar un papel muy importante en la modulación de la TEM por su capacidad para favorecer la vía de señalización de BMP7 (Lin, J. y col., 2005) así como para antagonizar la de TGF- β (Lin, J. y col., 2006) (figura 1). Una cuestión de suma importancia es que BMP7 juega un papel esencial en el desarrollo embrionario del riñón (Dudley, A. T. y col., 1995; Karsenty, G. y col., 1996) mientras que KCP no parece afectarlo en lo absoluto; sin embargo, ratones *knock-out* para este gen han mostrado ser más susceptibles al daño renal y tener mayor índice de mortalidad y fibrosis que los ratones normales (Lin, J. y col., 2005). Esto podría situar a KCP como mejor candidata que BMP7 tanto como diana diagnóstica como terapéutica.

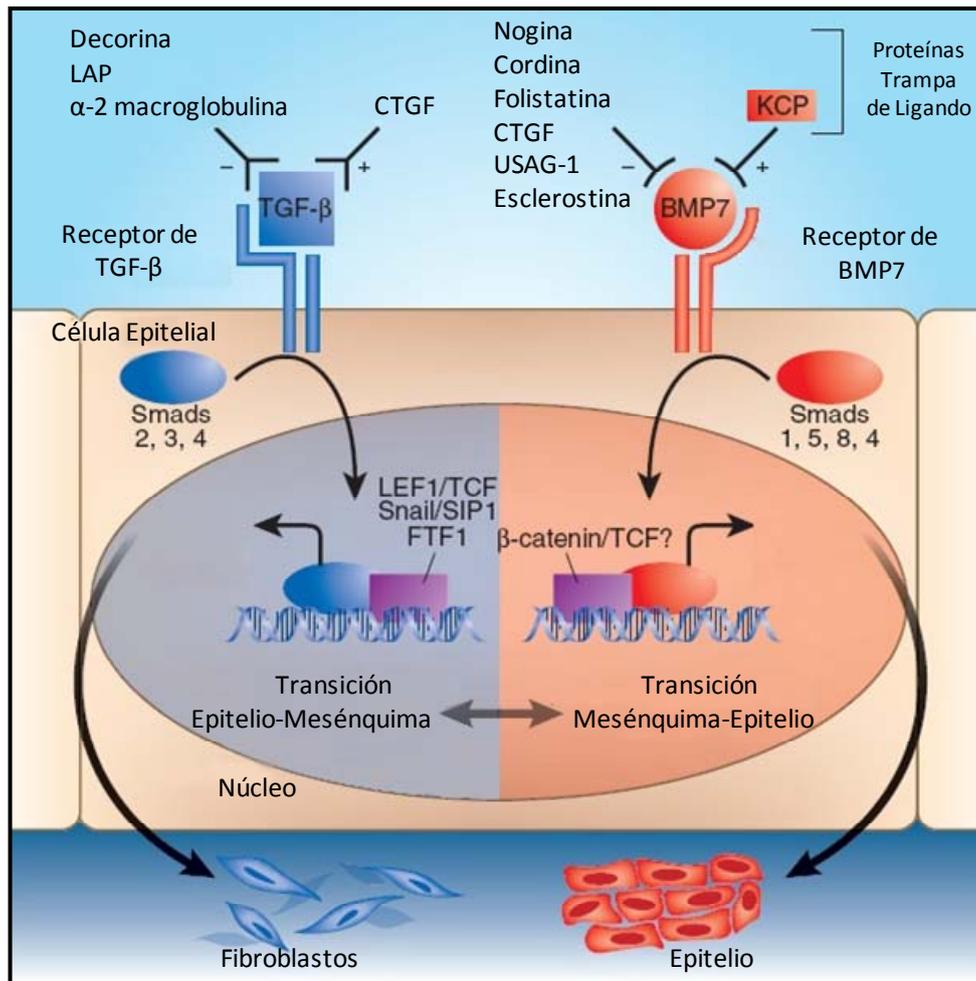


Figura 1. Panorámica de la Transición Epitelio-Mesénquima controlada por TGF-β y BMP7. Tanto TGF-β como BMP7 son modulados de forma bidireccional por sus correspondientes Proteínas Trampa de Ligando (PTL) en el medio extracelular. Las PTL positivas favorecen la unión del ligando a su receptor y las negativas la dificultan. La vía de señalización de TGF-β favorece la formación de fibroblastos mediante la transición epitelio-mesénquima mientras que la de BMP7 tiende a preservar el fenotipo epitelial. (Adaptado de Neilson E.G., 2005).

2.2 MCP-1.

Es frecuente encontrar monocitos y macrófagos presentes en las glomerulonefritis clínicas y experimentales. Se cree que éstos participan en la patogénesis de la enfermedad produciendo mediadores de inflamación. Las quimiocinas, un grupo de citocinas con actividad quimioatrayente de neutrófilos y monocitos, podrían estar implicadas en la localización de estas células infiltradas durante la inflamación glomerular. Los monocitos se extravasan y migran siguiendo el gradiente químico de MCP-1, que es sintetizado por los propios monocitos residentes y por las células endoteliales y mesangiales del riñón.

Los datos recogidos en diferentes modelos experimentales como la nefropatía difusa por estreptozotocina en ratón (Chow, F.Y. y col., 2006), glomerulonefritis proliferativa por inyección de suero antitimocito en rata (Schneider, A. y col., 1999) o nefritis lúpica en ratones MLR/lpr (Shimizu, S. y col., 2004) sugieren un papel funcional de esta quimiocina en el daño renal, así como la utilidad de diversas estrategias moleculares y farmacológicas que atenúen sus acciones (Shimizu, S. y col., 2004; Sánchez-López, E. y col., 2009).

En ratas con reducción de masa renal se ha encontrado un aumento de MCP-1 en las zonas que presentan glomerulosclerosis focal y en la región apical de las células tubulares distales, a la vez que un mayor número de macrófagos en glomérulo e intersticio (Schiller, B. y Moran J., 1997). MCP-1 juega un papel fundamental en la activación tanto de NF- κ B como de AP-1 en células humanas del epitelio tubular del riñón (Viedt, C. y col., 2002). A su vez, se ha observado que ambos factores de transcripción están involucrados en la expresión de MCP-1 en células proximales tubulares de rata (Wang, Y. y col., 2000).

Todo parece indicar que MCP-1 es un factor clave en la inflamación, la fibrosis y el daño renal en la nefropatía diabética, ya que sus niveles en orina están estrechamente relacionados con la producción de dicha molécula a nivel renal y correlacionan significativamente con niveles de albuminuria, albúmina glicosilada en suero, N-Acetilglucosaminidasa (NAG) en orina y macrófagos CD68+, tanto en humanos como a nivel experimental en modelos animales (Banba, N. y col., 2000; Wada, T. y col., 2000; Morii, T. y col., 2003; Chow, F.Y. y col., 2006; Chow, F.Y. y col.; 2007). Por último, en humanos, la presencia del alelo de MCP-1 A (-2518) se ha asociado con la diabetes tipo 1 (Yang, B. y col., 2004) y con la nefritis lúpica (Kim, H.L. y col., 2002).

2.3 ET-1.

La ET es uno de los péptidos vasoconstrictores más potentes hasta ahora caracterizados (Yanagisawa, M. y col., 1988). Se han descrito hasta el momento cuatro isopéptidos denominados ET-1, ET-2, ET-3 y ET-4, a este último también se le conoce como Constrictor Vasoactivo Intestinal (CVI); tan sólo se diferencian en su estructura en algún aminoácido (Hirata, Y., 1996). Las células endoteliales sintetizan ET-1 en forma de un precursor de 201 aminoácidos denominado pre-proET-1. Mediante la acción de una endopeptidasa específica de pares de aminoácidos básicos (Lys-Arg y Arg-Arg) da lugar a la proET-1 (o Big-ET-1) de 38 aminoácidos, que finalmente sufre una segunda proteólisis en la posición Trp-Val por la llamada enzima convertora de endotelina (ECE), dando lugar a la ET-1 de 21 aminoácidos. Puesto que la ET-1 no se almacena dentro de la célula, tanto la regulación de la transcripción de la pre-proET-1 (Dorfman, D.M. y col., 1992; Lee, M.E. y col., 1990; Rodríguez-Pascual, F. y col., 2003) como sus modificaciones proteolíticas posteriores constituyen los elementos clave de regulación de la síntesis de este péptido (Marsden, P.A. y col., 1991). Su biosíntesis está regulada por estímulos de naturaleza química o mecánica, entre los que se incluye la trombina, angiotensina II, vasopresina, TGF- β , ionóforo de Ca^{2+} , ésteres de forbol y fuerzas de rozamiento vascular (Golden, C.L. y col., 1995; Emori, T. y col., 1992; Imai, T. y col., 1992; Malek, A. e Izumo, S., 1992).

La producción renal de endotelina se encuentra aumentada, virtualmente, en todas las formas de enfermedad renal crónica. Específicamente, la ET-1, ha sido implicada en el desarrollo de la enfermedad renal en diversos modelos de experimentación, incluyendo aquellos estudios realizados en animales transgénicos que la sobreexpresan. Por otra parte, se ha observado que el aumento de su expresión promueve la activación de c-Fos en el riñón, elemento principal del factor de transcripción AP-1 (Chareandee, C. y col., 2000).

Además de su descripción inicial como factor vasoconstrictor, se ha demostrado que la endotelina regula gran variedad de respuestas biológicas en tejidos no vasculares. En el riñón podría actuar como un factor autocrino y paracrino en la regulación del flujo sanguíneo renal, la hemodinámica glomerular y la homeostasis de agua y sodio. La endotelina realiza sus acciones a través de los receptores tipo A y tipo B (ET_A y ET_B). El bloqueo de estos receptores mediante antagonistas específicos se ha utilizado para investigar si interferir en las acciones de la endotelina por esta vía podría conferir renoprotección, como se comenta más detalladamente en el *apartado 6.6*.

3. Sistema renina-angiotensina y regulación transcripcional en la enfermedad renal.

Diversos estudios realizados en modelos experimentales y en humanos han puesto de manifiesto la participación del sistema renina-angiotensina (SRA) en la progresión de la fibrosis renal (Ots, M. y col., 1998; Mogensen, C.E. y col., 2000; Nishiyama, A. y col., 2002; Nakao, N. y col., 2003; Azizi, M. y col., 2006). Este sistema es uno de los principales reguladores del volumen extracelular y de la presión arterial, de manera que cuando los barorreceptores presentes en el arco aórtico y en el seno carotídeo detectan una disminución en la presión arterial producen una activación del sistema simpático que conduce a una vasoconstricción sistémica, esto provoca un aumento de la presión arterial y una liberación de renina por el aparato yuxtaglomerular presente en las nefronas del riñón. Esta enzima circula en el plasma en dos formas moleculares: una activa, la renina propiamente dicha, y otra inactiva de mayor peso molecular, la prorenina, cuyas proporciones relativas varían considerablemente según diferentes circunstancias y patologías. Por otra parte, la renina es la responsable de la transformación del angiotensinógeno, secretado principalmente en el hígado, en angiotensina I, que a su vez, por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), es transformada en el principal efector del SRA: la angiotensina II. Ésta estimula gran variedad de respuestas fisiológicas que contribuyen al control de la presión sanguínea y de la función renal. Alternativamente, a nivel tisular en el riñón se puede generar angiotensina II directamente del angiotensinógeno por medio de las enzimas elastasa, catepsina G y el activador tisular del plasminógeno (Dinh, D.T. y col., 2001). A este sistema de generación tisular de angiotensina II independiente de la actividad renina se le conoce como sistema local o tisular generador de angiotensina II (SLGAI) (Danser, A.H., 2003), para diferenciarlo del SRA, que opera a nivel circulatorio.

La angiotensina II participa en la patogénesis de la hipertensión, la enfermedad arterial, la hipertrofia y el fallo cardíaco, y la enfermedad renal progresiva (Li, X.C. y Zhuo, J.L., 2008; Ruiz-Ortega, M. y col., 2006). La hipertensión glomerular, la hipertrofia de las células glomerulares y la expansión de matriz extracelular con infiltración de monocitos-macrófagos son fenómenos comunes al desarrollo de gran número de glomerulopatías. En todas estas anomalías parece estar implicada una producción elevada de angiotensina II. Los antagonistas y los inhibidores de la síntesis de la angiotensina II reducen claramente e incluso pueden prevenir el deterioro renal en diferentes modelos experimentales que provocan fallo renal progresivo: 5/6 de nefrectomía (Piecha, G. y col., 2008; Nishimura, M. y col., 2007), en ratas hipertensas SHR/NDmcr-cp (Watanabe, D. y col., 2009). Se sabe que la angiotensina II

activa al menos dos receptores: AT1 y AT2, y que la mayoría de los efectos como vasoconstricción, inflamación y deposición de matriz están regulados por el primero de ellos. Aunque el segundo ha sido menos estudiado, se están haciendo múltiples esfuerzos para entender qué papel puede estar jugando en el SRA. Recientemente, en un trabajo con ratones *knock-out* para el receptor AT2 se demostró activación de toda una serie de acontecimientos propios del daño renal en los animales objeto de estudio: albuminuria y mayor mortalidad que en los ratones normales; igualmente, los autores encontraron aumento de expresión de fibronectina 1 (FN-1), MCP-1 y RANTES (Benndorf, R.A. y col., 2009). Estos resultados sugieren que el receptor AT2 podría tener propiedades antiproteínúricas, antiinflamatorias y antifibróticas en la ERC.

El papel de la angiotensina II a nivel hemodinámico es más conocido que a nivel metabólico; por ello, algunos grupos de investigación están centrando sus esfuerzos en el esclarecimiento de esta vía de acción relacionada con el metabolismo. Todo parece indicar que la angiotensina II podría estar jugando algún papel en el consumo de oxígeno a nivel renal, de manera que otro tipo de mecanismos, además de los hemodinámicos, podrían estar involucrados en los beneficios generados por el bloqueo de éste péptido (Deng, A. y col., 2009).

La relación existente entre el SRA y el TGF- β ha quedado claramente establecida, pues se ha demostrado que la angiotensina II induce fibrosis mediante la activación de la vía de señalización de TGF- β (Border, W.A. y Noble, N.A., 1998) y la subsiguiente inducción de los factores nucleares Smad (Massagué, J. y Chen, Y.G., 2000). Por otra parte, las acciones fisiopatológicas de la angiotensina II se deben parcialmente, a la activación de factores nucleares como NF- κ B y AP-1 (Suzuki, Y. y col., 2003), aspecto en el que se profundizará en el siguiente apartado.

4. NF- κ B y AP-1: Factores de transcripción implicados en la ERC.

Muchos genes mediadores de inflamación son activados por el factor de transcripción NF- κ B. En realidad este engloba a un grupo de factores nucleares, que inducen la transcripción de múltiples genes que contienen en su región promotora una de las secuencias de 10 pares de bases 5'-GGGRNYYYCC-3', donde R=purina, Y=pirimidina y N=cualquier base. Han sido clonadas y caracterizadas cinco proteínas de la familia Rel/NF- κ B: p50,

también llamada NF- κ B1; p52, conocida como NF- κ B2; RelA, también llamada p65; RelB y c-Rel. El factor de transcripción NF- κ B es un dímero formado por proteínas de la familia Rel/NF- κ B. De las 15 isoformas existentes, al menos doce tienen capacidad de unirse al DNA y regular la transcripción: RelA/RelA, RelA/p50, RelA/c-Rel, RelB/p52, RelB/p100, RelB/p50, c-Rel/c-Rel, c-Rel/p50, p50/p50, p50/Bcl3, p52/p52, p52/Bcl3 (Hoffmann, A. y col., 2006; Hayden, M.S. y Ghosh, S., 2004; Chen, L.F. y Greene, W.C., 2004). En la mayoría de los tipos celulares, la isoforma por excelencia es el heterodímero p65/p50, que además de ser la más común es la más potente como transactivador génico y la más estudiada en riñón y en otros tejidos. Por otra parte, en macrófagos de ratones carentes de p50, se ha observado una reducción de la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y sobreexpresión de citocinas proinflamatorias como IL-12 y TNF (Cao, S. y col., 2006). Estas observaciones están en consonancia con un estudio previo en el que sus autores destacaban que los efectos provocados por el bloqueo de NF- κ B dependían en gran medida del estadio en la evolución del proceso inflamatorio (Lawrence, T. y col., 2001). Asimismo, se ha demostrado en dos modelos de nefritis aguda (glomerulonefritis por anticuerpos antitimocito en rata y nefritis inducida por lipopolisacáridos en ratón) que la isoforma p65/p50 se encuentra sobreexpresada en la etapa aguda del proceso inflamatorio, mientras que en la etapa de resolución predomina la isoforma homodimérica p50/p50 (Panzer, U. y col., 2009). El conjunto de estos hallazgos sugieren un posible papel antiinflamatorio y un carácter renoprotector para la isoforma p50/p50. Los mecanismos mediante los que las proteínas Rel/NF- κ B dimerizan y dan lugar a las diferentes isoformas, así como sus correspondientes papeles tanto a nivel bioquímico como fisiológico no están del todo esclarecidos.

NF- κ B permanece inactivo y unido a la proteína inhibidora I κ B en el citoplasma de múltiples tipos celulares, como linfocitos T, monocitos, macrófagos y células renales (Guijarro, C. y Egido, J., 2001). La activación de NF- κ B requiere de la fosforilación y posterior degradación proteolítica de la subunidad inhibidora I κ B (figura 2). El NF- κ B libre, que como se ha indicado, es un heterodímero compuesto habitualmente por las proteínas p65 y p50, se transloca al núcleo donde se une a los sitios κ B en la región promotora de numerosos genes involucrados en la inflamación y la respuesta inmune (Barnes, P.J. y Karin, M., 1997), como MCP-1, TNF- α , interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8) y moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1). Por otra parte, algunos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la capacidad de NF- κ B para regular la transcripción de algunas sustancias

vasoactivas como la pre-proendotelina-1 y de proteínas de matriz extracelular como la fibronectina 1. Además, se han localizado elementos de respuesta de NF- κ B en los promotores de estos genes (Quehenberger, P. y col., 2000; Lee, B.H. y col., 2002; Kon, A. y col., 1999).

La activación de NF- κ B es característica de numerosos modelos experimentales de daño renal. Así, se han encontrado niveles elevados de NF- κ B en la nefropatía por obstrucción vía urinaria (Klahr, S. y Morrissey, J., 1998; Miyajima, A. y col., 2003), la nefritis por inmunocomplejos (Ruiz-Ortega, M. y col., 1998; Kosaka, T. y col., 2008), la nefritis por nefrotoxicidad (Sakurai, H. y col., 1996), la nefropatía por adriamicina (Rangan, G. K. y col., 1999) y la nefritis inducida por lipopolisacáridos (LPS) (Tomita, N. y col., 2000). Estos pueden reducirse eficazmente mediante tratamiento con inhibidores del enzima conversor de angiotensina (IECA), lo que pone de manifiesto el papel mediador de NF- κ B en los efectos de la angiotensina II. Este hallazgo está en consonancia con observaciones realizadas *in vitro* que demuestran que la angiotensina II potencia la actividad de dicho factor nuclear en monocitos, células mesangiales y células de músculo liso vascular. Por otro lado, la angiotensina II puede provocar la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la estimulación de la NADPH oxidasa en diversos tipos celulares. Estas ROS pueden actuar como mensajeros de transducción de señales para NF- κ B (Li, N. y Karin, M., 1999; Mervaala, E. y col., 2003).

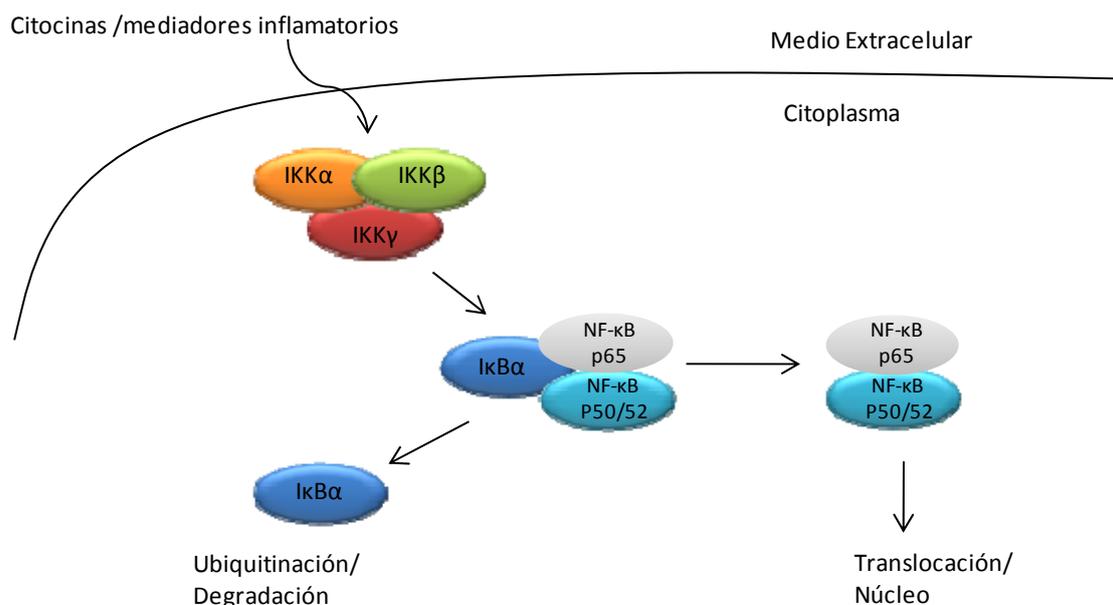


Figura 2. Mecanismo de activación de NF-κB. Diferentes agentes proinflamatorios (IL-1, TNF- α , LPS) promueven la fosforilación del complejo IKK (IKK α , IKK β e IKK γ). Este complejo fosforila la subunidad inhibitoria de NF-κB (IκB α) que a su vez es ubiquitinizada y posteriormente proteolizada. El dímero de NF-κB, ahora activo, es capaz de translocarse al núcleo e inducir o reprimir la activación de múltiples genes. IL-1: Interleucina-1; TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral- α ; LPS: Lipopolisacárido.

AP-1 es un regulador transcripcional compuesto de miembros de las familias Fos y Jun principalmente (figura 3). Mientras las proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) sólo pueden formar heterodímeros con miembros de la familia Jun, estos últimos (Jun, JunB y JunD) pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros con miembros de Fos (Zenz, R. y Wagner, E.F., 2006). Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que los heterodímeros Jun-Fos son más estables y muestran una mayor capacidad de unión al DNA que los homodímeros Jun-Jun (Halazonetis, T.D. y col., 1988; Ryseck, R.P. y Bravo, R.; 1991). Las diferentes proteínas que conforman AP-1 poseen diferencias sustanciales en sus dominios de transactivación (Milde-Langosch, K., 2005). Así, a pesar de que las proteínas c-Jun, c-Fos y FosB poseen un dominio de transactivación amino-terminal, JunB, JunD, Fra-1, Fra-2 y FosB2 poseen una actividad de transactivación muy débil (Papavassiliou, A.G. y col., 1992). De este modo, la regulación de este factor se realiza a través de cambios en la tasa de transcripción de los genes que codifican para las diferentes subunidades de AP-1, modificaciones postraduccionales, así como mediante interacciones específicas entre las

diferentes proteínas implicadas y otros factores de transcripción y/o cofactores. En este sentido, se ha demostrado en un modelo de nefritis por nefrotoxicidad en rata, que c-Jun y c-Fos son las isoformas que mayor aumento de expresión experimentan, y que existe una estrecha correlación entre la activación de AP-1 y el aumento de expresión de MCP-1 (Zhang, A.H. y col., 2004). Asimismo, en células túbulo-epiteliales humanas se ha observado que un inhibidor selectivo de Jun kinasa, el SP600125, es capaz de reducir la fosforilación de c-Jun, atenuando de esta forma la sobreexpresión de colágeno I y de MCP-1 mediada por TGF- β (de Borst, M.H. y col., 2007). Por otra parte, se ha observado que la proteína nuclear JunD es un determinante de suma importancia en la actividad de macrófagos y está asociado con la susceptibilidad a glomerulonefritis en ratas Wistar Kyoto (Behmoaras, J. y col., 2008).

AP-1 regula la expresión de varios genes implicados en la patogénesis del daño glomerular, como la endotelina, el TGF- β 1, la interleucina-6, el MCP-1 y el colágeno I. De hecho, las vías de activación del TGF- β actúan coordinadamente con AP-1 en la activación transcripcional de la pre-proET-1 (Rodríguez-Pascual, F. y col., 2003), y el colágeno I (Tharoux, P.L. y col., 2000; de Borst, M.H. y col., 2007), y se ha demostrado que se requiere la inducción de AP-1 para el aumento de expresión de fibronectina mediada por TGF- β 1 (Hocevar, B.A. y col., 1999).

La actividad de AP-1 puede ser modulada por diferentes efectores: citocinas, factores de crecimiento, señales de estrés, estímulos oncogénicos entre otros, que provocan la activación de diversos mecanismos de transducción de señales (Young, M.R. y Colburn, N.H., 2006; Karin, M., 1995). Asimismo, la activación del factor de transcripción AP-1 parece ser responsable parcial de las acciones profibrogénicas de la angiotensina II (Hamaguchi, A. y col., 1999). Este proceso parece estar ligado, a su vez, a la capacidad de la angiotensina II para estimular la producción de ROS (Mervaala, E. y col., 2003). Como ya se ha comentado, la angiotensina II induce fibrosis mediante la activación de la vía de señalización del TGF- β (Border, W. y Noble, N.A., 1998) y la subsiguiente inducción de factores nucleares Smad (Massagué, J. y Chen, Y.G., 2000). La activación simultánea de AP-1 y de factores nucleares Smad inducida por angiotensina II podría favorecer las acciones coordinadas de estos factores nucleares en la regulación de la expresión de otros genes profibrogénicos.

Por otra parte, las posibles conexiones entre las acciones de NF- κ B y AP-1 es algo que desde hace tiempo inquieta a la comunidad científica dedicada a estudiar la fisiología y

fisiopatología renales. En este sentido, los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II (ARAII) reducen el incremento de endotelina (Lariviere, R. y col., 1998), de TGF- β 1 y de proteínas de matriz extracelular (Lee, L.K. y col., 1995) en el riñón de ratas nefrectomizadas. Se ha demostrado que la endotelina 1 y el TGF- β 1 actúan de forma sinérgica en la potenciación de la síntesis de colágeno I tras administración intravenosa de angiotensina II (Fakhouri, F. y col., 2001). Un efecto similar se ha observado en piezas de corteza renal expuestas a angiotensina II *ex vivo* (Tharaux, P. L. y col., 2000). En este modelo, es necesaria la activación de las vías de señalización del TGF- β 1 y de la proteína quinasa activada por mitógenos-kinasa regulada por estímulos extracelulares (MAPK/ERK), que parecen cooperar en la formación del complejo transcripcional AP-1 y en la consiguiente activación de la expresión génica del colágeno I. Resulta llamativo que la activación de NF- κ B por angiotensina II no parece guardar relación con la fibrogénesis en este estudio. Esto sugiere que las acciones de los factores nucleares AP-1 y NF- κ B en el daño renal podrían transcurrir por vías independientes.

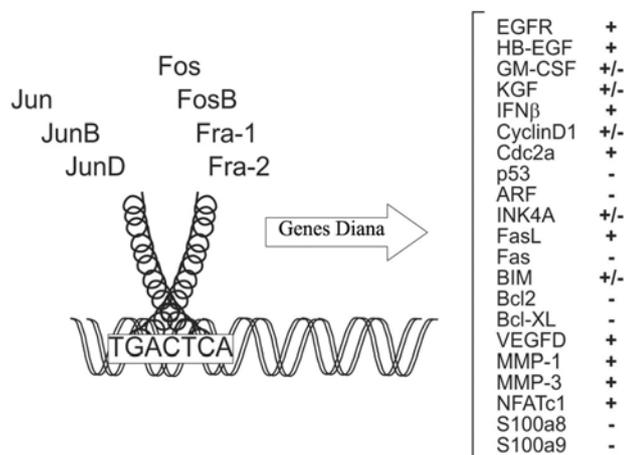


Figura 3. Factor de transcripción proteína activadora 1 (AP-1). Es un factor de transcripción dimérico compuesto por proteínas Jun y Fos. Las proteínas Jun forman homo o heterodímeros con las proteínas Fos mediante dominios cremallera de leucina. Las distintas combinaciones diméricas reconocen secuencias pertenecientes a promotores o activadores de diferentes genes diana; estos últimos son regulados positivamente (+), negativamente (-) o positiva y negativamente (+/-) según el tipo de dímero de AP-1. Se muestra el elemento de respuesta clásico a ésteres de forbol (TRE) y la secuencia consenso correspondiente (TGACTCA).

5. Modelo de 5/6 de nefrectomía: características moleculares.

La reducción quirúrgica severa de masa renal (5/6 de nefrectomía) en animales de experimentación progresa inevitablemente hacia el fallo renal. La hiperperfusión de las nefronas remanentes constituye la respuesta renal adaptativa a la reducción de la masa renal. Los procesos de adaptación hemodinámicos dan lugar a la aparición de hipertensión sistémica y glomerular, que previsiblemente terminará afectando a la permeabilidad selectiva de la barrera de filtrado glomerular. Esta precede al desarrollo de glomerulosclerosis, que se acompaña de proteinuria creciente, insuficiencia renal progresiva y de hipertrofia renal y cardíaca. La importancia del SRA en la patogénesis del daño renal ha sido descrita en este modelo experimental (Lafayette, R. A. y cols., 1992). Sin embargo, los efectos renoprotectores de los IECA y de los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II no parecen estar canalizados exclusivamente por una reducción en los valores de la presión arterial. Este modelo presenta diferencias importantes en la expresión de citocinas y factores de crecimiento, y en el tiempo de evolución de la patología renal respecto a otros modelos experimentales. Así, como se ha comentado anteriormente en el *apartado 2*, se ha observado que en el modelo de 5/6 de nefrectomía no hay aumento de expresión de TNF- α (Schiller, B. y Moran, J., 1997), mientras que en modelos experimentales como la nefritis lúpica en ratón o la nefritis por aminonucleósidos en rata (Neale, T.J. y col., 1995) sí parece jugar un papel destacado en la progresión de la enfermedad. Estas diferencias están relacionadas previsiblemente con los mecanismos particulares que entran en juego en los primeros estadios de la enfermedad en cada modelo experimental. El modelo de 5/6 de nefrectomía es uno de los más aceptados de insuficiencia renal crónica. Es extrapolable al humano, como se ha podido observar en diferentes procesos patológicos (esclerosis focal y segmentaria, agenesia renal, etc.) y es de los pocos modelos que ofrece todo el espectro de evolución de la enfermedad renal: proteinuria, hipertensión arterial y pérdida de función renal. En éste coexisten el daño glomerular, tubulointersticial y vascular.

6. Estrategias renoprotectoras.

Muchas son las estrategias renoprotectoras utilizadas hasta la fecha. Gran parte de ellas se basan en terapias antihipertensivas y antiproteinúricas; de hecho, diferentes estudios han demostrado que el control de la hipertensión en sí mismo, es capaz de incidir en la disminución de la proteinuria (Peterson, J.C. y col., 1995; Schrier, R.W. y col., 2002; Wright, J.T., Jr. y Douglas, J., 2003). Si bien alcanzar una presión arterial relativamente baja (< 125

mmHg) debería ser el objetivo de cualquier tratamiento antihipertensivo enfocado a la renoprotección (Peterson, J.C. y col., 1995; Schrier, R.W. y col., 2002) en el caso de un tratamiento antiproteinúrico lo ideal sería alcanzar valores de proteinuria inferiores a 300 mg/m²/día, debido a que se han asociado con claros efectos renoprotectores (Jafar, T.H. y col., 2001; Ruggenti, P. y col., 2001).

En nuestro estudio hemos empleado fármacos con capacidad renoprotectora o bien aquellos en los que se ha hipotetizado que pueden proteger el riñón. En primer lugar, utilizamos un agente antihipertensivo bloqueante del SRA, específicamente, un ARAII (losartán). Nos decantamos por este fármaco en lugar de por un IECA debido a que consideramos que las vías alternativas para producir angiotensina II a nivel tisular, independientes del enzima conversor de angiotensina, pueden escapar al abordaje terapéutico de este tipo de agente farmacológico, mientras que el ARAII, que actúa sobre los receptores AT1, sería capaz de neutralizar los efectos de la angiotensina II independientemente de la vía por la que ésta última se hubiera generado. En segundo lugar, utilizamos el carvedilol, un betabloqueante y vasodilatador con capacidad renoprotectora previamente documentada en 5/6 de nefrectomía por nuestro grupo (Rodríguez-Pérez, J.C. y col., 1997). Como ya habíamos elegido dos fármacos con capacidades antihipertensivas y renoprotectoras bien documentadas en 5/6 de nefrectomía (Lariviere, R. y col., 1998; Rodríguez-Pérez, J.C. y col., 1997), decidimos utilizar otros que nos permitieran analizar la renoprotección independientemente del control de la presión arterial. Las estatinas son capaces de reducir la producción de MCP-1 (Kim, S.Y. y col., 1995) y NF-κB en células mesangiales humanas (Guijarro, C. y col., 1996). Asimismo, se ha postulado que las estatinas podrían disminuir el avance de la progresión de la ERC como consecuencia de sus acciones pleiotrópicas (Epstein, M. y Campese, V.M., 2005; Campese, V.M. y col., 2005), por lo que decidimos utilizar una de ellas, específicamente, la cerivastatina. Por otra parte, debido al protagonismo que estaba adquiriendo la endotelina-1 en la progresión de la ERC en el 5/6 de nefrectomía (Remuzzi, G. y col., 1997) utilizamos un antagonista no selectivo de los receptores ET_A y ET_B (Ro 48-5695). A continuación se comentan las diversas estrategias que han sido utilizadas o podrían llegar a ser de utilidad en la clínica para el tratamiento de la ERC, aunque no todas ellas han sido analizadas en el presente estudio.

6.1 Bloqueadores de los canales de calcio.

Aunque el potencial renoprotector de estos fármacos no está del todo claro, todo apunta a que sus acciones pleiotrópicas podrían contribuir a proteger el riñón del daño provocado por la hipertensión, ya que son capaces de normalizar los valores de presión arterial (PA) en pacientes con ERC. Si bien se ha documentado que algunos bloqueadores de los canales de calcio (BCC) dihidropiridínicos, como el nifedipino o el amlodipino pueden ser ineficaces o incluso contraproducentes, otros BCC no-dihidropiridínicos como el verapamil o el diltiazem pueden tener cierto efecto antiproteinúrico y, en consecuencia, podrían ser buenos candidatos a la renoprotección (Remuzzi, G. y col., 1997). Actualmente se sabe que los BCC dihidropiridínicos de tercera generación como el manidipino, el nilvadipino o el benidipino ofrecen beneficios en la función renal por su capacidad para ejercer vasodilatación tanto de las arteriolas eferentes como aferentes (Hayashi, M. y col., 2000; Hayashi, K. y col., 2003). Sin embargo, es necesario realizar ensayos clínicos suficientes que aclaren el potencial de estos fármacos en la ERC.

6.2 Bloqueo del SRA.

Existen diferentes alternativas terapéuticas relacionadas con el sistema renina-angiotensina-aldosterona. La generación anormal de angiotensina II está claramente implicada en el desarrollo de la enfermedad renal progresiva, como se comentó en el *apartado 3*. Por ello, entre las estrategias terapéuticas más utilizadas se encuentran las destinadas al bloqueo del SRA mediante el uso de fármacos como los antagonistas de la renina, los IECA y los ARAII. Los antagonistas de la renina inhiben selectivamente los receptores prorenina implicados en la síntesis de angiotensina I a partir de angiotensinógeno. Los IECA obstaculizan la conversión de angiotensina I en angiotensina II, inhibiendo la enzima que cataliza dicha reacción, mientras que los ARAII bloquean los receptores tipo 1 de la angiotensina II, y por tanto, las acciones de esta última mediadas por dicho receptor. Los antagonistas de la renina se postulan como posibles candidatos para el tratamiento de la enfermedad renal por su capacidad para el bloqueo parcial de este sistema. El caso del aliskiren es una prueba de ello, pues se ha demostrado que es capaz de normalizar los valores de PA en pacientes hipertensos (Oparil, S. y col., 2007), y contribuye a la reducción de la albuminuria en pacientes con nefropatía diabética en tratamiento con ARAII (Parving, H.H. y cols., 2008). Sin embargo, aún no hay estudios suficientes sobre su capacidad renoprotectora.

