

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

TESIS DOCTORAL

**Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica en la
Isquemia/Reperfusión y Trasplante Renal. Efectividad de
la Cardiotrofina-1.**

DOCTORANDA

Dña. María Begoña García Cenador

Directores

Prof. Alberto Gómez Alonso

Prof. José Miguel López Novoa

Julio 2011

El Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria. Director del Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado **“Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica en la Isquemia/Reperfusión y Trasplante Renal. Efectividad de la Cardiotrofina-1.”** ha sido realizado por Dña. María Begoña García Cenador en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, para optar al Grado de Doctor por esta Universidad, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmo el presente certificado en, Salamanca a seis de junio de dos mil once.

Fdo. Prof. Clemente Muriel Villoria
Director del Departamento de Cirugía

**El Prof. Dr. D. Alberto Gómez Alonso. Catedrático de Cirugía. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca.**

**El Prof. Dr. D. José Miguel López Novoa. Catedrático de Fisiología. Facultad de Medicina.
Universidad de Salamanca.**

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica en la Isquemia/Reperfusión y Trasplante Renal. Efectividad de la Cardiotrofina-1.”** realizado por Dña. María Begoña García Cenador, para optar al Grado de Doctor por esta Universidad, ha sido desarrollado bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante un Tribunal.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en, Salamanca a seis de junio de dos mil once.

Fdo.: Prof. Alberto Gómez Alonso
Director de la Tesis

Fdo.: Prof. José Miguel López Novoa
Director de la Tesis

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar quiero manifestar mi gratitud a los Profesores. D. Alberto Gómez Alonso y D. José Miguel López Novoa, Directores de esta Tesis Doctoral por su absoluta disponibilidad y por todas las facilidades ofrecidas.

Al Departamento de Cirugía y particularmente a su Director, el Prof. D. Clemente Muriel Villoria por los medios prestados para el desarrollo de este proyecto. Al Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario de Salamanca y al Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca, donde generosamente nos ayudaron con algunas de las técnicas presentadas en este trabajo.

Al equipo de trabajo que ha participado en el desarrollo del proyecto en el que se encuentra englobado este trabajo: Prof. Francisco Javier García Criado, Prof. José Miguel López Novoa, Prof. Miguel Angel Arévalo Gómez.

Finalmente doy las gracias a todas aquellas personas que me han ayudado de forma anónima y desinteresada en la realización del presente trabajo para la consecución de esta Tesis Doctoral.

A Daniela García García,
objetivo de todos mis esfuerzos

ÍNDICE

	Página
I. Estado actual del problema	
1. Trasplante de órganos	
1.1.- Importancia actual del trasplante	
1.2.- Trasplante renal	
1.2.1.-Patologías que conducen al trasplante renal	
1.2.1.1.-ARF	
1.2.1.1.1.- Fisiopatología de la ARF	
1.2.1.1.2.-CRF	
1.3.- Problemática del trasplante renal	
1.3.1.-Preservación	
1.3.1.1.-Isquemia hipotérmica anaeróbica	
1.3.1.2.-Metabolismo órgano específico	
1.3.2.-Rechazo del injerto	
1.3.3.-Disfunción del injerto	
2. Lesión por isquemia y reperusión (I/R)	
2.1.-Lesión por isquemia	
2.3.-Lesión por reperusión	
3. Necrosis tubular aguda	
3.1.-Morfología de la NTA	
3.2.-Fisiopatología del daño renal	
3.2.1.-Alteraciones hemodinámicas	
3.2.2.-Alteraciones en la función tubular	
3.2.3.-Alteraciones en el metabolismo celular del túbulo	
3.2.4.-Alteraciones microvasculares	
3.3.-Fases de la NTA	
4. Endotelio	

5. Inflamación en la lesión por I/R

5.1.- Generalidades

5.2.- Mediadores Bioquímicos

5.2.1.-Aminas vasoactivas

5.2.2.-Mediadores químicos del plasma

5.2.2.1.-Sistema de las cininas

5.2.2.2.-Sistema del complemento

5.2.2.3.-Sistema de la coagulación

5.2.3.-Derivados del ácido araquidónico

5.2.3.1.-Vía de la ciclooxigenasa

5.2.3.2.-Vía de la lipooxigenasa

5.2.4.-Factor activador de las plaquetas (PAF)

5.2.5.- Citocinas

5.2.5.1.-Interleucina-1 (IL-1)

5.2.5.2.-Interleucina-6 (IL-6)

5.2.5.3.- Interleucina-10 (IL-10)

5.2.5.4.- Factor de necrosis tumoral (TNF)

5.2.5.5.- Interferón (INF)

5.2.6.- Productos lisosómicos de los leucocitos

5.2.7.- Quimiocinas

5.2.8.- Radicales libres del oxígeno (RLO)

5.2.9.- Óxido nítrico (NO)

5.3.- Factores transcripcionales

5.3.1.- El factor de transcripción inducible por hipoxia

5.3.2.- El factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$

5.4.- Receptores tipo toll (TLRs)

5.5.- Células inflamatorias

5.5.1.-Neutrófilos

5.5.2.-Linfocitos

5.5.3.-Células natural killer

5.5.4.-Macrófagos

5.5.5.-Células dendríticas

5.6.-Activación de la inflamación

5.6.1.-Interacción Leucocito-Endotelio

5.6.2.-CAMs

5.6.2.1.-Familia de las selectinas

5.6.2.2.-Familia de las integrinas

5.6.2.3.-Superfamilia de las inmunoglobulinas

5.6.3.-Etapas de la interacción Leucocito-Endotelio

5.6.3.1.-Marginación y rodamiento

5.6.3.2.-Activación y quimiotaxis

5.6.3.3.- Adhesión

5.6.3.4.-Migración

6. Cardiotrofina-1

6.1.- Introducción

6.2.- Estructura de la cardiotrofina-1

6.2.1.- Estructura molecular. Biosíntesis

6.2.2.- Complejo receptor

6.2.2.1.-Formación del complejo receptor

6.2.2.1.1-Glicoproteína gp130

6.2.2.1.2- CT-1R α

6.2.2.1.3- Receptor del factor LIF (LIFR β)

6.2.2.2.-Activación del complejo receptor

6.2.2.2.1-Estructura y función de las JAKs

6.2.2.2.2-Estructura y función de las STATs

6.2.3- Vías de señalización

6.2.3.1.- JAK-STAT

6.2.3.2.- Regulación negativa de la vía JAK-STAT

6.2.3.3.- ERK1/2

6.2.3.4.- PI3K-Akt

6.2.3.5.- Vías de señalización y su implicación

6.3.- Efectos de la cardiotrofina-1

6.3.1.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el corazón

6.3.1.1.- Efectos cardioprotectores

6.3.1.1.1.-Hipoxia de miocardio

6.3.1.1.2.- Daño por isquemia/reperfusión

6.3.1.1.3.- Hipertrofia cardiaca

6.3.1.1.4.- Sepsis

6.3.1.2.- Efectos hemodinámicos

6.3.1.3.- Propiedades endocrinas

6.3.2.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el hígado

6.3.3.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el pulmón

6.3.4.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el tejido neural

6.3.5.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el sistema neuromuscular

6.3.6.- Cardiotrofina-1 y otros órganos

II. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Objetivos

III. Material y métodos

1.- Materiales

Instalaciones

Equipos

Animales de experimentación

2.- Métodos: Diseño experimental

☐ Condiciones generales del estudio

☐ Modelos experimentales

- Fase I.- Control de dosis

Grupos de trabajo

Técnica

Variables estudiadas

- Fase II.- Estudios de I/R

Grupos de trabajo

Técnica quirúrgica

Variables estudiadas

- Fase III.- Ensayo de preservación renal

Grupos de trabajo

Técnica quirúrgica

VARIABLES ESTUDIADAS

- Fase IV.- Ensayo de trasplante renal

Grupos de trabajo

Técnica quirúrgica

VARIABLES ESTUDIADAS

Estudios estadísticos

Técnicas de determinación para las variables estudiadas

IV. Resultados

Resultados de la fase I. Control de dosis

Resultados de la fase II. Estudios de I/R

Resultados de la fase III. Estudios de preservación

Resultados de la fase IV. Resultados de la fase trasplante renal

V. Discusión

Discusión de resultados del control de dosis

Discusión de resultados de la fase de I/R renal

Discusión de resultados de la fase de preservación.

Discusión de resultados de la fase de trasplante renal

VI. Conclusiones

VII. Bibliografía

ABREVIATURAS

A1AR	Receptor de Adenosina A1
ACE	Enzima de Conversión de la Angiotensina
AcH	Acetilcolina
ADH	Hormona Antidiurética
ADP	Adenosin difosfato
AINES	Antiinflamatorios No Esteroideos
AP-1	Activador proteico
ATP	Adenosin trifosfato
BUN	Nitrógeno Ureico en Sangre
CAMs	Moléculas de Adhesión Celular
CD	Células dendríticas
COX	Ciclooxigenasa
CT-1	Cardiotrofina-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
Crry	Inhibidor del Complemento
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ESRF	Insuficiencia Renal Terminal
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
GADPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
G-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos
GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G
HGF	Factor de Crecimiento Hepático
HIF-1	Factor Inducible por Hipoxia-1
HSP	Proteínas de choque térmico
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
IGF-1	Factor de Crecimiento de Insulina tipo-1
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- γ
iNOS	Sintasa Inducible del Óxido Nítrico

IRA	Insuficiencia Renal Aguda
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
IRF-1	Factor de Transcripción Regulador del Interferón-1
IRT	Insuficiencia Renal Terminal
JAM	Molécula de adhesión de uniones intercelulares
KC	Quimiocina Derivada de Queratinocitos
LFA-1	Antígeno 1 Asociado con la Función de los Linfocitos
LPS	Lipopolisacáridos
MAC	Complejo de Ataque a la Membrana
MCP-1	Proteína quimiotractante para monocitos-1
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP-1	Proteína Inflamatoria de los Macrófagos tipo 1
MIP-2	Proteína Inflamatoria de los Macrófagos tipo 2
mPT	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial
mTAL	Parte gruesa ascendente del asa de Henle
NAD+	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH2	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Dihidrogenasa
NF- κ B	Factor de Transcripción Nuclear- κ B
NKT cells	Células T Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NTA	Necrosis Tubular Aguda
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
PAF	Factor Activador de las Plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión celular plaquetaria-endotelial-1
PG	Prostaglandina
pro-IL-1 β	Precursor de la Interleucina-1 β
PSGL1	Ligando Glucoproteico de P-selectina1
RGD	Motivos arginina-glicerol-asparaginasa
RLO	Radicales Libres del Oxígeno
S3	Segmento recto del túbulo proximal
CBM	Módulo de unión a la citocina
JAK	Janus cinasa
PC	Precondicionamiento isquémico

PIAS	Proteína inhibidora de las STATs activadas
SOCS	Supresor de señalización de citocinas
STATs	Proteínas activadoras de la transcripción y transductoras de la señal
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
THP	Proteína Tamm-Horsfall
TLRs	Receptores Tipo Toll
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
LVH	Hipertrofia Ventricular Izquierda
TX	Tromboxano
Hsp	Proteínas de choque térmico
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UW	Universidad de Wisconsin
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VCAM-1	Molécula de Adhesión Celular Vascular-1
$\Delta\Psi_m$	Potencial de Membrana

I.- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

I.- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

1.- Trasplante de Órganos

1.1.- Importancia actual del trasplante:

En la segunda mitad del siglo XX los trasplantes de órganos han supuesto una auténtica revolución en el mundo de la medicina y se han convertido en una actividad cotidiana en los hospitales ^{1,2}.

El trasplante es uno de los avances más significativos de la cirugía moderna, y está considerado como parte de la terapéutica en el estadio terminal de diversas patologías que afectan a la funcionalidad de diversos órganos. Esta opción de tratamiento ha mejorado significativamente sus resultados en unas pocas décadas, siendo varios los factores que han contribuido a estas mejoras, entre los que se incluyen, una mayor eficacia de los tratamientos farmacológicos utilizados para tratar y prevenir el rechazo de órganos, los avances técnicos en la cirugía, los métodos de monitorización de pacientes, la mejora en las pruebas de histocompatibilidad y en los procedimientos de obtención de órganos, así como la temprana y más precisa detección de rechazo, al igual que una comprensión más integral del sistema inmune.

En el 2007 se realizaron aproximadamente 100.000 trasplantes de órganos sólidos en todo el mundo: 68.250 de riñón, 19.850 de hígado, 5179 corazón, 3245 pulmón y 2797 trasplantes de páncreas ².

En España, según los datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT, 2010), dependiente del Ministerio de Sanidad, en 2009 se realizaron 4.028 trasplantes, procedentes de 1.605 donantes, con máximos históricos en trasplante renal (2.328) y pulmonar (219).

El trasplante renal de donante vivo se ha incrementado en un 50% y representa ya el 10% del total de los riñones trasplantados, de acuerdo con los objetivos de la ONT. Por lo tanto el año pasado, nuestro país ha vuelto a confirmar su liderazgo mundial, que viene ejerciendo en este campo de forma ininterrumpida, desde hace 18 años ³.

La tasa de donación se sitúa en 34,3 donantes por millón de población (pmp), similar a la de años anteriores, dado el progresivo aumento del censo de población paralelo al del número de donantes. Se trata un año más de la mayor tasa del mundo. Con estos datos, España sigue afianzando su liderazgo mundial en materia de donación, ya que supera en 8 puntos la media de EEUU (26,3 pmp) y duplica la tasa media de la Unión Europea (18,1 pmp). Estas cifras explican que el modelo español de trasplantes se haya convertido en un ejemplo en todo el mundo ³. (Tabla I)

Tabla I.- Donaciones y trasplantes en España en los años 2007,2008 y 2009 (ONT, 2009)

DONACIÓN Y TRASPLANTE EN ESPAÑA	2007	2008	2009
DONANTES	1.550	1.577	1.605
TRASPLANTES RENALES	2.210	2.229	2.328
TRASPLANTES HEPÁTICOS	1.112	1.108	1.099
TRASPLANTES PULMONARES	185	192	219
TRASPLANTES CARDIACOS	241	292	274
TRASPLANTES PANCREÁTICOS	76	110	97
TRASPLANTES INTESTINALES	5	14	11
TOTAL TRASPLANTES	3.829	3.945	4.028

1.2.- Trasplante renal:

1.2.1.- Patologías que conducen al trasplante renal:

La insuficiencia renal es un trastorno parcial o completo de la función renal. Existe incapacidad para excretar los productos metabólicos, iones y agua, y aparece un trastorno funcional de todos los órganos y sistemas del organismo. La insuficiencia renal puede ser aguda o crónica, y ambas constituyen los diagnósticos más frecuentes de la práctica nefrológica en el momento actual.

1.2.1.1.-Insuficiencia renal aguda (IRA):

La IRA es un síndrome clínico común, caracterizado por una pérdida rápida y progresiva de la función renal (horas a semanas) ⁴⁻⁸. La tasa de filtración glomerular (TFG) disminuye y como consecuencia, hay un incremento de la creatinina en el suero y un fuerte incremento de las sustancias nitrogenadas en la sangre (azotemia) que puede ir acompañada de oliguria, (volumen urinario <400 cc/24h), aunque lo más frecuente es que no se produzca, (alrededor del 60%) ⁶.

La etiología es múltiple y la morbi-mortalidad es elevada, aproximadamente el 70% de pacientes que se encuentran en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) ⁷. Su incidencia en pacientes hospitalizados es aproximadamente un 5% y hasta de un 30% en admisiones a UCI ⁸.

Puede aparecer tras episodios de hipovolemia, hipotensión grave y prolongada o tras la exposición a un agente nefrotóxico. Las dos causas más comunes de la IRA son la isquemia renal prolongada y las lesiones nefrotóxicas que producen oliguria. También puede deberse a otros cuadros clínicos como los traumatismos, la sepsis, la administración de sangre de diferente grupo y las lesiones musculares graves.

Según la causa, se distinguen 3 tipos de IRA:

- ✚ *IRA Pre-renal* (55% de los casos de IRA): Está considerada como una respuesta funcional de los riñones estructuralmente normales a la hipoperfusión renal, en la cual no hay lesiones ni en la estructura ni en la microestructura renal.

- ✚ *IRA Post-renal* (5% de los casos de IRA): Es una consecuencia de la obstrucción mecánica o funcional del tracto urinario. Puede o no, estar inicialmente acompañada por pequeños cambios morfológicos.
- ✚ *IRA Intra-renal o intrínseca* (40% de los casos de IRA): Es el resultado de daños estructurales en el parénquima de la vasculatura renal, en los glomérulos, túbulos renales e intersticio en respuesta a daños citotóxicos, isquémicos o inflamatorios del riñón, con la consiguiente disfunción de las nefronas⁹.

En la IRA prerenal y postrenal la recuperación de la función renal es completa, entre 1 y 2 días, si se corrige la causa y se restablece la volemia, antes de que se produzcan cambios estructurales. La IRA prerenal representa la forma más común de lesión renal y conduce a la IRA intrínseca si no se corrige rápidamente¹⁰.

La IRA intrarenal está asociada patológicamente a la necrosis tubular aguda (NTA), siendo las causas más frecuentes de ésta, la hipoperfusión renal prolongada y los fármacos nefrotóxicos.

Fisiopatología de la IRA

Cuando disminuye el flujo sanguíneo renal, también lo hace la fuerza motriz básica de la filtración. Además, los riñones dejan de recibir oxígeno y otros nutrientes vitales para el metabolismo celular. Como consecuencia de la disminución de la TFG, se acumulan los productos residuales del organismo y por ello, el paciente experimentará un incremento de los niveles séricos de creatinina y de nitrógeno ureico en sangre (BUN), lo que recibe el nombre de uremia.

La hipoperfusión renal es consecuencia de la hipovolemia, disminución en el gasto cardiaco, vasodilatación sistémica o vasoconstricción intrarrenal. En todas estas ocasiones la disminución de la volemia provoca caída de la presión arterial (<80mm Hg), iniciándose una activación del sistema nervioso simpático, del sistema renina angiotensina-aldosterona y liberación de la hormona antidiurética. (Figura 1)

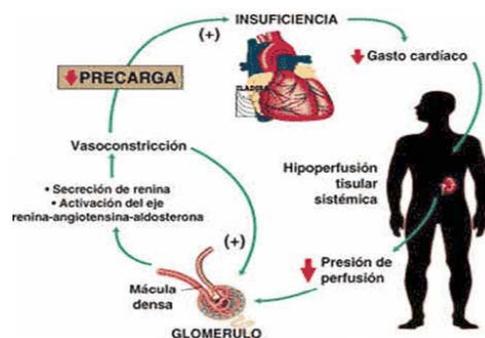


Figura 1.- Fisiopatología de la IRA

En situaciones de hipoperfusión poco importante en el riñón, la perfusión glomerular, la presión de ultrafiltrado y la TFG se mantienen estables a través de varios mecanismos:

✚ La autoregulación: Este mecanismo trata de mantener constante la presión hidrostática glomerular por medio de la dilatación de la arteriola aferente y la constricción de la arteriola eferente consiguiendo mantener el flujo sanguíneo, la presión en el lecho capilar glomerular y la TGF.

La dilatación arteriolar aferente ocurre a través de la respuesta miogénica, retroalimentación túbulo glomerular, y a las prostaglandinas y posiblemente también del óxido nítrico (NO).

La constricción arteriolar eferente ocurre vía angiotensina II

✚ Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona^{11,12}: Este sistema estimula la vasoconstricción periférica, que incrementa a su vez la presión de perfusión, estimulando la secreción de aldosterona que da lugar a la reabsorción de Na⁺ y agua y excreción de K⁺. La reabsorción de Na⁺ y agua aumenta el volumen intravascular total mejorando la perfusión de los riñones. La reabsorción de Na⁺ da lugar a un aumento de la osmolaridad del plasma, que a su vez estimula la liberación de la hormona antidiurética (ADH), la cual favorece la reabsorción de agua en los túbulos distales. (Figura 2)

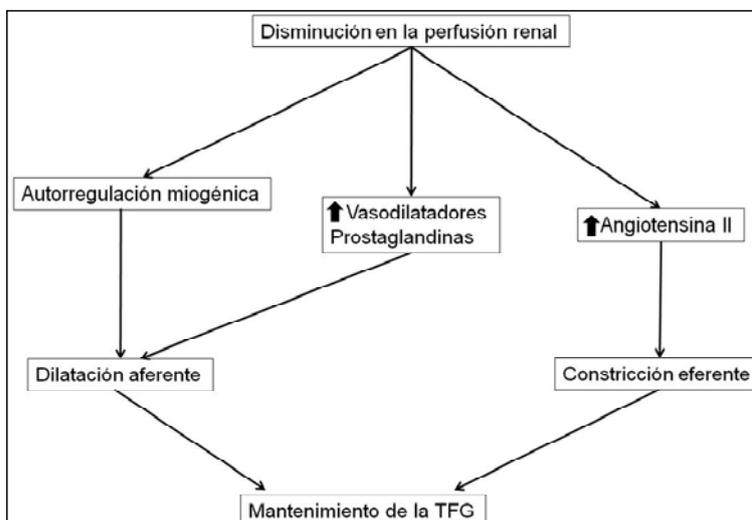


Figura 2.- Mecanismos de compensación que mantienen la TFG a pesar de una reducción en la presión de perfusión renal.

La excesiva estimulación del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina provoca una mayor vasoconstricción renal que a la larga aboca a daño tubular¹². La interferencia iatrogénica con una compensación renal por la administración de vasoconstrictores, inhibidores de la prostaglandina sintasa (AINEs), o inhibidores del sistema renina-angiotensina, como los

inhibidores de la enzima de conversión de la Angiotensina (ACE) o antagonistas de los receptores de angiotensina, puede acelerar la NTA en los individuos con la perfusión renal reducida.

La vasoconstricción renal grave se ha demostrado en IRA clínicas y experimentales y se ha considerado en el pasado como el factor predominante que lo provoca, lo que explica el nombre de la nefropatía vasomotora¹³. Sin embargo, la reducción en el flujo sanguíneo renal total por sí solo no parece ser el responsable de la fuerte reducción de la TFG, ya que el incremento del flujo sanguíneo renal mediante aumento de volumen o de la administración de vasodilatadores no corrige la TFG.

Las manifestaciones de la IRA, pueden no aparecer hasta una semana después de la lesión inicial. Sin embargo cuando aparecen lo hacen de manera brusca. La patofisiología de la IRA, inducido por la I/R renal incluye daño microvascular y tubular, tumefacción celular, muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis, trastornos hemodinámicos, infiltración de células inflamatorias y se producen cambios en la TFG. Además, la I/R causa una liberación de citocinas y factores de crecimiento asociados con la nefropatía crónica que llevan a la rápida activación de la respuesta inflamatoria¹⁴.

1.2.1.2.- Insuficiencia renal crónica (IRC):

La IRC se desarrolla desde meses hasta años y conduce a una destrucción irreversible del tejido renal¹⁵, con la consiguiente enfermedad renal progresiva que conduce a la insuficiencia renal terminal (IRT)¹⁶.

Es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte en el mundo industrializado, indudablemente vinculado al progresivo envejecimiento de la población y a la elevada prevalencia de otros procesos crónicos como la diabetes mellitus, hipertensión y obesidad.

Además de a la diabetes, la hipertensión, y las enfermedades obstructivas de las vías urinarias (como cálculos, tumores, etc.), la IRA se debe a la complicación de una gran cantidad de enfermedades del riñón, tales como enfermedades inflamatorias renales (llamadas en conjunto glomerulonefritis), nefropatía por IgA (enfermedad de Berger), pielonefritis crónica y retención urinaria, y el uso de medicamentos tóxicos para el riñón (especialmente medios de contraste, antineoplásicos, AINEs y algunos antibióticos).