Los IECA y los ARAII son capaces de reducir la presión intraglomerular y la proteinuria, de disminuir la liberación local de citocinas y de quimiocinas, así como de controlar los mecanismos de inflamación implicados, de manera que la esclerosis e hipertrofia glomerular, la inflamación túbulointersticial y la fibrosis se ven considerablemente atenuados, retrasando la aparición del daño renal (Lewis, E.J. y col., 1993; Maschio, G. y col., 1996; Izuhara, Y. y col., 2005).

En el caso particular que nos interesa, los ARAII, como el losartán, actúan bloqueando competitiva y selectivamente los receptores AT1, inhibiendo así los efectos hipertensivos de la angiotensina II, especialmente los relacionados con la vasoconstricción y la liberación de aldosterona. Los ARAII se dividen en dos subgrupos químicos: los bifeniltetrazoles y no bifeniltetrazoles. El losartán pertenece al primero de los subgrupos y no se une ni bloquea otros receptores hormonales o canales de iones importantes en la regulación cardiovascular. Estos fármacos han demostrado una alta seguridad y eficacia, además de ejercer efectos beneficiosos independientes de su acción antihipertensiva en pacientes con insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus tipo 1 y nefropatías. Asimismo, los ARAII disminuyen la proteinuria y la glomeruloesclerosis en modelos animales de insuficiencia renal asociada o no a diabetes, debido, en parte, a una disminución de la fibrosis intersticial y de la expresión glomerular de TGF β -1, colágenos tipo I, III y IV, y FN-1 (Timmermans, P.B. y col., 1993; Burnier, M., 2001; Goa, K.L. y Wagstaff, A.J., 1996; Croom, K.F. y col., 2004; Sharpe, M. y col., 2001; Easthope, S.E. y Jarvis, B., 2002; Wellington, K. y Faulds, D.M., 2002; Unger, T. y col., 2004; Horiuchi, M. y col., 1999).

Diferentes ensayos clínicos han arrojado resultados positivos sobre este fármaco. El estudio LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension), que se llevó a cabo en pacientes hipertensos constató la capacidad del losartán para reducir las cifras de presión arterial. Aunque la capacidad antihipertensiva del losartán fue similar a la del atenolol con el que estaban tratados los pacientes del grupo control, el losartán redujo el riesgo de sufrir infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y muerte por enfermedad cardiovascular en relación al atenolol. El losartán parece conferir, por tanto, beneficios más allá de la reducción de la presión arterial (Dahlöf, B. y col., 2002; Egan, B. y col., 2004). Por otra parte, el estudio RENAAL (Reduction of End points in NIDDM with the Angiotensin II Receptor Antagonist Losartan), demostró que el losartán es capaz de reducir la proteinuria y el riesgo de progresión hacia insuficiencia renal terminal en un grupo de pacientes con diabetes tipo 2 y nefropatía (Brenner, B.M. y col., 2001; Egan, B. y col., 2004). Asimismo, en

pacientes normotensos con nefropatía IgA, el losartán redujo la proteinuria y la excreción de N-acetilglucosaminidasa en orina y, por tanto, la magnitud de las lesiones tubulares, con independencia de la PA (Shimizu, A. y col., 2008).

Los antagonistas de la aldosterona, por sus propiedades diuréticas, se han utilizado en el tratamiento de la hipertensión y de la ERC en asociación con otros fármacos como ARAII o IECA. Estos fármacos llevan implícito el riesgo de provocar hiperpotasemia, así como la aparición de posibles efectos secundarios relacionados con el sistema endocrino; no obstante, el desarrollo de nuevos principios activos ha ido superando este último escollo. Un ejemplo de ello es la eplerenona, que al contrario que la espinolactona, tiene menos afinidad por los receptores de progesterona y androgénicos, y se ha demostrado que sus efectos secundarios apenas difieren de los correspondientes al placebo (White, W.B. y col., 2003).

6.3 Betabloqueantes.

El bloqueo de los receptores postsinápticos beta conlleva, entre otros efectos, una disminución de los valores de PA en pacientes con ERC. Se ha demostrado que el metoprolol y el atenolol tienen capacidad renoprotectora (Parving, H.H. y col., 1983; Marchi, F. y Ciriello, G., 1995) si bien betabloqueantes más novedosos como el carvedilol resultan más eficaces en la protección renal (Marchi, F. y Ciriello, G., 1995; Fassbinder, W. y col., 1999). Este fármaco es un antihipertensivo con acción beta-bloqueante no cardioselectiva sin actividad simpaticomimética intrínseca, alfa1-bloqueante a nivel postsináptico y vasodilatadora. Tiene la capacidad de no modificar los niveles de glucosa, ni el perfil lipídico, ni la función renal. Produce una rápida caída de la resistencia vascular periférica así como de la presión arterial sin modificar la frecuencia cardíaca ni el volumen minuto.

Son bien conocidas las propiedades cardioprotectoras de los betabloqueantes, sin embargo, los efectos negativos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos ha hecho que su utilización sea controvertida en pacientes diabéticos, cuya predisposición a padecer ERC es elevada. Así, los efectos secundarios de este tipo de fármacos en pacientes diabéticos contemplan disminución de los niveles de LDLs, aumento de los niveles de triglicéridos y aumento de insulino-resistencia. El estudio GEMINI compara los efectos del carvedilol y del tartrato de metoprolol sobre el control de la glucemia. Los autores observaron que los valores de microalbuminuria más bajos correspondieron a los pacientes que fueron tratados con carvedilol (Bakris, G. L. y col., 2004; Phillips, R. A. y col., 2008). Estos mismos pacientes

presentaron un aumento de la sensibilidad a la insulina, no observada en aquellos tratados con metoprolol, y no se apreciaron diferencias significativas en la variación promedio de hemoglobina glicosilada respecto del ingreso mientras que en el grupo tratado con metoprolol sí hubo aumento de proteína glicosilada.

Algunos estudios aportan información que ponen de manifiesto las propiedades antiproliferativas y antioxidantes del carvedilol (Sung, C.P. y col., 1993; Sung, C.P. y col., 1997; Yue, T.L. y col., 1992a; Yue, T.L. y col., 1992b; Yue, T.L. y col., 1992c; Yue, T.L. y col., 1993; Yue, T.L. y col., 1994a; Yue, T.L. y col., 1994b; Van den Branden, C. y col., 1997; Arumanayagam, M. y col., 2001). En un modelo de nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratas, el carvedilol redujo los niveles de malonildialdehído (MDA) renal incrementados por el cisplatino, y normalizó los correspondientes a enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la catalasa, disminuidos también por la acción del mismo quimioterápico (Gamal el-Din, A. M. y Al-Bekairi, A. M., 2006). Igualmente, en ratas sometidas a daño renal por isquemia/reperfusión, el carvedilol fue capaz de reducir considerablemente los niveles de creatinina sérica respecto al grupo control y a otro tratado con metoprolol (Hayashi, T. y col., 2008). Por otro lado, nuestro grupo ha encontrado mejora en la tasa de filtrado glomerular, reducción de la actividad de la renina plasmática y del daño renal en ratas sometidas a 5/6 de nefrectomía tratadas con distintas dosis de carvedilol. Este efecto estuvo presente incluso a dosis no antihipertensivas (Rodríguez-Pérez, J.C. y col., 1997).

6.4 *Estatinas.*

La introducción de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, comúnmente denominados estatinas, ha revolucionado el tratamiento farmacológico de las dislipidemias debido a su elevada eficacia y tolerancia. La inhibición de la biosíntesis del colesterol se acompaña de una mayor presencia de receptores hepáticos de LDL, que promueven la captación y el aclaramiento de colesterol del torrente sanguíneo (Knopp, R.H., 1999). El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición competitiva y reversible de la transformación del HMG-CoA a mevalonato, que es el precursor de los esteroides celulares, incluidos el colesterol y los lípidos isoprenoides (Goldstein, J.L. y Brown, M.S., 1990; Grunler, J. y col., 1994). Entre estos últimos se encuentra el dolicol, necesario para la glicosilación de proteínas, las ubiquinonas de la cadena respiratoria mitocondrial, la

isopentenil adenina, que interviene en la modificación de ciertas formas de RNAt, y los isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) que participan en la modificación postraducciona de gran variedad de proteínas que están involucradas en mecanismos de señalización celular. La modificación proteica por farnesilación o geranilgeranilación va a condicionar la localización subcelular y la actividad de estas proteínas. Los miembros de la superfamilia Ras, constituida por proteínas monoméricas capaces de unir GTP, también conocidas como proteínas G de bajo peso molecular, como Ras, Rac y Rho, son los sustratos principales de modificación postraducciona por isoprenilación y pueden ser dianas de interés para la inhibición por estatinas. No debe resultar extraño, por tanto, que las estatinas, además de su capacidad para inhibir la síntesis hepática de colesterol, también sean capaces de modificar otras funciones celulares, como las relativas al control del ciclo celular, la migración celular y el estado redox.

Respecto a la utilidad de estos fármacos como agentes renoprotectores, diversos estudios han demostrado que tienen la capacidad de retrasar la pérdida de la función renal en pacientes con IRC moderada, diabetes o problemas cardíacos (Tonelli, M. y col., 2003, 2005a y 2005b). Las estatinas pueden frenar la progresión de la enfermedad renal a través de sus conocidas acciones pleiotrópicas (Epstein, M. y Campese, V.M., 2005), entre las que se incluyen la reversión de la disfunción endotelial, la regulación del SRA, y sus acciones antiinflamatorias, antiproliferativas y antihipertensivas. Trabajos recientes evidencian que son capaces de reducir el estrés oxidativo, así como la expresión génica de laminina, CTGF, TGF- β y fibronectina, a la vez que pueden aumentar la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) (Koepke, M.L. y col., 2007; Zhou, M.S. y col., 2008). Por otra parte, en los últimos años se ha atribuido un papel relevante a la vía RhoA/Rho-quinasa en la progresión de la enfermedad renal en general y en la podocituria en particular, de modo que el efecto renoprotector de algunas estatinas podría residir en su capacidad para modular esta vía de señalización (Shibata, S. y col., 2006; Peng, F. y col., 2008). Sin embargo, todo parece indicar que a pesar de tener efectos beneficiosos en la proteinuria y la protección renal, las estatinas por sí solas son incapaces de lograr una renoprotección eficaz (Sandhu, S. y col., 2006).

La cerivastatina, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa utilizado en este trabajo, es un derivado piridínico sintético, enantioméricamente puro. Tiene una alta selectividad hepática, no atraviesa la barrera hematoencefálica y se ha demostrado que, tanto *in vitro* como *in vivo*, su afinidad enzimática es superior a la de otras estatinas como lovastatina, simvastatina y pravastatina. Posee una semivida de eliminación relativamente corta (2 a 3

horas para una dosis única de 0,2mg), aunque se transforma en los metabolitos M1, M23 y M24 que retienen las capacidades inhibitoras del fármaco original. Además de su capacidad para inhibir la síntesis de colesterol, se ha demostrado que la cerivastatina puede reducir la proteinuria y retrasar la aparición de uremia, atenuar la fibrosis renal e inhibir la infiltración de células inflamatorias en un modelo de fibrosis renal progresiva (Koepke, M.L. y col., 2007).

6.5 Inhibidores de NF- κ B.

Trabajos recientes mantienen a NF- κ B en el punto de mira como futura diana terapéutica por su importante papel en el progreso del daño renal en diferentes modelos animales, así como por las evidencias de reversión del daño al utilizar inhibidores específicos de este factor nuclear (Fujihara, C.K. y col., 2007; Wang, H. y col., 2008; Kosaka, T. y col., 2008). Algunos fármacos mencionados anteriormente en esta sección introductoria son capaces, al menos parcialmente, de modular la activación de NF- κ B. Entre ellos podemos citar los IECA y los ARAII, cuyo uso clínico en la protección renal está ampliamente contrastado, y las estatinas, a las cuales se les han atribuido capacidades renoprotectoras (Abbate, M. y col., 2006; Gilmore, T.D., 2006). Aunque estos fármacos pueden interferir con el mecanismo de activación de NF- κ B, no hay que olvidar que además pueden actuar en otras vías de señalización. Probablemente, el beneficio del uso de estos fármacos esté relacionado con el conjunto de efectos que pueden desencadenar y no sólo con su capacidad para inhibir NF- κ B. No está del todo claro si la modulación específica de la actividad de NF- κ B podría resultar aún más beneficiosa para el tratamiento de la ERC. Con el objetivo de dar respuesta a ésta incógnita se están llevando a cabo numerosos estudios y se está investigando en el desarrollo de inhibidores específicos de este factor de transcripción para su uso en la clínica (Gilmore, T.D. y Herscovitch, M., 2006). Se piensa que los inhibidores de las IkappaB quinasas (IKKs) podrían ser candidatos a aparecer muy pronto en el escenario clínico debido a que actualmente se encuentran en fase preclínica, y los resultados que se han obtenido son bastante alentadores (Heckmann, A. y col., 2004).

Los datos recogidos en diversos modelos experimentales de enfermedad renal también parecen evidenciar la utilidad de la inhibición específica de la activación de NF- κ B. En este sentido, Sánchez-López, E. y col. sometieron a tratamiento con partenolida, un inhibidor de NF- κ B, a ratones a los que se les había administrado CTGF durante 24h y que como

consecuencia habían experimentado sobreexpresión de quimiocinas como MCP-1 y RANTES, y citocinas como INF-gamma, IL-6 e IL-4 a nivel renal. La partenolida redujo la respuesta inflamatoria inducida por CTGF, además de la sobreexpresión de las citocinas y quimiocinas mencionadas (Sánchez-López, E. y col., 2009). Asimismo, la partenolida se muestra capaz de revertir el daño renal en un modelo animal basado en infusión de angiotensina II (Ozawa, Y. y Kobori, H., 2007). Un efecto similar sucede al utilizar fasudil, un inhibidor de la Rho-quinasa, demostrando que el eje Rho quinasa/NF- κ B juega un papel fundamental en la progresión del daño renal inducido por angiotensina II. Esta conexión entre proteínas Rho y NF- κ B se ha visto corroborada en un trabajo reciente en el que la administración de HA-1077, un inhibidor de Rho-quinasa, a ratones con nefritis inducida por lipopolisacáridos, provocó una reducción en la fosforilación de la isoforma p65 de NF- κ B y su translocación al núcleo (Meyer-Schwesinger, C. y col., 2009). Otro inhibidor de NF- κ B, el dihidroximetil-epoxiquinomicina (DHMEQ), se ha utilizado en diferentes modelos de daño renal en rata, como la obstrucción ureteral y la glomerulonefritis por anticuerpos antitimocito, obteniéndose muy buenos resultados (Miyajima, A. y col., 2003; Kosaka, T. y col., 2008).

Una sustancia muy utilizada a nivel experimental es el PDTC, tiocompuesto de bajo peso molecular con propiedades diversas: modulador del estado redox (Li, C. y col., 1999; Orrenius, S. y col., 1996); quelante de metales pesados (Iseki, A. y col., 2000) e inhibidor enzimático (Ross, S.D. y col., 2000). Este compuesto se ha utilizado como un potente inhibidor de NF- κ B (Li, C. y col., 1999; Schreck, R. y col., 1992), pero también como antioxidante (Muller, D.N. y col., 2000) y antagonista de citocinas proinflamatorias (Liu, S.F. y col., 1999). Si bien en algunos de estos estudios el PDTC no ha demostrado tener efectos sobre otros factores nucleares como AP-1, la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) o el factor de transcripción ubicuo (Sp-1) (Schreck y col., 1992; Liu, S.F. y col., 1999), otros trabajos han mostrado que puede inducir la actividad de AP-1, sugiriendo que dicho factor nuclear podría funcionar como un elemento de respuesta a los antioxidantes (Meyer, M. y col., 1993). En ratas transgénicas que sobreexpresan los genes del angiotensinógeno y la renina, como las ratas dTGR, se ha planteado la hipótesis de que la inhibición selectiva de NF- κ B con esta sustancia podría reportar un mayor beneficio que el que aportaría el bloqueo conjunto de la actividad transcripcional de AP-1 y de NF- κ B (Muller, D.N. y col., 2000). En estos animales no se ha encontrado disminución de la actividad de AP-1 después de haberles administrado PDTC, hallazgo que los autores han

interpretado como una posible contribución al papel antioxidante del PDTC y a la reducción de las lesiones cardíacas y renales propias del modelo.

En ratas con glomerulonefritis e inflamación tubulointersticial inducida por adriamicina, la inhibición de NF- κ B con PDTC se acompaña de reducción de la atrofia de las células tubulares y de un menor infiltrado de monocitos, aunque no se consigue atenuar la proteinuria (Rangan, G.K. y col., 1999). Asimismo, aunque el PDTC previene eficazmente el incremento de la actividad de NF- κ B en la nefritis pasiva de Heymann (NPH), sólo reduce la proteinuria en aquellos animales en que la enfermedad se induce a dosis subóptima de antisuero anti-Fx1A (Mudge, S.J. y col., 2001). Estos trabajos parecen sugerir que en modelos de daño renal severo, se debe actuar eficazmente en otras vías alternativas ya que la normalización de la actividad de NF- κ B, aunque necesaria, no es suficiente para frenar completamente la progresión de la enfermedad renal.

6.6 Antagonistas de los receptores de la ET.

La ET-1 actúa sobre dos tipos de receptores, ET_A y ET_B (Arai, H. y col., 1990; Sakurai, T. y col., 1990), que se encuentran ampliamente distribuidos en los lechos vasculares. La unión de la ET-1 a los receptores ET_A y ET_B en las células del músculo liso produce contracción (Opgaard, O.S. y col., 1994; Teerlink, J.R. y col., 1994; White, D.G. y col., 1993). Igualmente, la ET-1 estimula la contracción de la célula mesangial a través de los receptores ET_A (Simonson, M.S. y col., 1989), regulando la superficie capilar y la tasa de filtración (Badr, K. F. y col., 1989). Una vez producida la unión de la ET-1 a sus receptores en la célula muscular lisa o en la célula mesangial, se produce una activación de la fosfolipasa C y un aumento de los niveles citoplasmáticos de inositol trifosfato. Este suceso desencadena un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ y la subsiguiente respuesta contráctil a la ET-1 de la célula muscular lisa en la vasculatura o de la célula mesangial en el glomérulo (Dlugosz, J.A. y col., 1998). Los receptores ET_B localizados en las células endoteliales median la liberación de los vasodilatadores NO y prostaciclina (PGI₂) cuando son activados por ET-1 y ET-3 (de Nucci, G. y col., 1988; Hirata, Y. y col., 1993; Karaki, H. y col., 1993; Stricklett, P.K. y col., 2006), induciendo por tanto, relajación que podría modular su acción constrictora.

Aunque aún no se dispone de datos concluyentes sobre la eficacia a medio y largo plazo del antagonismo de los receptores de endotelina en humanos con enfermedad renal, se

han realizado estudios que ponen de manifiesto la capacidad renoprotectora y antihipertensiva de algunos antagonistas selectivos, sobre todo, de los receptores de endotelina ET_A (Brochu, E. y col., 1999; Tostes, R. C. y col., 2002; Lariviere, R. y Lebel, M., 2003; Chade, A.R. y col., 2006; Sasser, J.M. y col., 2007; Dhaun, N. y col., 2009; Weber, M.A. y col., 2009). Todo parece indicar que los receptores ET_B juegan un papel protector frente a los efectos profibróticos de la endotelina (Okada, Y. y col., 2004). Por último, el potencial terapéutico del antagonismo no selectivo de ambos receptores se ha puesto de manifiesto en algunos estudios de experimentación realizados en animales con fallo renal progresivo (Nabokov, A. y col., 1996; Benigni, A. y col., 1996) o en la glomerulonefritis proliferativa por inmunocomplejos (Ruiz-Ortega, M. y col., 1998; Kosaka, T. y col., 2008).

Entre los fármacos o sustancias utilizadas para el bloqueo no selectivo de los receptores A y B de la ET encontramos el bosotán. A partir de éste se ha generado otro antagonista aun más potente, el Ro 48-5695, que también actúa bloqueando de forma no selectiva los receptores ET_A y ET_B. Este antagonista se ha utilizado en múltiples estudios y en diferentes modelos animales, en su mayoría relacionados con patologías gástricas, cardíacas y renales (Taner, C.B. y col., 2001; Padol, I. y col., 2000; Clozel, M. y col., 1999; Poo, J.L. y col., 1999; Padol, I. y col., 1999; Best, P.J. y col., 1999).

6.7 Tratamiento combinado.

A pesar de que dos fármacos por separado podrían tener propiedades beneficiosas para una determinada patología, no es trivial su uso de forma combinada sin realizar estudios e investigaciones previas que den cuenta de si realmente se obtiene alguna ventaja respecto a la monoterapia, así como de las posibles interacciones medicamentosas que pudieran tener lugar. Estudios realizados en el modelo de 5/6 de nefrectomía desvelan que en ocasiones la terapia combinada no ofrece ventaja alguna frente a la monoterapia (Piecha, G. y col., 2008). En este trabajo los autores compararon tres grupos experimentales: uno tratado con losartán, otro con espirolactona y el tercero con la combinación de ambos. Los resultados pusieron de manifiesto que la combinación de los fármacos no es capaz de revertir la glomerulosclerosis de manera más eficaz que su uso por separado en este modelo experimental.

La ERC es una patología compleja que difícilmente pueda ser tratada de forma eficaz mediante monoterapia. De hecho, los pacientes que sufren esta dolencia desarrollan

hipertensión, y según las directrices del JNC7 aquellos que presenten una PA superior a 160/100 mmHg deben iniciar terapia combinada (Chobanian, A.V. y col., 2003).

La combinación de antagonistas del SRA de diferente naturaleza como los IECA y los ARAII potencia las propiedades antiproteinúricas de ambos fármacos con independencia de la presión arterial en pacientes no diabéticos con enfermedad renal, sugiriendo que a largo plazo podrían tener efectos renoprotectores superiores al uso de ambos fármacos por separado (Nakao, N. y col., 2003; Campbell, R. y col., 2003). Por otra parte, un meta-análisis en el que se comparó el uso individual *versus* simultáneo de IECA y ARAII puso de manifiesto que la terapia combinada es más eficaz para reducir los valores de PA, aunque la escasa diferencia encontrada no parece justificar su uso rutinario para el tratamiento de la hipertensión hasta disponer de suficientes estudios cuidadosamente controlados (Doulton, T.W. y col., 2005). En otro meta-análisis, que incluía 21 estudios y un total de 654 pacientes diabéticos y no diabéticos con enfermedad renal, la combinación de un IECA y ARAII resultó especialmente eficaz en la reducción de la proteinuria, al menos en el corto plazo, aunque no mejoró la tasa de filtrado glomerular respecto a los tratamientos individuales (MacKinnon, M. y col., 2006). Los autores plantean la necesidad de disponer de estudios con un largo período de seguimiento para determinar si el descenso de la proteinuria dará lugar a una preservación significativa de la función renal. El conjunto de estos estudios ha arrojado resultados menos espectaculares de lo que se podía preveer en un principio. Es posible que otras combinaciones de fármacos que actúen en vías de señalización diferentes y con mecanismos de acción complementarios puedan llegar a resultar más eficaces para el tratamiento de la enfermedad renal.

Las estatinas han mostrado la capacidad de amplificar tanto las propiedades antiinflamatorias como depresoras del estrés oxidativo de los ARAII en un modelo de ratones *knock-out* para ApoE sometidos a dieta elevada en colesterol (Li, Z. y col., 2004). Igualmente, se ha demostrado que el uso concomitante de una estatina y un ARAII ha sido capaz de prevenir la restenosis coronaria, en un grupo de pacientes a los que se les colocó stent, de forma más eficaz que utilizando la monoterapia correspondiente (Nishikawa, H. y col., 2005). El bloqueo del SRA unido al tratamiento con estatina ha resultado especialmente beneficioso en un modelo severo de glomerulonefritis (Zoja C. y col., 2002a), lo que sugiere que podríamos estar ante una combinación farmacológica cuanto menos interesante para el tratamiento de la ERC.

OBJETIVOS

El presente estudio fue diseñado para evaluar las acciones moleculares y fisiopatológicas de diferentes agentes farmacológicos con reconocidas propiedades renoprotectoras en un modelo experimental de IRC, como el de ablación renal (5/6Nx). Los objetivos concretos se muestran a continuación:

1. Determinar si los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 están implicados en la pérdida de función renal, así como su posible relación con la expresión de genes profibróticos involucrados en la progresión de la enfermedad (colágeno IV, fibronectina 1, endotelina-1 y MCP-1).
2. Estudiar las posibles conexiones entre las acciones de NF- κ B y AP-1.
3. Analizar la expresión de genes relevantes en la aparición de fibrosis renal, TGF- β 1, fibronectina 1, laminina y colágenos (I a VI), y contrastarla con la expresión de moléculas como BMP7 y KCP, capaces de antagonizar con los mecanismos de aparición de fibrosis indicados previamente.
4. Comparar la utilidad terapéutica de diversos fármacos en la progresión de la enfermedad renal en el modelo utilizado, estudiando asimismo la capacidad de cada uno de ellos para interferir con las modificaciones moleculares provocadas por la pérdida de masa renal. Los agentes farmacológicos empleados serán un antagonista del receptor AT1 de la angiotensina II (losartán), un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (cerivastatina), un agente de acción dual con propiedades vasodilatadoras y β -bloqueantes (carvedilol) y un antagonista no específico de los receptores ET_A y ET_B de la endotelina-1 (Ro 48-5695).
5. Determinar la utilidad terapéutica de la combinación de un antagonista del receptor AT1 (losartán) y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (cerivastatina), identificando los posibles efectos sinérgicos y/o aditivos en los parámetros estudiados.
6. Determinar si la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B y AP-1 podría estar asociada con los beneficios farmacológicos en este modelo de ERC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo experimental y seguimiento de la enfermedad

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 250-300 g de peso de la colonia criada en nuestra Unidad de Investigación. Los animales se mantuvieron según condiciones establecidas en el RD 1201/2005; Ley 32/2007. Todos los estudios se realizaron acorde a la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. El riñón derecho se extrajo bajo anestesia ligera con éter. Nueve días más tarde, los animales se anestesiaron con tiopental sódico (Pentotal: 50 mg/kg i.p.; Lab. Abbott, Chicago IL) y se llevaron a la mesa quirúrgica donde se realizó una laparotomía media con ampliación a incisión subcostal izquierda, visualizando el hilio y riñón izquierdo. Una vez ligadas dos de las tres ramas arteriales, el riñón sufrió un infarto de sus 2/3 partes, que incluyó polo superior, inferior y cara posterior. La temperatura del animal se mantuvo entre 37-38 °C hasta recuperación de la anestesia.

Se realizaron dos series de experimentos. La primera estuvo compuesta por animales a los que se les realizó la técnica quirúrgica de 5/6 de nefrectomía y que serían sacrificados 7 días después de la cirugía (Ct5/6Nx-7d; n=12). En esta misma serie se añadió un grupo de ratas a las que se sometió al mismo estrés quirúrgico, realizándoles una laparotomía media con ampliación a incisión subcostal izquierda, con visualización del hilio y riñón izquierdo, pero sin llevar a cabo la ablación renal (Sham-7d; n=8). La segunda serie de experimentos estuvo compuesta por un grupo sham (n=11) y animales con nefrectomía parcial que serían sacrificados a los 42 días de la cirugía. Como se muestra en la figura 4, las ratas nefrectomizadas fueron aleatorizadas para ser utilizadas como controles (Ct5/6Nx-42d; n=8), o bien recibir los correspondientes tratamientos farmacológicos: i) losartán (n=8; 200 mg/L en agua de bebida; Merck Sharp & Dohme, España); ii) cerivastatina (n=7; 0,1 mg/kg/día mediante sonda oral; Bayer AG, Wuppertal, Alemania); iii) losartán con cerivastatina (n=9) a las mismas dosis y mediante la misma vía de administración que los tratamientos individuales, y iv) carvedilol (n=8; 20 mg/L en agua de bebida; Hoffmann-La Roche, Grenzach, Alemania). Dentro de esta misma serie de experimentos se añadieron, *a posteriori*, dos grupos adicionales que recibieron tratamiento con un antagonista no selectivo de los receptores de endotelina ET_A/ET_B (Ro 48-5695; n=6; 30 mg/kg/día mediante sonda oral; Hoffmann-La Roche, Grenzach, Alemania) y con el inhibidor selectivo de NF-κB, PDTC (n=6; 200 mg/kg/día, inyección subcutánea; Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA).

Con el objetivo de observar qué efectos ejercían los fármacos desde los momentos iniciales de la ablación renal provocada por el modelo empleado, los tratamientos comenzaron una semana después de la cirugía y continuaron hasta el final del estudio. Las dosis de los diferentes fármacos se escogieron en base a diferentes trabajos revisados en la literatura científica (Lafayette, R.A. y col., 1992; Rodríguez-Pérez, J.C. y col., 1997; Bischoff, H. y col., 1997; Clozel, M. y col., 1999). Los animales fueron entrenados en sus correspondientes cepos durante 14 días antes del comienzo de los experimentos para asegurar unas medidas de tensión arterial fiables. El día de la uninefrectomía se determinó la presión arterial basal de forma incruenta en la cola de la rata (Letica Scientific Instruments: LE-5007; Barcelona). Justo antes del inicio del tratamiento, a los 24 días y al final del experimento se realizaron nuevas medidas electrónicas de la presión arterial (figura 4). Se tomaron cinco medidas por animal, descartando siempre la más elevada y la más baja de las obtenidas, de manera que el valor final fue la media de las tres medidas restantes. Igualmente se registraron los pesos de cada animal y se recolectaron las correspondientes orinas, para lo que se les dejó 24 horas en jaula metabólica. El día del sacrificio se realizó perfusión cardíaca con suero fisiológico a 37°C y se recogieron sangre y muestras de corteza renal para los estudios histológicos y las determinaciones moleculares. Se tuvo especial cuidado en la recogida de corteza renal para lo que se dejó un margen amplio de separación con la médula.

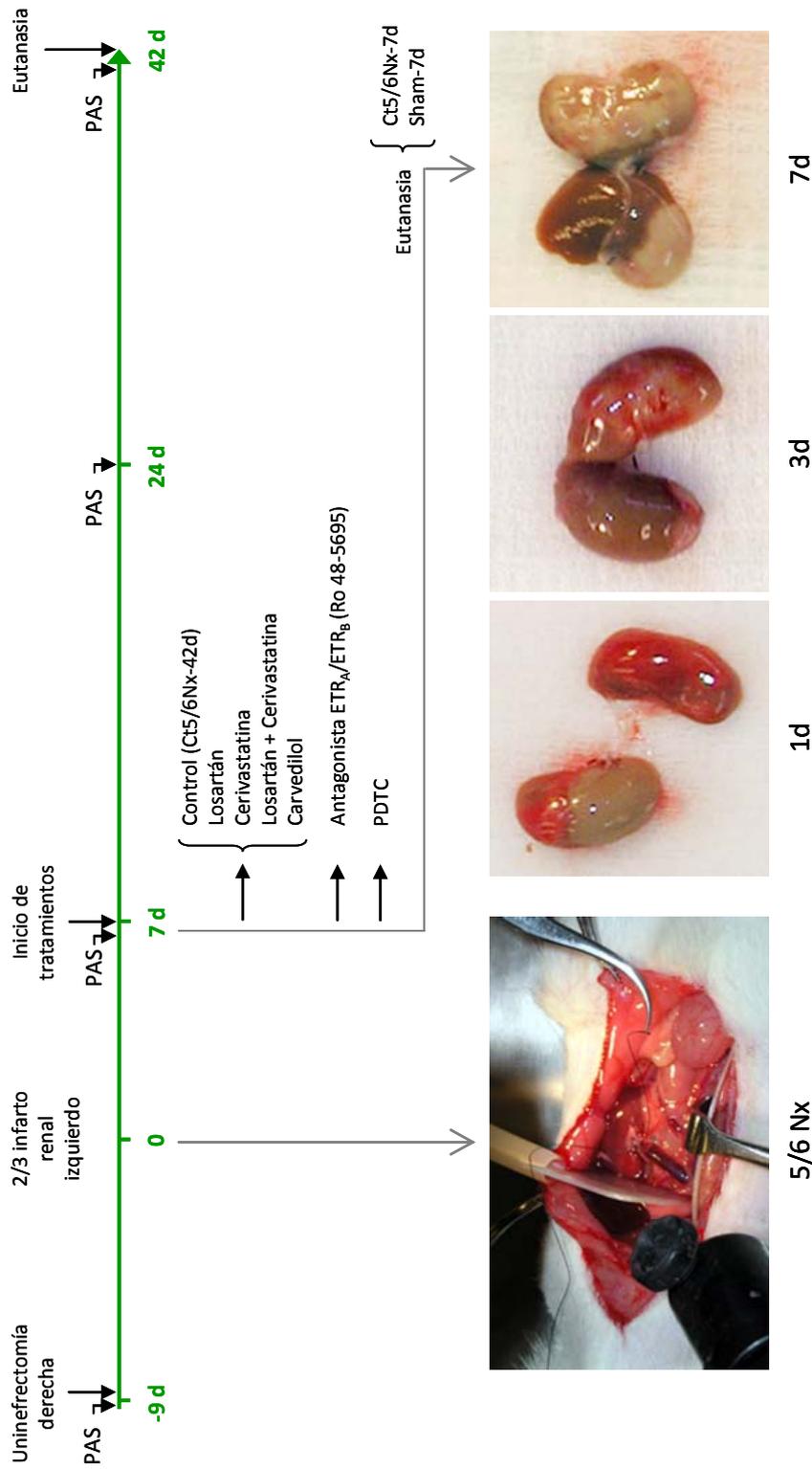


Figura 4. Modelo experimental y seguimiento de la enfermedad. En la parte superior se muestra el diseño experimental, que incluye los días a los cuales se efectúa la cirugía, cuando se realizan las tomas de PAS y se sacrifican las ratas de los experimentos a 7 y 42 d, y el momento de la aleatorización para el inicio de los tratamientos del experimento a 42 días. Abajo se muestran fotografías del momento de la ligadura de una de las ramas de la arteria renal izquierda y del aspecto del riñón izquierdo extraído 1, 3 ó 7 días después de completar la nefrectomía parcial (5/6 Nx), donde se aprecia como 1/3 de la masa renal presenta un aspecto normal.