Como consecuencia de la destrucción progresiva de las nefronas, las que permanecen intactas empiezan a trabajar al máximo para adaptarse al aumento de las necesidades de filtración de solutos y de esta manera, suplir la función de las nefronas destruidas. Esta respuesta de adaptación provocará que dichas células se hipertrofien, lo que conlleva una pérdida de la capacidad de las mismas para concentrar la orina de forma adecuada. Uno de los primeros signos de la IRC es la isostenuria poliuria, con aumento de la excreción de orina que es casi isotónica con el plasma. Más adelante, los túbulos empiezan a perder su capacidad para reabsorber electrolitos, seguidamente, como el organismo no puede librarse de los productos residuales a través de los riñones, aparece la uremia clínica y, finalmente, los desequilibrios hidroelectrolíticos del organismo empiezan a afectar a otros sistemas corporales. El conjunto de las manifestaciones de la IRC se incluye en el término uremia o síndrome urémico.

La IRT, es la última consecuencia de la IRC, en la cual generalmente se requiere diálisis hasta que se encuentre un donante para un trasplante renal. (Figura 3)

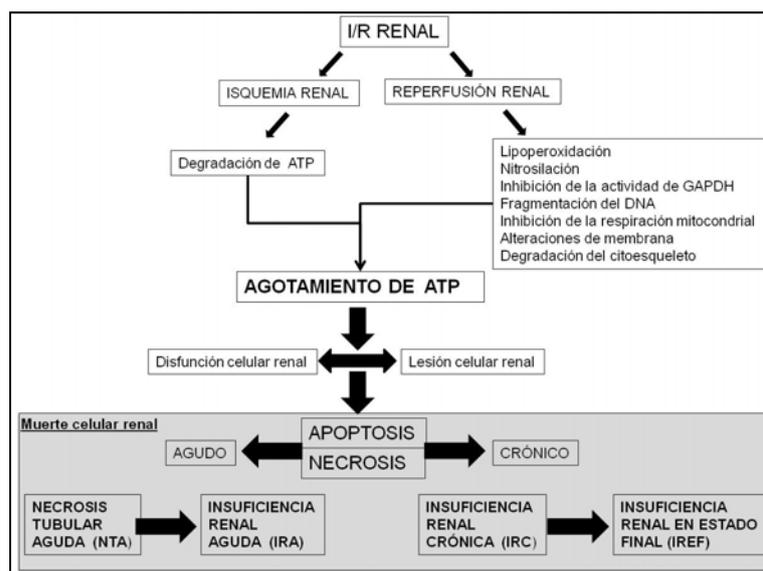


Figura 3.- Mecanismos de lesión por I/R renal

La incidencia de la IRT, se ha incrementado internacionalmente a ritmo constante desde 1989. Los EEUU tienen la tasa de incidencia de IRT más alta, seguida de Japón, el cual tiene una prevalencia más alta que EEUU ^{17,18}.

Según el informe anual del Registro de Enfermedad Renal Crónica en tratamiento renal sustitutivo, pacientes en diálisis y/o trasplante, de 2009, la IRC mantiene una incidencia de 129

pacientes por millón de población en ese año y la prevalencia es de 1039 por millón de población. En cuanto al número de pacientes en tratamiento sustitutivo, y en comparación con otros países europeos y del resto del mundo, España se encuentra en una posición intermedia^{19,20}.

Si se detecta la enfermedad de manera temprana, puede reducirse la velocidad en el progreso del daño, retrasando la necesidad de iniciar las terapias de reemplazo de la función renal y preparando mejor al paciente para cuando sea necesario su inicio. Las terapias de reemplazo renal son la diálisis y el trasplante renal¹⁹. La diálisis se inicia cuando el paciente no puede conservar un estilo de vida razonable con medidas conservadoras o bien cuando estas no son suficientes y la TFG es inferior a 12 ml/min.

El éxito del trasplante renal es el resultado de muchos años de investigación en medicina clínica, quirúrgica y ciencias básicas. El coste de un año de la diálisis es similar al coste del trasplante renal en el primer año. En los años sucesivos, el coste del trasplante renal es sólo el 20% de la diálisis. Si se le añade al factor económico la muy alta calidad y “cantidad” de vida, queda mucho más que justificado cualquier programa bien estructurado de trasplante renal²¹.

Actualmente los resultados del trasplante renal de cadáver son muy buenos, lográndose una supervivencia del injerto de alrededor de 90% al año, del 70-75% a los cinco años y del 50-60% a los 10 años. Las principales causas de pérdida del injerto a largo plazo son la respuesta inflamatoria, el rechazo crónico y la muerte del paciente con injerto funcionante en relación con problemas cardiovasculares, infecciones, tumores y hepatopatías. Los resultados del trasplante renal de donante vivo son superiores a los de cadáver y se caracterizan por una menor incidencia de rechazo agudo y unos resultados superiores en cuanto a supervivencia del injerto que pueden ser al año del 98%, a los cinco años del 85% y a los 10 años del 75%.

1.3.- Problemática del trasplante renal

En el trasplante renal, es frecuente la presencia de un período postoperatorio de disfunción inicial del injerto. Este hecho puede asociarse, con una peor evolución funcional del riñón trasplantado a medio y largo plazo. La presencia de la isquemia normotérmica y la conservación en hipotermia así como las lesiones producidas en el momento de la reperusión del

órgano son eventos que pueden condicionar esos trastornos mediante la interacción de factores inmunológicos e isquémicos.

Algunos aspectos técnicos y farmacológicos, así como la optimización de las condiciones de preservación del órgano pueden aumentar el porcentaje de órganos con función inmediata, lo que tendría consecuencias económicas significativas (menor número de sesiones complementarias de diálisis y acortamiento del ingreso hospitalario). Estos avances pueden mejorar la supervivencia tanto del injerto como del paciente a medio y largo plazo.

1.3.1.- Preservación

El perfeccionamiento de nuevas y mejores técnicas de preservación de órganos ha tenido un impacto decisivo en la viabilidad de los órganos y en el éxito del trasplante, lo que permite que la supervivencia de los injertos en el primer año se mantenga por encima del 90% para riñones, hígado, páncreas y corazón. Sin embargo, en los últimos años, el mantenimiento de la viabilidad de los órganos durante la preservación se ha convertido en un verdadero reto, ya que, como consecuencia de la escasez de donantes, los criterios de inclusión del donante cadáver se han ampliado de forma muy importante. En la actualidad, los órganos se obtienen de donantes con edad avanzada, con más enfermedades y un mayor número de donantes a corazón parado que los obtenidos hace 10 años. La extracción, el almacenamiento y el trasplante de un órgano sólido de un donante alteran significativamente la funcionalidad del órgano y sus efectos se manifestarán en la capacidad de recuperar su función tras el trasplante. Las diferentes técnicas de preservación de órganos sirven para minimizar este daño y mejorar la función y la supervivencia del injerto.

El daño de los órganos durante el trasplante ocurre en tres fases:

- ✚ La primera, denominada fase de *isquemia caliente*, incluye el tiempo que pasa desde la interrupción de la circulación del órgano donado hasta el momento en que es perfundido con la solución hipotérmica de preservación.
- ✚ La segunda fase, llamada fase de *isquemia fría*, es el período que transcurre desde que el órgano es preservado en un estado hipotérmico hasta su implante en el receptor.²²
- ✚ La tercera fase, es la fase de *reperfusión*, cuando el injerto es revascularizado con la sangre del receptor.

En la práctica clínica, el tiempo de preservación del riñón a trasplantar en isquemia fría, varía considerablemente. Un periodo prolongado de isquemia fría tiene como consecuencia una alta incidencia de retraso en la función del injerto, que es un factor negativo para su supervivencia. El tiempo de preservación debería ser lo más corto posible y hay autores que demuestran que cuando el tiempo de isquemia fría supera las 6 horas, se incrementan los efectos clínicos negativos, aumentando hasta un 26% el riesgo de disfunción primaria del injerto ²³.

Debido a ello, existen pocos estudios experimentales sobre trasplante renal en los que los tiempos de preservación del órgano sean prolongados ²⁴.

Durante la hipotermia se ha observado en los túbulos proximales, tumefacción mitocondrial junto con los cambios en su estructura, edema extra e intracelular, y marginación de la cromatina. Esto, refleja la incapacidad para mantener la fosforilación oxidativa y el transporte de membrana a temperaturas no fisiológicas. Aunque la fosforilación oxidativa esté interrumpida, las reservas energéticas se pierden más lentamente en frío, de acuerdo con la regla de Van't Hoff's. Con respecto a la isquemia caliente cardíaca, la pérdida total del ATP se ha observado después de 40 minutos ²⁵, sin embargo, esto no pasa dentro de los tiempos de isquemia fría clínicamente justificados, aunque si se observa una disminución del 50% del índice de ATP/ADP ²⁵.

La hipoxia es capaz de poner en marcha un importante número de genes que se han conservado desde hace millones de años en la evolución. Sin embargo, los procesos de transcripción y traducción están limitados por la ausencia de oxígeno, necesaria para responder rápidamente a las demandas energéticas. Aunque hay diversas opiniones sobre la expresión de genes durante la hipotermia, se piensa que el incremento del RNAm se debe a la estabilización del RNAm en el frío, y no hay evidencias de que se despliegue la doble cadena de DNA, ni el transporte de nucleótidos ²⁶.

Durante la preservación hipotérmica se desarrollan también alteraciones mitocondriales relacionadas directamente con el frío: es un estado celular de apoptosis latente o preapoptosis. En el momento de la reperfusión, esas células pasan a una fase activa de apoptosis debido a la activación de una cascada de sucesos bioquímicos. Nuevamente las características del donante, del órgano y de la calidad de preservación serán esenciales. Es decir, la isquemia se relaciona con destrucción celular directa por necrosis y la reperfusión con pérdida celular por apoptosis. La hipotermia produce lesiones celulares específicas, que son más importantes cuanto más tiempo tarde el órgano en ser trasplantado ^{27,28}.

Durante la fase de isquemia hipotérmica en la mitocondria celular, el frío inducirá la elevación del Ca^{++} intracelular, la aparición de los RLO en el medio así como la inversión de la relación BCL-2/BAX (proteínas de membrana) en la mitocondria. Estos cambios producen la apertura del poro mTP con edema mitocondrial secundario. La alteración de la membrana de la mitocondria facilita la salida del citocromo C al medio extramitocondrial. El citocromo C, en el momento de la reperfusión del órgano puede estimular la agregación de determinadas moléculas proapoptóticas con activación final de la enzima pro-caspasa 3 y de la vía proteolítica de las caspasas. Esto permitirá el desarrollo de la apoptosis. Ese edema mitocondrial progresivo, se observa durante la fase de hipotermia y constituye la apoptosis celular durante la reperfusión.

En cuanto a los RLO, [anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitritos (ONOO^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot)], dependiendo del tipo de isquemia se generan distintos tipos que juegan un papel diferente en la isquemia caliente y en la isquemia fría²⁶.

La resistencia de diferentes tipos celulares a diferentes tipos de isquemia es difícil de valorar, ya que los cambios morfológicos capaces de verse con microscopía se llevan a cabo solamente después de períodos prolongados de isquemia, mientras los cambios son más tempranos cuando se produce la reperfusión. Las células endoteliales cardiacas son muy resistentes a la isquemia caliente con un 50% de viabilidad después de 12 horas de isquemia²⁹. El mayor daño endotelial solo se desarrolla cuando el tejido es reperfundido después del periodo de isquemia. De este modo, el daño por isquemia caliente en cardiomiocitos afecta a las funciones de contracción post-reperfusión, fenómeno que no se produce durante la isquemia fría prolongada³⁰.

La isquemia caliente también produce un importante daño a los hepatocitos y reduce el número de células de Kupffer viables³¹. Sin embargo, la isquemia fría seguida de la reperfusión provoca cambios notables en las células endoteliales sinusoidales con necrosis temprana sin afectar a los hepatocitos³¹. En el riñón, el daño por isquemia caliente se produce primero en las células del túbulo proximal. Aunque toleran una exposición corta a la isquemia caliente, los cambios en el potencial trans-epitelial y en las uniones célula-célula aparecen muy pronto³². Algunos órganos pueden tolerar isquemias frías prolongadas y algunos isquemia caliente sin un deterioro significativo de la función. Sin embargo, cuando ambos factores se dan en el mismo tejido se produce un importante daño con una marcada muerte celular³².

El desarrollo de una solución de preservación útil para la mayoría de órganos donantes, tanto para el enfriamiento in situ en el donante como para el almacenamiento en frío tras la

extracción, ha sido posible tras integrar los principios básicos de la isquemia en hipotermia anaeróbica con los principios del metabolismo órgano-específico ^{33,34}.

1.3.1.1.- Isquemia hipotérmica anaeróbica

El fundamento de la preservación de órganos se basa en la supresión del metabolismo y de las enzimas catabólicas mediante hipotermia a 4°C. Se ha demostrado que la hipotermia enlentece la actividad enzimática con disminución de los requerimientos de oxígeno e incluso llega a paralizarla a temperaturas inferiores a los 0°C ^{34,35}.

La mayoría de las enzimas en los animales homeotérmicos reducen su actividad de 1,5 a 2 veces por cada 10°C de descenso de la temperatura, pero todavía hay una importante actividad a 1°C. Por ello, el mantenimiento de unas concentraciones mínimas de ATP es fundamental para controlar la lesión isquémica. Sin embargo, la hipotermia no está exenta de efectos adversos. A su capacidad de disminuir la actividad metabólica y, por lo tanto, el consumo de ATP hay que añadir que también afecta a la actividad de la enzima Na⁺/K⁺ ATPasa, lo que favorece la aparición del edema celular ³⁶.

Los órganos expuestos a la isquemia normotérmica permanecen viables durante períodos relativamente cortos, usualmente menos de 1 h. Sin embargo, enfriando el órgano de 37°C hasta 2-4°C, se puede alargar el tiempo de preservación por un período de 12-13 h. Este período de almacenamiento puede alargarse de forma significativa si, además, se utiliza una solución de preservación apropiada ^{37,38}.

Para conseguir la hipotermia se realiza la infusión intravascular de líquidos fríos, de manera que, además de conseguir un enfriamiento homogéneo del órgano, proporciona un lavado intravascular con arrastre de elementos formes, isoaglutininas y factores de coagulación que dificultan la microcirculación. Estos líquidos, empleados para enfriar el órgano, han ido variando su composición con nuevos aditivos para conferir al órgano una protección frente a los efectos de la isquemia y la hipotermia, dando lugar a las diferentes soluciones de preservación que se utilizan hoy en día.

De acuerdo con los mecanismos de lesión tisular en relación con la I/R, hay una serie de principios que deben cumplir las soluciones de preservación para tratar de evitar dicha lesión (Tabla II) ³⁸:

Tabla II.- Diferentes funciones de algunos de los componentes de una solución de preservación ³⁹.

COMPONENTE	FUNCIÓN	EJEMPLO
Agentes osmóticos activos	Previenen el edema celular	Glucosa, sucrosa, manitol, lactobionato, rafinosa, citrato, gluconato
Electrolitos	Tienen un efecto osmótico	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺ , Mg ⁺
Tampón iones H ⁺	Regula la concentración extracelular H ⁺	Bicarbonato, citrato, fosfato, histidina, lactobionato, piperazina
Coloides	Previenen la expansión del espacio intersticial	Albúmina, hidroxietil-almidón
Inhibidores metabólicos	Evitan la degradación de los componentes celulares	Alopurinol, antiproteasas, clorpromazina
Metabolitos	Facilitan la regeneración de ATP	Inosina, adenosina, glutatión
Antioxidantes	Inhiben la lesión producida por los radicales libres del O ₂	Aminoesteroides, vitamina E, desferroxamina
Fármaco	Minimiza la entrada de Ca ⁺ , a la célula	Mg ⁺ , verapamilo, nifedipino, diltiazem, trifluoperazina

Minimización del edema celular inducido por hipotermia.

Las células se encuentran rodeadas por un medio líquido extracelular con una concentración alta en Na⁺ y baja en K⁺ mientras que el líquido intracelular tiene una concentración alta de K⁺ y baja de Na⁺. Esta situación iónica estable se mantiene a través de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, la cual requiere gran cantidad de la energía en forma de ATP derivada de la fosforilación oxidativa. La preservación en condiciones de hipotermia anaeróbica suprime la actividad de la bomba de Na⁺, y disminuye el potencial de la membrana plasmática, en consecuencia, las moléculas de Na⁺ y Cl⁻ entran en la célula bajo un gradiente de concentración, y al no ser bombeados al exterior, la célula se edematiza al acumularse agua en su interior arrastrada con el Na⁺. Esta tendencia al edema intracelular puede contrarrestarse añadiendo una concentración de 310 mmol/L (310 mOs/kg de fuerza osmótica) de sustancias para las que la membrana celular es impermeable, es decir, moléculas de alto peso molecular que retienen el agua en el compartimento extracelular.

Así pues, un componente clave en las soluciones de almacenamiento en frío es una concentración adecuada de sustancias impermeables osmóticamente activas como azúcares (glucosa, sacarosa, manitol) o lactobionato, rafinosa etc.

Prevención de la acidosis celular.

Una segunda consideración para la preservación en frío es la prevención de la acidosis intracelular. La isquemia, incluso en medio frío, estimula la glucólisis, la gluconeogénesis y también incrementa la producción de ácido láctico y la concentración de iones de hidrógeno. La acidosis tisular puede dañar las células e induce una inestabilidad lisosomal al activar los enzimas lisosomales. La prevención de la acidosis intracelular es un requisito importante para la correcta preservación de órganos. Un efecto tampón efectivo en las soluciones durante el almacenamiento o un pH alcalino durante la perfusión, mejoran la viabilidad del órgano.

Disminuir la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula.

La entrada de Ca^{2+} es muy dañina ya que activa las fosfolipasas que atacan a la membrana celular. Por eso se añaden sustancias bloqueantes de los canales de Ca^{2+} como el verapamilo, el nifedipino o el diltiazem.

Prevención de la expansión del espacio intersticial.

La expansión del espacio intersticial sucede durante la perfusión *in situ* y tras la extracción del injerto. El aumento del espacio intersticial comprime el sistema capilar y provoca una deficiente distribución de la solución perfundida en el parénquima.

Una solución ideal es aquella que contiene sustancias que incrementen la presión oncótica, y permita un libre intercambio de los constituyentes del líquido sin expandir el espacio intersticial.

Prevención de las lesiones por los RLO.

La alta reactividad natural de estas moléculas condiciona que su lugar de acción esté próximo al lugar de su formación, provocando entonces la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática, la desnaturalización de proteínas estructurales y de enzimas, y la fragmentación del ADN.

Por lo tanto se añaden sustancias antioxidantes con actividad "scavenger" que frena el efecto de los RLO. También se pueden añadir enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa que activan el catabolismo del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido, respectivamente. El glutatión es reducido por la enzima glutatiónperoxidasa en el proceso de detoxificación del

peróxido de hidrógeno. Otras moléculas de menor importancia con poder antioxidante son el piruvato, algunos aminoácidos, proteínas e hidratos de carbono celulares.

Suministro de sustratos energéticos.

El ATP se degrada rápidamente durante la hipotermia y los productos finales de su degradación (adenosina, iosina e hipoxantina) son permeables a la membrana plasmática. La reperfusión del órgano necesita una regeneración rápida de la actividad de la bomba de Na^+ y de otros procesos que requieren energía en forma de ATP, por esto, la disponibilidad de precursores de ATP es primordial para que la preservación del órgano sea correcta ⁴⁰.

1.3.1.2.- Soluciones de preservación:

Son diversas las soluciones que se utilizan para la preservación de órganos ⁴⁰, aunque cada una de ellas difiere sustancialmente en su composición, sus objetivos son los mismos: prevenir el edema celular, retrasar la destrucción celular y maximizar la función del órgano una vez que se restablezca la perfusión ⁴¹. Las soluciones de preservación multiorgánica que más se utilizan en el ámbito clínico en la actualidad son:

- ✚ Solución de Eurocollins: Es una solución de tipo intracelular, ligeramente hiperosmótica, que se caracteriza por su sencillez y por contener altas concentraciones de potasio, fosfato que actúa como tampón, y glucosa como agente osmótico. Su uso mejoró enormemente la preservación de órganos; en el caso de la preservación renal, permitía una buena conservación de los riñones en hipotermia desde 18 a 24h. Esta solución se utiliza actualmente en la preservación de corazón, hígado y pulmón ⁴².
- ✚ Solución de la Universidad de Wisconsin: A principios de los años ochenta Belzer diseñó la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) o solución de Belzer. Esta solución tiene una composición electrolítica de tipo intracelular, omite la glucosa y, además, contiene nuevos impermeabilizantes no metabolizables, como lactobionato y rafinosa. La solución también contiene fosfato y sulfato como tampones, adenosina como precursor para la resíntesis de ATP, y un coloide estable y efectivo para aportar presión coloidosmótica, el hidroxietil-almidón. Por último, se añaden otras sustancias con actividad antioxidante (glutación, alopurinol) y citoprotectores (magnesio, dexametasona e insulina). En la actualidad, todavía se considera que es la solución de preservación de referencia para riñón, hígado, páncreas e intestino delgado ³⁸.

- ✚ Custodiol o solución HTK: El Custodiol, solución HTK o solución de Bretschneider es una solución de preservación que está muy extendida en Europa central para la preservación cardíaca, renal, pancreática y hepática. Es una solución de tipo intracelular, prácticamente exenta de Ca^{++} y con concentraciones de Na^+ muy bajas. El Custodiol ha mostrado su eficacia en la preservación cardíaca, ya que permite prolongar la isquemia fría. En preservación renal y hepática ha mostrado resultados similares cuando se compara con la UW. A pesar de la ausencia de estudios aleatorizados y controlados, muchos grupos utilizan la solución HTK para preservar todos los órganos abdominales ⁴³.
- ✚ Solución Celsior: La solución Celsior, diseñada en 1994, tiene una formulación de tipo extracelular que combina el efecto de los sustratos metabólicos inertes de la solución de Belzer (lactobionato, manitol) y el de actividad tampón de la solución HTK. En los últimos años, ha mostrado buenos resultados en preservación cardíaca, pulmonar, hepática, pancreática, renal y de intestino delgado. ⁴³.

El interés creciente sobre la importancia en la evolución de la respuesta inflamatoria provocada por la lesión de I/R, tras el trasplante ha estimulado la investigación en el campo de la lesión por preservación y el desarrollo de nuevas soluciones de preservación, como la solución de la Universidad de Ámsterdam (Polysol), la solución IGL-1, desarrollada por un grupo de Lyon o la solución de la Universidad de Kyoto que se encuentran en fase de investigación clínica ³⁸.

1.3.1.3.- Metabolismo órgano específico

Se han observado importantes diferencias en el metabolismo del riñón, hígado y páncreas que influyen en su preservación en frío.

Como hemos visto, se necesitan sustancias impermeabilizantes para evitar el edema celular. La glucosa, el principal impermeabilizante en la solución de Collins, no es efectiva para la preservación del hígado ni del páncreas, porque rápidamente difunde hacia el interior celular de estos órganos. El manitol, otro compuesto usado como impermeabilizante, es tan permeable como la glucosa en el hígado. La acidosis celular resultado de la glicólisis anaeróbica, así como el control de la glicólisis y la producción de ácidos, son diferentes en el riñón y en el hígado. El hígado produce mayor cantidad de iones hidrógeno que el riñón por su mayor contenido en glucógeno y por la mayor permeabilidad de su membrana plasmática a la glucosa.