2. Aislamiento de RNA y determinación de la expresión génica.

Las muestras de tejido renal se disgregaron en solución de isotiocianato de guanidinio y el aislamiento del RNA total se realizó por el método de Chomczynski (Chomczynski, P. y col., 1987). El RNA total (2 µg en un volumen total de 20 µl) fue retrotranscrito a cDNA a 37°C durante 60 min en presencia de 200 unidades de MMLV-RT (Promega, Madison, WI), 20 unidades de inhibidor de ribonucleasas RNasin (Promega) y 100 pmol de hexanucleótidos randomizados (Amersham Biosciences, Buckinghamshare, England). El nivel de expresión de los genes de interés se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en Tiempo Real (LightCycler Instrument, Roche Applied Science), utilizando el kit comercial FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Este método es claramente más ventajoso que la PCR convencional debido a que es más sensible, más preciso, y menos laborioso. Como se puede observar en la figura 5, permite trabajar con valores de concentración correspondientes a la zona de la curva en que su segunda derivada toma un valor máximo (*crossing point*), donde la homogeneidad de los datos contrasta con la variabilidad existente en la fase *plateau*, a la que se suele llegar en el proceso de cuantificación mediante PCR convencional. Se diseñaron parejas de primers específicos para la amplificación de MCP-1, TGF-β1, colágenos (I, II, III, IV, V y VI), fibronectina 1, laminina B1, pre-proendotelina-1, BMP7, KCP, RNA-pol2a y GAPDH. Las condiciones de las PCRs se exponen en la Tabla 3. El número de ciclos de PCR requeridos para alcanzar la fase logarítmica del proceso de amplificación o *crossing point* se determinó automáticamente con el software del LightCycler mediante el cálculo del Máximo de la Segunda Derivada. Para la construcción de las curvas estándar se utilizaron diluciones seriadas de una mezcla de cDNA de los animales del grupo Sham. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Como medida de la variabilidad en la reacción de PCR se calculó el coeficiente de variación (CV) de las tres determinaciones de cada muestra y se obtuvo la media de los CV para el conjunto de las muestras analizadas (Tabla 3). Los valores de expresión génica fueron normalizados por los niveles de expresión de GAPDH, que fue utilizado como gen control o *housekeeping gene*. Alternativamente, se realizaron normalizaciones de la expresión génica haciendo uso de RNA-pol2a como gen control, obteniendo resultados muy similares a los obtenidos con GAPDH. La especificidad de los productos se verificó mediante el análisis de las curvas de fusión inmediatamente después de la finalización de la reacción de PCR y mediante electroforesis en geles de agarosa. Se

confirmó la secuencia de cDNA utilizando secuenciador automático ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 3. Secuencia de los primers y condiciones de las PCR realizadas en el Termociclador Lightcycler

RNA _m	Número de acceso (GenBank)	Secuencias/primers (Forward and Reverse)	MgCl ₂ (mM)	Programa	CV (%)
MCP-1	M57441	GTGCTGACCCCAATAAGGAA GCTTGAGGGTGGTTGTGGAAA	3.0	45 x (95°C, 10 seg; 63°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	18.2
TGF-β1	X52498	TGAGTGGCTGCTTTTGACG TGGGACTGATCCCAATTGATT	3.0	50 x (95°C, 10 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 6 seg)	9.5
Bmp7	NM_001191856	AGGAGGGCTGGTTGGTATTT TGAAGGGTTGCTTGTTCCTGG	2.25	40 x (95°C, 5 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	14.5
Kcp	XM_001064164	ACCCTGCCAACAATCCTACC ACACCTCACAGTCCCACCTCT	3.5	43 x (95°C, 5 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	24.7
Colágeno I	NM_053304	GTGCTCCTGGTATTGCTGGT GGGCTCCTCGTTTTCCTTC	3.0	50 x (95°C, 5 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	17.3

Tabla 3 (continuación)

RNAm	Número de acceso (GenBank)	Secuencias/primers (Forward and Reverse)	MgCl ₂ (mM)	Programa	CV (%)
Colágeno II	NM_012929	CTCAGCCCTTCCCATTGTT TCAGGTCAGGTCAGCCATTTC	3.5	50 x (95°C, 5 seg; 60°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	n.d.
Colágeno III	NM_032085	ATCCCATTTGGAGAATGTTGTGC GGACATGATTCACAGATTCCAGG	3.0	50 x (95°C, 5 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	19.1
Colágeno IV	NM_001135009	GCCAAGTGTGCATGAGAAGA AGCGGGGTGTGTTAGTTACG	2.0	40 x (95°C, 10 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 9 seg)	11.3
Colágeno V	NM_134452	CCCAGCAGAACATCACCTACA CAATCTCCAGCACCCGTCTTC	3.0	50 x (95°C, 5 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	15.4
Colágeno VI	XM_215375	AAAAGGGAAGCCGTGGAG CCATCAAATCCTGGCGAAC	3.0	50 x (95°C, 5 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	12.9

Tabla 3 (continuación)

RNAm	Número de acceso (GenBank)	Secuencias/primers (Forward and Reverse)	MgCl ₂ (mM)	Programa	CV (%)
Fibronectina I	NM_019143	GTGGCTGCCCTTCAACTTCTC AGTCCCTTAGGGCGGTCAAT	2.5	40 x (95°C, 10 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 10 seg)	10.0
Laminina-B1	M15525	CGCTTGTTCTCATGCCCTAC CACACTCCCTGCTGTTCTCCA	3.0	45 x (95°C, 10 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 6 seg)	5.5
Endotelina-1	NM_012548	GTTGCTCCTGCTCCTCCTTG GCATGGAGAGCGCAGAGTTG	2.5	42 x (95°C, 10 seg; 65°C, 1 seg; 72°C, 27 seg)	19.2
GAPDH	BC059110	TCCCTCAAAGATTGTCAGCAA AGATCCACACACGGATACATT	2.5	35 x (95°C, 10 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 13 seg)	6.9
RNA-pol2a	XM_343922	CAGGCAAGCAAATCTTCTCC ACCAGAGAGCCTGCTGATGT	2.25	40 x (95°C, 10 seg; 58°C, 5 seg; 72°C, 8 seg)	8.5

CV: Valor medio de los coeficientes de variación de los genes analizados; n.d.: no determinado.

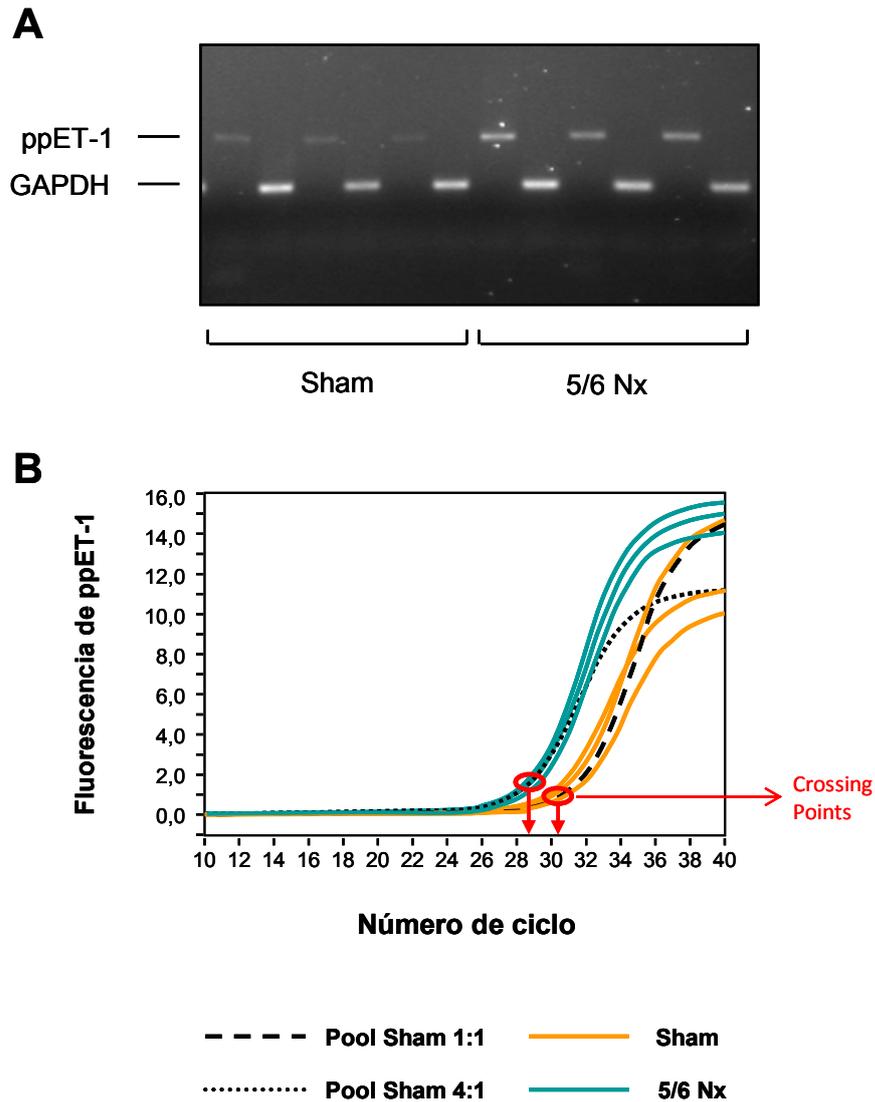


Figura 5. Determinación de la expresión génica mediante PCR convencional y PCR en Tiempo Real. **A)** Productos de amplificación de pre-proET-1 y GAPDH mediante PCR convencional, que permiten estimar de forma semicuantitativa la diferencia de expresión entre ratas nefrectomizadas (5/6Nx) y no nefrectomizadas (Sham). Para que las señales de bromuro de etidio de los productos separados en geles de agarosa fueran detectables y cuantificables, las reacciones de PCR se alargaron aproximadamente hasta el final de la fase logarítmica e inicio de la fase plateau de la PCR, donde el error en la estimación de la expresión del RNAm se incrementa de forma considerable. **B)** Gráfico correspondiente a la evolución de una PCR en Tiempo Real para el transcrito pre-proET-1. Se ha señalado la zona de la curva donde se encuentra el *crossing point*, cuyo valor se utiliza para determinar la tasa de expresión del transcrito en las muestras indicadas. Por tanto, este método permite calcular la expresión de un RNAm concreto en la región de la reacción de la PCR donde la variabilidad es mínima. Se muestran las curvas de amplificación de pre-proET-1 en tres ratas nefrectomizadas (5/6Nx) y tres no nefrectomizadas (Sham) y dos curvas correspondientes a muestras sham de concentración relativa conocida en una proporción 4:1 (líneas discontinuas).

3. Análisis Bioquímico.

La creatinina sérica fue medida mediante un test enzimático colorimétrico (Boehringer-Mannheim) en un auto-analizador (Hitachi 717; Boehringer-Mannheim Biochemical, Mannheim, Germany). La albuminuria se determinó en las muestras de orina de 24 horas mediante un test inmunoturbidimétrico (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Brevemente, se añade anticuerpo anti-albúmina, que reacciona con el antígeno de la muestra formando un complejo antígeno-anticuerpo. Después de la aglutinación, la albúmina en orina se calcula por turbidimetría utilizando el estándar adecuado.

4. Análisis Histológico.

La muestra de riñón no necrótica se fijó en formalina tamponada con fosfatos al 10%, se deshidrató en alcoholes de gradación creciente y se embebió en parafina. Las secciones de tejido de 5 μm , después de haber sido desparafinadas y rehidratadas, se tiñeron con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y Ácido peryódico de Schiff (APS) para una evaluación general de las regiones celular y extracelular. Todas las biopsias renales fueron analizadas por dos patólogos haciendo uso de un microscopio Olympus BX50 y BX-FLA (Olympus Optical Co., Europe, GMBH). Las imágenes fueron fotografiadas e impresas a exposiciones equivalentes.

Al menos siete muestras de riñón teñidas con tricrómico de Masson, seleccionadas al azar de cinco animales de cada grupo, fueron evaluadas con el objetivo de determinar el grado de glomeruloesclerosis y daño tubulointersticial (atrofia, dilatación, engrosamiento de la membrana basal tubular, fibrosis e inflamación intersticial). Todos los glomérulos fueron analizados teniendo en cuenta el nivel de esclerosis glomerular. Se usó una escala de daño glomerular establecida de 1 a 4. El índice de esclerosis fue determinado según el método de Komatsu (Komatsu y col., 1995). El daño tubulointersticial se midió mediante escala semicuantitativa según Cao, Z. y col., 2002.

5. Preparación de los extractos nucleares.

Los extractos nucleares fueron preparados a partir de piezas de corteza renal (160 mg) los días del sacrificio. Dichas muestras fueron homogeneizadas en 1ml de tampón hipotónico (Hepes 20 mM, pH 7,5, NaF 5 mM, Na₂MoO₄ 10 μM, EDTA 0,1 mM) suplementado con DTT 1 mM y Nonidet P-40 0,01% con un homogeneizador Dounce en hielo. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 850 x g, y los pellets con el tejido homogeneizado fueron resuspendidos suavemente en 1 ml de tampón hipotónico. Después de 15 min a 4°C, se añadió Nonidet P-40 hasta alcanzar una concentración final de 0,5%. Los tubos se agitaron en un *vortex* a la máxima potencia durante 10 seg y los núcleos se sedimentaron a 14.000 x g durante 30 seg. Los pellets nucleares se resuspendieron en 100 μl de tampón de lisis que contenía Hepes (20 mM), pH 7,5, NaCl (400 mM), glicerol (20%), EDTA (0,1 mM), NaF (10 mM), Na₂MoO₄ (10 μM), NaVO₃ (1 mM), para-nitrofenil fosfato (10mM), β-glicerofosfato (10 mM), DTT (1 mM) y un cóctel de inhibidores de proteasas de Active Motif (Carlsbad, CA). Todo fue mezclado enérgicamente en una plataforma a 4°C durante 30 min, luego se le realizó un *vortex* de 30 seg y se centrifugó durante 10 min a 14.000 x g. Las alícuotas del sobrenadante que contenían las proteínas nucleares se almacenaron a -80°C. El contenido proteico fue determinado mediante un ensayo de cuantificación de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad protein assay).

6. Ensayo de unión de factores de transcripción.

La actividad de unión al DNA de NF-κB y AP-1 se midió utilizando un ensayo basado en los fundamentos del método de ELISA. El factor de transcripción de interés es capturado no por un anticuerpo, como en un ELISA clásico, sino por un oligonucleótido de doble cadena que contiene el sitio consenso de unión para el factor nuclear (Renard, P. y col., 2001) como se ilustra en la figura 6.

La activación de NF-κB y AP-1 fue medida usando los *kits* Trans-AMTM NF-κB p65 y Trans-AMTM AP-1 Family (Active Motif, Carlsbad, CA), respectivamente, según las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos específicos inmovilizados en placas de 96 pocillos que contenían una secuencia consenso para NF-κB (5'-GGGACTTCC-3') o bien para AP-1 (5'-TGAGTCA-3') fueron incubados con los extractos nucleares (20 y 50 μg, respectivamente) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como se observa en la figura 7, la

especificidad de los ensayos de unión a AP-1 y NF- κ B se verificó mediante experimentos de competición en ausencia o presencia de los oligonucleótidos consenso o sus variantes mutadas. Las secuencias de los oligonucleótidos que contenían las versiones mutadas de NF- κ B o AP-1 fueron 5'-AGTTGAGCTCACTTTCCCAGGC-3' y 5'-CGCTTGAGGAGTCGGCCGGAA-3', respectivamente. Con el fin de determinar la cantidad de NF- κ B o AP-1 que estaba unida a su DNA correspondiente, se utilizaron anticuerpos primarios específicos para NF- κ B p65 o para proteínas de las familias Fos y Jun, como c-Fos, FosB, c-Jun y JunD. A continuación se realizó incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Al final de la reacción de revelado, la absorbancia se determinó por espectrofotometría a 450 nm.

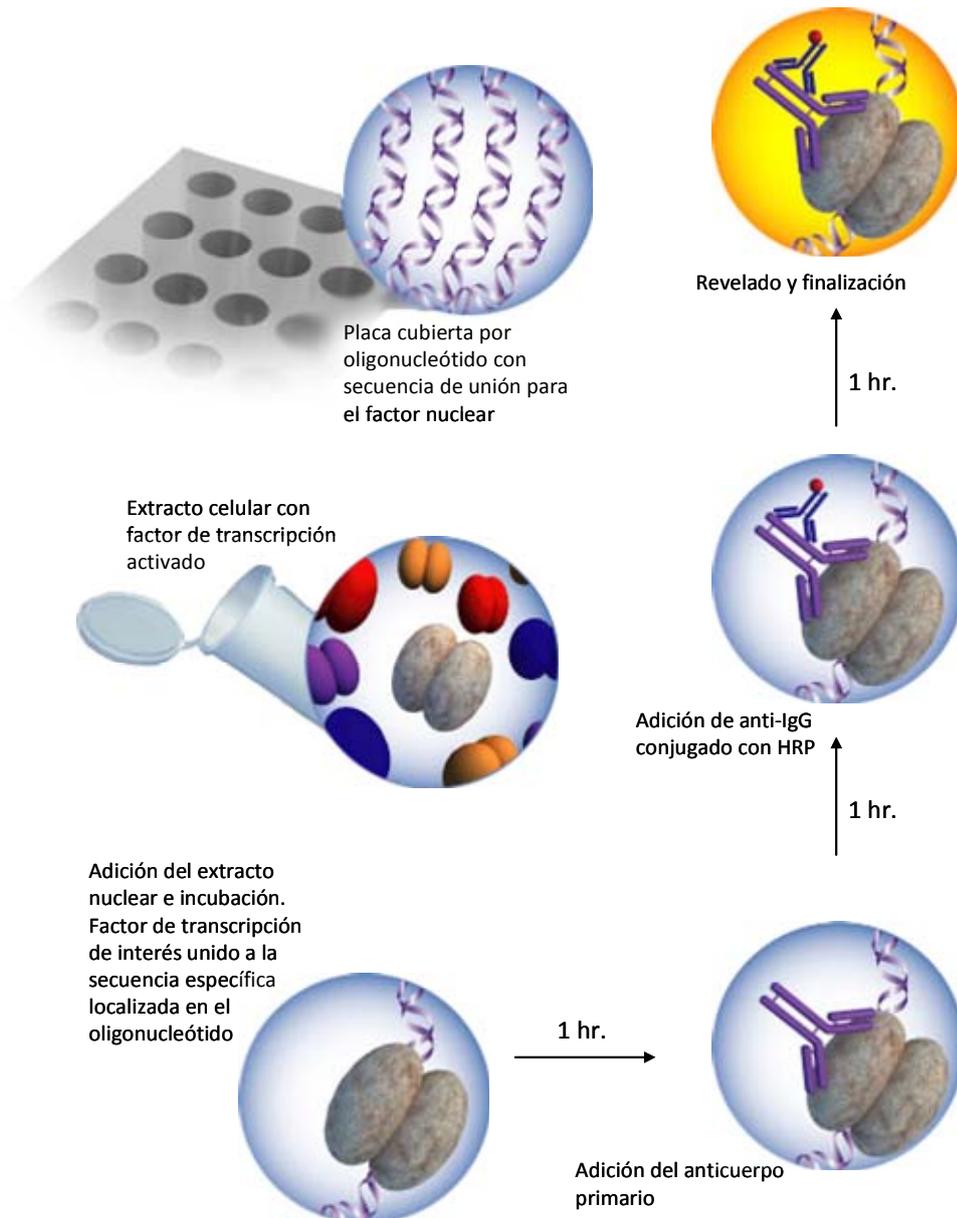


Figura 6. Diagrama de flujo del ensayo de unión de factores de transcripción TransAM. Los factores de transcripción activados en un extracto celular se unen a los oligonucleótidos inmovilizados en el pocillo. La actividad del factor de transcripción se determina tras incubación con anticuerpos primario y secundario, igual a como se haría en un ensayo de ELISA convencional.

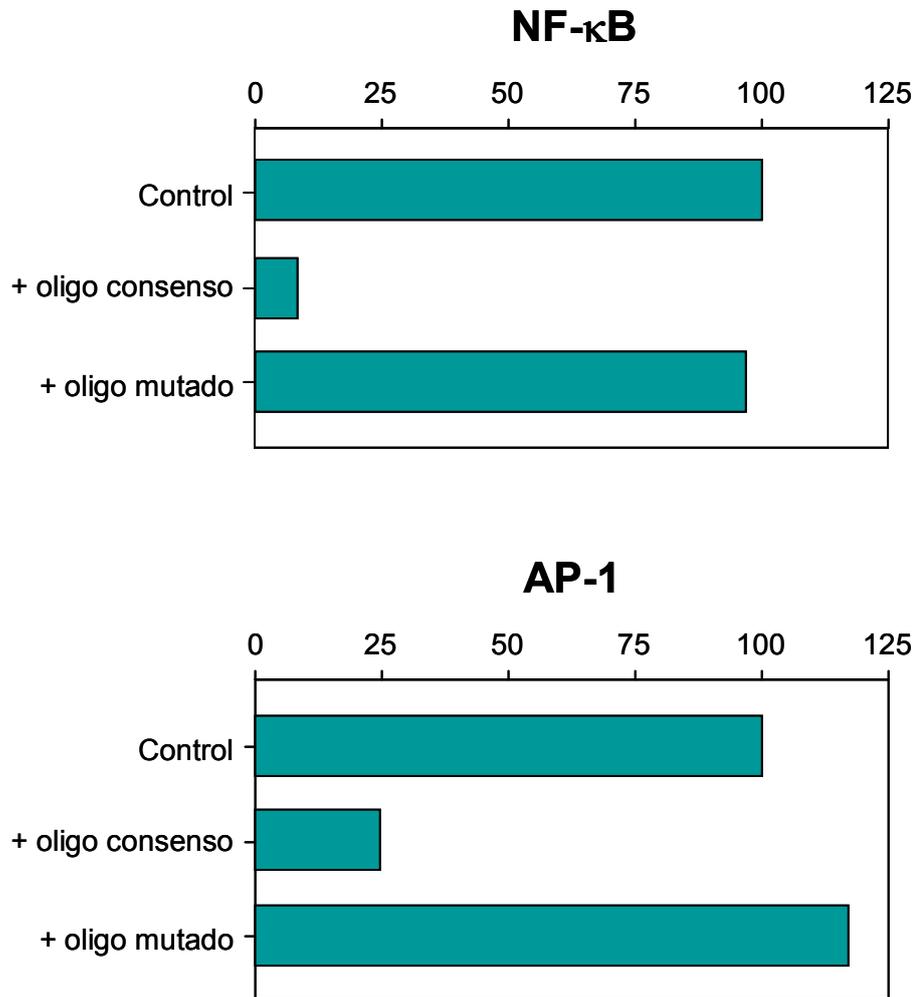


Figura 7. Ensayos de especificidad para NF-κB y AP-1. Se realizaron sendos experimentos de competición, analizando la unión de los factores nucleares a los oligonucleótidos inmovilizados en la placa en ausencia o presencia de cantidades saturantes (20pmol) de oligonucleótidos que contenían las secuencias consenso de unión (oligo consenso) o sus variantes mutadas (oligo mutado).

7. Análisis Inmunohistoquímico.

Las muestras fueron tratadas respectivamente con anticuerpos específicos: monoclonal de ratón anti-NF- κ B p65 (SC-8008; 1:200) y policlonal de conejo anti-TGF- β 1 (SC-146; 1:100) de Santa Cruz Biotechnology; policlonal de conejo anti-endotelina-1 (6901, 1:100) de Península Lab.; monoclonal de ratón anti-macrófago (MO632; 1:50) de Dako Lab.; monoclonal de ratón anti-colágeno IV (C-1926) y policlonal de conejo anti-fibronectina (F-3648) de Sigma.

La inmunoreactividad fue detectada mediante el método de streptavidina-biotina-peroxidasa. Brevemente, las secciones de tejido de 5 μ m fueron desparafinadas, rehidratadas y pretratadas para anular la actividad peroxidada endógena con H₂O₂ al 3% en metanol, durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se bloqueó con BSA al 1% y suero de cabra al 1% en TBS a temperatura ambiente durante 30 min, seguido por incubación con los respectivos anticuerpos en TBS más Triton X-100 al 0,5%, a 4°C durante 16 h y con anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de conejo (Caltag Labs., 1:200 en TBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas con streptavidina-biotina-peroxidasa (Caltag Labs., 1:200 en TBS) durante 1 h a temperatura ambiente y la peroxidada unida al tejido se reveló con 3,3'-diaminobenzidina al 0,05% y H₂O₂ al 0,003% en tampón Tris-HCl (pH 7,6) 0,1 M. Finalmente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris y montadas en resina sintética (DPX). Los controles negativos se realizaron en ausencia del anticuerpo primario.

8. Análisis Estadístico

Los datos se presentaron como la media \pm el error típico salvo que se indique lo contrario. Las desviaciones de la normal se evaluaron mediante el estadístico Kolmogorov-Smirnov. Las variables que no siguieron una distribución normal fueron transformadas logarítmicamente. La diferencia de medias entre grupos fue valorada mediante la prueba t de Student y mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con la corrección de Bonferroni si se comparaban más de dos grupos. Cuando el número total de observaciones resultó insuficiente para verificar el ajuste de los datos a una distribución normal, se utilizaron tests de estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney y H de Kruskal-Wallis). Donde se indique, las variables NF- κ B y AP-1 se categorizaron en cuartiles, modo de agrupación que consideramos adecuado para el tamaño muestral de nuestra población. Como los valores de

AP-1 fueron muy similares en los cuartiles 1, 2 y 3 y diferían claramente de los del cuartil 4, en algunos análisis los cuartiles 1, 2 y 3 se agruparon en una sola categoría. La asociación entre variables continuas se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, salvo cuando alguna de las variables no se ajustaba a la normalidad, en cuyo caso se calculó la Rho de Spearman. Con objeto de averiguar si NF- κ B y AP-1 contribuían independientemente a la varianza de la expresión del RNAm de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1 se realizaron análisis de regresión lineal múltiple. El nivel de significación estadística se estableció para una $P < 0,05$. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el Paquete Estadístico SPSS 15.0.

RESULTADOS

Resulta lógico pensar que para encontrar el tratamiento más adecuado de cualquier patología, pueda ser de gran ayuda tener un conocimiento profundo de los mecanismos que la originan, de igual forma que es necesario disponer de herramientas farmacológicas apropiadas para hacerle frente. En el modelo de insuficiencia renal crónica utilizado en nuestro estudio, consideramos que aunque a los 7 días de la ablación renal aún es temprano para apreciar cambios histopatológicos en el riñón, se podrían estar desencadenando los mecanismos moleculares responsables de la génesis y progresión de la enfermedad. Debido a que la mayoría de modelos experimentales reúnen grandes analogías en etapas avanzadas de la enfermedad renal, nosotros preferimos centrarnos en fases relativamente tempranas. Por ello se seleccionaron tiempos de seguimiento a 7 y 42 días. En la figura 8 se muestra el estado de los riñones a los tiempos indicados, evaluado inicialmente en base a la deposición de proteínas de matriz extracelular. Éstas se visualizan en azul mediante la tinción Tricrómica de Masson.

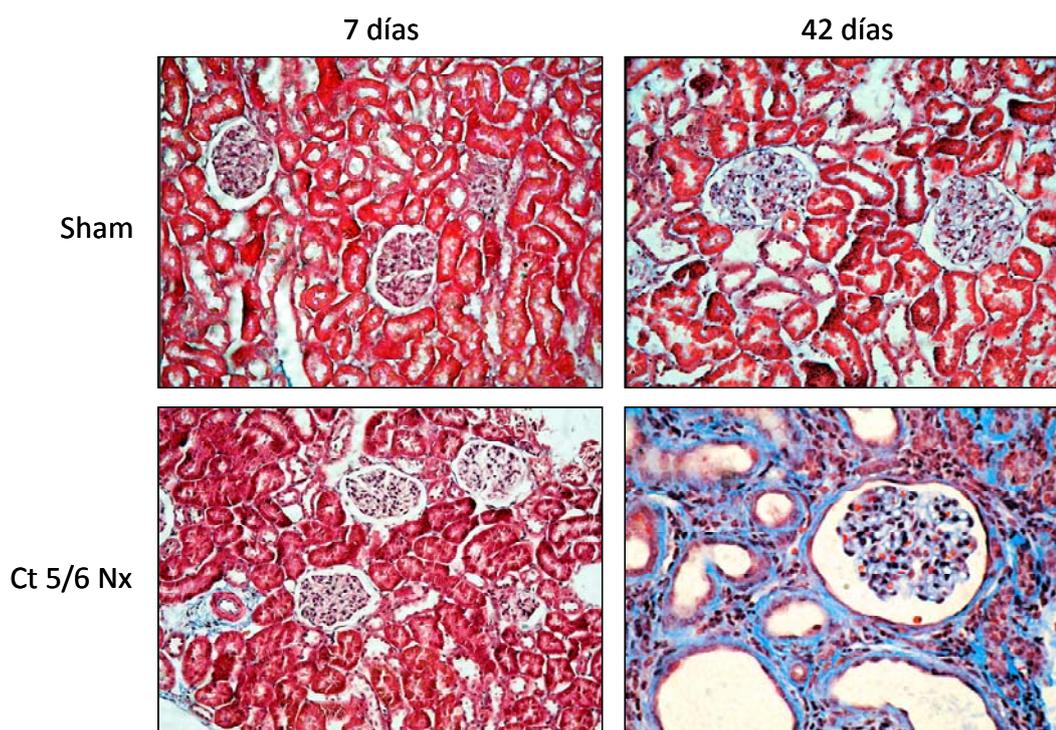


Figura 8. Determinación de deposición de matriz extracelular a los 7 y 42 días de la ablación renal. Secciones de 5 μ m de corteza renal de las ratas tras 7 y 42 días de realizada la nefrectomía y sus correspondientes controles fueron visualizadas mediante tinción tricrómica de Masson y evaluadas con microscopio Olympus BX50 y BX-FLA. El color azul corresponde a fibras de matriz extracelular y pone de relieve el engrosamiento de las membranas basales en los glomérulos y la expansión del espacio tubulointerstitial. Aumento original entre 200x y 400x.

En los apartados sucesivos, se muestran los resultados obtenidos a los 7 y 42 días de la nefrectomía, así como los correspondientes a las diferentes estrategias farmacológicas utilizadas. Los experimentos realizados estuvieron encaminados a dilucidar la relación existente entre los resultados del estudio histológico y los indicadores moleculares de daño a los respectivos tiempos de evolución en el modelo de 5/6 de nefrectomía.

1. NEFRECTOMÍA: 7 DÍAS

1.1. Parámetros sistémicos

Se valoró si los animales nefrectomizados experimentaban cambios de presión arterial y se analizó si había indicios de daño microvascular mediante la determinación de la albuminuria. Como se muestra en la figura 9, desde los 7 días los animales nefrectomizados presentaron un incremento acusado de la PA sistólica ($P < 0,0001$, vs. Sham). La hipertensión se acompañó de un aumento muy marcado de excreción urinaria de albúmina ($P < 0,0001$, vs. Sham).

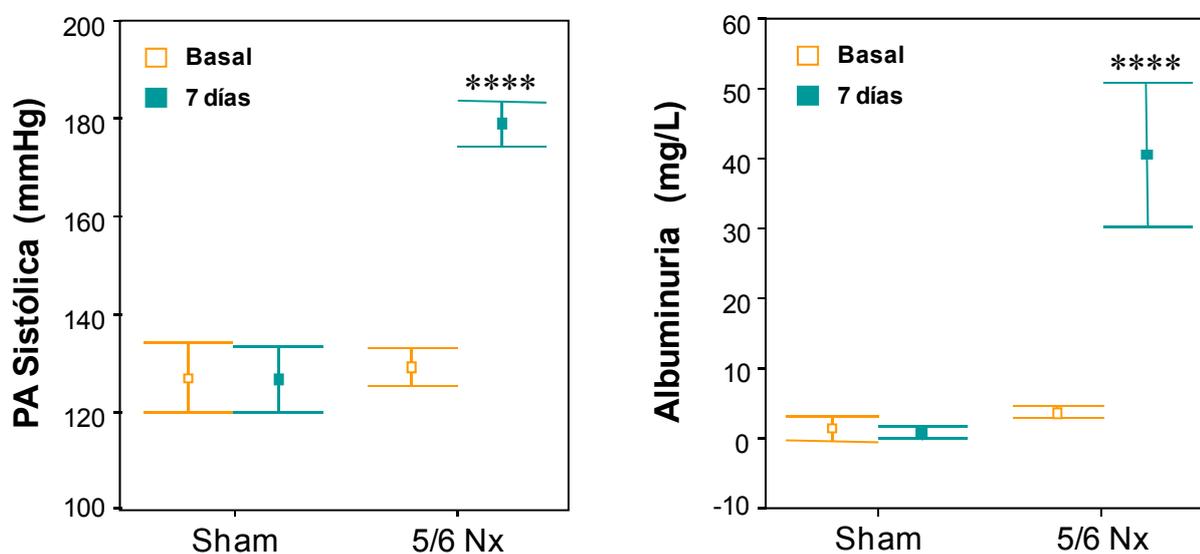


Figura 9. Efecto de la ablación renal en la PA sistólica y la albuminuria a los 7 días. Las medidas de la PAS se realizaron de forma incruenta en la cola de los animales con un analizador automático de presión arterial (LE-5007 Letica Scientific Instruments). La albuminuria se determinó en muestras de orina (recogidas durante 24 horas) mediante test inmunoturbidimétrico (Roche Diagnostics). La PA sistólica y la albuminuria basales fueron medidas antes de practicar la uninefrectomía derecha. Las barras representan un intervalo de confianza del 95%. **** $P < 0,0001$ vs. Sham.

1.2. Análisis Histológico y Morfológico

La apariencia histológica de los riñones del grupo Sham-7d y del grupo Ct5/6Nx-7d fue totalmente normal sin diferencias entre ellos (figura 8). Sólo se aprecia tinción de proteínas de matriz extracelular en la adventicia de los capilares y en las delgadas láminas basales de túbulo y glomérulos.

1.3. Expresión génica

Aunque a los 7 días no se apreciaron cambios morfológicos en las ratas nefrectomizadas, nos preguntamos si podrían detectarse cambios de expresión en diversos genes que codifican para proteínas de matriz, así como en aquellos capaces de regular la síntesis de estas proteínas. Estas alteraciones a nivel molecular podrían ser una manifestación temprana de los cambios morfológicos que se observan a los 42 días y de los procesos fisiopatológicos involucrados en la progresión de la enfermedad renal crónica. Como se muestra en la figura 10, el grupo de ratas al que se le realizó el procedimiento quirúrgico (Ct5/6Nx-7d) presentaron un incremento significativo de expresión del RNAm de las proteínas de matriz extracelular indicadas: colágenos tipo I, III, IV, V y VI ($P < 0,05$ vs. Sham), fibronectina 1 ($P < 0,001$ vs. Sham) y laminina B1 ($P < 0,05$ vs. Sham).

El aumento de expresión de las proteínas de matriz extracelular, no se acompañó de una modificación de la expresión del RNAm de TGF- β 1 (figura 11A). Sin embargo, BMP7 y KCP, dos proteínas que promueven acciones opuestas a TGF- β 1 en células epiteliales renales, presentaron una reducción significativa de expresión en los animales con ablación renal (15%, $P < 0,05$ y 50%, $P < 0,0001$ de inhibición vs. Sham, respectivamente). Como se muestra en la figura 11B, la tasa de expresión de BMP7 guardó una estrecha correlación con la de su agonista KCP ($r = 0,66$; $P < 0,01$).

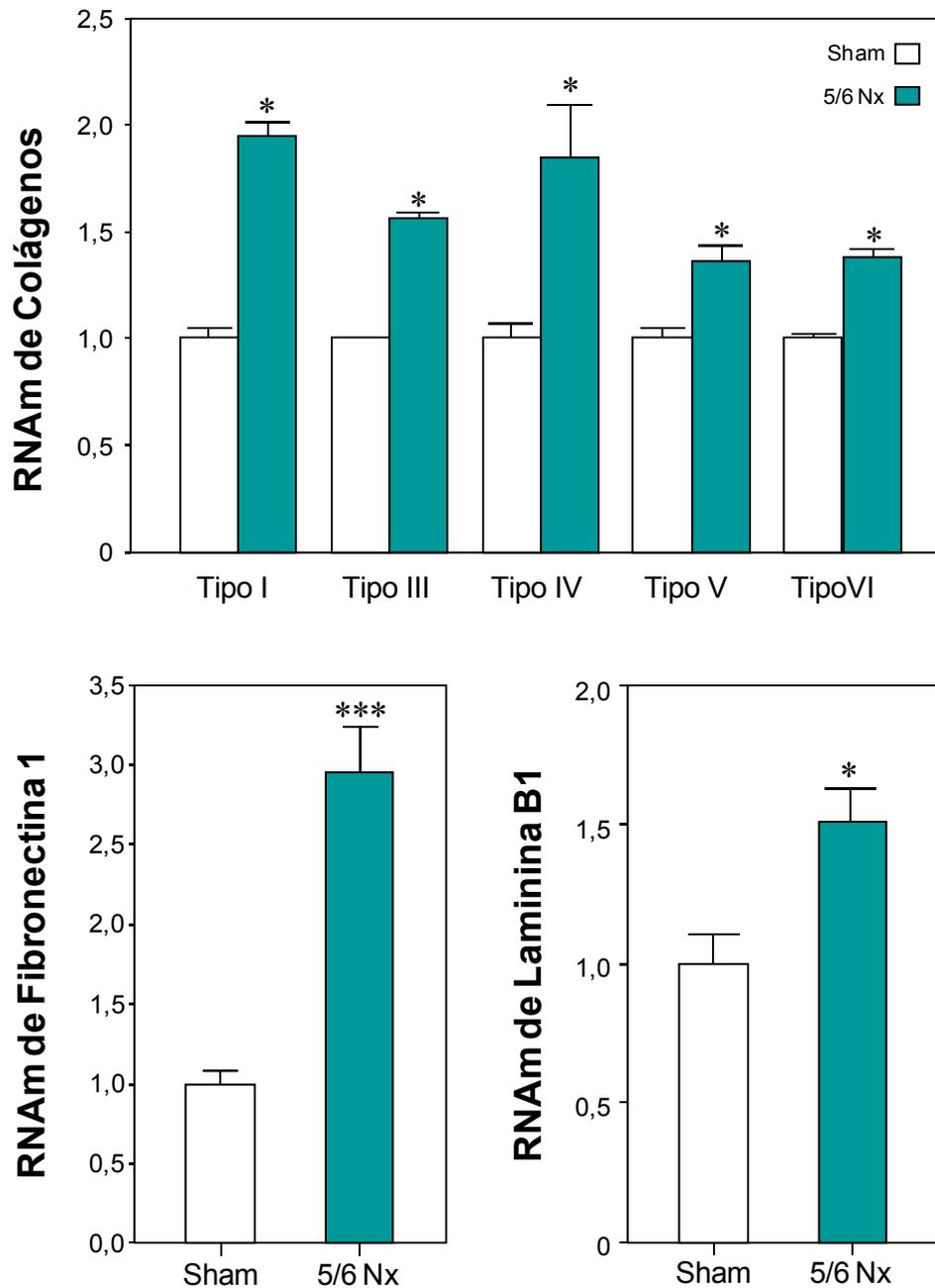


Figura 10. Expresión del RNAm de proteínas de matriz extracelular a los 7 días de la nefrectomía.