En cuanto a la preservación renal, hay dos métodos aplicables en el ámbito clínico: a) la conservación en frío, que sería efectiva para riñones recuperados de donantes óptimos ⁴⁴, y b) la

máquina de perfusión hipotérmica pulsátil que estaría indicada para la preservación de riñones que hayan sufrido daños por isquemia caliente o hipotensión ⁴⁴.

En estudios recientes, la máquina de perfusión reduce la incidencia, la duración y la severidad de la disfunción primaria del injerto tanto y mejora la función del injerto después del trasplante de órganos de donantes a corazón parado ⁴⁵. Sin embargo, a pesar de la evidencia de que las técnicas de preservación con máquina de perfusión hipotérmica proporcionan una mayor calidad del injerto y mayores tiempos de preservación, la técnica estándar actual es la perfusión del órgano con una solución de preservación y su almacenamiento a 4 °C durante el mínimo tiempo necesario antes del trasplante. Un argumento válido a favor de esta práctica es que proporciona aceptables resultados con un método más simple y barato que la máquina de perfusión, que requiere un instrumental caro e incómodo, así como personal adicional para hacerlo funcionar ⁴⁴.

Las soluciones de preservación más utilizadas para el riñón son Eurocollins, Wisconsin y Custodiol, que obtienen unos tiempos de preservación que oscilan en 18-30 h ⁴⁶.

1.3.2.- Rechazo del injerto

El éxito del trasplante de órganos ha mejorado significativamente en unas pocas décadas, uno de los factores que ha contribuido decisivamente al éxito de los trasplantes, ha sido la mejora de la inmunosupresión con la introducción de las terapias inmunosupresoras basadas en la interrupción de la IL-2, por los inhibidores calcineurínicos (ciclosporina y tacrolimus) ⁴⁷. Pero a pesar de los impresionantes avances con la ciclosporina y tacrolimus, el rechazo (sobre todo el crónico), la infección y la toxicidad de los fármacos obstaculizan el éxito del trasplante. Este hecho refleja la inutilidad de los regímenes inmunosupresores actuales para bloquear selectivamente la respuesta del aloinjerto mientras permanecen intactas otras defensas del huésped.

Por supuesto, el agente inmunosupresor ideal, sería aquel capaz de reducir o anular la posibilidad de un rechazo, pero sin afectar al resto de la respuesta inmune. Por desgracia este agente inmunosupresor no ha sido descubierto hasta el momento, por lo que es necesario tener en cuenta que los pacientes inmunosuprimidos presentan problemas de disminución de defensas frente a todo tipo de organismos patógenos y de desarrollo de determinados tipos de tumores.

En el trasplante renal pueden diferenciarse tres tipos de rechazo ⁴⁸:

- ✚ Rechazo hiperagudo: El rechazo hiperagudo es irreversible y es necesario realizar nefrectomía del injerto. El tejido trasplantado es rechazado en cuestión de minutos a horas debido a que la vascularización se destruye rápidamente. Los complejos antígeno-anticuerpo activan el sistema del complemento, causando trombosis masiva en los capilares, lo que impide la vascularización del injerto. Esta forma de rechazo, es poco frecuente.
- ✚ Rechazo agudo: Es el más característico de las primeras semanas o meses del trasplante. Ocurre en un 20-40% de los trasplantes de cadáveres con terapia inmunosupresora habitual. Según las estructuras involucradas, existen dos patrones de rechazo agudo: el más común es el túbulo-intersticial, que en muchas ocasiones es fácil de superar; el otro es el vascular, mucho más difícil de tratar.
- ✚ Rechazo crónico: Éste aparece en periodos más tardíos de evolución del trasplante. Hay buenas evidencias de que el mecanismo subyacente en el rechazo crónico es la histoincompatibilidad, como en el rechazo agudo.

El uso de medicamentos inmunosupresores ha aumentado la supervivencia de los aloinjertos en el primer año, pero el rechazo crónico no se puede evitar en la mayoría de los casos. En los receptores de los riñones, el rechazo crónico (llamado nefropatía crónica del injerto) se manifiesta como fibrosis y glomerulopatía.

1.3.3.- Disfunción del injerto:

La nefrona está recubierta por células epiteliales tubulares polarizadas que están altamente especializadas en el control de la excreción de agua, electrolitos, otros solutos orgánicos, y mantener el equilibrio ácido-base. Además de su papel en el control del contenido de la orina, las células epiteliales tubulares polarizadas desempeñan un papel activo en la defensa contra la infección urinaria ascendente.

La I/R severa puede causar necrosis y apoptosis de las células epiteliales tubulares polarizadas. La IRA causada por lesiones isquémicas o tóxicas a menudo se conoce como NTA, un término derivado de la apariencia histológica del riñón. Aunque la necrosis suele ser un componente menor en la histología de esta enfermedad, la disfunción renal profunda que se produce en NTA es más probable que sea causado por una desorganización celular de las células epiteliales tubulares polarizadas subletalmente dañadas, cambios en el flujo sanguíneo y

obstrucción vascular, obstrucción de los túbulos renales por los túbulos desprendidos y detritus, y la respuesta inflamatoria a la lesión hipóxica ⁴.

El trasplante de riñón está inevitablemente asociado a un período de isquemia y la reperfusión del riñón isquémico, lo que puede causar lesión celular aguda y disfunción renal ⁴⁹. Dependiendo de la gravedad de la IRA provocada por el fenómeno de I/R, entre el 20–80% de los trasplantes de riñón de donante de cadáver, necesita apoyo de diálisis temporal en la primera semana después del trasplante; esta condición se conoce como *función renal retardada* ^{50,51}. La función renal retardada complica el tratamiento de los pacientes después del trasplante de riñón con episodios de rechazo agudo que no pueden ser diagnosticados clínicamente. Además, un estudio publicado recientemente demuestra que la función renal retardada en los riñones de donantes de muerte cerebral, está independientemente asociada con un aumento del 40% en el riesgo del fracaso del injerto a largo plazo ⁵¹.

En contraste con la donación tras la muerte cerebral, los riñones de donantes después de la parada cardíaca sufren lesión isquémica caliente desde que se detiene la circulación hasta la preservación del órgano. Como resultado, la mayoría de estos riñones experimentan función renal retardada y entre un 15-25% de los riñones de donantes después de la parada cardíaca no tendrá recuperación funcional; esto se conoce como *disfunción primaria*.

La disfunción primaria después del trasplante de riñón es una complicación grave, ya que los receptores de estos riñones han estado expuestos a los riesgos de la cirugía y la inmunosupresión y pueden haberse sensibilizado con los antígenos del donante, limitando las oportunidades del retrasplante ⁵².

Los intentos de reducir la incidencia de retraso en la función del injerto en el trasplante renal, se han centrado principalmente en la mejora de la preservación hipotérmica del órgano, en la reducción de los efectos nefrotóxicos de medicamentos inmunosupresores y en la modulación del daño por I/R ⁵³.

Los resultados de supervivencia del injerto a largo plazo ⁴⁹ no han experimentado la misma mejoría que la supervivencia a corto plazo y las causas de mayor incidencia en la pérdida del injerto son la nefropatía crónica del injerto y la muerte del paciente con órgano funcionante debida a patología cardiovascular ^{54,55}.

Recientemente se ha abierto la puerta a una nueva dimensión sobre la comprensión del daño biológico en lugar del estrictamente inmunológico con respecto a los fenómenos de rechazo

crónico del injerto, que parece reflejar los resultados de ambos fenómenos: específico antígeno-dependiente y no específico antígeno-independiente. Uno de esos factores antígeno-independientes es la lesión por I/R ⁵⁶.

La viabilidad del órgano trasplantado depende de la tolerancia del injerto a la isquemia fría y al daño por I/R durante la cirugía. El daño por I/R secundario a la extracción, almacenaje y trasplante renal, afecta a la recuperación del órgano tras el trasplante y se identifica como un factor antígeno independiente del fallo del injerto. La influencia del daño por I/R sobre la función del injerto a largo plazo, no está completamente aclarada, pero si se ha comprobado que los injertos expuestos a I/R tienen aumentada su inmunogenicidad, favoreciendo de este modo el desarrollo de rechazo agudo, que es un factor de riesgo para el IRC ⁵⁷.

Además, la I/R causa una liberación de citocinas y factores de crecimiento que llevan a la rápida activación de la respuesta inflamatoria ⁵⁸. El daño por I/R es causa de los hallazgos histológicos de la NTA y de los resultados clínicamente probados del retraso de la función del injerto. El daño renal causado por el fenómeno de I/R se manifiesta por una combinación de daño glomerular y tubular que conduce a una IRA que se acompaña de altas tasas de mortalidad.

Otro de los objetivos de la modulación biológica de la IRA isquémica o NTA es reducir la incidencia de la función retardada del injerto y así incrementar sin incidentes el número de trasplantes renales utilizando órganos que hayan sufrido períodos largos de isquemia, como en parada cardíaca ⁵⁹.

La patofisiología de la disfunción primaria del injerto después de un trasplante de riñón en la clínica muestra grandes similitudes con la IRA isquémica en modelos de ratón ⁵⁰.

Dada la complejidad de su patofisiología se sigue investigando para atenuar la IRA isquémico. A pesar de los conocimientos en la patofisiología del desarrollo de IRA, los mecanismos celulares involucrados son complejos y aun no son comprendidos totalmente. Se está investigando mucho en modelos experimentales para reducir la mortalidad asociada con la IRA, pero la escasez de opciones terapéuticas para los receptores del trasplante está en agudo contraste con el crecimiento exponencial de blancos terapéuticos identificados en modelos de roedores de la IRA isquémica durante las últimas dos décadas⁵⁰, por lo que actualmente las intervenciones terapéuticas aplicables son el trasplante y la diálisis¹⁹.

Tanto en la IRA como en el IRC está involucrada la isquemia en el desarrollo del daño renal

2.- Lesión por Isquemia y Reperfusión (I/R)

La lesión por I/R es un fenómeno complejo que contribuye a la morbilidad y la mortalidad en el trasplante clínico de órganos sólidos ⁶⁰. El daño mediado por el fenómeno de I/R en el órgano trasplantado es de extraordinaria importancia en la evolución del mismo, siendo en estos momentos un aspecto del máximo interés en la investigación biomédica del trasplante. La I/R renal tiene muchas similitudes con el daño por I/R que se produce en otros órganos aunque su patofisiología difiere con relación a varios aspectos visibles en otros órganos ⁶¹⁻⁶³.

Aunque la introducción de las soluciones de preservación en la práctica clínica ha reducido la gravedad de lesiones isquémicas, la lesión por I/R todavía sigue siendo un problema importante. Durante el proceso de obtención de un órgano sólido a partir de un donante y su posterior implante en el receptor, existen etapas en las que se producen diferentes lesiones en el injerto hasta ahora inevitables: uno durante la evidente isquemia por falta de riego sanguíneo, tras la extracción del órgano y durante su preservación previa al implante, e irónicamente, también durante la reperfusión tras el implante en el receptor, cuando la sangre vuelve a circular nuevamente por el órgano elevando su temperatura y activando el metabolismo celular y otro de la respuesta inflamatoria originada, por lo tanto estudiaremos separadamente lo que ocurre durante estos períodos bien diferenciados.

2.1.-Lesión por isquemia

El término isquemia (del griego *isch*, restricción y *haema*, sangre) indica una reducción relativa o absoluta en el suministro de sangre a un órgano, que se traduce en una disminución o anulación del suministro de oxígeno.

Su impacto en el parénquima dependerá de su intensidad, de la duración, y del tipo de célula y sus necesidades metabólicas. La isquemia produce una alteración del metabolismo

celular, desencadenando modificaciones bioquímicas y moleculares complejas, pero cada vez mejor conocidas. Las alteraciones en el riñón pueden ser detectadas, a los pocos minutos de iniciarse la isquemia ⁶⁴.

La mayoría de los estudios señalan que el agotamiento de las reservas energéticas necesarias para mantener los gradientes iónicos y la homeostasis de la célula lleva a la acumulación de metabolitos tóxicos en su interior que contribuyen a la muerte celular ⁶⁵.

2.1.1.- Biología celular y molecular del daño isquémico

La isquemia inicial y posterior de privación de oxígeno, cualquiera que sea su causa, hace que disminuyan las reservas celulares de ATP, dando lugar a una serie de eventos bioquímicos.

En la célula hipóxica se produce la conversión del metabolismo celular aerobio en anaerobio, modificándolo hacia la fermentación láctica y eludiendo el ciclo de Krebs. En consecuencia, la producción anaeróbica de adenosín trifosfato (ATP), molécula energética celular esencial, es sensiblemente inferior (Figura 4).

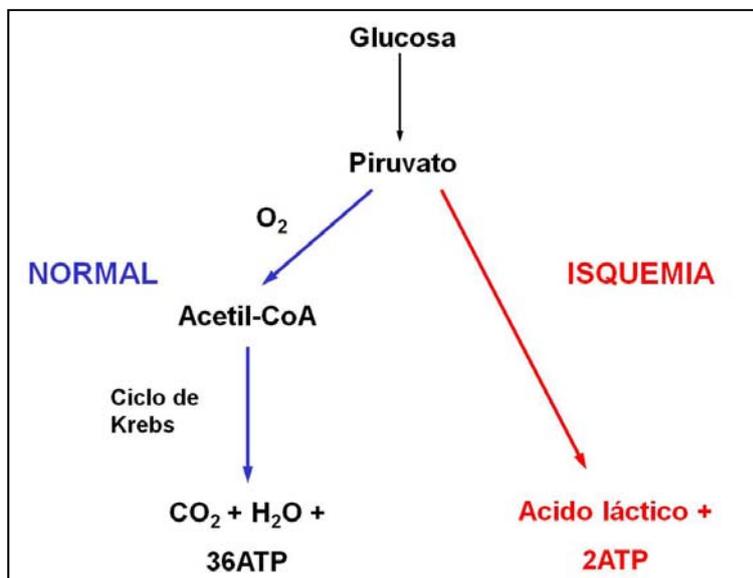


Figura 4.- Cambios metabólicos en la lesión isquémica.

La síntesis de una molécula de glucosa por fosforilación oxidativa produce 36 moléculas de ATP (36 ATP/glucosa). ⁶⁶ Sin embargo, el metabolismo anaeróbico produce una cantidad mínima de fosfatos de alta energía, insuficiente para las demandas energéticas de la célula ^{60,67}.

Enumeramos a continuación las principales consecuencias de la pérdida de ATP celular: (Figura 5)

1. Pérdida de la función de las bombas Na^+/K^+ ATPasas tanto de las membranas plasmáticas celulares y microsomales lo que provoca:
 - a. Alteraciones en el contenido electrolítico de las células
 - b. Hinchazón celular
 - c. Incremento de la concentración de Ca^{+2} libre en el citosol
 - d. Acidosis intracelular
2. Activación de determinadas enzimas
 - a. Fosfolipasas
 - b. Proteasas

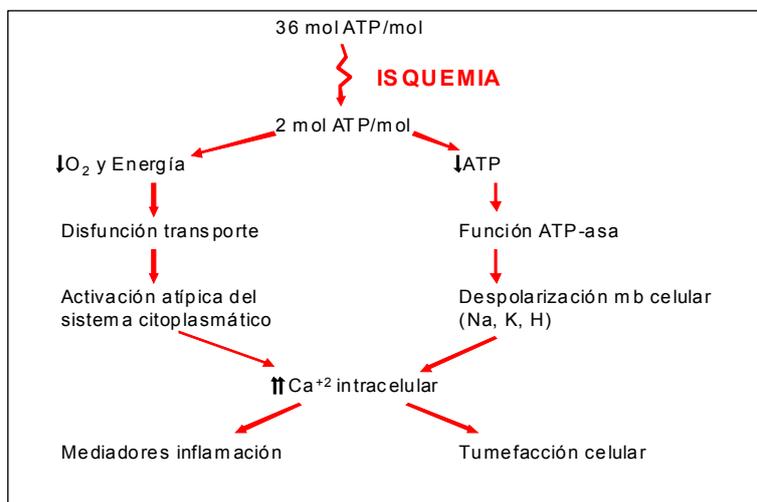


Figura 5.- La pérdida energética y la disfunción de los sistemas de transporte de la membrana conducen a la acumulación de fluido y a la tumefacción celular.

La isquemia renal da paso a una segunda fase de reperfusión, en la que paradójicamente se incrementa el daño celular por:

3. Generación de RLO
4. Reversión de la acidosis intracelular
5. Lesión inducida por los leucocitos

El déficit energético conduce a un aumento de la glucólisis con la consiguiente disminución del glucógeno y del pH, además de una disminución de la síntesis proteica; estos hechos conllevan la liberación de enzimas lisosomales citosólicas, que rompen el esqueleto celular, y de la fosfolipasa A2, que degrada los fosfolípidos de membrana, esta fosfolipasa juega un importante papel en el daño isquémico. Los ratones knockout de esta enzima tienen menos actividad de la mieloperoxidasa postreperfusión y menor liberación del ácido araquidónico ⁶⁸.

Todas estas alteraciones conducen a la producción de cambios nucleares y autodigestión proteica. (Figura 6)

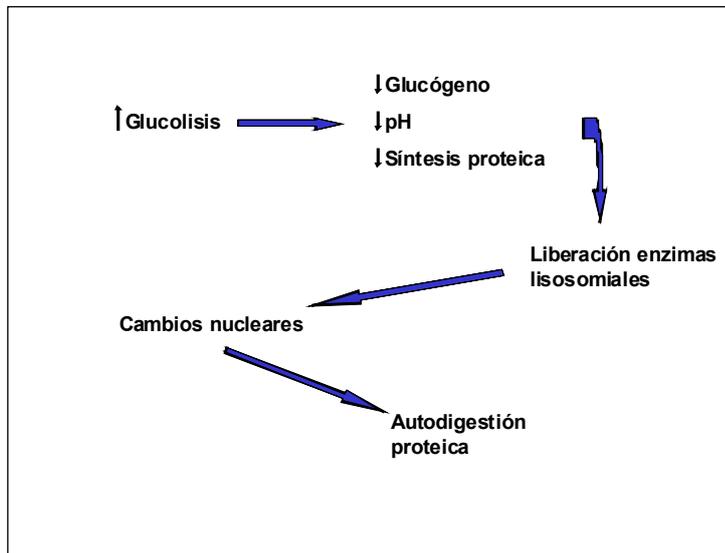


Figura 6.- Autodigestión proteica en la lesión isquémica.

Aunque no es el factor más contribuyente, el agotamiento del glucógeno detiene la glucólisis anaeróbica. Sin embargo, es más significativo, que si todavía hay glucógeno pero ya hay ausencia de ATP, la fosforilación de la fructosa 6P no se lleva a cabo y la vía de la glucólisis no se inicia.

A los pocos segundos, después de la interrupción del flujo sanguíneo, la célula consume el oxígeno que hay en la oxihemoglobina, y adapta su metabolismo para hacer la glucólisis anaeróbica, abastecida por la glucogenólisis, y que mantiene una producción mínima de ATP. Sin embargo, la demanda excede rápidamente la producción, y disminuye la concentración intracelular de ATP. La acumulación de lactato y H^+ como consecuencia de la glucólisis anaeróbica y la reducción de la oxidación de la NADPH₂ por las mitocondrias acidifica la célula y también inhibe la glucólisis anaeróbica⁶⁷.

La detención de la glucólisis debido a la deficiencia en NAD^+ conduce a la inhibición de la enzima GADPDH que tiene como resultado la acumulación de diversos intermediarios los cuales algunas son partículas osmóticamente activas como la glucosa, glucosa-6P, glucosa-1P, α -glicerol-P y productos como el lactato, el NADH, el H^+ . Esto conduce a un incremento en la osmolaridad en el interior de la célula isquémica. La hiperosmolaridad también atrae agua hacia el interior de la célula a través de la difusión simple por los canales de agua, y los canales de cloruro así como el

transportador de glucosa, y se cree que este mecanismo puede ser también responsable del edema celular isquémico.

Las ATPasas de membrana (Na^+/K^+ ATPasa), actúan lentamente durante la isquemia ⁶⁹, pero la ausencia de ATP las inhibe. De ese modo se pierde la capacidad de mantener el potencial de membrana y la excitabilidad celular para el mantenimiento del gradiente de concentración de iones Na^+ y K^+ dentro y fuera de la célula. Por lo tanto, el Na^+ entra en el citoplasma produciendo el edema celular.

Además en situaciones de isquemia los metabolitos salen fuera de la célula, y se acumulan en el espacio extracelular a menos que haya un balance entre la osmolaridad intracelular y extracelular y la permeabilidad de la membrana. El fenómeno puede llegar a tener consecuencias mayores cuando el espacio extracelular es lavado con la máquina de perfusión para la preservación del órgano, particularmente si la osmolaridad de la solución de perfusión no está incrementada. El espacio extracelular puede llegar a ser fácilmente hipotónico con formación acelerada del edema. Los resultados del edema son la desorganización de las membranas celulares, no solamente de la membrana celular externa por apertura de los canales que contrarrestan el incremento del volumen, sino también del retículo endoplasmático, aparato de Golgi, de las membranas mitocondriales y de los microtúbulos del citoesqueleto, cuyos daños son dependientes del tiempo de isquemia ⁷⁰.

La pérdida de la coordinación del ciclo metabólico y de la fosforilación lleva a la apertura del poro de transición mitocondrial (mPT). El mPT es un poro no selectivo en la membrana mitocondrial interna, que es casi impermeable bajo condiciones fisiológicas, pero se abre debido a la alta concentración de Ca^{+2} en el interior de la mitocondria.

Finalmente la reducción del ATP intracelular impide la regeneración del glutatión, ácido ascórbico y tocoferol que llevan a cabo la detoxificación de los metabolitos presentes en el citosol y en la membrana sarcoplasmática ⁷¹.

Como ya hemos dicho el déficit de oxígeno junto con el agotamiento de la energía celular, conducen a diversas alteraciones bioquímicas, como la disfunción del sistema de transporte de membrana y la activación atípica de los sistemas citoplasmáticos. La ausencia de ATP, disminuye la función de las ATPasas, que está implicada en el mantenimiento de las concentraciones iónicas dependientes de los sistemas de transporte localizados en las membranas celulares (Na^+ , K^+ , H^+ ,

Ca^{+2}) produciéndose una despolarización de la membrana y una mayor acumulación de Ca^{+2} libre intracelular que proviene principalmente de su liberación desde los depósitos intracelulares donde se halla secuestrado, mitocondrias y retículo endoplasmático ⁷², este aumento del Ca^{+2} citosólico además, se ve incrementado por la disminución de la actividad de la Ca^{+2} -ATPasa, que lo vuelve a recaptar hacia el interior de dichos depósitos. El aumento de la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$, segundo mensajero, provoca la activación de diversos sistemas enzimáticos importantes para la producción de los mediadores de la inflamación ⁷³⁻⁷⁵. (Figura 5)

La sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria causa la inhibición temprana del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena transportadora de electrones y si la isquemia se mantiene quedan afectados los complejos III (complejo citocromo bc_1) y IV (citocromo C oxidasa).

El citocromo C pierde sus uniones de la membrana mitocondrial interna y penetra en el citosol, activando la caspasa-3 durante la reperfusión. La liberación del citocromo C se lleva a cabo a través del mPT, cuya apertura está relacionada con la tumefacción de la matriz mitocondrial, con la pérdida de las crestas mitocondriales internas y ruptura de la membrana externa.