El nivel de expresión de los genes analizados se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se indica en la sección de Material y Métodos. Las muestras fueron analizadas al menos en tres experimentos de PCR independientes y el promedio se utilizó para el análisis estadístico posterior. Los valores de expresión génica fueron normalizados utilizando GAPDH como gen control. Los datos corresponden a la media \pm el error típico. *** $P < 0,001$ vs. Sham, * $P < 0,05$ vs. Sham.

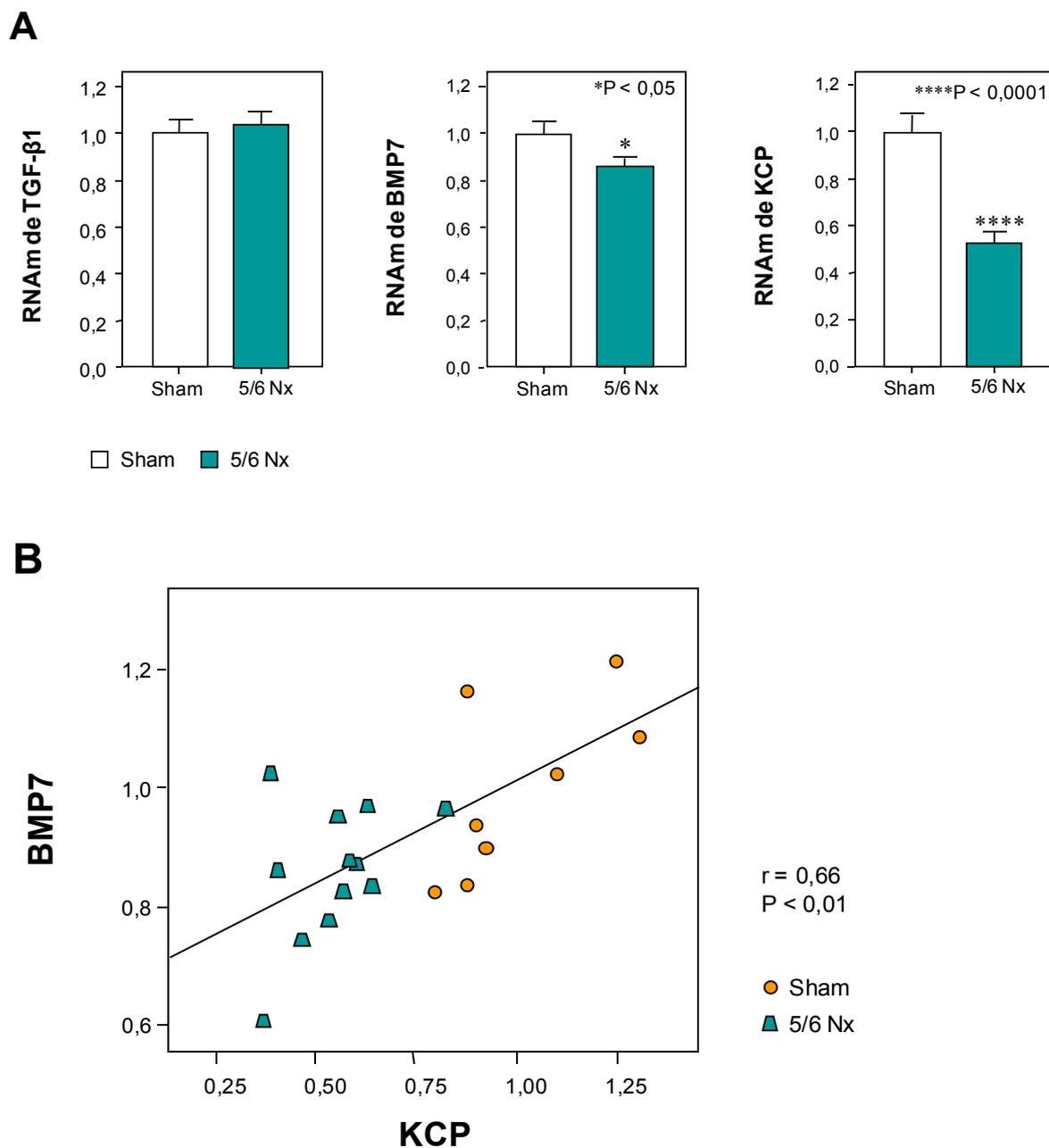


Figura 11. Expresión del RNAm de TGF-β1, BMP7 y KCP a los 7 días de la ablación renal. A) El nivel de expresión de TGF-β1, BMP7 y KCP se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se indica en la sección de Material y Métodos. Las muestras fueron analizadas en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica fueron normalizados utilizando GAPDH como gen control. Las columnas representan la media \pm el error típico. ****P < 0,0001 vs. Sham, *P < 0,05 vs. Sham B) Gráfico de correlación entre la expresión génica de BMP7 y KCP. r: coeficiente de correlación de Pearson.

Por otra parte, la tasa de expresión del RNAm de la citocina quimiotáctica MCP-1, que participa en el reclutamiento de monocitos en las zonas de lesión renal, presentó un incremento de dos veces en los animales nefrectomizados respecto a los del grupo Sham-7d (figura 12). Sin embargo, esta diferencia no llegó a alcanzar significación estadística ($P = 0,098$).

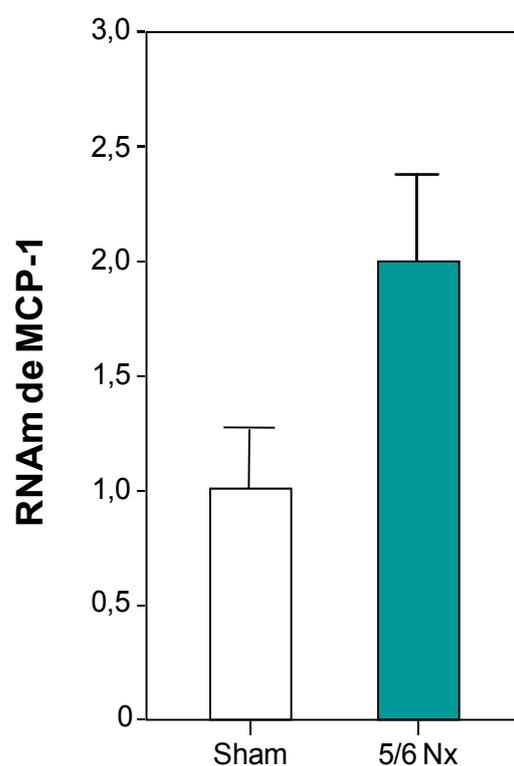


Figura 12. Expresión del RNAm de MCP-1 en los grupos Sham-7d y Ct5/6Nx-7d a los 7 días. El nivel de expresión de MCP-1 se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se indica en la sección de Material y Métodos. Las muestras fueron analizadas en tres experimentos de PCR independientes y el promedio se utilizó para el análisis estadístico posterior. Los valores de expresión génica fueron normalizados utilizando GAPDH como gen control. Los datos corresponden a la media \pm el error típico.

2. NEFRECTOMÍA: 42 DÍAS

2.1. Parámetros sistémicos

Para valorar el estado de los animales tras 42 días de nefrectomía se midió la PA inmediatamente antes de la eutanasia y se determinaron los valores de albuminuria y creatinina en plasma. Como se observa en la figura 13, la PAS estaba claramente incrementada respecto al grupo Sham (Ct5/6Nx-42d: 204 ± 4 , Sham-42d: 129 ± 3 mmHg, $P < 0,0001$). Estas cifras fueron incluso superiores a las observadas a los 7 días (Ct5/6Nx-7d: 179 ± 2 mmHg; ver *apartado 1.1.* de esta sección). Igualmente, la albuminuria y la creatinina presentaron niveles considerablemente elevados en las ratas nefrectomizadas (figura 13).

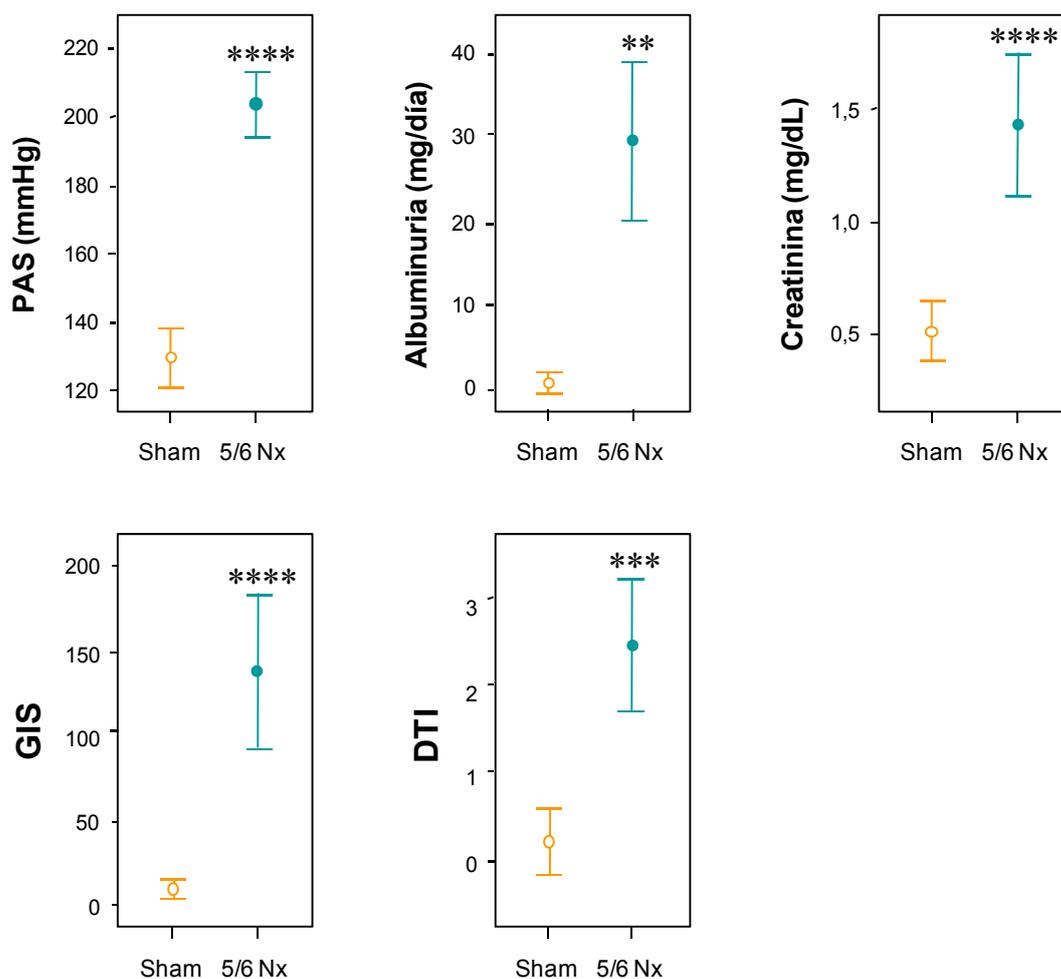


Figura 13. Presión arterial, albuminuria, creatinina en plasma y parámetros morfológicos en los animales operados sin tratamiento (Ct5/6Nx-42d) frente a los no operados (Sham-42d) a los 42 días. Las medidas de la PAS se realizaron de forma incruenta en la cola de los animales con un analizador automático de presión arterial (LE-5007 Letica Scientific Instruments). La albuminuria se determinó en muestras de orina (recogidas durante 24 horas) mediante test inmunoturbidimétrico (Roche Diagnostics GmbH). La creatinina sérica fue medida mediante un test enzimático colorimétrico (Boehringer-Mannheim) en auto-analizador (Hitachi 717; Boehringer-Mannheim Biochemical). Los índices de daño renal GIS y DTI se determinaron por el método de Komatsu y mediante escala semicuantitativa según Cao, Z. y col., 2002, respectivamente. Las barras representan un intervalo de confianza del 95%. ****P < 0,0001, ***P < 0,001 y **P < 0,01 vs. Sham.

2.2. Análisis Histológico y Morfológico

La apariencia histológica de los riñones del grupo Sham-42d fue totalmente normal (figuras 14a y 14b), mientras que los pertenecientes al grupo Ct5/6Nx-42d desarrollaron cambios focales degenerativos. Los glomerulos (figuras 14c y 14d) mostraron diferentes grados de esclerosis con colapso capilar y dilatación, aumento de matriz mesangial, mesangiolisis, deposición hialina positiva para APS (figura 14d) y adhesión del ovillo glomerular a la cápsula de Bowman. La lámina basal de ésta cápsula se vio notablemente engrosada debido a la deposición de tejido conectivo (figura 14d, detalle inferior). Un engrosamiento similar de la membrana basal se observó alrededor de los túbulos, debido en parte, a material positivo para APS (figuras 14e y 14f). Los túbulos mostraron además, cambios degenerativos como atrofia tubular, dilatación (figura 14e, detalle superior), descamación de células epiteliales tubulares, acúmulo de material en la luz tubular (figura 14e, detalle inferior) y degeneración hialina (figura 14f, detalle).

El engrosamiento del espacio intersticial fue evidente (figuras 14e y 14f) y fue debido a la acumulación de fibroblastos y deposición de matriz extracelular que se tiñó de verde haciendo uso del tricrómico de Masson. Mediante inmunohistoquímica también se pudo observar presencia de macrófagos en las regiones tubulointersticiales engrosadas (figura 14c, detalle).

Estos cambios estuvieron en consonancia con el grado de lesión glomerular (GIS) y tubulointersticial (DTI), que dieron cuenta del daño que experimentaron los riñones de los animales con ablación renal respecto a los del grupo Sham-42d (figura 13).

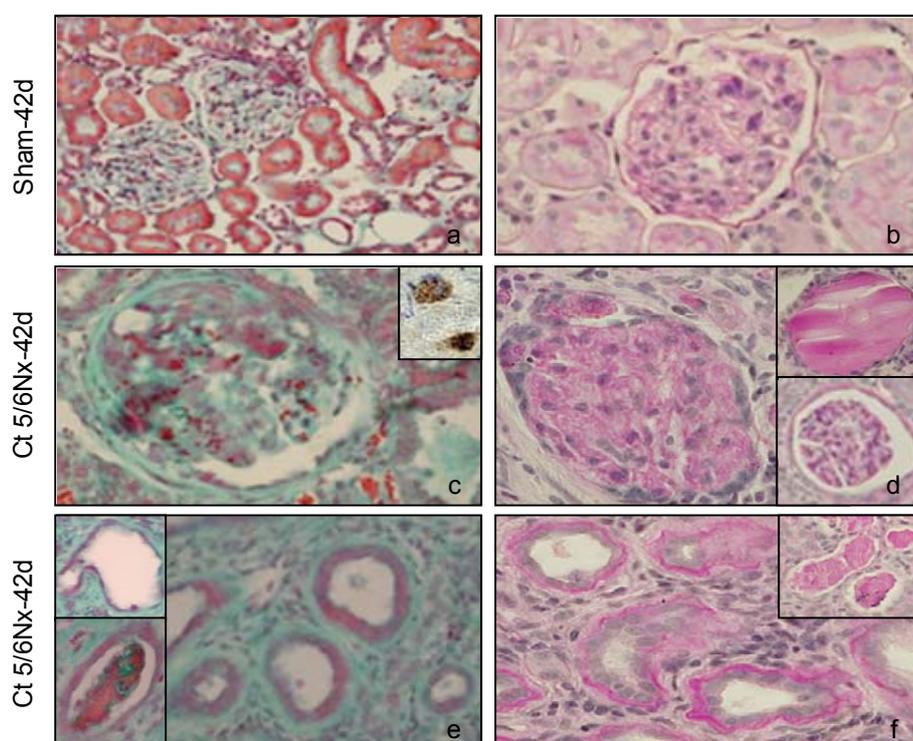


Figura 14. Evaluación histológica glomerular y tubulointersticial. Alteraciones histológicas importantes en glomerulos de las ratas sometidas a 5/6 de nefrectomía mostrando colapso capilar y dilatación (c), deposición de matriz mesangial (c, d), hialinosis (d, detalle superior), y engrosamiento de la cápsula de Bowman (d, detalle inferior). Infiltrado intersticial inespecífico (e, f) con macrófagos aislados (c, detalle) entre túbulos con lámina basal engrosada (e) y material positivo para APS (f). Dilatación de la luz de los túbulos, (e, detalle superior) apreciándose daño celular y material teñido con APS (e, detalle inferior; f, detalle). Estos cambios patológicos contrastan con la histología normal de los grupos Sham (a, b). Tinción tricrómica de Masson (figuras a la izquierda) y tinción de APS (figuras a la derecha).

2.3. Expresión génica

De forma general, la expresión del RNAm de proteínas de matriz extracelular en el grupo Ct5/6Nx-42d fue claramente superior a la encontrada en el grupo Sham-42d (Tabla 4). Así, los colágenos I, III, IV y V presentaron aumentos de expresión significativos ($P < 0,05$). Sin embargo, la pérdida de masa renal no provocó cambios en la tasa de expresión del colágeno II y, aunque el colágeno VI presentó valores de expresión aumentados 2,5 veces, la

diferencia con el grupo Sham no alcanzó significación estadística ($P = 0,06$). Por otra parte, la expresión de fibronectina 1 se incrementó por encima de las 4 veces ($P < 0,0001$), mientras que en el caso de la laminina B1 no se encontraron diferencias de expresión entre los animales nefrectomizados y los del grupo Sham.

En contraste con lo que sucedía a los siete días (figura 11), tras 42 días de ablación renal se observó sobreexpresión del RNAm de TGF- β 1 ($P < 0,05$), pero no de BMP7 ni de KCP. Como se muestra en la Tabla 4, los niveles de expresión del RNAm de la sustancia vasoactiva pre-proET-1 y del mediador de inflamación MCP-1 experimentaron un claro aumento en el grupo de ratas con nefrectomía subtotal frente a las correspondientes al grupo Sham ($P < 0,01$).

Tabla 4. Tasas de expresión del RNAm de diferentes genes en los grupos *Sham-42d* y *Ct 5/6 Nx-42d*.

	Sham	5/6 Nx	P
Colágeno I	0,94 \pm 0,14	2,46 \pm 0,38	< 0,01
Colágeno II	0,80 \pm 0,12	0,92 \pm 0,33	N.S.
Colágeno III	0,90 \pm 0,06	2,06 \pm 0,32	< 0,05
Colágeno IV	1,00 \pm 0,06	2,18 \pm 0,17	< 0,0001
Colágeno V	1,00 \pm 0,10	1,86 \pm 0,31	< 0,05
Colágeno VI	1,00 \pm 0,10	2,53 \pm 0,75	N.S. (= 0,06)
Fibronectina 1	1,00 \pm 0,06	4,18 \pm 0,73	< 0,0001
Laminina B1	1,00 \pm 0,05	1,22 \pm 0,09	N.S.
TGF- β 1	1,00 \pm 0,05	1,77 \pm 0,24	< 0,05
Bmp7	1,00 \pm 0,08	1,16 \pm 0,13	N.S.
Kcp	1,00 \pm 0,13	1,15 \pm 0,16	N.S.
Pre-proET-1	1,00 \pm 0,14	2,84 \pm 0,68	< 0,01
MCP-1	1,00 \pm 0,13	3,63 \pm 0,78	< 0,01

2.4. Actividad de NF- κ B y AP-1.

A continuación, realizamos experimentos encaminados a determinar el grado de activación de NF- κ B en los animales nefrectomizados. Encontramos un incremento de los niveles de la subunidad p65 de NF- κ B en los extractos nucleares de corteza renal de los animales nefrectomizados (figura 15). Se escogió la subunidad p65 de NF- κ B porque esta contiene un dominio de activación de la transcripción, no existente en la subunidad p50 (Guijarro, C. y col., 2001).

El papel que juega NF- κ B, y específicamente la isoforma p65/p50 como mediador patogénico en la ERC, nos llevó a indagar si existía alguna relación entre su activación y los parámetros morfológicos de daño glomerular (GIS) y túbulointersticial (DTI) en nuestro estudio. La figura 15 B ilustra claramente la correlación existente entre la actividad de NF- κ B y el GIS ($r = 0,87$; $P < 0,0001$) o DTI ($r = 0,83$; $P < 0,0001$).

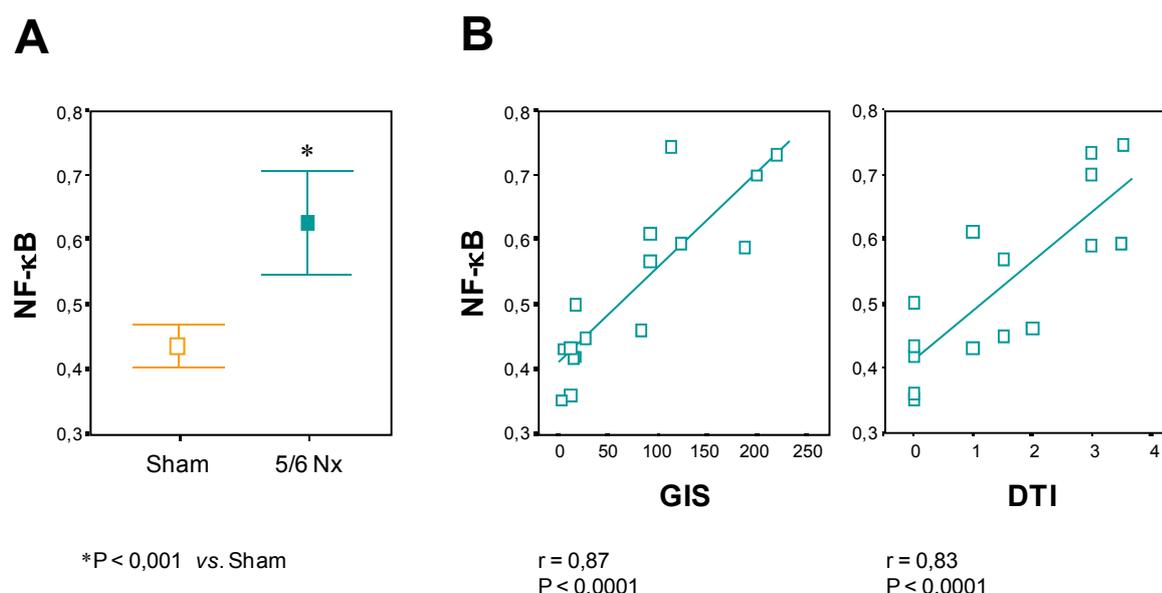


Figura 15. Activación de NF- κ B en el modelo de 5/6 de nefrectomía. La actividad de NF- κ B fue medida usando el *kit* Trans-AMTM NF- κ B p65 Family de Active Motif. Los parámetros de daño renal GIS y DTI se determinaron por el método de Komatsu y mediante escala semicuantitativa según Cao Z y col., 2002, respectivamente, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. **A**) Actividad de NF- κ B de los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d. Las barras corresponden a un intervalo de confianza del 95%. *P < 0,001 vs. Sham. **B**) Análisis de correlación entre la actividad de NF- κ B y los índices de daño glomerular (GIS) y tubulointersticial (DTI) en las ratas correspondientes a los grupos Sham-42d y Ct5/6 Nx-42d.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la capacidad de NF- κ B para modular la expresión de proteínas de matriz extracelular como fibronectina 1, citocinas como MCP-1 y sustancias vasoactivas como endotelina-1 en distintos tipos celulares del riñón (Rovin, B.H. y col., 1995; Wang, Y. y col., 1999; Gómez-Garre, D. y col., 2001). Además, se han localizado elementos de respuesta a NF- κ B en la región promotora de estos genes (Lee, B.H. y col., 2002; Xing, L. y Remick, D.G., 2007; Quehenberger, P. y col., 2000), por lo que decidimos evaluar la existencia o ausencia de correlación entre la actividad de este factor nuclear y la expresión de los genes que codifican para las proteínas mencionadas. Se observó una estrecha correlación entre la actividad de NF- κ B y la expresión del RNAm de fibronectina 1 ($P < 0,01$), MCP-1 ($P < 0,001$) y pre-proET-1 ($P < 0,01$) en el conjunto de animales de los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d (Tabla 5).

Tabla 5. Correlación entre la actividad de NF- κ B y la expresión de diferentes genes involucrados en el daño renal en los animales de los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d.

	Correlación de Pearson	
	r	P
Fibronectina 1	0,62	< 0,01
MCP-1	0,72	<0,001
Pre-proET-1	0,63	< 0,01

Con objeto de comprobar si la inhibición selectiva de NF- κ B condicionaba la inducción de algunos genes involucrados en la progresión de la enfermedad renal, determinamos la expresión de TGF- β 1, colágeno IV, fibronectina 1 y MCP-1 en un grupo tratado con PDTC, un inhibidor selectivo de NF- κ B. Como se muestra en la figura 16, se observó una clara reversión de la sobreexpresión de los cuatro genes mencionados. Mientras que TGF- β 1, colágeno IV y MCP-1 experimentaron una reversión completa, en el caso de la fibronectina 1 la reversión inducida por PDTC fue de un 65%.

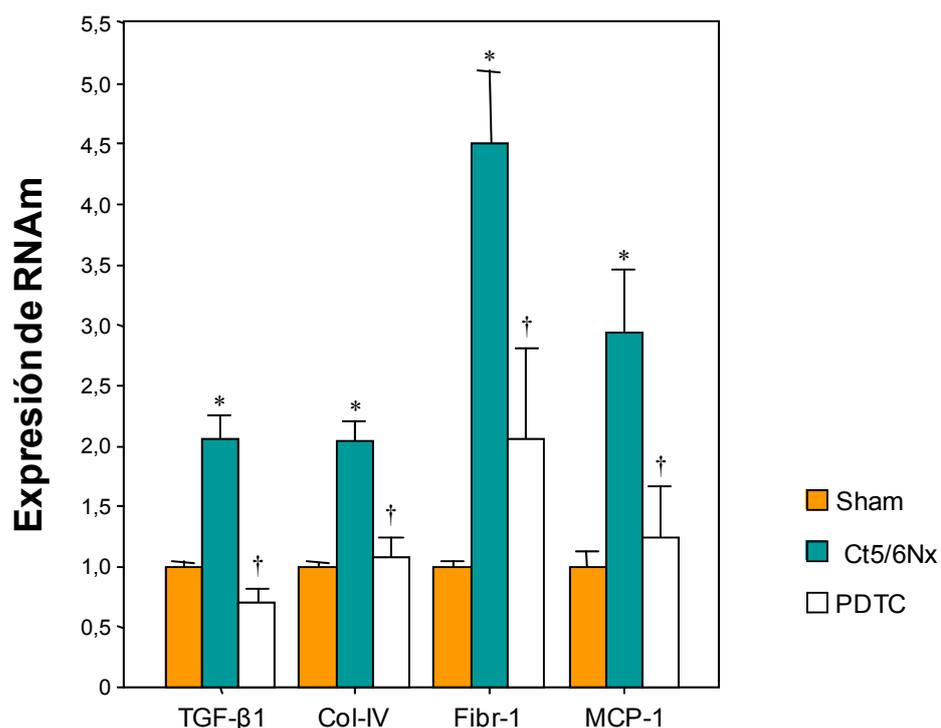


Figura 16. Efectos del PDTC en la expresión del RNAm de TGF-β1, colágeno IV, fibronectina 1 y MCP-1 en ratas nefrectomizadas. Una semana después de completar la cirugía los animales fueron seleccionados aleatoriamente para recibir tratamiento con vehículo o PDTC (200 mg/kg/día, inyección subcutánea) durante cinco semanas. La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en Tiempo Real como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica fueron normalizados por los niveles de expresión de GAPDH. El histograma representa la media \pm el error típico. Col-IV: colágeno IV, Fibr-1: fibronectina 1. *P < 0,05 vs. Sham, † P < 0,05 vs. Ct5/6Nx.

Con la intención de investigar si AP-1 estaba jugando algún papel en el desarrollo de la patología en nuestro modelo y qué elementos de la superfamilia podían estar involucrados, realizamos medidas de la actividad de AP-1, analizando la participación de c-Fos, FosB, c-Jun y JunD. En un *pool* de extractos nucleares de los animales correspondientes al grupo Ct5/6Nx-42d encontramos niveles de c-Fos elevados, pero no de los otros componentes de AP-1: FosB, c-Jun ni JunD (101, 100 y 103 respectivamente, en porcentajes de los valores del grupo Sham-42d; figura 17A). Sin embargo, el incremento de c-Fos en las ratas nefrectomizadas analizadas individualmente se produjo a expensas de la fuerte activación de c-Fos sólo en la mitad de animales del grupo (Ct5/6Nx-42d: $0,18 \pm 0,07$; Sham-42d: $0,08 \pm 0,01$, NS).

A continuación, analizamos si los valores de c-Fos estaban relacionados con los parámetros morfológicos de daño glomerular (GIS) y túbulointersticial (DTI). Para ello, tomando en cuenta el tamaño de nuestra muestra, categorizamos c-Fos en cuartiles. Como los valores de cFos eran muy similares en los cuartiles 1, 2 y 3 y diferían claramente de los del cuartil 4, establecimos dos categorías: cuartiles 1 a 3 y cuartil 4 (figura 17B). En los animales con niveles de c-Fos en el cuartil 4, los valores de GIS y DTI fueron de dos a tres veces superiores a las tasas de daño correspondientes a los cuartiles 1 a 3 de c-Fos (figura 17B).

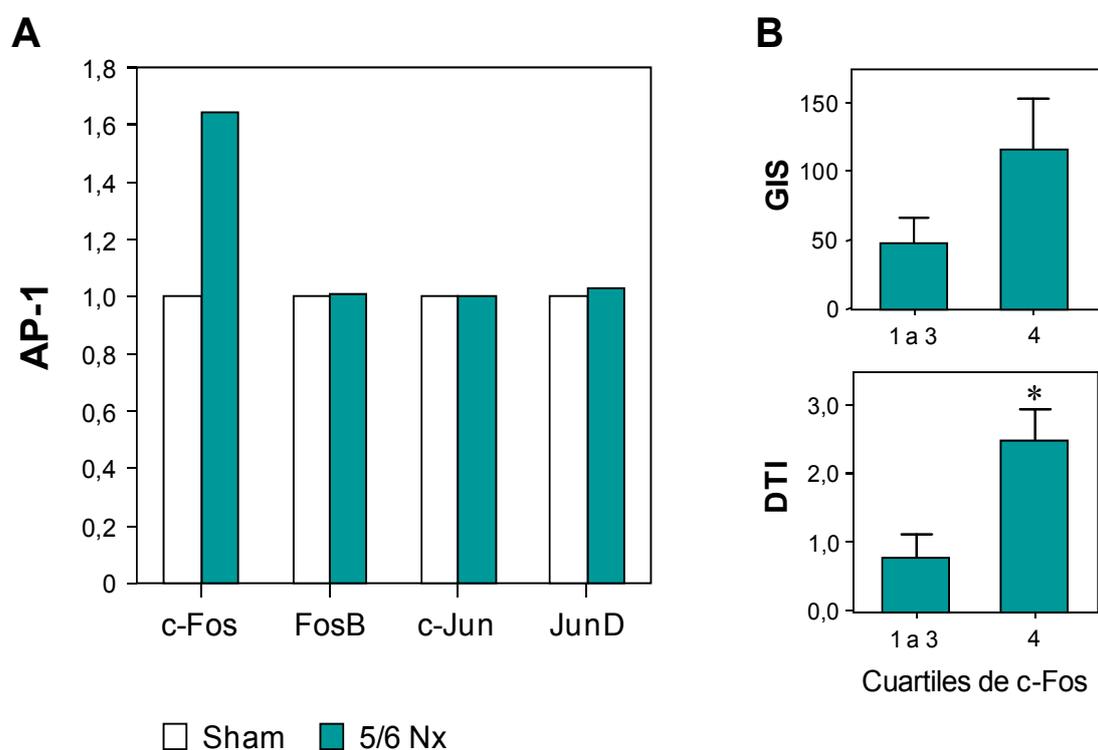


Figura 17. AP-1 en modelo de 5/6 de nefrectomía. A) Valores relativos de las diferentes proteínas de la familia AP-1 (c-Fos, FosB, c-Jun y JunD) en los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d. La actividad de AP-1 fue medida usando el *kit* Trans-AM™ AP-1 Family (Active Motif). Con el fin de determinar la cantidad de AP-1 unido al DNA, se utilizaron anticuerpos primarios específicos para las proteínas c-Fos, FosB, c-Jun y JunD. **B)** Análisis de los parámetros morfológicos de daño glomerular (GIS) y tubulointersticial (DTI) en el conjunto de animales de los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d para las dos categorías de c-Fos establecidas (cuartiles 1 a 3 y cuartil 4). Los parámetros GIS y DTI se determinaron mediante método de Komatsu y mediante escala semicuantitativa según Cao, Z. y col., 2002 respectivamente, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. *P < 0,05 vs. cuartiles 1 a 3.

También analizamos si la actividad de AP-1 en el modelo de 5/6Nx estaba asociada a la expresión génica de proteínas involucradas en la progresión del daño renal como fibronectina 1, MCP-1, pre-proET-1 y colágeno IV. Para ello, realizamos un análisis de correlación tomando los datos de expresión génica obtenidos de los animales de los grupos Ct5/6Nx-42d y Sham-42d y los correspondientes valores de actividad del factor nuclear AP-1. Los resultados mostraron la existencia de correlación entre la actividad de AP-1 y la expresión de fibronectina 1, MCP-1 y colágeno IV (Tabla 6). Aunque no se encontró una correlación significativa entre la expresión de la pre-proET-1 y la actividad de AP-1, pudimos apreciar cierta tendencia a la asociación de ambas variables ($P = 0,07$).

Tabla 6. Correlación entre la actividad de AP-1 y la expresión de diferentes genes involucrados en el daño renal en los animales de los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d.

	Correlación de Pearson	
	r	P
Fibronectina 1	0,70	< 0,01
MCP-1	0,61	<0,01
Pre-proET-1	0,42	= 0,07
Colágeno IV	0,59	< 0,01

Como ya hemos comentado, AP-1 es capaz de actuar de forma coordinada con el TGF- β para regular la expresión de diferentes genes profibróticos (Rodríguez-Pascual, F. y col., 2003; Tharaux, P. L. y col., 2000; de Borst, M. H. y col., 2007; Hocevar, B. A. y col., 1999). Igualmente, se ha hecho referencia a diferentes trabajos que ponen de manifiesto la capacidad del TGF- β 1 para regular la composición y arquitectura de la matriz extracelular en glomérulo e intersticio gracias a su habilidad para modificar la expresión de proteínas de matriz como laminina, colágenos y fibronectina 1 (ver *apartado 2.1* de la sección Introducción). Por ello, realizamos un análisis de correlación entre la expresión del RNAm del TGF- β 1 y de los genes profibróticos que se muestran en la Tabla 7. Las muestras utilizadas correspondieron al conjunto de animales de los grupos Ct5/6Nx-42d y Sham-42d. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la estrecha correlación existente entre la tasa de expresión génica del TGF- β 1 y la correspondiente a los genes fibronectina 1, pre-proET-1, colágeno I y colágenos III a VI (Tabla 7) en el modelo de 5/6Nx.

Tabla 7. Correlación entre los niveles de expresión de TGF- β y la expresión de diferentes genes involucrados en el daño renal en los animales de los grupos Sham-42d y Ct5/6Nx-42d.

	Correlación de Pearson	
	r	P
Fibronectina 1	0,85	< 0,0001
Pre-proET-1	0,72	<0,001
Colágeno I	0,83	<0,0001
Colágeno III	0,88	< 0,0001
Colágeno IV	0,84	< 0,0001
Colágeno V	0,91	< 0,0001
Colágeno VI	0,72	< 0,001

3. EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS A LOS 42 DÍAS

3.1. Parámetros sistémicos

Las curvas de ganancia de peso fueron similares en todos los grupos experimentales. Con vistas a determinar qué efectos tuvieron los diferentes fármacos sobre la presión arterial, se hicieron determinaciones de PAS a diferentes tiempos (figuras 18 y 19). Los tratamientos con losartán, losartán + cerivastatina y carvedilol redujeron la PAS a niveles similares a los del grupo Sham-42d, siendo el grupo Losartán + Cerivastatina el que alcanzó los valores más bajos (131 ± 1 mmHg) (figura 18). En los dos grupos que recibieron tratamiento con losartán, la PAS experimentó una reducción parcial desde el día 24 del experimento, pero no se alcanzó una normalización completa hasta el día 42 (figura 19). Sin embargo, el carvedilol alcanzó un efecto antihipertensivo máximo desde los 24 días. Aunque ni la cerivastatina ni el antagonista de los receptores ET_A y ET_B (Ro 48-5695) fueron capaces de normalizar las cifras de PAS, sí que detuvieron su aumento a partir del día 7 del experimento (figura 19); de hecho, la cerivastatina provocó una reducción de la PAS de 10 mmHg, que se apreció desde el día 24 y se mantuvo hasta el final del experimento.

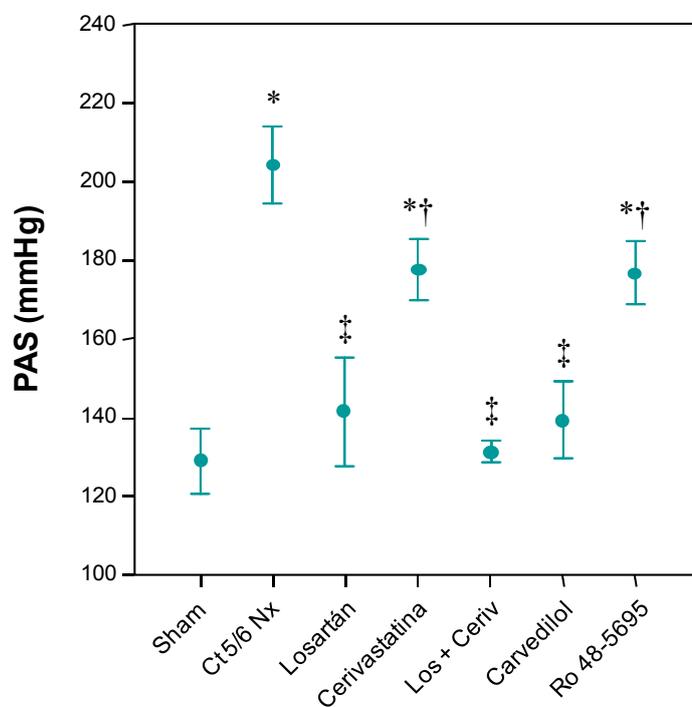


Figura 18. Efecto de los tratamientos con losartán, cerivastatina, losartán + cerivastatina, carvedilol y Ro 48-5695 sobre los valores de la PAS al final del estudio. Las medidas de la PAS se realizaron de forma incruenta en la cola de los animales con un analizador automático de presión arterial (LE-5007 Letica Scientific Instruments). Las barras representan intervalos de confianza de un 95%. * $P < 0,0001$ vs. Sham, ‡ $P < 0,0001$, † $P < 0,001$ vs. Ct5/6Nx.

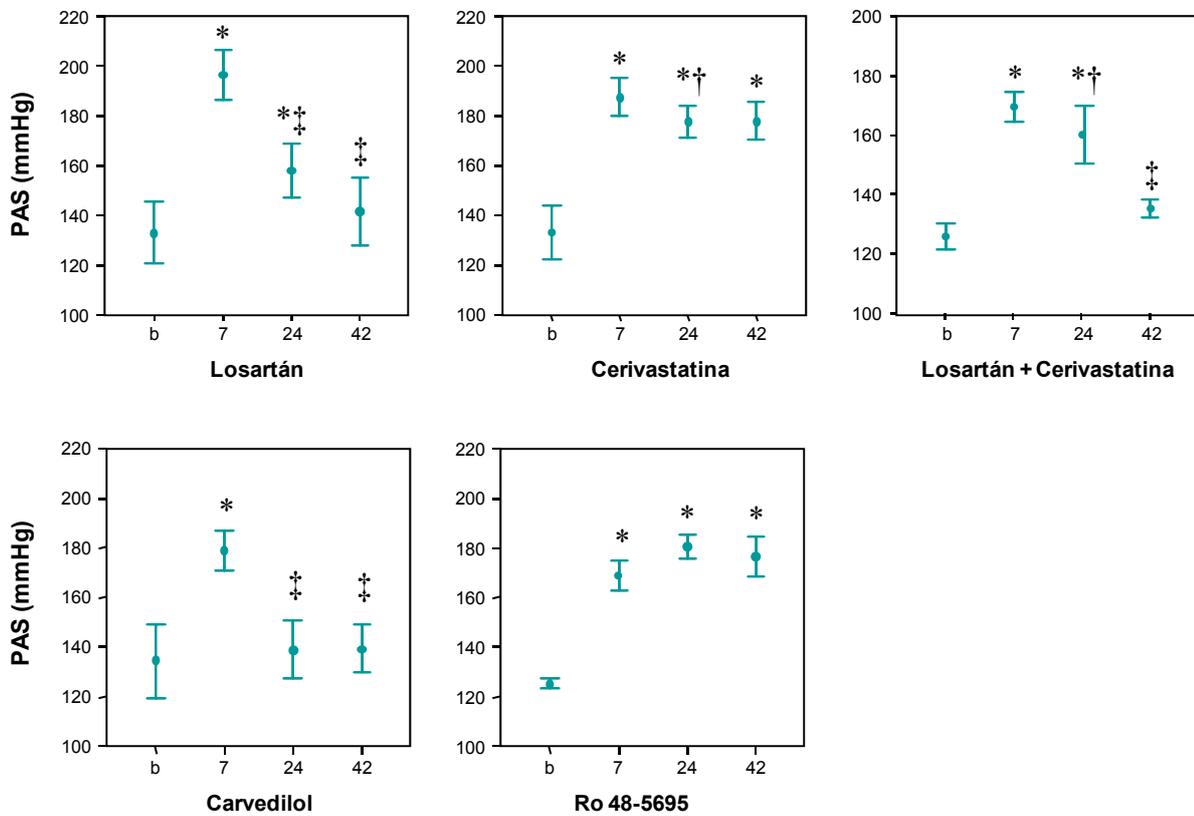


Figura 19. Evolución de la PAS en los animales tratados con losartán, cerivastatina, losartán + cerivastatina, carvedilol y Ro 48-5695 a lo largo del estudio. Las medidas de la PAS se realizaron de forma incruenta en la cola de las ratas con un analizador automático de presión arterial (LE-5007 Letica Scientific Instruments) en los momentos indicados: el día de la uninefrectomía derecha (basal:b) y los días 7 (inicio de los tratamientos), 24 y 42 tras la nefrectomía. Las barras representan intervalos de confianza de un 95%. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la t de Student para datos apareados. *P < 0,001 vs. basal, ‡P < 0,001 vs. 7 días, †P < 0,05 vs. 7 días.

A continuación se evaluó el efecto de los tratamientos farmacológicos sobre el estado de la barrera de filtrado glomerular. La albuminuria se mantuvo elevada hasta el final del estudio en las ratas nefrectomizadas que no recibieron tratamiento. Ni el carvedilol, ni la cerivastatina pudieron prevenir la excreción urinaria de albúmina (Tabla 8). Por el contrario, los animales pertenecientes al grupo Losartán + Cerivastatina experimentaron una reversión completa de la albuminuria, mientras que el grupo en tratamiento con losartán presentó valores de excreción de albúmina cercanos a los del grupo Sham. El grupo Ro 48-5695 mostró valores de albuminuria reducidos respecto al grupo Ct5/6Nx-42d, aunque continuaron siendo moderadamente elevados respecto al grupo Sham ($P < 0,05$).

La disminución de la función renal, evaluada según los niveles de creatinina sérica, fue revertida parcialmente en los animales del grupo Losartán (50% de reversión, $P < 0,01$) y de forma aún más clara en los grupos tratados con cerivastatina o con losartán más cerivastatina (60% de reversión, $P < 0,001$). Por otra parte, el tratamiento con el antagonista de los receptores de endotelina, Ro 48-5695, fue incapaz de reducir el incremento de creatinina sérica provocado por la pérdida de masa renal (Tabla 8).

Tabla 8. Albuminuria, creatinina sérica y parámetros morfológicos de todos los grupos al final del estudio.

	Albuminuria (mg/día)	Creatinina Sérica (mg/dL)	GIS	DTI
Sham-42d	1 ± 0,4	0,52 ± 0,05	10 ± 2	0,3 ± 0,2
Ct5/6 Nx-42d	30 ± 4 ^b	1,42 ± 0,02 ^d	138 ± 19 ^d	2,6 ± 0,3 ^c
Losartán	2 ± 0,4 ^x	0,96 ± 0,07 ^{dx}	40 ± 12 ^y	0,4 ± 0,3 ^x
Cerivastatina	33 ± 11 ^c	0,87 ± 0,03 ^{by}	96 ± 22 ^b	1,4 ± 0,2 ^{by}
Losartán + Cerivastatina	1 ± 0,5 ^x	0,89 ± 0,03 ^{cy}	29 ± 6 ^x	0,4 ± 0,2 ^x
Carvedilol	28 ± 7 ^b	(n. d.)	63 ± 20 ^x	0,4 ± 0,2 ^x
Ro 48-5695	4 ± 1 ^{ax}	1,31 ± 0,15 ^b	126 ± 15 ^d	1,9 ± 0,3 ^b

Los valores representan las medias ± SEM. ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ y ^d $P < 0,0001$ vs. Sham-42d; ^y $P < 0,05$, ^x $P < 0,01$, ^y $P < 0,001$ y ^z $P < 0,0001$ vs. Ct5/6Nx-42d; GIS, índice de daño glomerular; DTI, índice de daño tubulointerstial; n. d., no determinado.

3.2. Análisis Histológico y Morfológico

Para averiguar si los distintos tratamientos tuvieron alguna influencia en la morfología del riñón remanente con 2/3 de nefrectomía, se realizaron valoraciones histológicas con ayuda de las tinciones tricrómica de Masson y del ácido peryódico de Schiff, y se determinaron las tasas de daño renal GIS y DTI.

Cuando los animales fueron tratados con losartán (figuras 20g y 20h) o con la combinación de losartán más cerivastatina (figuras 20i y 20j), las alteraciones morfológicas en glomérulos y en el espacio tubulointersticial mejoraron considerablemente, si bien esta mejora fue más clara en el grupo que recibió la terapia combinada. En este sentido, la acumulación de proteínas de matriz, determinada mediante tinción con APS, estuvo parcialmente incrementada en las láminas basales de las ratas del grupo Losartán (figura 20h). También se contabilizaron algunos glomérulos retraídos en áreas focales del tejido renal de los animales de este grupo, mientras que no se observaron diferencias morfológicas entre los grupos Losartán + Cerivastatina y Sham-42d. En consonancia con estos datos, el tratamiento combinado (losartán + cerivastatina) previno el incremento de GIS que siguió a la ablación renal ($P < 0,0001$, Tabla 8). Aunque con menor intensidad, un efecto similar se observó tras el tratamiento con losartán usado individualmente ($P < 0,001$) o con carvedilol ($P < 0,01$). Por el contrario, la estatina usada como monoterapia no redujo significativamente el daño glomerular (Tabla 8). En comparación con las ratas nefrectomizadas sin tratamiento farmacológico, la tasa de lesiones tubulointersticiales estuvo claramente atenuada en las ratas que recibieron tratamiento con losartán, losartán + cerivastatina o carvedilol ($P < 0,01$ para los tres grupos vs. Ct5/6Nx-42d), mientras que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa fue menos eficaz en este sentido ($P < 0,05$ vs. Ct5/6Nx-42d). Por otra parte, el antagonista de los receptores de ET (Ro 48-5695) fue incapaz de prevenir el daño tanto a nivel glomerular como tubulointersticial.

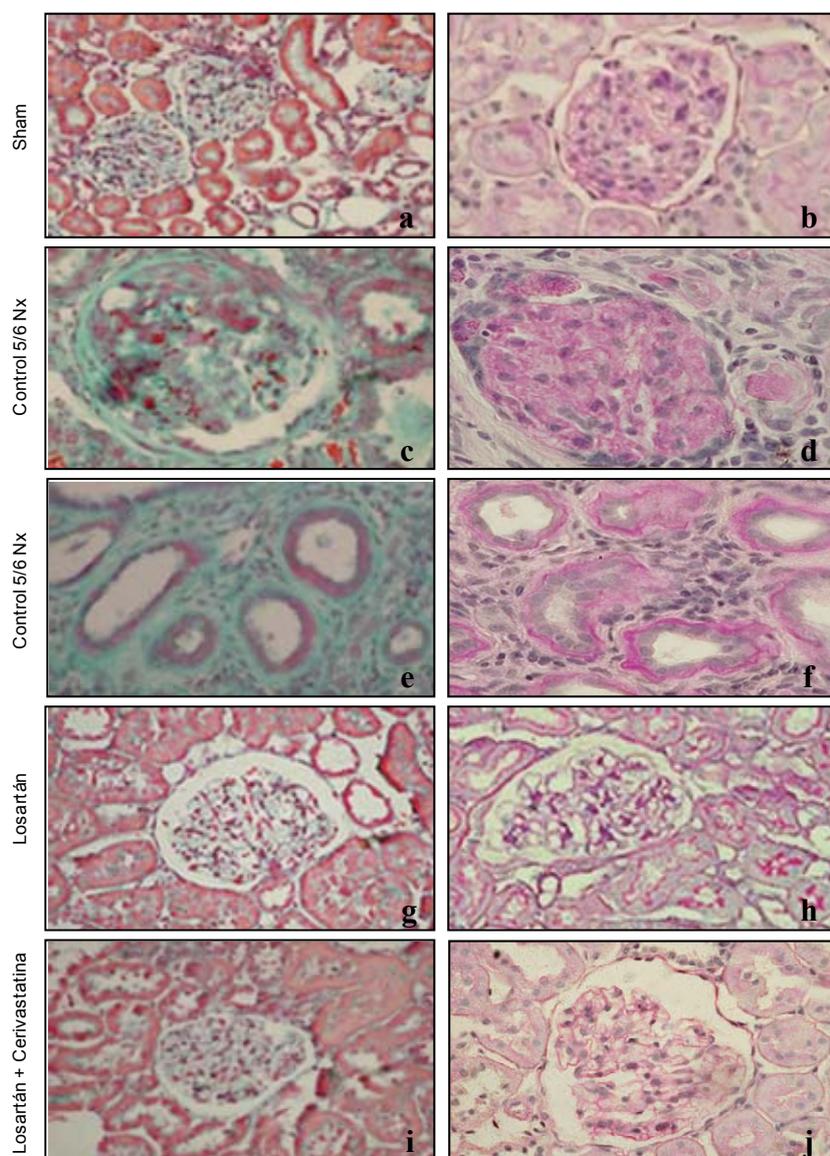


Figura 20. Efecto de los tratamientos con losartán y losartán más cerivastatina a nivel glomerular y tubulointerstitial. Las alteraciones histológicas observadas en glomérulo y tubulointersticio de las ratas sometidas a 5/6 de nefrectomía experimentaron una considerable mejoría al utilizar el ARAII (losartán) en combinación con la estatina (cerivastatina). El losartán, por sí solo, también demostró tener capacidad para mejorar dichas alteraciones, si bien se detectó un incremento parcial en la deposición de proteínas de matriz extracelular no observado en el grupo que recibió la terapia combinada. Tinción tricrómica de Masson (figuras a la izquierda) y tinción de APS (figuras a la derecha).

3.3. Efectos de los fármacos en la regulación de la expresión génica

A continuación, con la intención de evaluar qué efectos provocaron los diferentes tratamientos en la expresión de genes de conocida implicación en el daño renal, analizamos, en primer lugar, la activación de NF- κ B y AP-1 en los distintos grupos experimentales, y seguidamente determinamos la expresión génica de TGF- β 1, BMP7, KCP, colágenos (I, III, IV, V y VI), fibronectina 1, laminina B1, pre-proET-1 y MCP-1. Los resultados del antagonista no selectivo de los receptores ET_A y ET_B de la endotelina-1 se presentan en un subapartado diferente, debido a que fue un grupo que se añadió *a posteriori*.

3.3.1. Actividad de NF- κ B y AP-1.

El grupo Losartán experimentó disminución de la actividad de NF- κ B, aunque las diferencias observadas no llegaron a alcanzar significación estadística respecto al grupo Ct5/6Nx-42d. Si bien la cerivastatina por sí sola no ejerció ningún efecto en la modulación de la actividad de este factor nuclear, su administración combinada con el losartán fue capaz de reducirla de manera significativa. El grupo Carvedilol mostró una disminución parcial de la actividad de NF- κ B (figura 21A).

El estudio de localización de p65 mediante inmunohistoquímica en las ratas nefrectomizadas puso de manifiesto la presencia de lesiones focales en el núcleo de células mesangiales y epiteliales de la cápsula de Bowman (figura 21Ba), en células tubulares (figura 21Bb) y pertenecientes al intersticio (figura 21Bc). En consonancia con los ensayos de actividad, los animales del grupo Losartán alcanzaron una reversión parcial de la actividad de NF- κ B (figura 21Be) mientras que en el grupo que recibió el tratamiento simultáneo (losartán + cerivastatina) la reversión de la actividad de NF- κ B fue prácticamente total (figura 21Bf).

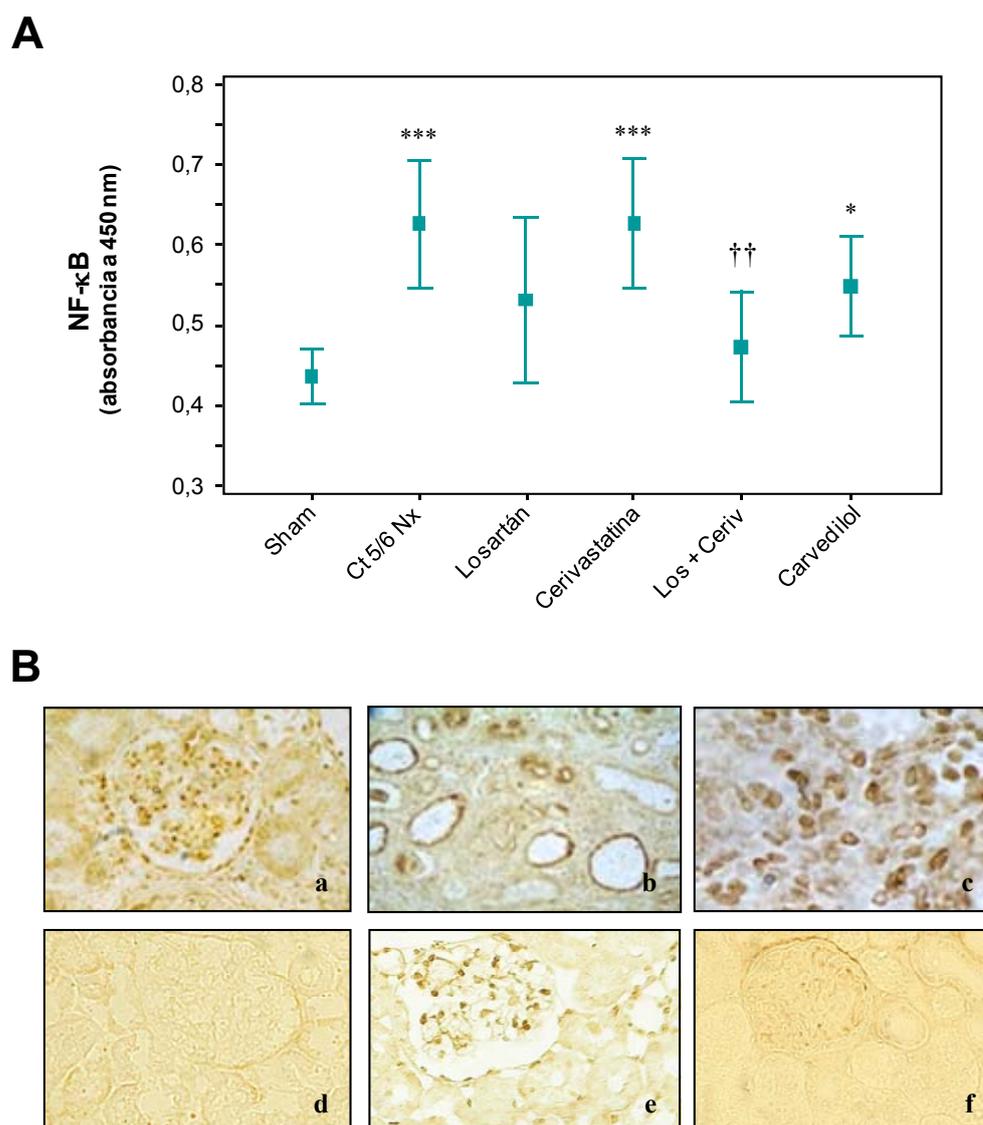


Figura 21. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la actividad de NF-κB. **A)** La actividad de NF-κB se midió usando el *kit* Trans-AM™ NF-κB p65 Family (Active Motif, Carlsbad, CA) como se describe en la sección Materiales y Métodos. Las barras representan intervalos de confianza de un 95%. Los+Ceriv: losartán + cerivastatina. *P < 0,05, ***P < 0,001 vs. Sham, ††P < 0,01 vs. Ct5/6Nx. **B)** Localización tisular de NF-κB en glomérulo (a), túbulo (b) e intersticio (c) en animales del grupo Ct5/6Nx-42d. Ausencia de expresión en los grupos Sham (d) y Losartán + Cerivastatina (f). Reversión parcial en el grupo Losartán (e). Aumento original entre 200x y 400x.

Todos los grupos, independientemente del tratamiento empleado, mostraron disminución de la actividad de c-Fos (figura 22).

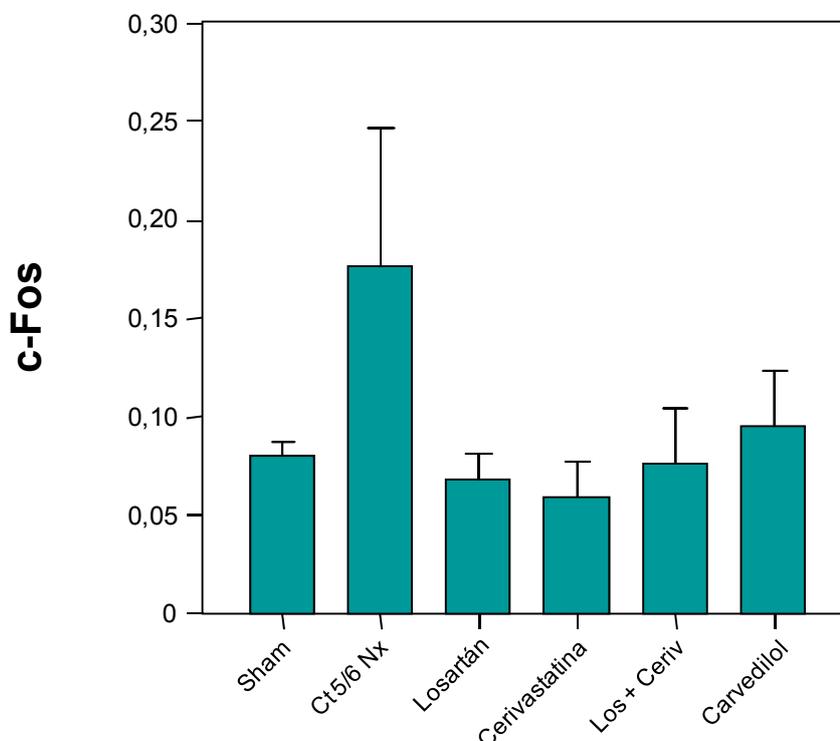


Figura 22. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la actividad de c-Fos (AP-1). La actividad de AP-1 se midió usando el *kit* Trans-AM™ AP-1 Family (Active Motif, Carlsbad, CA) como se describe en la sección Materiales y Métodos. Las columnas representan intervalos de confianza de un 95%. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina.

3.3.2. Expresión génica

Como ya se comentó en la introducción de este subapartado, los genes analizados fueron: TGF- β 1, BMP7, KCP, colágenos (I, III, IV, V y VI), fibronectina 1, laminina B1, pre-proET-1 y MCP-1. En los grupos Losartán y Losartán + Cerivastatina se valoró la expresión de cuatro proteínas clásicas en el daño renal (TGF- β 1, colágeno IV, fibronectina 1 y pre-proET-1) mediante inmunohistoquímica, y se contrastó con los respectivos análisis de expresión génica realizados.

TGF- β 1, BMP7 y KCP: La expresión de TGF- β 1 de los diferentes grupos en tratamiento fue similar a la observada en el grupo Ct5/6Nx-42d, a excepción del grupo Losartán + Cerivastatina, cuyos niveles de expresión fueron muy similares a los del grupo

Sham-42d (figura 23A). En consonancia con estos resultados, los análisis inmunohistoquímicos revelaron que el tratamiento consistente en la combinación del losartán más la cerivastatina fue capaz de revertir casi en su totalidad la expresión de esta citocina (figura 23Bd), especialmente incrementada en el citoplasma de células mesangiales, de células epiteliales de la cápsula de Bowman y aunque menos intensamente, también de células tubulares de los animales del grupo Ct5/6Nx-42d (figura 23Bb) y del grupo Losartán (figura 23Bc).

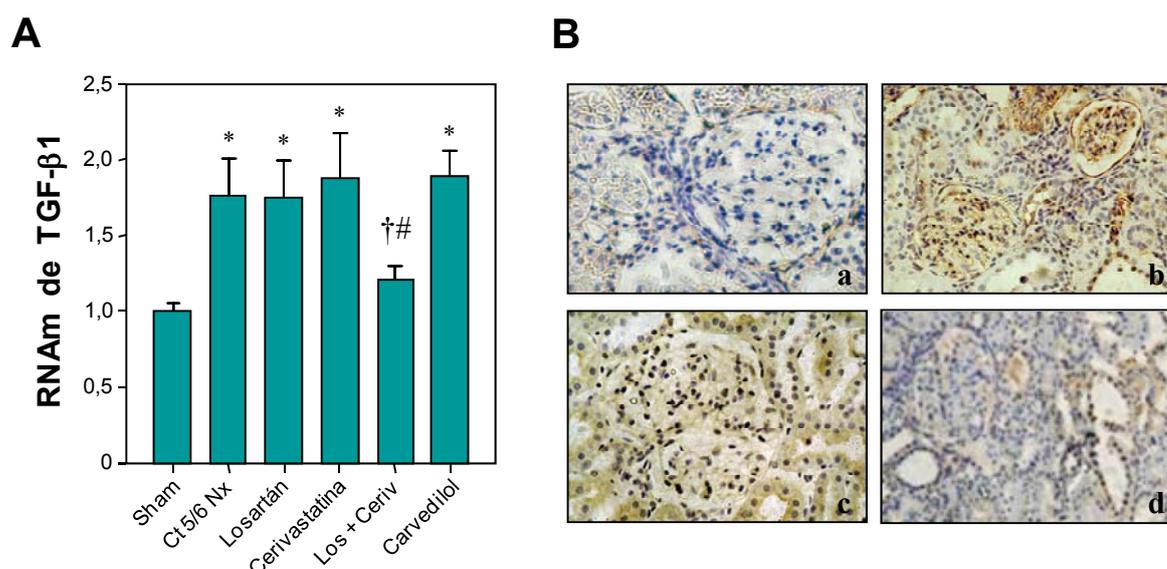


Figura 23. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión génica del TGF-β1. **A)** El nivel de expresión del RNAm de TGF-β1 se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los resultados de expresión génica obtenidos se normalizaron utilizando GAPDH como gen control. Los datos corresponden a la media ± el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina. * $P < 0,05$ vs. Sham, † $P < 0,05$ vs. Ct5/6Nx, # $P < 0,01$ vs. Losartán. **B)** La inmunohistoquímica se realizó tratando las muestras con anticuerpo policlonal de conejo anti-TGF-β1 (SC-146; 1:100) de Santa Cruz Biotechnology, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Sham(a), Ct5/6Nx (b), Losartán (c) y Losartán + Cerivastatina (d).

Curiosamente, los niveles de expresión génica de las dos proteínas que antagonizan la vía de señalización de TGF- β en células epiteliales renales, BMP7 y KCP, apenas se vieron modificados en ninguno de los grupos (figura 24).

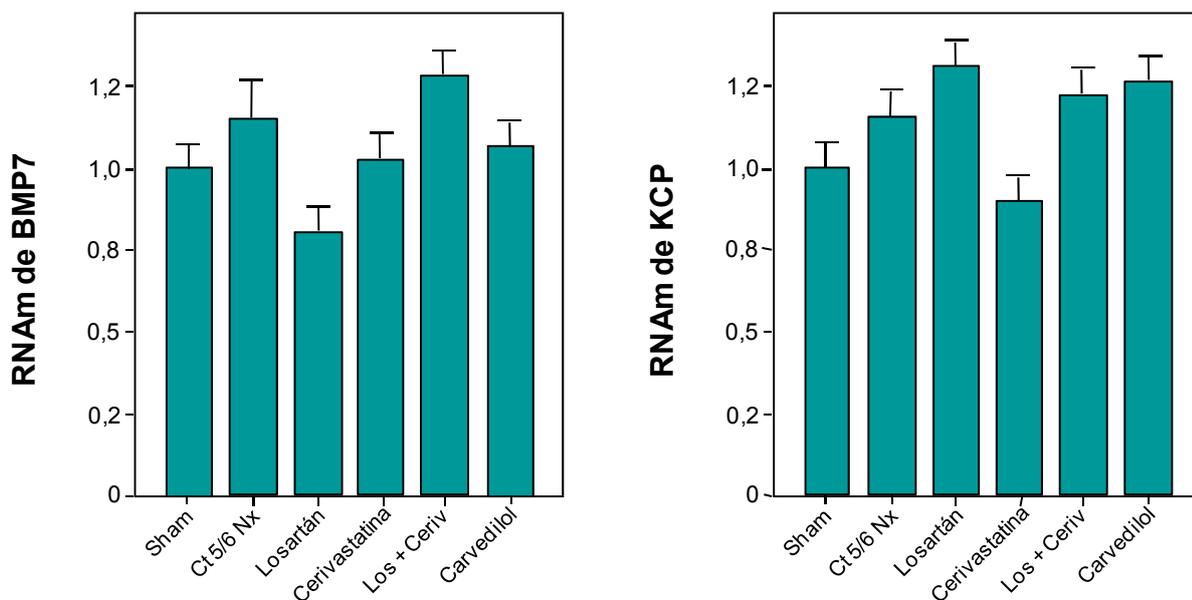


Figura 24. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión génica de BMP7 y KCP. La expresión del RNAm de BMP7 y KCP se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica fueron normalizados por los niveles de expresión de GAPDH. Las barras representan la media \pm el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina.

Colágeno I: Los tratamientos con losartán o cerivastatina provocaron reducción parcial de la expresión del colágeno I, mientras que la terapia combinada de ambos fármacos fue capaz de revertirla de manera considerable (figura 25). Por otra parte, el carvedilol no mostró efecto alguno en la expresión de este colágeno (figura 25).

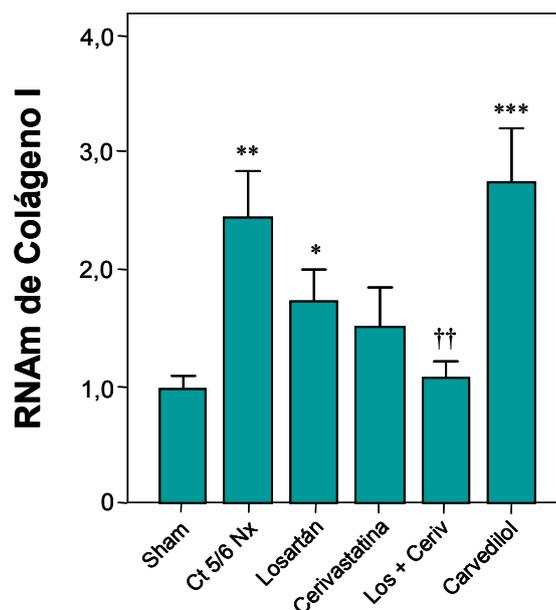


Figura 25. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de colágeno I.

La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra fue analizada por triplicado en experimentos de PCR independientes. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron utilizando GAPDH como gen control. El histograma representa la media \pm el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina. ***P < 0,001 vs. Sham, **P < 0,01 vs. Sham, *P < 0,05 vs. Sham, †† P < 0,01 vs. Ct5/6Nx.

Colágeno III: Los grupos Losartán, Cerivastatina y Carvedilol experimentaron disminución de la expresión del colágeno III, pero sus niveles estuvieron bastante alejados del correspondiente al grupo Sham. Por otra parte, el tratamiento simultáneo del losartán con la cerivastatina se mostró como el más eficaz para controlar la expresión de este colágeno, logrando una reducción de un 40% (figura 26).

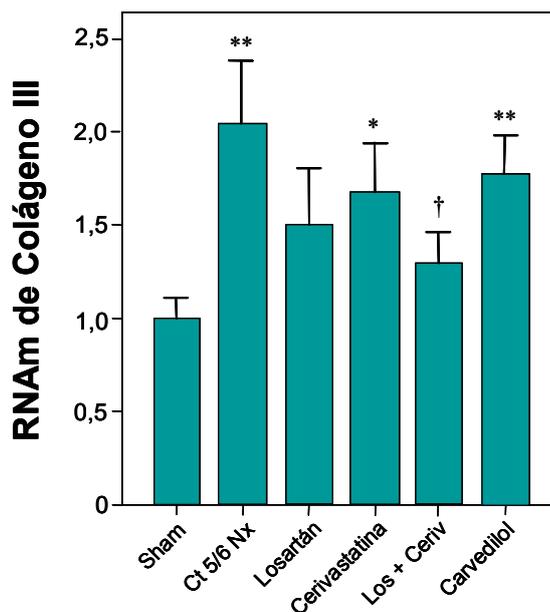


Figura 26. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de colágeno III.

El nivel de expresión génica del colágeno III se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real en un equipo LightCycler como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica se normalizaron de forma relativa a los niveles de expresión de GAPDH. Las columnas representan la media \pm el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina. **P < 0,01 vs. Sham, *P < 0,05 vs. Sham, † P < 0,05 vs. Ct5/6Nx.

Colágeno IV: La combinación del ARAII (losartán) con el antagonista de la HMG-CoA reductasa (cerivastatina) demostró ser el tratamiento más eficaz para controlar la expresión del colágeno IV. En este sentido, el losartán, aunque también fue capaz de reducirla, no logró la eficacia alcanzada con el tratamiento combinado. Por otra parte, ni la cerivastatina por sí sola, ni el carvedilol, fueron capaces de disminuir de forma clara la expresión génica de este colágeno. Los resultados correspondientes a los grupos Losartán y Losartán + Cerivastatina fueron corroborados con el análisis inmunohistoquímico, ya que la sobreexpresión observada, especialmente en espacio intersticial y en lámina basal tubular de los animales nefrectomizados no tratados farmacológicamente (figura 27Bb) se redujo claramente con ambos tratamientos, si bien la terapia combinada fue más eficaz que la monoterapia en este sentido (figuras 27Bc y 27Bd).

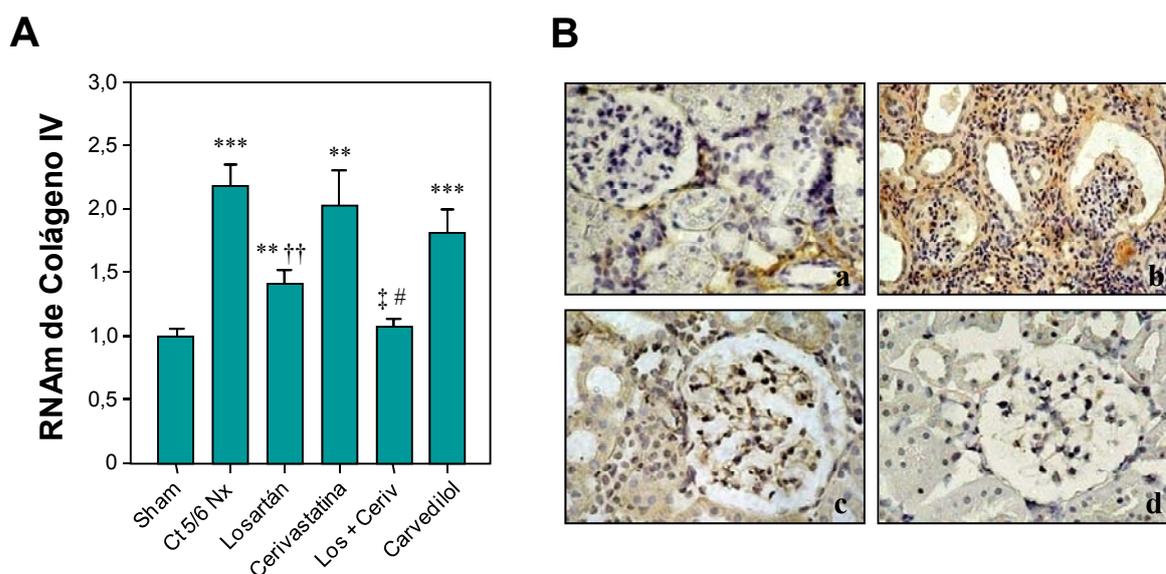


Figura 27. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de colágeno IV.