La hipercalcemia mitocondrial, secundaria a la hipercalcemia celular, induce edema mitocondrial, alteraciones en las estructuras supramoleculares (fosforilación oxidativa) localizadas en la membrana interna de la mitocondria y anula su potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). La pérdida del $\Delta\Psi_m$ va acompañada de la apertura del poro mPT en la mitocondria y es irreversible. Este amplio canal no específico deja pasar moléculas de un peso molecular de más de 15 kDa hacia la matriz mitocondrial lo cual pone en peligro la supervivencia de la mitocondria. La sobrecarga de Ca^{+2} mitocondrial es el mayor desencadenante de la apertura de los poros mPT ⁷⁶.

La inhibición de los poros mPT, atenúan el daño en estados en los que se provoca un incremento en la concentración de Ca^{+} necesaria para la apertura del poro mPT, tanto en el preconditionamiento isquémico, períodos cortos de isquemia, en isquemia seguida de reperfusión, o por intervención farmacológica. La ciclosporina es un potente inhibidor del poro mPT ⁷⁷. Se ha demostrado, que los inhibidores de los mPT, mejoran la lesión isquémica renal en diversos estudios con animales, aunque los mecanismos que confieren esta protección no están claros ⁷², y podrían incluir una mejoría en la hemodinámica renal, un efecto en la estabilización de la membrana de las células epiteliales del túbulo, y un efecto antagonista de la calmodulina, además de la prevención de la sobrecarga de Ca^{+2} en las células. Los inhibidores de mPT también han tenido resultados alentadores en NTA en humanos. La administración de los inhibidores de

mPT, tanto en los donantes como en los receptores se ha demostrado que reduce la prevalencia de IRA tras el trasplante de riñón de cadáver, sin embargo, el efecto beneficioso de los inhibidores de mPT en esta situación puede ser debido a su capacidad de atenuar la nefrotoxicidad de la ciclosporina administrada simultáneamente. Por lo tanto, el uso profiláctico de los inhibidores del poro mPT antes de un daño renal, como la isquemia fría en el trasplante de cadáver, parece ser beneficioso. Sin embargo, es poco probable que sea eficaz en la NTA establecida ⁷⁷.

En el ámbito de la membrana plasmática, y como consecuencia de las alteraciones de los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , el potencial de membrana desaparece. Debido a la elevada concentración de Cl extracelular y la presencia de elevada concentración proteica intracelular, el Cl penetra dentro de la célula con un catión (Na^+ y Ca^{2+}) arrastrando agua y el K^+ sale fuera para mantener el equilibrio iónico con el espacio intersticial. Todo ello conduce al edema celular y a la activación de enzimas, por el Ca^{2+} intracelular, como las fosfolipasas (producirá la lesión de las diferentes membranas: citoplasmática, mitocondrial, lisosomal), proteasas, ATPasas (falta de ATP) y endonucleasas (fragmentación de cromatina) por lo tanto se produce la muerte celular por citolisis ⁷⁴.

Dos importantes grupos de proteasas se activan en respuesta al incremento del Ca^{2+} intracelular; las calpains (cisteínas proteasas dependientes del Ca^{2+}) y las caspasas. Las caspasas tienen sustratos en la membrana plasmática, lisosomas, mitocondria y en el núcleo, y están involucradas en la ejecución de la apoptosis y en la muerte celular. Si se añade un inhibidor de caspasas al medio de preservación se ha demostrado que disminuye el daño hepático durante la I/R ⁷⁸.

Las vías apoptóticas más importantes en el daño isquémico son la vía extrínseca, que requiere de la activación del receptor de la membrana plasmática Fas, con señal de traducción vía FADD, y que tiene como resultado la activación de la caspasa 8. La vía intrínseca requiere de la translocación, de la proteína proapoptótica Bax, a la mitocondria, formándose poros de transición en la membrana mitocondrial para la liberación del citocromo C y la activación de la caspasa 9. La proteína proapoptótica Bax también puede ser activada por las vías dependientes de p53. La activación de Bax, en células normales, es inhibida por las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y Bcl-xL. Ambas caspasas, la 8 y la 9 activan la caspasa-3, la cual inicia la vía final de la apoptosis ⁷⁹. (Figura 7)

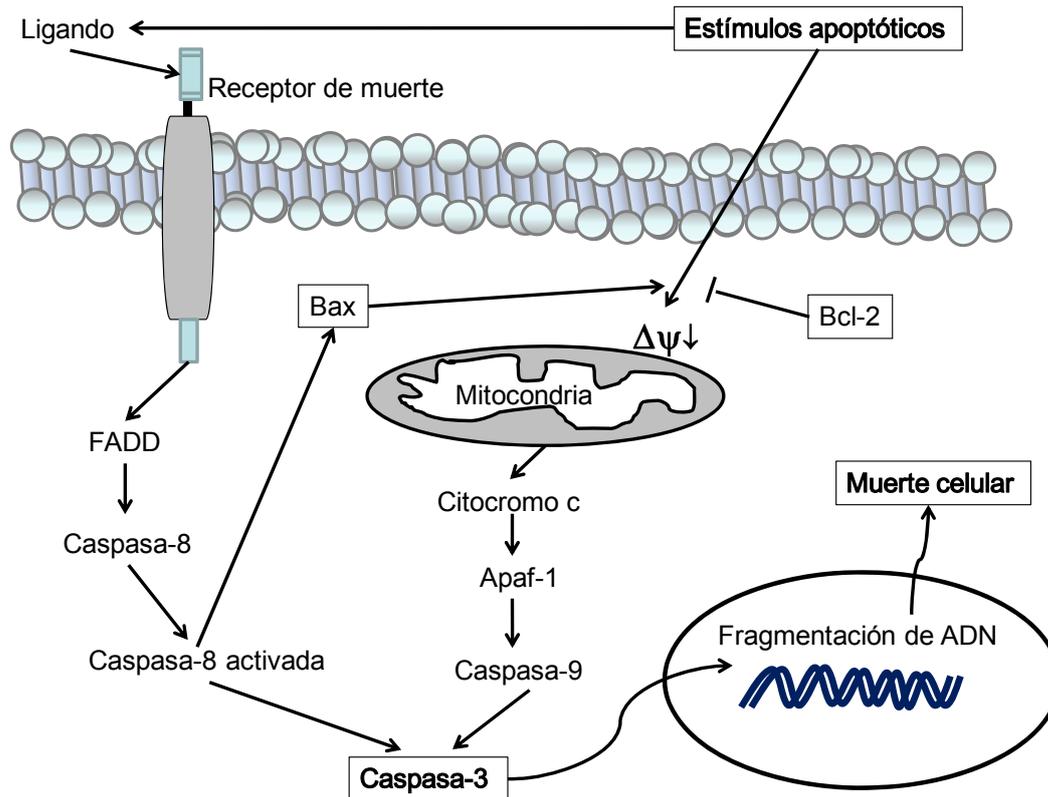


Figura 7.- Esquema de las dos vías principales que conducen a la muerte celular por apoptosis

Al mismo tiempo, la isquemia conduce a una pérdida de fosfolípidos de membrana, alteraciones en el citoesqueleto y a una acumulación de adenosina y sus productos de degradación, xantina e hipoxantina y nucleótidos de adenina. Los nucleótidos de adenina difunden libremente fuera de las células, y su ausencia imposibilita la resíntesis del ATP intracelular durante la reperfusión. Además, existe una rápida conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. En consecuencia, tanto ésta como la hipoxantina están presentes en exceso. Estas dos enzimas catalizan las mismas reacciones, la transformación de la hipoxantina en xantina y xantina en ácido úrico. Pero mientras que la primera utiliza NAD^+ como un cofactor, la segunda utiliza oxígeno y forma el anión superóxido, un RLO que se producirá masivamente durante la reperfusión ⁸⁰.

Otra fuente de RLO es el complejo III de la cadena transportadora de electrones ⁸¹. Los aniones superóxido pueden ser generados por casi todas las oxidasas de este complejo. Los RLO son lesivos para las membranas celulares, incrementándose aun más la entrada de Ca^{+2} en la célula y en las mitocondrias y activando y promoviendo liberación de un número superior de enzimas. (Figura 8)

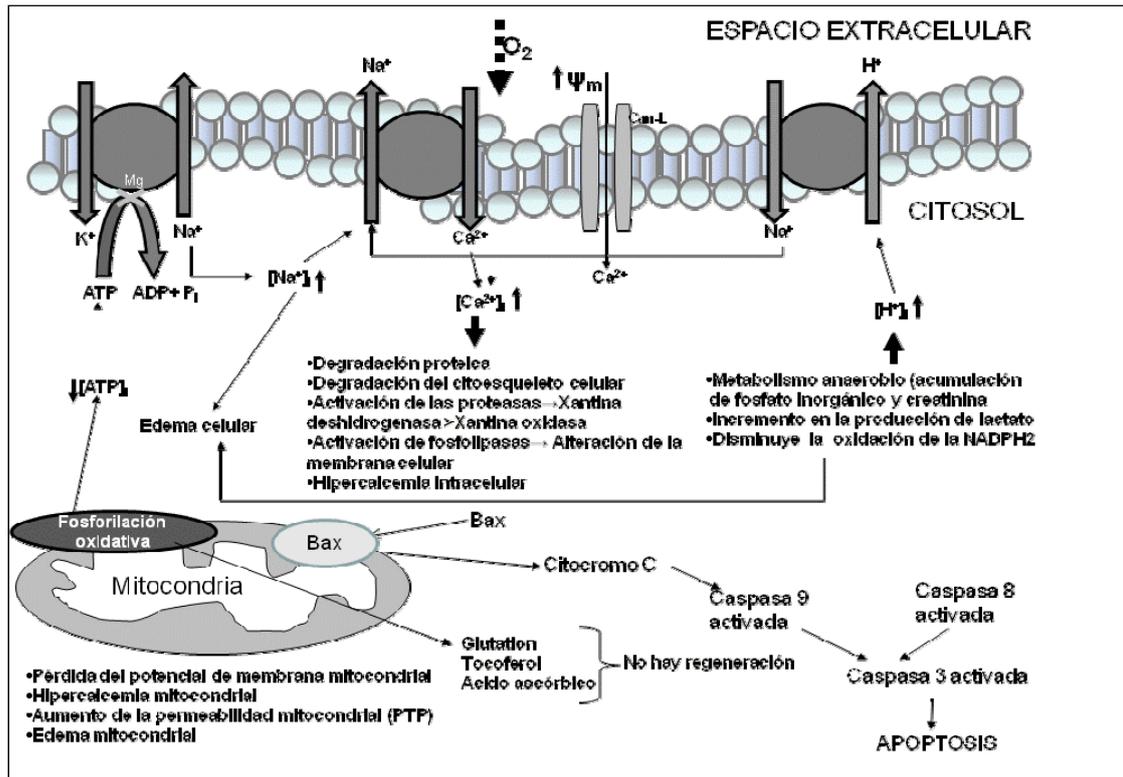


Figura 8.- La disminución en la concentración del ATP intracelular durante la isquemia afecta significativamente al metabolismo, a la homeostasis iónica y a la estructura de las proteínas en la célula. NADPH₂ (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato); Pi (fósforo inorgánico); PTP (poro de transición en la permeabilidad mitocondrial), [i] (intracelular ion concentration), ψ_m (Potencial de membrana sarcoplasmática). (Modificada de ⁶⁷)

La ruptura de la membrana citoplasmática dañada es un factor importante en la patogénesis de la lesión isquémica irreversible. Si la isquemia es lo suficientemente prolongada (más de 24 horas), el daño ocasionado será irreversible (necrosis celular) dependiendo del órgano afectado, careciendo de importancia a partir de este momento la fase de perfusión ^{65,82}.

Todas las células del tejido isquémico quedan afectadas en mayor o menor medida como consecuencia del edema. A nivel de las células endoteliales de la microcirculación, durante la reperfusión, aparece el fenómeno de "no reflujo" ⁸³, caracterizado por la imposibilidad de la reperfusión del órgano debido a la obstrucción progresiva en la microcirculación ⁸⁴ debido al hinchamiento del endotelio y a la obstrucción capilar.