A) El nivel de expresión génica del colágeno IV se determinó mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó por triplicado en experimentos de PCR independientes. La normalización de la expresión se realizó utilizando GAPDH como *housekeeping gene*. Los datos corresponden a la media \pm el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina. ***P < 0,001 vs. Sham, **P < 0,01 vs. Sham, †† P < 0,01 vs. Ct5/6Nx, ‡P < 0,001 vs. Ct5/6Nx, #P < 0,01 vs. Losartán. **B)** La inmunohistoquímica se realizó tratando las muestras con anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno IV (C-1926), tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Sham(a), Ct5/6Nx (b), Losartán (c) y Losartán + Cerivastatina (d).

Colágeno V: Tanto el losartán como la cerivastatina, utilizados individualmente, fueron capaces de disminuir parcialmente la expresión del colágeno V. No obstante, el uso combinado de ambos fármacos revirtió por completo el aumento de expresión observado en los animales con ablación renal que no recibieron tratamiento ($P < 0,01$). Resulta destacable el hecho de que el grupo que recibió la terapia combinada (losartán más cerivastatina), presentase cifras de expresión significativamente más bajas que el grupo que sólo fue tratado con losartán ($P < 0,05$; figura 28). El carvedilol no ejerció efecto alguno en la expresión génica del colágeno V.

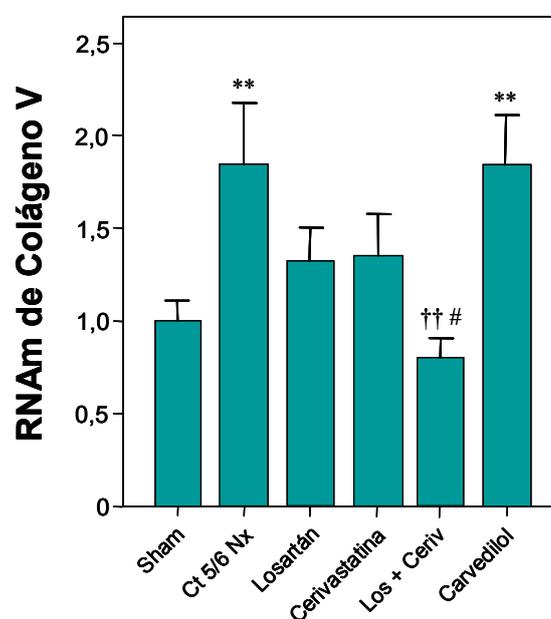


Figura 28. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de colágeno V.

La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron utilizando GAPDH como gen control. El histograma corresponde a la media \pm el error típico. Los+Ceriv: losartán + cerivastatina. ** $P < 0,01$ vs. Sham, †† $P < 0,01$ vs. Ct5/6Nx, # $P < 0,01$ vs. Losartán.

Colágeno VI: El tratamiento combinado (losartán más cerivastatina) fue capaz de revertir casi por completo el aumento de expresión de colágeno VI experimentado por los animales nefrectomizados que no recibieron tratamiento farmacológico (figura 29). Sin embargo, los grupos tratados con carvedilol, losartán o cerivastatina experimentaron disminución parcial de dicha expresión.

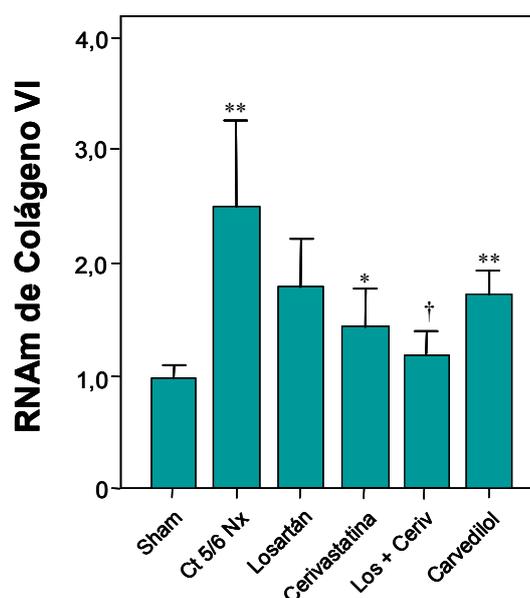


Figura 29. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de colágeno VI.

El nivel de expresión del colágeno VI se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real en un equipo LightCycler como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra fue analizada por triplicado en experimentos de PCR independientes. La normalización de la expresión se realizó utilizando GAPDH como *housekeeping gene*. Las barras corresponden a la media ± el error típico. Los+Ceriv: losartán + cerivastatina. **P < 0,01 vs. Sham, *P < 0,05 vs. Sham, † P < 0,05 vs. Ct5/6Nx.

Fibronectina 1: Los grupos de animales tratados con carvedilol, losartán o cerivastatina experimentaron una reducción parcial de la expresión génica de fibronectina 1, mientras que el grupo Losartán + Cerivastatina experimentó una reversión prácticamente total (figura 30A). En consonancia con estos resultados, los análisis inmunohistoquímicos pusieron de manifiesto que el tratamiento consistente en la combinación del losartán más la cerivastatina fue capaz de revertir casi completamente la expresión de esta proteína (figura 30Bd), principalmente incrementada en láminas basales engrosadas de glomérulos y túbulos, así como en la matriz mesangial de los glomérulos esclerosados de los animales nefrectomizados sin tratamiento (figura 30Bb).

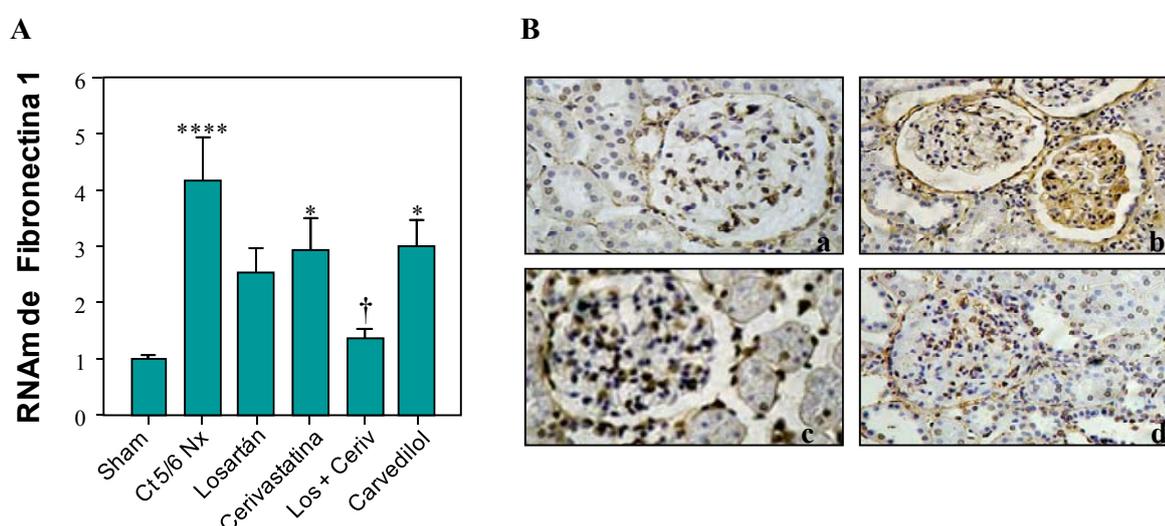


Figura 30. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de fibronectina 1. **A)** La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó por triplicado en experimentos de PCR independientes. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron utilizando GAPDH como gen control. Las columnas corresponden a la media \pm el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina. **** $P < 0,0001$ vs. Sham, * $P < 0,05$ vs. Sham, † $P < 0,01$ vs. Ct5/6Nx. **B)** La inmunohistoquímica se realizó tratando las muestras con anticuerpo policlonal de conejo anti-fibronectina (F-3648) de Sigma, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Sham(a), Ct5/6Nx (b), Losartán (c) y Losartán + Cerivastatina (d).

Laminina B1: No se detectaron diferencias significativas en la expresión génica de la laminina B1 entre los grupos analizados (figura 31).

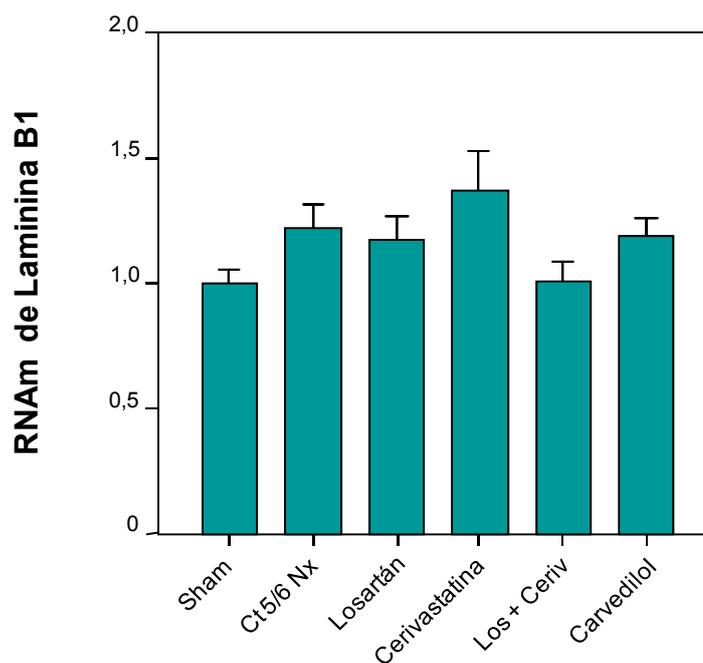


Figura 31. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión de RNAm de Laminina B1.

El nivel de expresión génica de la laminina B1 se determinó mediante RT-PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. La normalización de la expresión se realizó utilizando GAPDH como *housekeeping gene*. El histograma corresponde a la media \pm el error típico. Los + Ceriv: losartán + cerivastatina.

Pre-proET-1: Todos los tratamientos redujeron de forma significativa la expresión génica de esta sustancia vasoactiva llegando a valores muy próximos a los del grupo Sham (figura 32A). Los resultados correspondientes a los grupos Losartán y Losartán + Cerivastatina fueron corroborados con el análisis inmunohistoquímico, ya que el aumento de expresión observado en los animales nefrectomizados que no recibieron tratamiento (figuras 32Bc y 32Bd) se redujo considerablemente en ambos grupos (figuras 32Be y 32Bf).

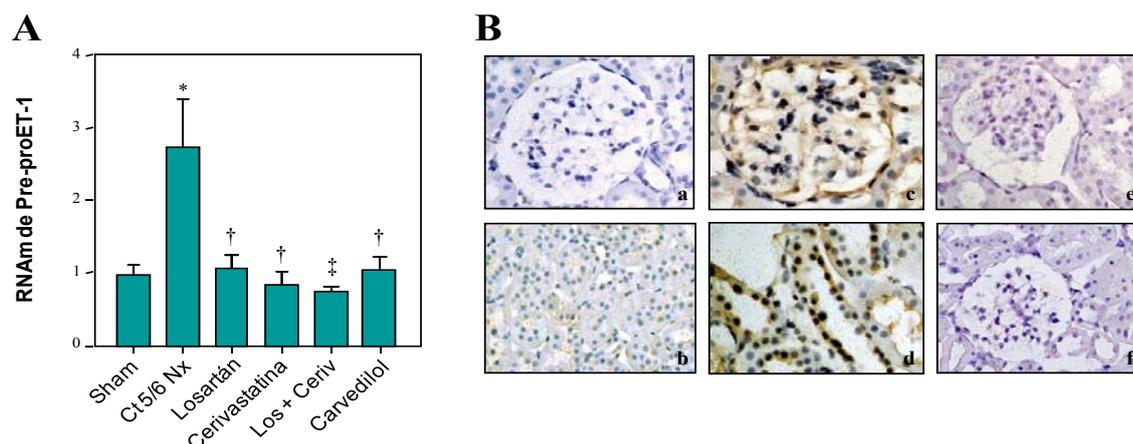


Figura 32. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de pre-proET-1.

A) La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real (LightCycler Instrument) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó por triplicado en experimentos de PCR independientes. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron utilizando GAPDH como gen control. Las barras corresponden a la media \pm el error típico. Los+Ceriv: losartán + cerivastatina. * $P < 0,01$ vs. Sham, † $P < 0,01$ vs. Ct5/6Nx, ‡ $P < 0,001$ vs. Ct5/6Nx. **B)** La inmunohistoquímica se realizó tratando las muestras con anticuerpo policlonal de conejo anti-endotelina-1 (6901, 1:100) de Península Lab., como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Sham (a y b), Ct5/6Nx (c y d), Losartán (e) y Losartán + Cerivastatina (f).

MCP-1: De todos los tratamientos utilizados sólo el correspondiente al grupo Losartán + Cerivastatina fue capaz de revertir la expresión de RNAm a niveles cercanos a los del grupo Sham-42d. El resto de grupos presentaron valores muy cercanos a los del grupo Ct5/6Nx-42d (figura 33).

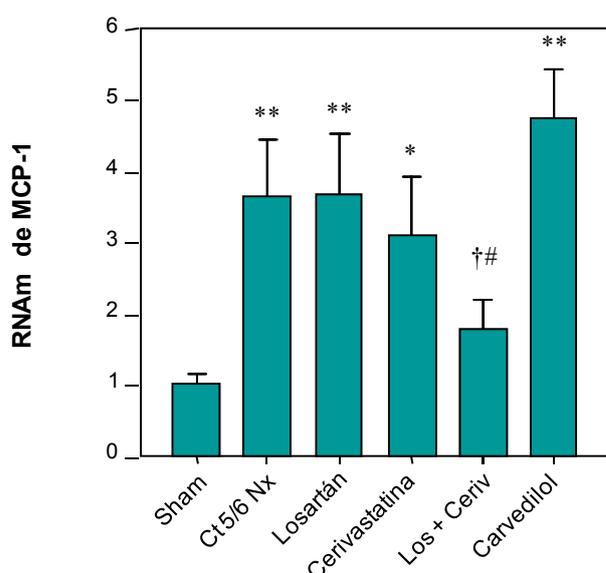


Figura 33. Efecto del losartán, cerivastatina y carvedilol en la expresión del RNAm de MCP-1. El nivel de expresión del MCP-1 se determinó de forma semicuantitativa mediante RT-PCR en tiempo real en un equipo LightCycler como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica se normalizaron de forma relativa a los niveles de expresión de GAPDH. Las columnas representan la media \pm el error típico. Los+Ceriv: losartán + cerivastatina. **P < 0,01 vs. Sham, *P < 0,05 vs. Sham, †P < 0,05 vs. Ct5/6Nx, #P < 0,05 vs. Losartán.

3.3.3. Efectos de un antagonista no selectivo de ET_A/ET_B en la regulación de la expresión génica.

La activación de los factores nucleares NF- κ B y AP-1 observada en el grupo de animales tratados con el antagonista no selectivo de los receptores de ET-1, Ro 48-5695, fue muy similar a la que experimentó el grupo de ratas nefrectomizadas sin tratamiento (figura 34A). En este mismo sentido, el Ro 48-5695, a pesar de poder atenuar el grado de expresión génica de la pre-proET-1 en un 55% ($P < 0,05$), se mostró incapaz de revertir los niveles de expresión de genes como TGF- β 1, colágeno-IV, fibronectina 1 y MCP-1 (figura 34B).

3.4. NF- κ B y AP-1 en el perfil de expresión génica de los animales con ablación renal

A continuación, para investigar la influencia de la actividad de los factores nucleares de interés en la progresión de la enfermedad renal y tomando en cuenta el tamaño muestral del que disponíamos, categorizamos los valores de actividad de NF- κ B y de c-Fos (AP-1) de todos los grupos de ratas objeto de estudio en cuartiles, y los comparamos con sus respectivos niveles de expresión génica de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1, y con sus correspondientes parámetros morfológicos de daño glomerular (GIS) y tubulointersticial (DTI) (figura 35).

Al analizar todos los grupos experimentales en su conjunto, no se encontró correlación entre las actividades de c-Fos y de NF- κ B (Tabla 9), pero se detectó asociación entre los niveles de actividad de NF- κ B y la expresión del RNAm de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1 (figura 35A y correlaciones de Pearson en Tabla 9) así como entre los niveles de actividad de NF- κ B y el índice de daño glomerular y túbulointersticial (figura 35B). Igualmente, las tasas de expresión de los genes mencionados y los índices de daño glomerular y túbulointersticial se vieron incrementados de forma significativa en el cuartil 4 de c-Fos respecto a los cuartiles 1 a 3, donde se observaron valores muy similares de expresión génica y de las tasas de daño renal GIS y DTI (figuras 36A y 36B).

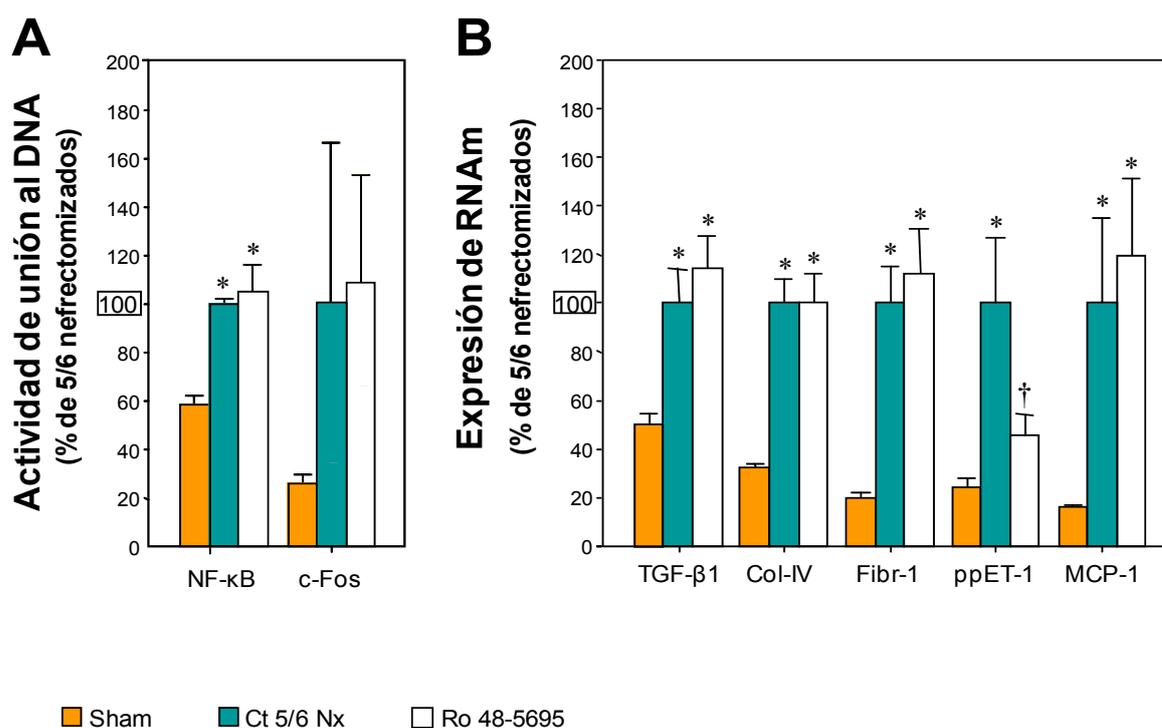


Figura 34. Efectos del antagonista no selectivo de los receptores de ET-1 (ET_A/ET_B), Ro 48-5695, en ratas 5/6 nefrectomizadas. Una semana después de completar la cirugía los animales fueron seleccionados aleatoriamente para recibir tratamiento con vehículo o Ro 48-5695 (30 mg/kg/día mediante sonda oral) durante cinco semanas. **A)** Las actividades de NF- κ B (p65) y AP-1 (c-Fos) se midieron usando los *kits* Trans-AMTM NF- κ B p65 y Trans-AMTM AP-1 Family (Active Motif, Carlsbad, CA) respectivamente, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. **B)** La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en Tiempo Real como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica fueron normalizados utilizando GAPDH como gen control. El histograma representa la media \pm el error típico. Los datos se presentan como porcentajes respecto al grupo Ct5/6Nx-42d debido a que la ablación renal provocó cambios heterogéneos tanto de actividad de unión al DNA (A) como de expresión de RNAm (B) dependiendo del gen analizado. Col-IV: colágeno IV, Fibr-1: fibronectina 1. *P < 0,05 vs. Sham; †P < 0,05 vs. Ct5/6Nx.

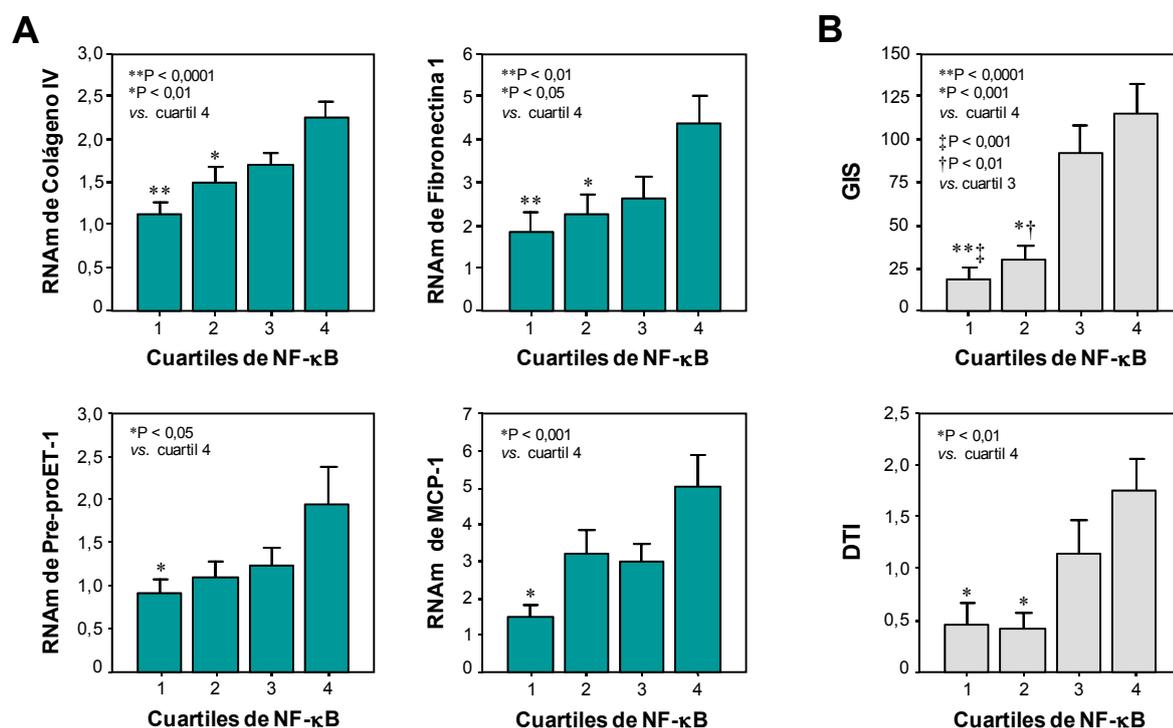


Figura 35. Influencia de la activación de NF- κ B en la expresión de genes involucrados en la progresión de la enfermedad renal, y en el daño glomerular y tubulointersticial. A) Actividad de NF- κ B (p65) categorizada en cuartiles y expresión génica de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1. La actividad de NF- κ B (p65) se midió usando el *kit* Trans-AMTM NF- κ B p65 Family (Active Motif, Carlsbad, CA). La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó en tres experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica fueron normalizados utilizando GAPDH como *housekeeping gene*. El histograma representa la media \pm el error típico. **B)** Actividad de NF- κ B (p65) categorizada en cuartiles y tasas de daño glomerular (GIS) y tubulointersticial (DTI). Los parámetros GIS y DTI se determinaron mediante método de Komatsu y mediante escala semicuantitativa según Cao, Z. y col., 2002 respectivamente, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos mostrados se corresponden con las medias \pm error típico.

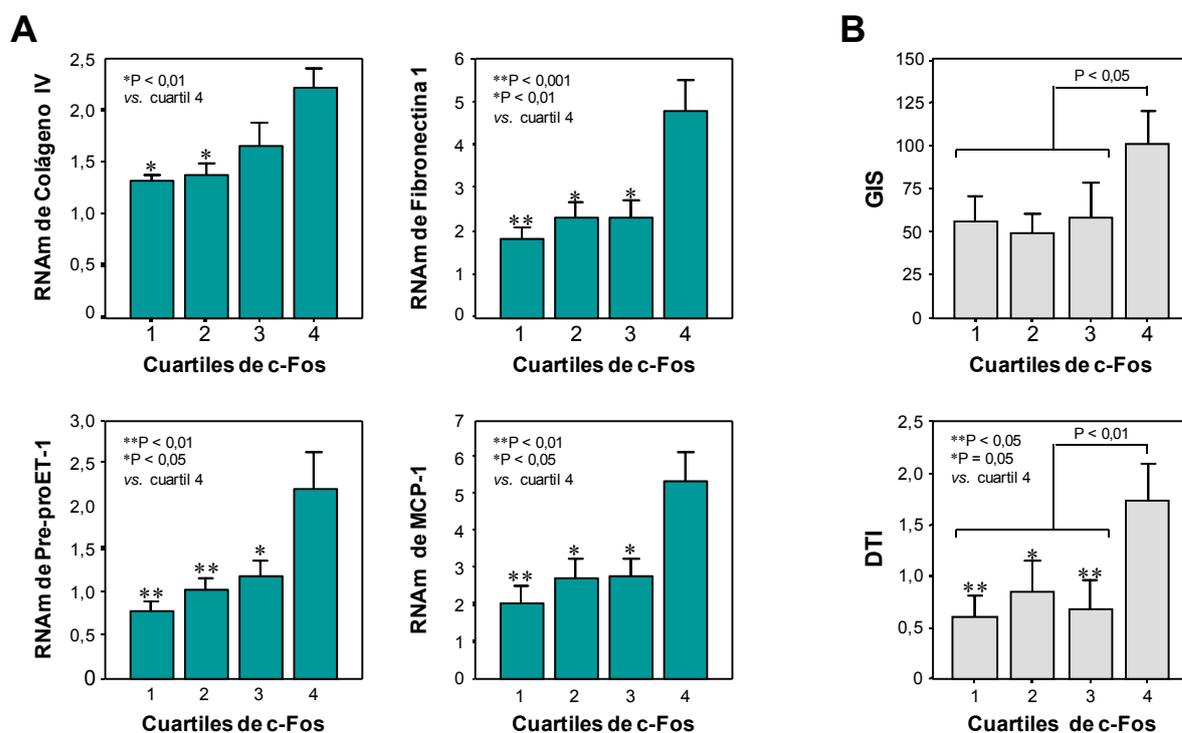


Figura 36. Influencia de la activación de c-Fos (AP-1) en la expresión de genes implicados en la progresión de la enfermedad renal, y en el daño glomerular y tubulointersticial. A) Actividad de c-Fos (AP-1) categorizada en cuartiles y expresión génica de colágeno IV, fibronectina 1, Pre-proET-1 y MCP-1. La actividad de c-Fos (AP-1) se midió usando el *kit* Trans-AM™ AP-1 Family (Active Motif, Carlsbad, CA). La expresión de RNAm se determinó mediante PCR en tiempo real como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Cada muestra se analizó por triplicado en experimentos de PCR independientes. Los valores de expresión génica fueron normalizados utilizando GAPDH como gen control. Las barras representan la media \pm el error típico. **B)** Actividad de c-Fos (AP-1) categorizada en cuartiles y parámetros morfológicos de daño glomerular (GIS) y tubulointersticial (DTI). Los parámetros GIS y DTI se determinaron mediante método de Komatsu y mediante escala semicuantitativa según Cao, Z. y col., 2002 respectivamente, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos mostrados se corresponden con las medias \pm error típico.

De forma general, cuando sólo uno de los factores nucleares (NF- κ B o AP-1) aumentó su actividad, el incremento de expresión del RNAm de los diferentes genes analizados fue bastante modesto en comparación con el notable aumento que experimentaron cuando ambos factores se encontraron activados simultáneamente (figura 37A). En consonancia con estos resultados, NF- κ B y c-Fos demostraron actuar como variables predictoras independientes de la expresión génica de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1, algo que comprobamos al realizar los correspondientes análisis de regresión lineal múltiple (Tabla 9); las capacidades predictoras fueron de un 54, 59, 41 y 51 % respectivamente ($P < 0,0001$ para los modelos establecidos). Los índices de daño glomerular (GIS) y tubulointerstitial (DTI) también alcanzaron los valores más altos cuando ambos factores nucleares se encontraron activados simultáneamente (figura 37B).

Por último, se observó que en aquellos animales cuyos tratamientos redujeron la actividad de NF- κ B, el daño glomerular se atenuó de forma correlativa (figura 38).

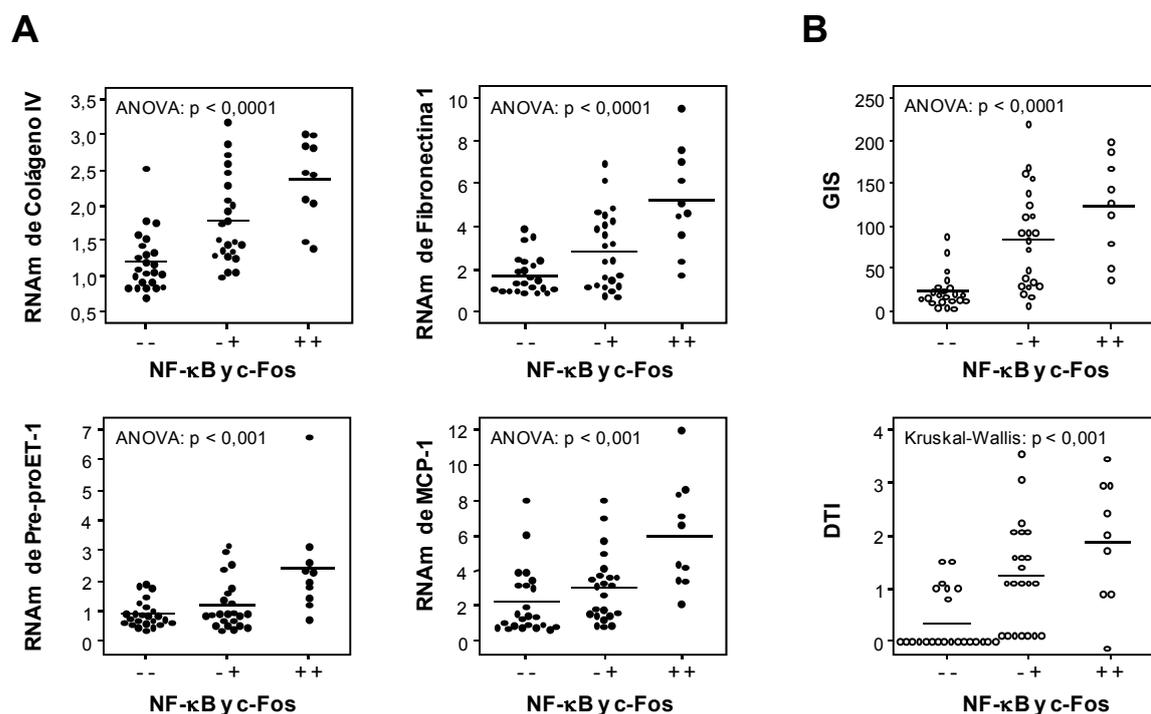


Figura 37. Comportamiento de la expresión de genes implicados en la progresión de la enfermedad renal, y del daño glomerular y tubulointersticial según la activación de NF- κ B y/o AP-1. Niveles de expresión génica de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1 (A) e índices de daño glomerular y tubulointersticial (B) respecto a la actividad de NF- κ B y de AP-1(c-Fos) como categorías combinadas en todas las ratas analizadas. Los resultados mostrados se corresponden con las medias \pm error típico. (- -) valores de NF- κ B por debajo de la mediana y AP-1 correspondiente a los cuartiles 1, 2 y 3; (- +) valores de NF- κ B por encima de la mediana o AP-1 correspondiente al cuartil 4; (+ +), valores de NF- κ B por encima de la mediana y AP-1 correspondiente al cuartil 4.

Tabla 9. NF-κB y c-Fos como indicadores predictores de la expresión de genes involucrados en la progresión de la enfermedad renal

Variable dependiente	Indicadores predictivos independientes	Correlación de Pearson		Análisis de regresión lineal múltiple	
		r	P	R ²	P
Colágeno IV	NF-κB	0,605	<0,0001	0,366	
	Log(c-Fos)	0,501	<0,0001	0,174	
	<i>Total</i>			0,540	<0,0001
Fibronectina 1	NF-κB	0,570	<0,0001	0,241	
	Log(c-Fos)	0,594	<0,0001	0,352	
	<i>Total</i>			0,593	<0,0001
Pre-proET-1	NF-κB	0,400	<0,01	0,105	
	Log(c-Fos)	0,548	<0,0001	0,300	
	<i>Total</i>			0,405	<0,0001
MCP-1	NF-κB	0,501	<0,0001	0,180	
	Log(c-Fos)	0,570	<0,0001	0,325	
	<i>Total</i>			0,505	<0,0001

Se realizaron los correspondientes análisis de regresión lineal múltiple y se determinó la capacidad predictora de NF-κB y c-Fos. También se muestran las correlaciones de Pearson entre las variables dependientes indicadas y NF-κB o c-Fos.

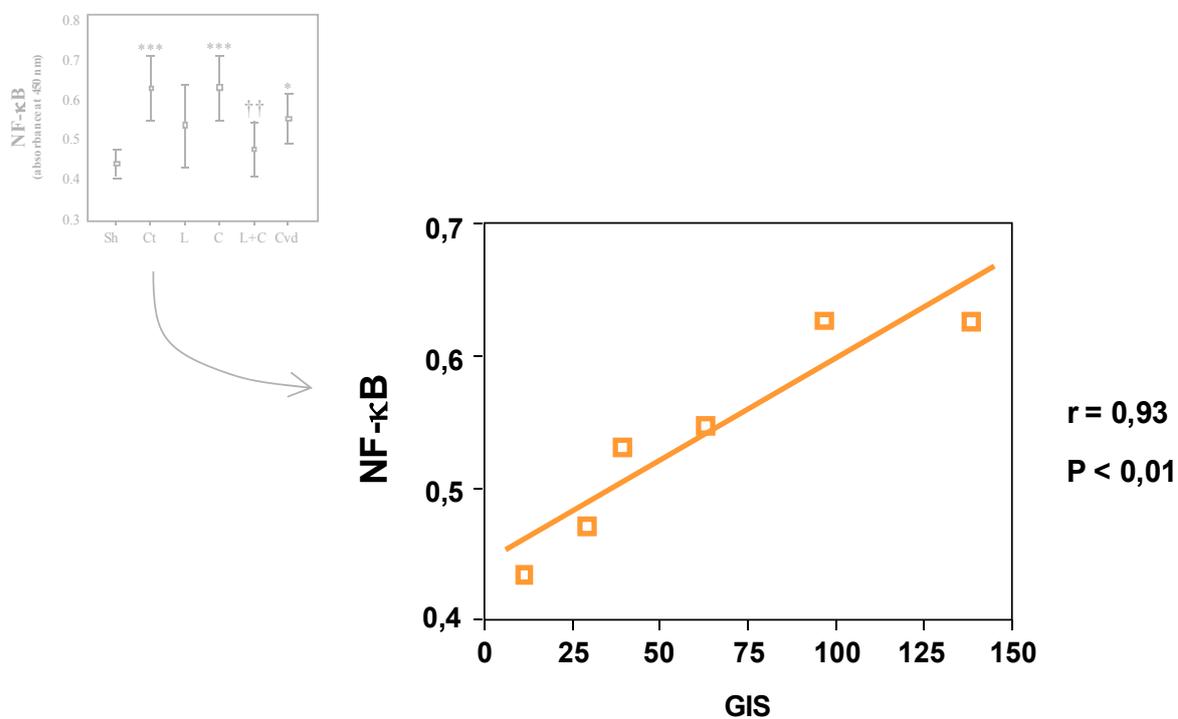


Figura 38. Relación entre la actividad de NF-κB y el daño glomerular en el 5/6 de nefrectomía. Efecto del losartán, carvedilol y cerivastatina sobre la activación de NF-κB en ratas con 5/6 de nefrectomía tras 5 semanas de tratamiento (arriba). Los valores medios de la actividad de NF-κB de cada grupo experimental y los correspondientes valores medios de GIS mostraron una fuerte correlación (abajo).

DISCUSIÓN

1. La ablación renal. 7 y 42 días.

A los 7 días del experimento, se observó una clara hipertensión acompañada de albuminuria en las ratas nefrectomizadas a pesar de no encontrarse diferencias a nivel morfológico entre sus riñones y los pertenecientes a las del grupo Sham. Este hallazgo podría deberse a la puesta en marcha de mecanismos moleculares específicos en respuesta a la pérdida de masa renal, que comenzarían a ejercer efectos en el endotelio y en la barrera de filtrado glomerular. Esta explicación se confirma al observar los niveles de expresión génica de proteínas de MEC como los colágenos tipo I, III, IV, V y VI, fibronectina 1 y laminina B1, claramente incrementados. Debido a que el TGF- β es capaz de inducir la síntesis de estas proteínas en diferentes modelos animales de enfermedad renal (Border, W.A. y Noble, N.A., 1994; Bitzer, M. y col., 1998; Miyajima, A. y col., 2000; Ma, L.J. y col., 2000) incluido el 5/6Nx (Lee, L.K. y col., 1995; Abbate, M. y col., 2002a) sería lógico pensar que esta citocina pudiera estar implicada en este fenómeno; sin embargo, nosotros no encontramos aumento de expresión temprana de TGF- β 1, algo que se corresponde con otros trabajos, donde los investigadores detectaron un débil incremento de expresión de este factor de crecimiento a los 7 días de la nefrectomía (Abbate, M. y col., 2002a) o no encontraron modificación de la expresión en absoluto (Lee L.K. y col., 1995). No obstante, sí que observamos caída de la expresión del RNAm de BMP7, que antagoniza la vía de señalización del TGF- β , y de KCP, que favorece la unión de BMP7 a su receptor. Los resultados de BMP7 obtenidos se corresponden con los observados en un estudio donde, entre otros análisis, los autores determinaron la expresión génica de esta BMP en el modelo de 5/6Nx a dos, diez y doce semanas de evolución del daño renal (Dube, P. H. y col., 2004). Estos autores observaron caída de la expresión a las dos semanas, restablecimiento a las diez y caída nuevamente a las doce. En nuestro caso encontramos disminución de la expresión a la semana y restablecimiento a las seis semanas. Estos resultados podrían explicar parcialmente, pero de forma plausible, el aumento de expresión génica de proteínas de MEC: la vía de señalización de BMP7 podría haberse visto afectada, y por tanto la expresión de los genes que promueven la transición mesénquima-epitelio o que obstaculizan el proceso inverso, como ocurre con Smad6, que es capaz de antagonizar la vía de señalización del TGF- β (figura 39).

Los niveles reducidos de BMP7 y KCP podrían provocar disminución de la tasa de transcripción de Smad6 y a su vez del antagonismo de la vía del TGF- β . Así, sin necesidad de que tenga lugar aumento de expresión del TGF- β , su vía de señalización podría verse

activada. Por otra parte, llamó la atención que a los 42 días no se apreciaran diferencias en los niveles de expresión génica de BMP7 ni de KCP, y sí un aumento claro de TGF- β , acompañado de un incremento de expresión de la mayoría de las proteínas de matriz (colágenos tipo I, III, IV, V y VI, y fibronectina 1) ligeramente superior al encontrado a los 7 días. Estas observaciones sugieren que con la ayuda de KCP, la vía de BMP7 podría haberse restablecido en un intento de regenerar tejido sano y ayudar en la recuperación del riñón; sin embargo, el TGF- β , que no presentó cambios de expresión a los 7 días, habría tomado las riendas del proceso, influyendo en la hipertrofia, hiperplasia y fibrosis encontradas en el tejido remanente al final del estudio. Que los niveles de expresión génica de las diferentes proteínas de MEC a los 42 días fueran sólo ligeramente superiores a los observados a 7 días, nos hace pensar que BMP7 y KCP podrían jugar un papel importante en la génesis de la enfermedad renal en el modelo de 5/6Nx.

Resultó curioso que la laminina B1 no presentara el mismo comportamiento que el resto de proteínas de matriz a los 42 días de la ablación renal, pues su expresión génica se vio disminuida a niveles similares a los obtenidos en el grupo Sham; este resultado podría estar relacionado con el restablecimiento de la vía de señalización de BMP7 sugerida anteriormente, que podría ejercer un control mayor sobre la expresión de laminina B1 que el propio TGF- β .

Por otra parte, se apreció un aumento de expresión de MCP-1 desde los 7 días que llegó a ser de mayor magnitud a los 42 días, alcanzando significación estadística. Debido a que se ha demostrado que el TGF- β puede estimular la expresión de MCP-1 en células mesangiales sin que medie activación de la vía del NF- κ B (Cheng, J. y col., 2005), así como que BMP7 puede inhibirla (Lee, M.J. y col., 2003), pensamos que la caída de la vía de BMP7 podría ser responsable del incremento de MCP-1 observado a los 7 días, independientemente de que se hubieran puesto en marcha otros mecanismos, como la activación de NF- κ B, no analizada por nuestro grupo en esta etapa del estudio.

Los resultados hasta aquí discutidos nos llevan a pensar en posibles hipótesis de trabajo futuras. Sería interesante investigar si la caída de expresión de BMP7 y KCP está involucrada en la activación de la vía del TGF- β y por tanto en la sobreexpresión de proteínas de MEC, tal y como hemos sugerido con anterioridad, o si, por el contrario, las acciones beneficiosas de activar la vía del BMP7 discurren por mecanismos no relacionados con la inhibición de los mecanismos de transducción de señales del TGF- β . Cabría preguntarse,

además, si NF- κ B y/o c-Fos podrían jugar algún papel en dicho fenómeno a tiempos tan cortos. Sería de interés llevar a cabo estudios enfocados a esclarecer si estas proteínas, o posibles metabolitos de las mismas, podrían actuar como marcadores precoces y/o futuras dianas terapéuticas en la ERC. En este sentido, en la última década han aparecido múltiples trabajos en los que se ha utilizado BMP7 recombinante humana como tratamiento en diferentes modelos de daño renal con resultados bastante prometedores (Hruska, K.A. y col., 2000; Hruska, K.A. y col., 2005; Zeisberg, M. y col., 2003; Zeisberg, M. y col., 2008; Wang, S. y col., 2006; Sugimoto, H. y col., 2007).

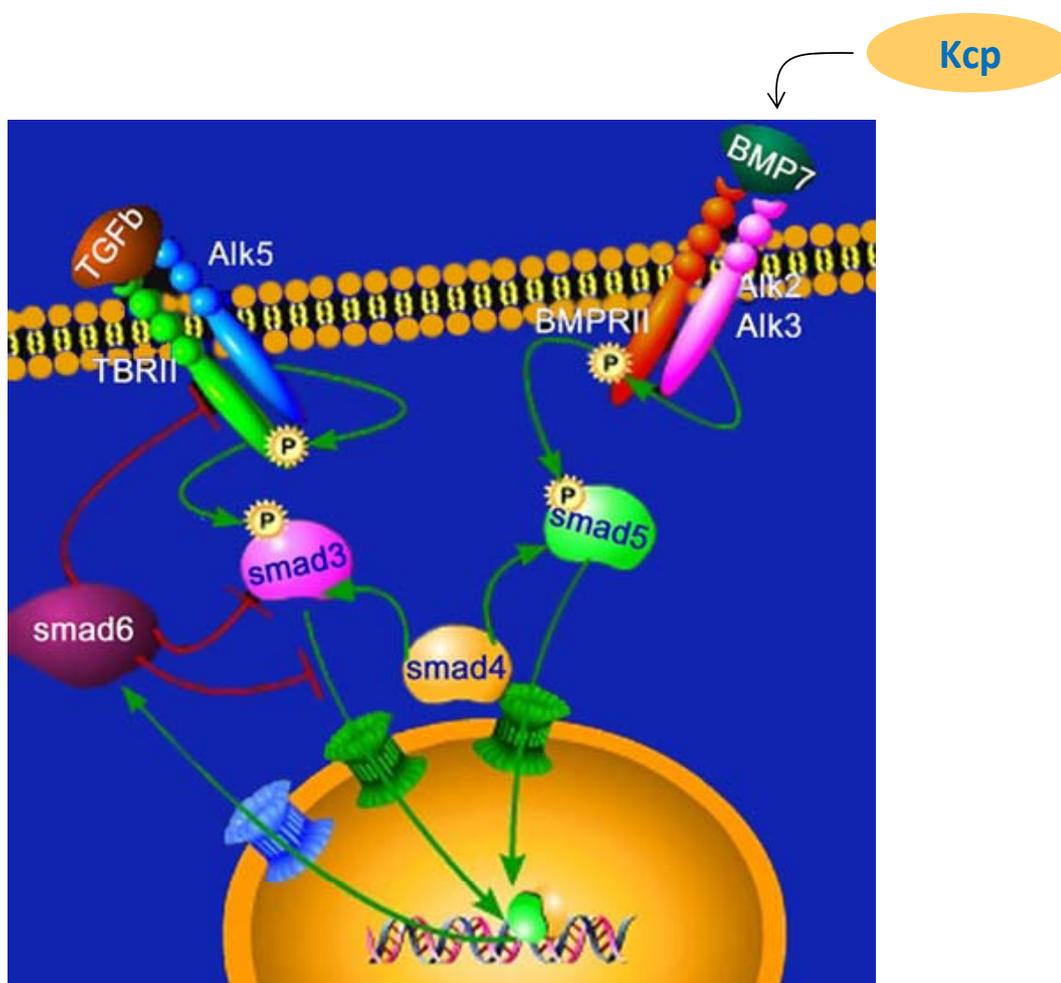


Figura 39. Modelo simplificado del mecanismo de inhibición de las señales de TGF- β por BMP7.

Muchos de los efectos profibrogénicos del TGF- β son transducidos por smad3 tras formar un heterodímero con smad4 y traslocarse al núcleo, actuando en elementos de respuesta específicos en el promotor de diversos genes. BMP7 activa smad5 que induce transcripcionalmente la síntesis de smad6. Esta smad inhibidora interacciona con smad3, posiblemente a través de la formación de heterodímeros smad3/smاد6, previniendo la translocación al núcleo de los complejos smad3/smاد4 y, por tanto, las acciones sobre sus genes diana.

Esta tesis doctoral pone de manifiesto una notable asociación entre la actividad de NF- κ B y la progresión de la enfermedad renal en el modelo experimental de 5/6 de nefrectomía. Nuestros datos muestran que la activación de este factor nuclear correlaciona estrechamente con la expresión de fibronectina 1, MCP-1 y pre-proET-1, así como con las tasas de daño glomerular y tubulointersticial GIS y DTI. Asimismo, en los animales nefrectomizados tratados con el inhibidor selectivo de NF- κ B, PDTC, observamos una clarísima disminución de la expresión de fibronectina 1, MCP-1, pre-proET-1 y TGF- β 1, lo que pone de relieve la implicación directa de NF- κ B en la progresión de la enfermedad renal en este modelo experimental de ERC.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en trabajos previos (Donadelli y col., 2000; Takase, O. y col., 2003; Fujihara y col., 2007). El control de la actividad de NF- κ B mediante PDTC, gliotoxina o partenolida (Rangan G.K. y col., 1999; Muller D.N. y col., 2000; López-Franco y col., 2002) o la transfección génica de I κ B α truncada (Takase, O. y col., 2003) ha puesto de manifiesto la importancia de este factor nuclear en la progresión de la enfermedad renal y su posible utilización como diana terapéutica en el futuro. En estos trabajos, NF- κ B se determinó por su capacidad de unión a una secuencia de DNA consenso mediante ensayos de retardo en gel, o mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, la participación de las subunidades p50 y p65 sólo fue estimada de forma cualitativa. Por el contrario, en nuestro trabajo la actividad de NF- κ B se determinó cuantificando la subunidad p65, que contiene un dominio de activación de la transcripción carente en la subunidad p50 (Guijarro, C. y Egido, J., 2001), de manera que nuestros datos reflejan el grado de activación de NF- κ B y no sólo su capacidad de unión al DNA.

Por otra parte, el papel central de p65 en la progresión de la enfermedad renal contrasta con el comportamiento ambiguo de la subunidad p50, aunque estudios realizados en los últimos años parecen empezar a esclarecer su papel. En este sentido, recientemente se ha demostrado que la protección que ofrece el preconditionamiento isquémico frente al daño provocado por isquemia-reperfusión, está asociado con la activación del homodímero p50/p50 (Cao, C. y col., 2010). Por otra parte, dos modelos experimentales de nefritis aguda, anti-Thy-1 y nefritis inducida por LPS, presentan una activación bifásica de NF- κ B, con predominio del heterodímero NF- κ B p65/p50 durante la fase de inducción del daño, mientras que en la

fase de resolución predomina el homodímero NF- κ B p50/p50 (Panzer, U. y col., 2009). La posible participación del homodímero p50/p50 en la protección del daño renal nos induce a pensar, por tanto, que la cuantificación de la subunidad p65 permite determinar de una forma más precisa el grado de participación de NF- κ B en la progresión del daño renal, comparado con la estimación de NF- κ B sin determinar de forma cuantitativa las subunidades involucradas.

Los niveles de actividad de c-Fos determinados en las muestras de corteza renal del grupo Ct5/6Nx-42d se vieron incrementados frente al grupo Sham-42d, aunque este efecto no fue homogéneo en todos los animales del grupo. Estos niveles elevados correlacionaron con los niveles de expresión de diferentes mediadores de inflamación y fibrosis renal, por tanto, no podemos descartar que la activación de AP-1, a través del incremento de los niveles nucleares de c-Fos, también pueda estar involucrada en el desarrollo de la ERC.

2. Efectos de los tratamientos farmacológicos a los 42 días de la ablación renal.

La terapia combinada de losartán y cerivastatina demostró ser la más eficaz para disminuir la progresión de la enfermedad renal en nuestro estudio, aunque debemos mencionar que el antagonismo del SRA solamente con losartán atenuó la albuminuria, la creatinina en plasma y los índices de glomeruloesclerosis y daño tubulointersticial, demostrando tener una capacidad renoprotectora importante. Debido a que el carvedilol dio lugar a la normalización de la PAS más rápidamente que el losartán, y que los efectos beneficiosos en el daño glomerular y en la albuminuria de este último superaron al primero, nos inclinamos a pensar que el efecto sobre la presión arterial juega un papel limitado en las acciones protectoras de los ARAII.

En consonancia con esta hipótesis, Lafayette, R. A. y col. (1992) han demostrado que los efectos del bloqueo del SRA con un IECA o un ARAII en el modelo de 5/6Nx, dependen de la reducción de los niveles y de la actividad de la angiotensina II, más que de la normalización de la presión arterial sistémica provocada por estos fármacos. La cerivastatina también redujo, aunque de forma modesta, las cifras de presión arterial existentes al inicio del tratamiento, mientras que en los animales no tratados se observó un incremento adicional de PAS al final del período experimental. La modesta capacidad vasodilatadora de las estatinas,

ha sido reseñada en diversos trabajos (Glorioso, N., 1999; Sposito, A.C., 1999) y podría estar relacionada con su capacidad para modificar la síntesis de diversos mediadores vasoactivos como la ET-1 y el NO (Hernández-Perera, O. y col., 1998; Hernández-Perera, O. y col., 2000).

La capacidad antiproteinúrica de los ARAII ya ha sido demostrada en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (Takao, T. y col., 2009; Tojo, A. y col., 2003), algo que se confirma en nuestro estudio, donde los dos grupos tratados con el ARAII, experimentan una clara reversión de la albuminuria. Sin embargo, resultó llamativo que el carvedilol, que revirtió el daño tubulointersticial y redujo parcialmente el daño glomerular, o la cerivastatina, que disminuyó de forma parcial el daño tubulointersticial, no tuvieron efecto alguno en la albuminuria. Una posible explicación a este fenómeno sería que estos fármacos estén actuando, al menos parcialmente, en algunos de los mecanismos proinflamatorios que se ponen en marcha como consecuencia de la exposición de la célula tubular a un exceso de albúmina, pero que no sean capaces de reparar las alteraciones sufridas por la barrera de filtración glomerular y consecuentemente, no lleguen a bloquear el incremento de albúmina en orina.

Entre los mecanismos susceptibles de ser bloqueados mediante tratamiento farmacológico podría citarse la activación del sistema del complemento. De hecho, existen trabajos que demuestran que el bloqueo de ciertos componentes de este sistema es capaz de atenuar el daño renal, independientemente de que persista la proteinuria (Morita, Y. y col., 1997; Nangaku, M. y col., 2002; Nangaku, M., 2004). Por tanto, nos inclinamos a pensar que la proteinuria, a pesar de ser un excelente marcador del daño renal, no siempre lo es de la eficacia farmacológica en la progresión de la enfermedad, ya que aunque permanezca elevada durante el tratamiento, sus acciones lesivas en el riñón podrían estar atenuadas.

Los animales tratados con el antagonista no selectivo de los receptores de ET-1, Ro 48-5695, presentaron tasas de expresión génica y magnitud de daño renal muy similares a los animales del grupo Ct5/6Nx-42d. La falta de efectividad de este fármaco en el modelo utilizado podría deberse al hecho de ser un antagonista no selectivo de los receptores de la ET-1, ET_A y ET_B, ya que se ha observado que éste último está implicado en la liberación de NO y PGI₂, por lo que su bloqueo podría ir en detrimento de su capacidad como modulador de la vasoconstricción, mediada, sobretudo, por el receptor ET_A (Shimizu, T. y col., 1999). En este sentido, recientemente se ha demostrado en glomerulos aislados de rata, que la

permeabilidad glomerular a la albúmina se reduce de manera significativa mediante el uso de un antagonista selectivo de los receptores ET_A, pero no al utilizar un antagonista selectivo de los receptores ET_B (Saleh, M.A. y col., 2010). Nuestros datos demuestran que el antagonista no selectivo utilizado en este estudio posee la capacidad de reducir parcialmente la proteinuria. Todos los tratamientos utilizados en el estudio fueron capaces de disminuir el incremento de ET-1 experimentado por los animales nefrectomizados, aunque debemos matizar que en el caso del Ro 48-5695 la reducción no fue completa, pues los animales tratados presentaron niveles de expresión dos veces superiores a los del grupo Sham. Este hallazgo podría estar relacionado con el hecho de que todos los tratamientos farmacológicos, a excepción del Ro 48-5695, presentaron niveles de c-Fos similares a los del grupo Sham.

En consonancia con esta hipótesis, en un modelo de daño renal inducido por infusión de aldosterona, se ha demostrado que el uso de un antagonista del receptor ET_A es capaz de atenuar la actividad de AP-1 (Tostes, R. C. y col., 2002). Quizás el uso de un antagonista selectivo de los receptores ET_A habría generado resultados diferentes en nuestro estudio. De hecho, en la última década, la mayoría de los trabajos sugieren que el bloqueo selectivo de ET_A podría ser más beneficioso que el bloqueo no selectivo (Brochu, E. y col., 1999; Cao, Z. y col., 2000; Dhaun, N. y col., 2009; Neuhofer, W. y col., 2009); sin embargo, es un tema controvertido que necesita ser esclarecido con la realización de ensayos clínicos aleatorizados.

Este trabajo demuestra que el tratamiento combinado de los animales nefrectomizados con un ARAII más una estatina es capaz de promover la normalización de la actividad de NF- κ B, así como la expresión de MCP-1, pre-proET-1, TGF- β 1, fibronectina 1, colágeno I, colágeno III, colágeno IV, colágeno V y colágeno VI. Sin embargo, los tratamientos sólo con losartán o con cerivastatina tuvieron una escasa repercusión en la expresión de la mayoría de los genes analizados. Estas diferencias tan evidentes a nivel molecular según el modelo de tratamiento elegido no lo fueron tanto en los análisis morfológicos y fisiológicos.

Debido a que los genes analizados en este trabajo son factores patogénicos claves, pudiendo actuar como predictores del daño glomerular y tubulointersticial, cabría esperar que el tratamiento combinado con ambos fármacos pudiera demostrar una capacidad renoprotectora claramente superior, respecto al tratamiento con un ARAII en ausencia de una estatina, tras períodos más prolongados de evolución de la enfermedad. En este sentido, se ha documentado una remisión de la proteinuria y una reducción del daño renal mediante la administración simultánea de un IECA, un ARAII y una estatina en un modelo severo de

nefritis pasiva de Heymann (Zoja C. y col., 2002b). Estos efectos renoprotectores se acompañaron de una reducción importante de la expresión de TGF- β 1.

El bloqueo farmacológico del SRA en ausencia de la estatina, o el tratamiento con la estatina solamente, tuvieron efectos de menor magnitud tanto en la prevención de la progresión del daño renal como en la inhibición del incremento de expresión de TGF- β 1. Igualmente, la combinación de un inhibidor de la ECA y una estatina ha resultado especialmente beneficiosa en la reducción de la expresión de MCP-1 en ratas con glomerulonefritis (Zoja, C. y col., 2002a). De acuerdo con estos resultados, nosotros encontramos que la expresión de MCP-1 y TGF- β 1 presenta una respuesta similar al tratamiento combinado con un agente bloqueante del SRA y una estatina en un modelo experimental de ERC. Además, hemos ampliado estos hallazgos a la actividad de NF- κ B p65, que como ya se ha comentado, es un factor de gran relevancia de los procesos inflamatorios que tienen lugar durante la progresión de la enfermedad renal, y a la expresión de las proteínas de matriz extracelular como fibronectina 1, colágeno I, colágeno III, colágeno IV, colágeno V y colágeno VI, cuya sobreexpresión da lugar a su acumulación a nivel glomerular e intersticial, siendo responsable del desarrollo de fibrosis renal. La utilidad del tratamiento combinado de un ARAII y una estatina debería confirmarse con la realización de ensayos clínicos suficientes que demuestren su valía. En este sentido, Ruggenti, P. y col. han llevado a cabo un estudio en pacientes con IRC que presentaban proteinuria residual. Los individuos estaban siendo tratados simultáneamente con un ARAII y un IECA; al añadir una estatina a la terapia no se encontró disminución de los niveles de proteínas en la orina. Aunque estos resultados podrían hacernos pensar que la estatina no está aportando beneficio alguno al tratamiento con el ARAII más el IECA, sería interesante hacer un seguimiento a más largo plazo con la intención de ver cuántos de estos pacientes llegan a insuficiencia renal terminal, ya que cabría la posibilidad de que la estatina estuviera realizando acciones beneficiosas en el riñón no detectables con la medición exclusiva de la proteinuria.

Fujihara, C.K. y col. (2005) han demostrado que dosis muy elevadas de losartán aportan una mayor renoprotección en ratas sometidas al modelo de 5/6 de nefrectomía, sugiriendo que las dosis utilizadas habitualmente, tanto en estudios experimentales como en la práctica clínica, no son suficientes para bloquear completamente los receptores AT-1 de la angiotensina II. Este descubrimiento induce a pensar que el losartán a las dosis utilizadas en la clínica, combinado con algún agente farmacológico capaz de actuar de manera complementaria en el SRA, podría ofrecer una mayor eficacia en el tratamiento de la ERC.

Los mecanismos mediante los que las estatinas pueden magnificar los efectos renoprotectores de los ARAII podrían estar relacionados con sus conocidas propiedades pleiotrópicas. El tratamiento con estatinas puede inhibir la actividad de la ECA (Luo, J.D. y col., 1999), pudiendo contribuir a la obtención de un bloqueo completo del SRA (Zoja, C. y col., 2002b). Además, la cerivastatina es capaz de reducir el aumento de angiotensina II experimentado por ratas dTGR (Dechend, R. y col., 2002). Por otra parte, la simvastatina puede prevenir los efectos adversos asociados con la infusión crónica de angiotensina II, como el desarrollo de hipertensión y la inducción de especies reactivas de oxígeno (Delbosc, S. y col., 2002). Asimismo, las estatinas atenúan la expresión de los receptores AT1 a través de la inhibición de las modificaciones postraduccionales de la GTPasa Rho A, disminuyendo la función biológica de la angiotensina II (Ichiki, T. y col., 2001). En correspondencia con estos hallazgos, la vía de la Rho-quinasa ha sido relacionada con el daño renal causado por la angiotensina II (Rupérez, M. y col., 2005); además, la inhibición de dicha vía contribuye a la disminución del daño renal, debido en parte, a la atenuación de la actividad de NF- κ B p65 (Meyer-Schwesinger, S. y col., 2009). Por otra parte, el tratamiento de células mesangiales con estatinas provoca reducción significativa de la actividad de NF- κ B (Guijarro, C. y col., 1996). En nuestro estudio, aunque la cerivastatina *per se* no demostró tener capacidad para prevenir la activación de NF- κ B en las ratas nefrectomizadas, en el contexto de una enfermedad renal atenuada como la observada en animales bajo tratamiento con losartán, la cerivastatina demostró tener capacidad para interferir en la actividad de NF- κ B y contribuir a la normalización de la actividad de este factor nuclear.

En nuestro trabajo, la actividad de NF- κ B p65 sólo revierte completamente con la combinación del ARAII y el inhibidor de la HMG-CoA reductasa. Sin embargo, la actividad de AP-1 también se normaliza con el ARAII o el inhibidor de la HMG-CoA reductasa usados individualmente. La mayor eficacia del tratamiento combinado de ARAII e inhibidor de la HMG-CoA reductasa en la reversión de los cambios de expresión génica, frente a las acciones más limitadas de los fármacos por separado, parecen sugerir un papel central de NF- κ B, más que de AP-1, en este modelo de fallo renal progresivo. Una segunda explicación a estos hallazgos podría estar relacionada con la necesidad de inhibir simultáneamente ambos factores nucleares y, por tanto, las vías de señalización en las que intervienen para alcanzar el objetivo terapéutico deseado. En esta dirección parecen apuntar los hallazgos de un estudio (Mezzano, S.A. y col., 2001) donde sus autores han encontrado que la coactivación de NF- κ B y AP-1, más que la simple activación de NF- κ B, está relacionada con la presencia de lesiones

renales en pacientes con síndrome nefrótico. Por otro lado, la reducción selectiva y eficaz de NF- κ B en diversos modelos experimentales no garantiza la reversión completa de la enfermedad renal progresiva (Rangan, G.K. y col., 1999; Mudge, S.J. y col., 2001), lo que sugiere la participación de forma independiente de otros mediadores moleculares en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. En los análisis de regresión lineal múltiple realizados, NF- κ B p65 y c-Fos resultaron variables predictoras independientes de los niveles de expresión de colágeno IV, fibronectina 1, pre-proET-1 y MCP-1. Sin embargo, no se encontró asociación entre las actividades de c-Fos y NF- κ B, sugiriendo que ambos factores de transcripción podrían contribuir independientemente al desarrollo de la fibrosis renal en el modelo de 5/6Nx. Nuestros datos parecen conferir un papel relevante al TGF- β 1 en el desarrollo de fibrosis en el modelo de 5/6Nx. Como se ha comentado previamente, las vías de activación de TGF- β 1 pueden actuar de forma coordinada con AP-1 en la regulación transcripcional de genes como colágeno I, fibronectina y pre-proET-1 (Tharaux, P.L. y col., 2000; de Borst, M.H. y col., 2007; Hocevar, B.A. y col., 1999; Rodríguez-Pascual, F. y col., 2003). Podríamos especular con la idea de que el TGF- β 1, a través de la activación de las proteínas nucleares Smad, pueda contribuir a la progresión del daño de forma complementaria a la activación de NF- κ B. En este sentido, el TGF- β se ha mostrado capaz de estimular la expresión de MCP-1 en células mesangiales sin que medie activación de NF- κ B (Cheng, J. y col., 2005).

En resumen, esta tesis doctoral pone de manifiesto que la terapia combinada de un ARAII y una estatina podría ser de gran utilidad para tratar la ERC. La capacidad de este tratamiento para reducir la actividad de factores nucleares como NF- κ B y AP-1, así como la expresión de genes profibróticos involucrados en la enfermedad renal como TGF- β , colágeno I, III, IV, V y VI, fibronectina 1, laminina B1, pre-proET-1 y MCP-1, avala esta idea. La importancia de reducir NF- κ B, en particular la subunidad p65, parece más que justificada debido a su estrecha asociación con los marcadores de daño glomerular y túbulo-intersticial. Por otra parte, la correlación entre los niveles nucleares de c-Fos y la expresión de diferentes genes implicados en la inflamación y fibrosis renal, sugiere que la activación de AP-1 podría contribuir al desarrollo de la ERC. Por último, nuestro trabajo propone que el eje TGF- β /BMP7 puede estar jugando un papel importante en la génesis de la ERC. La pérdida de actividad de la vía del BMP7 podría contribuir directa o indirectamente al incremento de la

síntesis de proteínas de matriz en las etapas iniciales de la enfermedad, incluso antes de que se aprecien cambios morfológicos reseñables.

Pensamos que los resultados de esta tesis pueden contribuir al desarrollo de nuevas líneas de investigación enfocadas a profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en la génesis y progresión de la enfermedad renal.

CONCLUSIONES

1. No se encuentran anomalías morfológicas en los riñones a los 7 días de la ablación renal; sin embargo, ya se observa hipertensión, albuminuria y puesta en marcha de mecanismos moleculares relacionados con el aumento de expresión de proteínas de MEC y del factor quimiotáctico MCP-1.
2. BMP7 y KCP disminuyen su expresión a la semana de la nefrectomía. El colágeno I, colágenos III-VI, fibronectina 1, laminina B1 y MCP-1 se sobreexpresan. La reducción de la expresión de BMP7 y KCP podría estar relacionada con una activación indirecta de la vía de señalización del TGF- β y, por tanto, con el aumento de expresión de proteínas de MEC citadas.
3. Existen claros signos de daño renal a nivel morfológico a los 42 días de realizado el 5/6 de nefrectomía. La albuminuria continúa elevada y la PAS es superior que a los 7 días.
4. Se observa aumento de expresión de ET-1, MCP-1, TGF- β y de proteínas de MEC a los 42 días de la nefrectomía. Contrariamente, BMP7, KCP y laminina B1 no experimentaron cambios de expresión, lo cual hace pensar que la laminina B1 podría estar regulada por la vía de señalización de BMP7 más que por la del TGF- β .
5. La actividad de NF- κ B está incrementada en la enfermedad renal en el modelo experimental de 5/6Nx a los 42 días, observándose además, una estrecha correlación entre los niveles de p65 y el daño glomerular y tubulointersticial, así como con la expresión de fibronectina 1, MCP-1 y pre-proET-1. Esta última observación se confirmó en el grupo de animales tratado con el inhibidor selectivo de NF- κ B, PDTC, que mostró una clarísima reducción de la expresión de fibronectina 1, MCP-1, pre-proET-1 y TGF- β 1.
6. Los niveles nucleares de c-Fos están asociados con la expresión de fibronectina-1, MCP-1, pre-proET-1, colágeno IV y los parámetros de daño glomerular y túbulointersticial en el modelo de 5/6 de nefrectomía a los 42 días, lo cual sugiere una posible participación de AP-1 en la progresión de la enfermedad renal.

7. Los niveles de c-Fos y p65 se asocian con la expresión de fibronectina-1, MCP-1, pre-proET-1, colágeno IV y con el daño tisular de forma independiente a los 42 días, sugiriendo que las acciones de AP-1 y NF- κ B pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad renal en el modelo de 5/6Nx por distintos mecanismos.
8. El bloqueo del sistema renina-angiotensina con un antagonista del receptor AT1 de la angiotensina II unido al uso de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y, en menor medida, el tratamiento con sólo el antagonista del receptor AT1, reduce de manera eficaz la albuminuria, la creatinina plasmática y los índices de glomerulosclerosis y de daño tubulointersticial en los animales con ablación renal. Además, la normalización de la presión arterial sistémica parece tener un papel limitado o parcial en las acciones de los antagonistas del receptor AT1.
9. El carvedilol fue el fármaco que más rápido normalizó la PAS. Fue capaz de revertir el daño tubulointersticial, en menor medida el glomerular, y apenas ejerció efecto en la albuminuria.
10. El antagonista no selectivo de los receptores de la ET-1 fue totalmente ineficaz en este modelo de ERC, lo que sugiere que el bloqueo simultáneo de ambos receptores no es el más indicado para el tratamiento de la enfermedad renal.
11. La combinación de una estatina con un antagonista del receptor AT1 de la angiotensina II es capaz de normalizar en el modelo de 5/6Nx la actividad de AP-1 y de NF- κ B, así como la expresión de colágeno I, colágenos III-VI, fibronectina-1, pre-proET-1, MCP-1 y TGF- β , sugiriendo su utilidad potencial en el tratamiento de la enfermedad renal crónica. El beneficio farmacológico de esta combinación podría deberse, en gran medida, a su capacidad para controlar la actividad de NF- κ B p65.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate, M. y col. "Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis." Am J Pathol. 2002b; **161**: 2179-93.
- Abbate, M., C. Zoja, y G. Remuzzi. "How does proteinuria cause progressive renal damage?" J Am Soc Nephrol. 2006; **17**: 2974-84.
- Abbate, M. y col. "Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts." Kidney Int. 2002a; **61**: 2066-77.
- Ando, T. y col. "Localization of transforming growth factor-beta and latent transforming growth factor-beta binding protein in rat kidney." Kidney Int. 1995; **47**: 733-39.
- Arai, H. y col. "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." Nature. 1990; **348**: 730-32.
- Arumanayagam, M. y col. "Antioxidant properties of carvedilol and metoprolol in heart failure: a double-blind randomized controlled trial." J Cardiovasc.Pharmacol. 2001; **37**: 48-54.
- Azizi, M. y col. "Renin inhibition with aliskiren: where are we now, and where are we going?" J Hypertens. 2006; **24**: 243-56.
- Badr, K. F. y col. "Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways." J.Clin.Invest. 1989; **83**: 336-42.
- Bakris, G. L. y col. "Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial." JAMA. 2004; **292**: 2227-36.
- Banba, N. y col. "Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy." Kidney Int. 2000; **58**: 684-90.
- Barnes, P.J. y Karin, M. "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med. 1997; **336**: 1066-71.

- Behmoaras, J. y col. "Jund is a determinant of macrophage activation and is associated with glomerulonephritis susceptibility." Nat.Genet. 2008; **40**: 553-59.
- Benigni, A. y col. "Blocking both type A and B endothelin receptors in the kidney attenuates renal injury and prolongs survival in rats with remnant kidney." Am J Kidney Dis. 1996; **27**: 416-23.
- Benndorf, R.A. y col. "Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice." Kidney Int. 2009; **75**: 1039-49.
- Best, P.J. y col. "Coronary endothelial function is preserved with chronic endothelin receptor antagonism in experimental hypercholesterolemia in vitro." Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 1999; **19**: 2769-75.
- Bischoff, H. y col. "Cerivastatin: pharmacology of a novel synthetic and highly active HMG-CoA reductase inhibitor." Atherosclerosis. 1997; **135**: 119-30.
- Bitzer, M., R. B. Sterzel, y E. P. Bottinger. "Transforming growth factor-beta in renal disease." Kidney Blood Press Res. 1998; **21**: 1-12.
- Blobe, G.C. y col. "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med. 2000; **342**: 1350-8.
- Bollineni, J.S. y A.S. Reddi. "Transforming growth factor-beta 1 enhances glomerular collagen synthesis in diabetic rats." Diabetes. 1993; **42**: 1673-77.
- Border, W.A. y N. A. Noble. "Transforming growth factor beta in tissue fibrosis." N Engl J Med. 1994; **331**: 1286-92.
- Border, W.A. y N. A. Noble. "Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis." Hypertension. 1998; **31**: 181-88.
- Border, W.A. y col. "Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease." Nature. 1992; **360**: 361-64.
- Brenner, B.M. y col. "Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy." N Engl J Med. 2001; **345**: 861-69.

- Brochu, E. y col. "Endothelin ET(A) receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uraemic rats." Nephrol Dial. Transplant. 1999; **14**: 1881-88.
- Burnier, M. "Angiotensin II type 1 receptor blockers." Circulation. 2001; **103**: 904-12.
- Campbell, R. y col. "Effects of combined ACE inhibitor and angiotensin II antagonist treatment in human chronic nephropathies." Kidney Int. 2003; **63**: 1094-103.
- Campese, V.M., M. K. Nadim, y M. Epstein. "Are 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors renoprotective?" J Am.Soc.Nephrol. 2005; **16**: S11-S17.
- Cao, C. y col. "Renal protection by ischemic preconditioning is associated with p50/p50 homodimers." Am.J.Nephrol. 2010; **31**: 1-8.
- Cao, S. y col. "NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages." J Biol Chem. 2006; **281**: 26041-50.
- Cao, Z. y col. "Angiotensin type 2 receptor antagonism confers renal protection in a rat model of progressive renal injury." J Am.Soc.Nephrol. 2002; **13**: 1773-87.
- Cao, Z. y col. "Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury." Hypertension. 2000; **36**: 561-68.
- Chade, A.R. y col. "Simvastatin promotes angiogenesis and prevents microvascular remodeling in chronic renal ischemia." FASEB J. 2006; **20**: 1706-08.
- Chareandee, C. y col. "Elevated endothelin-1 in tubular epithelium is associated with renal allograft rejection." Am.J.Kidney Dis. 2000; **36**: 541-49.
- Chen, L.F. y W.C. Greene. "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2004; **5**: 392-401.
- Chen, S. y col. "Reversibility of established diabetic glomerulopathy by anti-TGF-beta antibodies in db/db mice." Biochem.Biophys.Res.Commun. 2003; **300**: 16-22.

- Cheng, J. y col. "TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process." Am J Physiol Cell Physiol. 2005; **289**: C959-C970.
- Chobanian, A.V. y col. "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report." JAMA. 2003; **289**: 2560-72.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal.Biochem. 1987; **162**: 156-59.
- Chow, F.Y. y col. "Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice." Diabetologia. 2007; **50**: 471-80.
- Chow, F.Y. y col. "Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice." Kidney Int. 2006; **69**: 73-80.
- Clozel, M. y col. "Effects of nonpeptide endothelin receptor antagonists in rats with reduced renal mass." J Cardiovasc.Pharmacol. 1999; **33**: 611-18.
- Croom, K.F. y col. "Irbesartan: a review of its use in hypertension and in the management of diabetic nephropathy." Drugs. 2004; **64**: 999-1028.
- Dahlöf, B. y col. "Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol." Lancet. 2002; **359**: 995-1003.
- Danser, A. H. "Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions." Int.J Biochem.Cell Biol 2003; **35**: 759-68.
- de Borst, M. H. y col. "Glomerular and tubular induction of the transcription factor c-Jun in human renal disease." J Pathol. 2007; **213**: 219-28.
- de Nucci, G. y col. "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1988; **85**: 9797-800.

- De Petris, L. y col. "Bone morphogenetic protein-7 delays podocyte injury due to high glucose." Nephrol Dial. Transplant. 2007; **22**: 3442-50.
- Dechend, R. y col. "Statins and angiotensin II-induced vascular injury." Nephrol. Dial. Transplant. 2002; **17**: 349-53.
- Delbosc, S. y col. "Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress." Hypertension. 2002; **40**: 142-47.
- Deng, A. y col. "Regulation of oxygen utilization by angiotensin II in chronic kidney disease." Kidney Int. 2009; **75**: 197-204.
- Dhaun, N. y col. "Blood pressure-independent reduction in proteinuria and arterial stiffness after acute endothelin-a receptor antagonism in chronic kidney disease." Hypertension. 2009; **54**: 113-19.
- Dinh, D.T. y col. "Angiotensin receptors: distribution, signalling and function." Clin Sci.(Lond). 2001; **100**: 481-92.
- Dlugosz, J.A. y col. "Endothelin-1-induced mesangial cell contraction involves activation of protein kinase C-alpha, -delta, and -epsilon." Am.J.Physiol. 1998; **275**: F423-F432.
- Donadelli, R. y col. "Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation." Am J Kidney Dis. 2000; **36**: 1226-41.
- Dorfman, D.M. y col. "Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells." J Biol Chem. 1992; **267**: 1279-85.
- Doulton, T.W., F. J. He, y G. A. Macgregor. "Systematic review of combined angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade in hypertension." Hypertension. 2005; **45**: 880-86.
- Dube, P.H. y col. "Osteogenic Protein-1: gene expression and treatment in rat remnant kidney model." Toxicol. Pathol. 2004; **32**: 384-92.

- Dudley, A.T., K.M. Lyons, y E.J. Robertson. "A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye." Genes Dev. 1995; **9**: 2795-807.
- Easthope, S.E. y B. Jarvis. "Candesartan cilexetil: an update of its use in essential hypertension." Drugs. 2002; **62**: 1253-87.
- Egan, B., G. Gleim, y J. Panish. "Use of losartan in diabetic patients in the primary care setting: review of the results in LIFE and RENAAL." Curr Med Res.Opin. 2004; **20**: 1909-17.
- Emori, T. y col. "Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell." Biochem.Pharmacol. 1992; **44**: 2409-11.
- Epstein, M. y V.M. Campese. "Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on renal function." Am J Kidney Dis. 2005; **45**: 2-14.
- Erman, A. y col. "Renin-angiotensin system blockade prevents the increase in plasma transforming growth factor beta 1, and reduces proteinuria and kidney hypertrophy in the streptozotocin-diabetic rat." J Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst. 2004; **5**: 146-51.
- Fakhouri, F. y col. "Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal cortex and aorta of transgenic mice through interaction with endothelin and TGF-beta." J Am.Soc.Nephrol. 2001; **12**: 2701-10.
- Fassbinder, W., O. Quarder, y A. Waltz. "Treatment with carvedilol is associated with a significant reduction in microalbuminuria: a multicentre randomised study." Int.J Clin Pract. 1999; **53**: 519-22.
- Fujihara, C.K. y col. "Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model." Am.J Physiol Renal Physiol. 2007; **292**: F92-F99.
- Fujihara, C.K. y col. "An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model." Kidney Int. 2005; **67**: 1913-24.

- Gamal el-Din, A. M. y Al-Bekairi, A. M. "Carvedilol, a beta adrenoceptor blocker with antioxidative potential, attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats." Journal of Applied Sciences Research. 2006; **2**: 331-335.
- Gilmore, T.D. "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives." Oncogene. 2006; **25**: 6680-84.
- Gilmore, T.D. y M. Herscovitch. "Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting." Oncogene. 2006; **25**: 6887-99.
- Glorioso, N. y col. "Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia." Hypertension. 1999; **34**: 1281-86.
- Goa, K. L. y A. J. Wagstaff. "Losartan potassium: a review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension." Drugs. 1996; **51**: 820-45.
- Golden, C. L. y col. "Effects of vasoactive and inflammatory mediators on endothelin-1 expression in pulmonary endothelial cells." Am J Respir.Cell Mol.Biol. 1995; **12**: 503-12.
- Goldstein, J.L. y M. S. Brown. "Regulation of the mevalonate pathway." Nature. 1990; **343**: 425-30.
- Gómez-Garre, D. y col. "Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1." Hypertension. 2001; **37**: 1171-78.
- González-Albarrán, O. y col. "Role of systolic blood pressure on the progression of kidney damage in an experimental model of type 2 diabetes mellitus, obesity, and hypertension (Zucker rats)." Am J Hypertens. 2003; **16**: 979-85.
- Grunler, J., J. Ericsson, y G. Dallner. "Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins." Biochim.Biophys.Acta. 1994; **1212**: 259-77.

- Guijarro, C. y J. Egido. "Transcription factor-kappaB (NF-kappaB) and renal disease." Kidney Int. 2001; **59**: 415-24.
- Guijarro, C. y col. "Lovastatin inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation in human mesangial cells." Nephrol Dial. Transplant. 1996; **11**: 990-96.
- Halazonetis, T.D. y col. "c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities." Cell. 1988; **55**: 917-24.
- Hamaguchi, A. y col. "Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-induced transforming growth factor-beta1 expression in vascular smooth muscle cells." Hypertension. 1999; **34**: 126-31.
- Hayashi, K. y col. "Role of actions of calcium antagonists on efferent arterioles--with special references to glomerular hypertension." Am J Nephrol. 2003; **23**: 229-44.
- Hayashi, M. y col. "The effects of calcium channel blockers on nuclear factor kappa B activation in the mesangium cells." Hypertens Res. 2000; **23**: 521-25.
- Hayashi, T. y col. "Efficacy of carvedilol for ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats." Transplant. Proc. 2008; **40**: 2139-41.
- Hayden, M.S. y S. Ghosh. "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev. 18.18 (2004): 2195-224.
- Heckmann, A. y col. "IKK2 inhibitor alleviates kidney and wasting diseases in a murine model of human AIDS." Am J Pathol. 2004; **164**: 1253-62.
- Hernández-Perera, O. y col. "Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." J Clin Invest. 1998; **101**: 2711-19.
- Hernández-Perera, O. y col. "Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells." Circ. Res. 2000; **87**: 616-22.
- Hirata, Y. "Endothelin peptides." Curr Opin Nephrol Hypertens. 1996; **5**: 12-15.

- Hirata, Y. y col. "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." J Clin Invest. 1993; **91**: 1367-73.
- Hocevar, B. A., T. L. Brown, y P. H. Howe. "TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway." EMBO J. 1999; **18**: 1345-56.
- Hoffmann, A., G. Natoli, y G. Ghosh. "Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module." Oncogene. 2006; **25**: 6706-16.
- Honkanen, E. y col. "Urinary transforming growth factor-beta 1 in membranous glomerulonephritis." Nephrol Dial. Transplant. 1997; **12**: 2562-68.
- Horiuchi, M., M. Akishita, y V. J. Dzau. "Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system." Hypertension. 1999; **33**: 613-21.
- Hruska, K. A. et al. "Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction." Am J Physiol Renal Physiol. 2000; **279**: F130-F143.
- Hruska, K. A., S. Mathew, y G. Saab. "Bone morphogenetic proteins in vascular calcification." Circ. Res. 2005; **97**: 105-14.
- Ichiki, T. y col. "Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells." Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; **21**: 1896-901.
- Imai, T. y col. "Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells." Hypertension. 1992; **19**: 753-57.
- Isaka, Y. y col. "Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney." J Clin Invest. 1993; **92**: 2597-601.
- Iseki, A. y col. "Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits TNF-alpha-dependent activation of NF-kappaB by increasing intracellular copper level in human aortic smooth muscle cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; **276**: 88-92.

- Iwano, M. y col. "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis." J Clin Invest. 2002; **110**: 341-50.
- Izuhara, Y. y col. "Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering." J Am Soc Nephrol. 2005; **16**: 3631-41.
- Jafar, T.H. y col. "Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data." Ann.Intern Med. 2001; **135**: 73-87.
- Kaneto, H., J. Morrissey, y S. Klahr. "Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation." Kidney Int. 1993; **44**: 313-21.
- Karaki, H. y col. "Induction of endothelium-dependent relaxation in the rat aorta by IRL 1620, a novel and selective agonist at the endothelin ETB receptor." Br.J Pharmacol. 1993; **109**: 486-90.
- Karin, M. "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." J Biol.Chem. 1995; **270**: 16483-86.
- Karsenty, G. y col. "BMP 7 is required for nephrogenesis, eye development, and skeletal patterning." Ann.N Y.Acad.Sci. 1996; **785**: 98-107.
- Ketteler, M., N. A. Noble, y W. A. Border. "Transforming growth factor-beta and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis?" Annu.Rev.Physiol. 1995; **57**: 279-95.
- Kim, H. L. et al. "The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE." Am J Kidney Dis. 2002; **40**: 1146-52.
- Kim, S. Y. y col. "Human mesangial cell production of monocyte chemoattractant protein-1: modulation by lovastatin." Kidney Int. 1995; **48**: 363-71.
- Klahr, S. y J. Morrissey. "Angiotensin II and gene expression in the kidney." Am.J Kidney Dis. 1998; **31**: 171-76.

- Klahr, S. y col. "New approaches to delay the progression of chronic renal failure." Kidney Int.Suppl. 2002; **80**: 23-26.
- Knopp, R. H. "Drug treatment of lipid disorders." N Engl J Med. 1999; **341**: 498-511.
- Koepke, M. L. y col. "Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome." Nephrol Dial.Transplant. 2007; **22**: 1062-69.
- Komatsu, K. y col. "Glomerular dynamics and morphology of aged spontaneously hypertensive rats. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition." Hypertension. 1995; **25**: 207-13.
- Kon, A. y col. "Cooperation between SMAD and NF-kappaB in growth factor regulated type VII collagen gene expression." Oncogene. 1999; **18**: 1837-44.
- Kosaka, T. y col. "The novel NF-kappaB activation inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin suppresses anti-Thy1.1-induced glomerulonephritis in rats." Nephron Exp Nephrol. 2008; **110**: e17-e24.
- Lafayette, R. A. y col. "Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass." J Clin Invest. 1992; **90**: 766-71.
- Laiho, M., O. Saksela, y J. Keski-Oja. "Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase." J Biol Chem. 1987; **262**: 17467-74.
- Lariviere, R. y M. Lebel. "Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension." Can.J Physiol Pharmacol. 2003; **81**: 607-21.
- Lariviere, R. y col. "Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass." Am.J Hypertens. 1998; **11**: 989-97.

- Lawrence, T. y col. "Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation." Nat.Med. 2001; **7**: 1291-97.
- Lee, B.H. y col. "NF-kappaB activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes." Biochem.Biophys.Res.Commun. 2002; **297**: 1218-24.
- Lee, L.K. y col. "Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney." J Clin Invest. 1995; **96**: 953-64.
- Lee, M.E. y col. "Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence." J Biol Chem. 1990; **265**: 10446-50.
- Lee, M.J. y col. "Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-1 beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells: role for JNK/AP-1 pathway." J Immunol. 2003; **170**: 2557-63.
- Lewis, E.J. y col. "The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group." N Engl J Med. 1993; **329**: 1456-62.
- Li, C., W. Browder, y R. L. Kao. "Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart." Am J Physiol. 1999; **276**: H543-H552.
- Li, N. y M. Karin. "Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?" FASEB J. 1999; **13**: 1137-43.
- Li, X.C. y J. L. Zhuo. "Nuclear factor-kappaB as a hormonal intracellular signalling molecule: focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury." Curr Opin Nephrol Hypertens. 2008; **17**: 37-43.
- Li, Z. y col. "Fluvastatin enhances the inhibitory effects of a selective AT1 receptor blocker, valsartan, on atherosclerosis." Hypertension. 2004; **44**: 758-63.
- Lin, J. y col. "Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease." Nat.Med. 2005; **11**: 387-93.

- Lin, J. y col. "The cysteine-rich domain protein KCP is a suppressor of transforming growth factor beta/activin signaling in renal epithelia." Mol.Cell Biol. 26.12 (2006): 4577-85.
- Liu, S.F., X. Ye y A. B. Malik. "Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes." Circulation 100.12 (1999): 1330-37.
- López-Franco, O. y col. "Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis." Am J Pathol. 161.4 (2002): 1497-505.
- Luo, J.D. y col. "Simvastatin inhibits cardiac hypertrophy and angiotensin-converting enzyme activity in rats with aortic stenosis." Clin Exp.Pharmacol.Physiol 26.11 (1999): 903-08.
- Ma, L.J. y col. "Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1." Kidney Int. 58.6 (2000): 2425-36.
- MacKay, K. y col. "Expression of transforming growth factor-beta 1 and beta 2 in rat glomeruli." Kidney Int. 38.6 (1990): 1095-100.
- MacKinnon, M. y col. "Combination therapy with an angiotensin receptor blocker and an ACE inhibitor in proteinuric renal disease: a systematic review of the efficacy and safety data." Am J Kidney Dis. 48.1 (2006): 8-20.
- Malek, A. y S. Izumo. "Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium." Am J Physiol 263.2 Pt 1 (1992): C389-C396.
- Marchi, F. y G. Ciriello. "Efficacy of carvedilol in mild to moderate essential hypertension and effects on microalbuminuria: a multicenter, randomized, open-label, controlled study versus atenolol." Adv Ther. 12.4 (1995): 212-21.
- Marsden, P.A., M. S. Goligorsky, y B. M. Brenner. "Endothelial cell biology in relation to current concepts of vessel wall structure and function." J Am Soc Nephrol 1.7 (1991): 931-48.

- Maschio, G. y col. "Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group." N Engl J Med 334.15 (1996): 939-45.
- Massagué, J. "The transforming growth factor-beta family." Annu.Rev.Cell Biol 6 (1990): 597-641.
- Massagué, J. y Y. G. Chen. "Controlling TGF-beta signaling." Genes Dev. 14.6 (2000): 627-44.
- Mervaala, E. y col. "Lipoic acid supplementation prevents angiotensin II-induced renal injury." Kidney Int. 64.2 (2003): 501-08.
- Meyer, M., R. Schreck, y P. A. Baeuerle. "H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor." EMBO J 12.5 (1993): 2005-15.
- Meyer-Schwesinger, C. y col. "Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling." Am J Physiol Renal Physiol 296.5 (2009): F1088-F1099.
- Mezzano, S. A. y col. "Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease." Kidney Int. 60.4 (2001): 1366-77.
- Milde-Langosch, K. "The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis." Eur J Cancer 41.16 (2005): 2449-61.
- Mitu, G. y R. Hirschberg. "Bone morphogenetic protein-7 (BMP7) in chronic kidney disease." Front Biosci. 13 (2008): 4726-39.
- Mitu, G.M., S. Wang, y R. Hirschberg. "BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury." Am J Physiol Renal Physiol 293.5 (2007): F1641-F1648.
- Miyajima, A. y col. "Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction." Kidney Int. 58.6 (2000): 2301-13.

- Miyajima, A. y col. "Novel nuclear factor kappa B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction." J Urol. 169.4 (2003): 1559-63.
- Mogensen, C.E. y col. "Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study." BMJ 321.7274 (2000): 1440-44.
- Morii, T. y col. "Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy." J Diabetes Complications 17.1 (2003): 11-15.
- Morita, Y. y col. "The role of complement in the pathogenesis of tubulointerstitial lesions in rat mesangial proliferative glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol 8.9 (1997): 1363-72.
- Morrissey, J. y col. "Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function." J Am.Soc.Nephrol 13 Suppl 1 (2002): S14-S21.
- Mudge, S.J. y col. "Activation of nuclear factor-kappa B by podocytes in the autologous phase of passive Heymann nephritis." Kidney Int. 59.3 (2001): 923-31.
- Muller, D.N. y col. "NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats." Hypertension 35.1 Pt 2 (2000): 193-201.
- Nabokov, A. y col. "Influence of specific and non-specific endothelin receptor antagonists on renal morphology in rats with surgical renal ablation." Nephrol Dial.Transplant. 11.3 (1996): 514-20.
- Nakamura, T. y col. "Increased steady-state levels of mRNA coding for extracellular matrix components in kidneys of NZB/W F1 mice." Am.J.Pathol. 139.2 (1991): 437-50.
- Nakao, N. y col. "Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): a randomised controlled trial." Lancet 361.9352 (2003): 117-24.

- Nangaku, M. "Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure." Intern Med 43.1 (2004): 9-17.
- Nangaku, M., J. Pippin, y W. G. Couser. "C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys." J Am Soc Nephrol 13.4 (2002): 928-36.
- National Kidney Foundation. "K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification." Am J Kidney Dis. 39.2 Suppl 1 (2002): S1-266.
- Neale, T. J. y col. "Tumor necrosis factor-alpha is expressed by glomerular visceral epithelial cells in human membranous nephropathy." Am.J.Pathol. 146.6 (1995): 1444-54.
- Neilson, E. G. "Setting a trap for tissue fibrosis." Nat.Med 11.4 (2005): 373-74.
- Neuhof, W. y D. Pittrow. "Endothelin receptor selectivity in chronic kidney disease: rationale and review of recent evidence." Eur.J.Clin.Invest 39 Suppl 2 (2009): 50-67.
- Nishikawa, H. y col. "Combined treatment with statin and angiotensin-receptor blocker after stenting as a useful strategy for prevention of coronary restenosis." J Cardiol. 45.3 (2005): 107-13.
- Nishimura, M., H. Takahashi, y M. Yoshimura. "Upregulation of the brain renin-angiotensin system in rats with chronic renal failure." Acta Physiol (Oxf) 189.4 (2007): 369-77.
- Nishiyama, A., D. M. Seth, y L. G. Navar. "Renal interstitial fluid angiotensin I and angiotensin II concentrations during local angiotensin-converting enzyme inhibition." J Am Soc Nephrol 13.9 (2002): 2207-12.
- Okada, Y. y col. "Role of endothelin ETB receptor in partial ablation-induced chronic renal failure in rats." Eur J Pharmacol. 494.1 (2004): 63-71.
- Oparil, S. y col. "Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial." Lancet 370.9583 (2007): 221-29.

- Opgaard, O.S. y col. "Localization of endothelin immunoreactivity and demonstration of constrictory endothelin-A receptors in human coronary arteries and veins." J Cardiovasc.Pharmacol. 23.4 (1994): 576-83.
- Orrenius, S. y col. "Dithiocarbamates and the redox regulation of cell death." Biochem.Soc Trans. 24.4 (1996): 1032-38.
- Ortiz, A., Bustos, C., Alonso, J., Alcazar, R., Lopez-Armada, M.J., Plaza, J.J., Gonzalez, E. y Egido, J. "Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of experimental and human glomerulonephritis." Adv Nephrol Necker Hosp 1995.
- Ots, M. y col. "Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation." J Am Soc Nephrol 9.2 (1998): 224-30.
- Ozawa, Y. y H. Kobori. "Crucial role of Rho-nuclear factor-kappaB axis in angiotensin II-induced renal injury." Am J Physiol Renal Physiol 293.1 (2007): F100-F109.
- Padol, I. y col. "Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis." Eur J Gastroenterol.Hepatol. 12.3 (2000): 257-65.
- Padol, I., J. Q. Huang, y R. H. Hunt. "Anti-ulcerogenic properties of endothelin receptor antagonists in the rat." Aliment.Pharmacol.Ther. 13.4 (1999): 537-44.
- Panzer, U. y col. "Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases." Am J Physiol Renal Physiol 297.2 (2009): F429-F439.
- Papavassiliou, A.G. y col. "Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-Jun." Science 258.5090 (1992): 1941-44.
- Parving, H.H. y col. "Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy." Lancet 1.8335 (1983): 1175-79.
- Parving, H.H. y col. "Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy." N.Engl.J.Med. 358.23 (2008): 2433-46.

- Peng, F. y col. "RhoA/Rho-kinase contribute to the pathogenesis of diabetic renal disease." Diabetes 57.6 (2008): 1683-92.
- Peterson, J.C. y col. "Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study." Ann.Intern Med 123.10 (1995): 754-62.
- Phillips, R.A. y col. "Demographic analyses of the effects of carvedilol vs metoprolol on glycemic control and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes and hypertension in the Glycemic Effects in Diabetes Mellitus: Carvedilol-Metoprolol Comparison in Hypertensives (GEMINI) study." J Cardiometab.Syndr. 3.4 (2008): 211-17.
- Piecha, G. y col. "Regression of glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats: effects of monotherapy with losartan, spironolactone, and their combination." Am J Physiol Renal Physiol 295.1 (2008): F137-F144.
- Poo, J.L. y col. "Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects." Gastroenterology 116.1 (1999): 161-67.
- Quehenberger, P. y col. "Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells." Diabetes 49.9 (2000): 1561-70.
- Rangan, G. K. y col. "Inhibition of nuclear factor-kappaB activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats." Kidney Int. 56.1 (1999): 118-34.
- Remuzzi, G., P. Ruggenenti, y A. Benigni. "Understanding the nature of renal disease progression." Kidney Int. 51.1 (1997): 2-15.
- Renard, P. y col. "Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB." Nucleic Acids Res. 29.4 (2001): E21.
- Riser, B.L. y col. "Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis." J Am Soc Nephrol 11.1 (2000): 25-38.

- Rivarola, E.W. y col. "Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy." Braz.J Med Biol Res. 32.12 (1999): 1525-28.
- Rodríguez-Pascual, F., M. Redondo-Horcajo, y S. Lamas. "Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression." Circ.Res. 92.12 (2003): 1288-95.
- Rodríguez-Pérez, J.C. y col. "Effects of the novel multiple-action agent carvedilol on severe nephrosclerosis in renal ablated rats." J Pharmacol.Exp.Ther. 283.1 (1997): 336-44.
- Ross, S.D. y col. "Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB." Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol 279.3 (2000): L528-L536.
- Rovin, B.H. y col. "Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells." Kidney Int. 48.4 (1995): 1263-71.
- Ruggenenti, P. y col. "Effects of Add-on Fluvastatin Therapy in Patients with Chronic Proteinuric Nephropathy on Dual Renin-Angiotensin System Blockade: The ESPLANADE Trial." Clin J Am Soc Nephrol (2010).
- Ruggenenti, P., A. Schieppati, y G. Remuzzi. "Progression, remission, regression of chronic renal diseases." Lancet 357.9268 (2001): 1601-08.
- Ruiz-Ortega, M. y col. "Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis." J Immunol. 161.1 (1998): 430-39.
- Ruiz-Ortega, M., M. Rupérez, V. Esteban, J. Rodríguez-Vita, E. Sánchez-López, G. Carvajal y J. Egido. "Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases." Nephrol DialTransplant 2006: 16-20.
- Rupérez, M. y col. "The Rho-kinase pathway regulates angiotensin II-induced renal damage." Kidney Int. 2005.

- Ryseck, R.P. y R. Bravo. "c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins." Oncogene 6.4 (1991): 533-42.
- Sakurai, H. y col. "Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats." Biochim.Biophys.Acta 1316.2 (1996): 132-38.
- Sakurai, T. y col. "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor." Nature 348.6303 (1990): 732-35.
- Sánchez-López, E. y col. "CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB." J Am Soc Nephrol 20.7 (2009): 1513-26.
- Sandhu, S. y col. "Statins for improving renal outcomes: a meta-analysis." J Am Soc Nephrol 17.7 (2006): 2006-16.
- Sasser, J. M. y col. "Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism." J.Am.Soc.Nephrol. 18.1 (2007): 143-54.
- Schiller, B. y J. Moran. "Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model--an inflammatory disease mediated by cytokines." Nephrol Dial.Transplant. 12.3 (1997): 430-37.
- Schneider, A. y col. "Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta." Kidney Int. 56.1 (1999): 135-44.
- Schreck, R. y col. "Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells." J Exp Med 175.5 (1992): 1181-94.
- Schrier, R. W. y col. "Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes." Kidney Int. 61.3 (2002): 1086-97.
- Sharpe, M., B. Jarvis, y K. L. Goa. "Telmisartan: a review of its use in hypertension." Drugs 61.10 (2001): 1501-29.

- Shibata, S., M. Nagase, y T. Fujita. "Fluvastatin ameliorates podocyte injury in proteinuric rats via modulation of excessive Rho signaling." J Am Soc Nephrol 17.3 (2006): 754-64.
- Shimizu, A. y col. "Low-dose losartan therapy reduces proteinuria in normotensive patients with immunoglobulin A nephropathy." Hypertens.Res. 31.9 (2008): 1711-17.
- Shimizu, S. y col. "Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephritis in MRL/lpr mice." Rheumatology.(Oxford) 43.9 (2004): 1121-28.
- Shimizu, T. y col. "Different roles of two types of endothelin receptors in partial ablation-induced chronic renal failure in rats." Eur J Pharmacol. 381.1 (1999): 39-49.
- Shinomiya, K. y col. "A role of oxidative stress-generated eicosanoid in the progression of arteriosclerosis in type 2 diabetes mellitus model rats." Hypertens Res. 25.1 (2002): 91-98.
- Simonson, M.S. y col. "Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells." J.Clin.Invest 83.2 (1989): 708-12.
- Sporn, M.B. y A. B. Roberts. "The transforming growth factor-betas: past, present, and future." Ann.N Y.Acad.Sci. 593 (1990): 1-6.
- Stricklett, P.K., A. K. Hughes, y D. E. Kohan. "Endothelin-1 stimulates NO production and inhibits cAMP accumulation in rat inner medullary collecting duct through independent pathways." Am J Physiol Renal Physiol 290.6 (2006): F1315-F1319.
- Sugimoto, H. y col. "Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors." Diabetes 56.7 (2007): 1825-33.
- Sung, C.P. y col. "Carvedilol, a multiple-action neurohumoral antagonist, inhibits mitogen-activated protein kinase and cell cycle progression in vascular smooth muscle cells." J Pharmacol.Exp Ther. 283.2 (1997): 910-17.

- Sung, C.P., A. J. Arleth, y E. H. Ohlstein. "Carvedilol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation." J Cardiovasc.Pharmacol. 21.2 (1993): 221-27.
- Suzuki, Y. y col. "Inflammation and angiotensin II." Int.J Biochem.Cell Biol. 35.6 (2003): 881-900.
- Takao, T. y col. "Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on albumin-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells." Am.J.Nephrol. 29.2 (2009): 102-08.
- Takase, O. y col. "Gene transfer of truncated IkappaBalpna prevents tubulointerstitial injury." Kidney Int. 63.2 (2003): 501-13.
- Tanaka, M. y col. "Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury." Kidney Int. 73.2 (2008): 181-91.
- Taner, C. B. y col. "Treatment with endothelin-receptor antagonists increases NOS activity in hypercholesterolemia." J Appl.Physiol 90.3 (2001): 816-20.
- Teerlink, J. R. y col. "Potent vasoconstriction mediated by endothelin ETB receptors in canine coronary arteries." Circ.Res. 74.1 (1994): 105-14.
- Tharaux, P. L. y col. "Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway." Hypertension 36.3 (2000): 330-36.
- Timmermans, P. B. y col. "Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists." Pharmacol.Rev. 45.2 (1993): 205-51.
- Tojo, A. y col. "Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats." Hypertens.Res. 26.5 (2003): 413-19.
- Tomita, N. y col. "In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol 11.7 (2000): 1244-52.
- Tomooka, S. y col. "Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system." Kidney Int. 42.6 (1992): 1462-69.

- Tonelli, M. y col. "Effect of pravastatin on rate of kidney function loss in people with or at risk for coronary disease." Circulation 112.2 (2005a): 171-78.
- Tonelli, M. y col. "Effect of pravastatin in people with diabetes and chronic kidney disease." J Am Soc Nephrol 16.12 (2005b): 3748-54.
- Tonelli, M. y col. "Effect of pravastatin on loss of renal function in people with moderate chronic renal insufficiency and cardiovascular disease." J Am Soc Nephrol 14.6 (2003): 1605-13.
- Tostes, R. C. y col. "Contribution of endothelin-1 to renal activator protein-1 activation and macrophage infiltration in aldosterone-induced hypertension." Clin.Sci.(Lond) 103 Suppl 48 (2002): 25S-30S.
- Unger, T. y col. "The role of olmesartan medoxomil in the management of hypertension." Drugs 64.24 (2004): 2731-39.
- Van den Branden, C. y col. "Carvedilol protects against glomerulosclerosis in rat remnant kidney without general changes in antioxidant enzyme status. A comparative study of two beta-blocking drugs, carvedilol and propranolol." Nephron 77.3 (1997): 319-24.
- Viedt, C. y col. "MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1." J Am Soc Nephrol 13.6 (2002): 1534-47.
- Wada, T. y col. "Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy." Kidney Int. 58.4 (2000): 1492-99.
- Wang, H. y col. "The profile of gene expression and role of nuclear factor kappa B on glomerular injury in rats with Thy-1 nephritis." Clin Exp Immunol. 152.3 (2008): 559-67.
- Wang, S. y col. "Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy." Kidney Int. 63.6 (2003): 2037-49.

- Wang, S. y col. "Renal bone morphogenetic protein-7 protects against diabetic nephropathy." J Am Soc Nephrol 17.9 (2006): 2504-12.
- Wang, S.N., J. LaPage, y R. Hirschberg. "Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy." J Am Soc Nephrol 12.11 (2001): 2392-99.
- Wang, Y. y col. "Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein." J Am Soc Nephrol 8.10 (1997): 1537-45.
- Wang, Y. y col. "Lipopolysaccharide-induced MCP-1 gene expression in rat tubular epithelial cells is nuclear factor-kappaB dependent." Kidney Int. 57.5 (2000): 2011-22.
- Wang, Y. y col. "Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by albumin is mediated by nuclear factor kappaB in proximal tubule cells." J Am Soc Nephrol 10.6 (1999): 1204-13.
- Watanabe, D. y col. "Renoprotective effects of an angiotensin II receptor blocker in experimental model rats with hypertension and metabolic disorders." Hypertens Res. 32.9 (2009): 807-15.
- Weber, M. A. y col. "A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet 374.9699 (2009): 1423-31.
- Wellington, K. y D. M. Faulds. "Valsartan/hydrochlorothiazide: a review of its pharmacology, therapeutic efficacy and place in the management of hypertension." Drugs 62.13 (2002): 1983-2005.
- Wetzel, P. y col. "Bone morphogenetic protein-7 expression and activity in the human adult normal kidney is predominantly localized to the distal nephron." Kidney Int. 70.4 (2006): 717-23.
- White, D.G. y col. "Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth-muscle contraction." J Cardiovasc.Pharmacol. 22 Suppl 8 (1993): S144-S148.
- White, W.B. y col. "Assessment of the novel selective aldosterone blocker eplerenone using ambulatory and clinical blood pressure in patients with systemic hypertension." Am J Cardiol. 92.1 (2003): 38-42.

- Wilson, H.M. y col. "Transforming growth factor-beta isoforms and glomerular injury in nephrotoxic nephritis." Kidney Int. 57.6 (2000): 2434-44.
- Wright, J.T., Jr. y J. Douglas. "Optimal treatment of hypertension and cardiovascular risk reduction in African Americans: treatment approaches for outpatients." J Clin Hypertens (Greenwich.) 5.1 Suppl 1 (2003): 18-25.
- Xing, L. y D. G. Remick. "Promoter elements responsible for antioxidant regulation of MCP-1 gene expression." Antioxid.Redox.Signal. 9.11 (2007): 1979-89.
- Yamamoto, T. y col. "Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 90.5 (1993): 1814-18.
- Yanagisawa, M. y col. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature 332.6163 (1988): 411-15.
- Yang, B. y col. "Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in Type 1 diabetes mellitus and its complications." Cytokine 26.3 (2004): 114-21.
- Yang, C. W. y col. "Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 91.20 (1994): 9436-40.
- Yang, J. y Y. Liu. "Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis." Am J Pathol. 159.4 (2001): 1465-75.
- Yard, B. A. y col. "Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans." Nephrol Dial.Transplant. 16.9 (2001): 1769-75.
- Young, M. R. y N. H. Colburn. "Fra-1 a target for cancer prevention or intervention." Gene 379 (2006): 1-11.
- Yue, T. L. y col. "Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger." J Pharmacol.Exp Ther. 263.1 (1992c): 92-98.

- Yue, T. L. y col. "Carvedilol, a new vasodilating beta adrenoceptor blocker antihypertensive drug, protects endothelial cells from damage initiated by xanthine-xanthine oxidase and neutrophils." Cardiovasc.Res. 28.3 (1994a): 400-06.
- Yue, T. L. y col. "Carvedilol, a new antihypertensive agent, prevents lipid peroxidation and oxidative injury to endothelial cells." Hypertension 22.6 (1993): 922-28.
- Yue, T. L. y col. "SB 211475, a metabolite of carvedilol, a novel antihypertensive agent, is a potent antioxidant." Eur J Pharmacol. 251.2-3 (1994b): 237-43.
- Yue, T. L. y col. "Carvedilol, a new antihypertensive, prevents oxidation of human low density lipoprotein by macrophages and copper." Atherosclerosis 97.2-3 (1992b): 209-16.
- Yue, T. L. y col. "Carvedilol, a new beta-adrenoceptor antagonist and vasodilator antihypertensive drug, inhibits superoxide release from human neutrophils." Eur J Pharmacol. 214.2-3 (1992a): 277-80.
- Zeisberg, M. y col. "Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models." Am J Physiol Renal Physiol 285.6 (2003): F1060-F1067.
- Zeisberg, M. y R. Kalluri. "Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease." Pediatr.Nephrol 23.9 (2008): 1395-98.
- Zenz, R. y E. F. Wagner. "Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors." Int.J Biochem.Cell Biol 38.7 (2006): 1043-49.
- Zhang, A. H. y col. "[Induction of monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells by angiotensin II: role of c-Jun N-terminal kinase-c-Jun/activator protein-1 signal pathway]." Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi. 33.6 (2004): 550-54.
- Zhou, G., C. Li, y L. Cai. "Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway." Am J Pathol. 165.6 (2004): 2033-43.

- Zhou, M. S. y col. "Renoprotection by statins is linked to a decrease in renal oxidative stress, TGF-beta, and fibronectin with concomitant increase in nitric oxide bioavailability." Am J Physiol Renal Physiol 295.1 (2008): F53-F59.
- Ziyadeh, F. N. y col. "Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor-beta system." Kidney Int. 53.3 (1998): 631-38.
- Ziyadeh, F. N. y col. "Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 97.14 (2000): 8015-20.
- Ziyadeh, F. N. y K. Sharma. "Role of transforming growth factor-beta in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy." Kidney Int.Suppl 51 (1995): S34-S36.
- Zoja, C. y col. "How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach." J Am.Soc.Nephrol 13.12 (2002b): 2898-908.
- Zoja, C. y col. "Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy." Kidney Int. 61.5 (2002a): 1635-45.
- Zoja, C. y col. "Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation." Kidney Int. 53.6 (1998): 1608-15.
- Zoja, C. y col. "Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins." Am J Kidney Dis. 26.6 (1995): 934-41.