Recientes trabajos utilizando técnicas de microscopía intravital ha proporcionado nuevas revelaciones sobre el papel central de las alteraciones microvasculares y el daño tubular en el riñón isquémico produciendo disfunción renal ⁶⁴. Se han propuesto muchos factores para explicar

este fenómeno, entre ellos un desequilibrio entre mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores, congestión endotelial, incremento de la permeabilidad endotelial produciendo edema intersticial que comprime los capilares peritubulares, incremento de la adherencia leucocitaria, y acumulación extravascular de leucocitos, fenómenos que dan lugar a una obstrucción de tipo mecánico al flujo. Posteriormente, durante la reperfusión, puede también exacerbarse este daño isquémico (“reflow paradox”) ⁸⁵.

El daño isquémico pasa a manifestarse por la rápida activación de una reacción inflamatoria que involucra a los RLO, los factores endoteliales y los leucocitos. Se produce una rápida sobreexpresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) en la superficie endotelial, particularmente selectinas, que rompen el equilibrio que mantiene la homeostasis en la microcirculación con la atracción, activación, adherencia y migración de neutrófilos circulantes que se unen al endotelio vascular, causando la destrucción del tejido local por la descarga de RLO, proteasas y otros mediadores de la inflamación entre los que se incluyen factores activadores de las plaquetas y leucotrienos.

Antes de ser un mecanismo de agresión, los neutrófilos son necesarios para la reparación del tejido inflamado. Los neutrófilos toman parte en la extracción de tejido necrosado en el momento de la isquemia

Tras estos eventos iniciales, la cascada de citocinas y CAMs se amplifica; los linfocitos y macrófagos infiltran al tejido trasplantado y liberan varias citocinas y otros factores. (Figura 9)

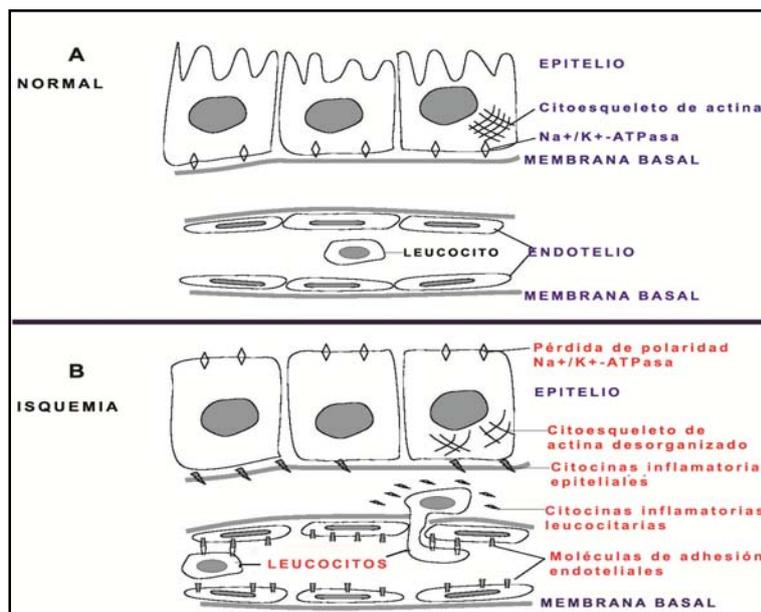


Figura 9.- El daño isquémico activa la reacción inflamatoria ⁸⁶.

Las alteraciones ultraestructurales son detectadas en el riñón isquémico muy precozmente (a los pocos minutos de iniciarse la isquemia) observándose una rápida desaparición de las microvellosidades apicales. En concreto la gama de lesiones identificadas son (Figura 10):

- disfunción endotelial y vasoconstricción renal sostenida;
- alteraciones en el citoesqueleto de las células tubulares, del volumen celular y de la dirección del transporte transmembrana;
- ruptura de las uniones entre las células tubulares y de éstas a la matriz extracelular, con la consiguiente pérdida de la permeabilidad de los túbulos;
- la organización de material de detritus en el interior y exterior de las células.⁸²

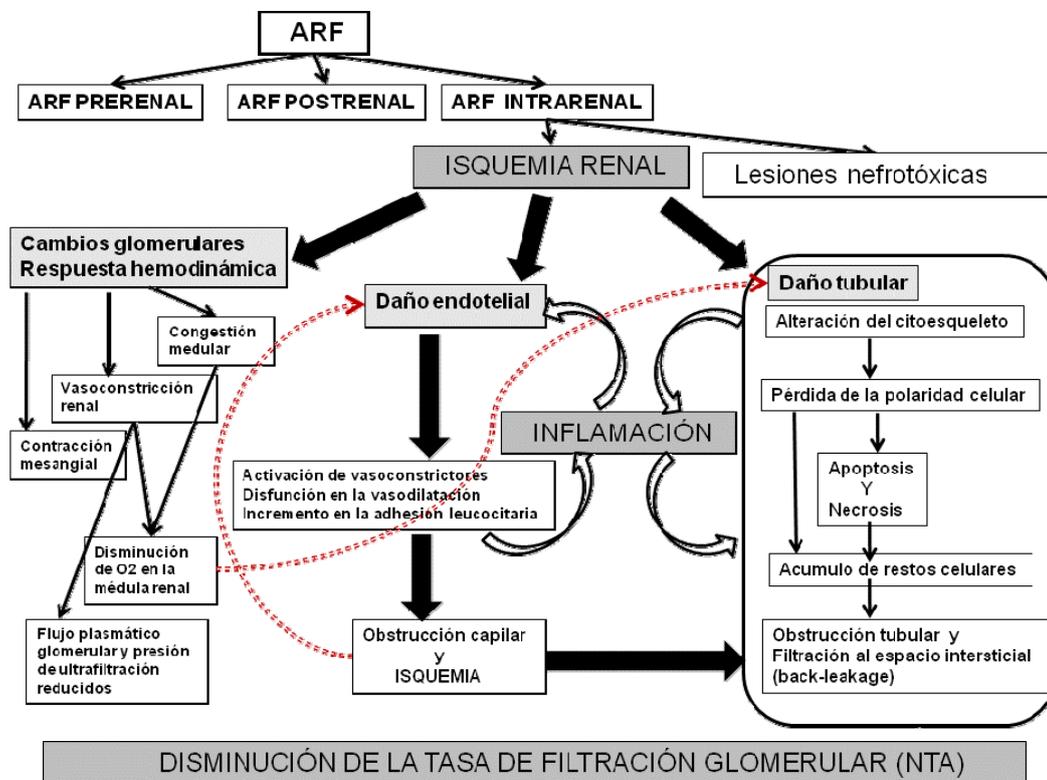


Figura 10.- Alteraciones que llevan a cabo la disminución de la tasa de filtración glomerular.

2.1.2- Alteraciones ultraestructurales en la isquemia renal (Descritas en el apartado de NTA)

- ✚ Lesión del citoesqueleto de actina
- ✚ Pérdida de polaridad celular
- ✚ Pérdida de la integridad del borde en cepillo

- ✚ Alteración de la unión entre las células tubulares y de estas a las membranas basales tubulares
- ✚ Alteración funcional de las uniones intercelulares
- ✚ Formación de cilindros intratubulares y obstrucción tubular

En resumen, la alteración en el citoesqueleto de actina puede jugar un papel importante en la obstrucción del flujo tubular y en la filtración tubular del mismo hacia el espacio intersticial, lo que contribuye de manera muy importante a la disminución del filtrado glomerular propio de la NTA

Como ya hemos comentado en el apartado de lesión por isquemia, la ausencia de ATP también activa las proteasas y fosfatasas, las cuales con la reperfusión causan daño oxidativo de las células tubulares, similar al daño en las células endoteliales de los capilares peritubulares, especialmente en la médula externa, la cual está pobremente oxigenada en condiciones normales.

Este daño oxidativo, junto con un cambio en el balance de sustancias vasoactivas y sustancias vasoconstrictoras tiene como resultado la vasoconstricción, congestión, hipoperfusión y expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) ⁷⁴.

La expresión de CAMs (Figura 9) inicia la infiltración leucocitaria, aumentada por citocinas proinflamatorias y quimiocinas generadas por las células tubulares isquémicas. Esos leucocitos obstruyen la microcirculación y liberan citocinas citotóxicas, RLO y enzimas proteolíticas las cuales producen daño en las células tubulares y NTA ⁷⁴.

2.2.-Lesión por reperfusión.

El restablecimiento del flujo sanguíneo es necesario para rescatar los tejidos isquémicos, con el fin de posibilitar la regeneración de la energía celular y la eliminación de los metabolitos tóxicos derivados de la situación de anoxia.

En cambio, la reperfusión inicia una sucesión de acontecimientos que de manera paradójica pueden prolongar la lesión tisular e incluso intensificarla ^{14,67,74,87}. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la reperfusión anóxica de los tejidos isquémicos da por resultado

poca lesión, pero en cambio, que las reacciones iniciadas durante la reperusión con oxígeno, van a ocasionar alteraciones más graves que las inducidas por la propia isquemia⁶⁵. (Figura 10)

Un mediador crucial de la lesión por I/R son los RLO en particular, el peróxido de hidrógeno⁸⁸. Los RLO se forman en los tejidos post-isquémicos por reducción química del oxígeno aportado en la reperusión⁸⁹. Una vez producidos, los RLO condicionarían por interacción con las membranas del endotelio vascular del tejido isquémico, un aumento de concentración de Ca^{2+} , que activaría una serie de proteasas no específicas y fosfolipasas (Fosfolipasa A_2); la activación de estas proteasas conduciría a la liberación de sustancias quimioatrayentes para los leucocitos que, entre otras, incluyen los metabolitos derivados de la cascada del ácido araquidónico como leucotrienos, tromboxanos y diferentes tipos de prostaglandinas^{90,91}. (Figura 11)

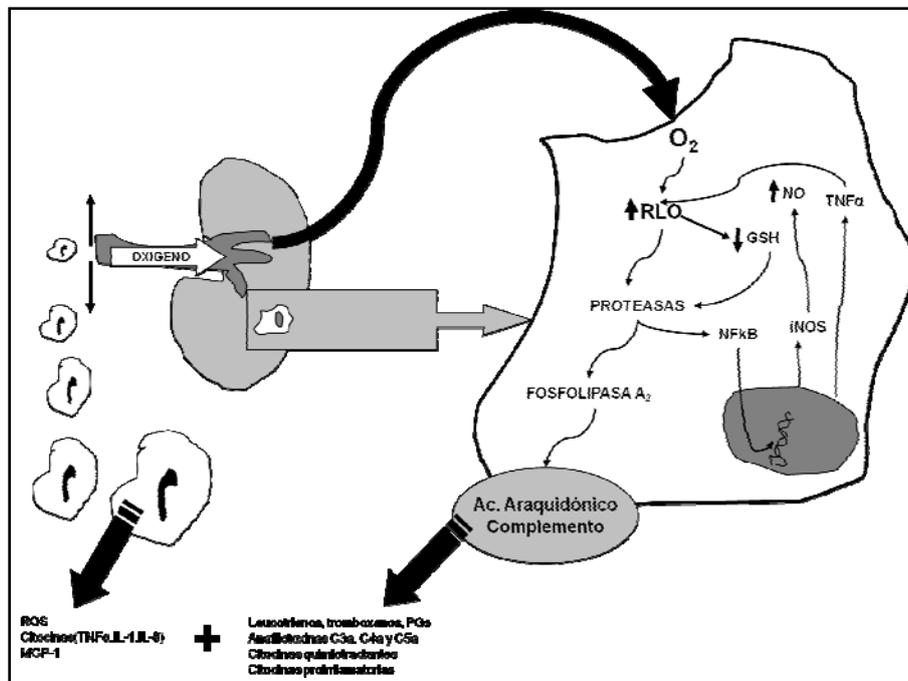


Figura 11.- Producción de RLO tras la reperusión; implicación en la producción de sustancias quimiotractantes

Por otro lado, los RLO ocasionarían una peroxidación de los lípidos de la membrana de las células con el consecuente aumento de la permeabilidad de la membrana celular. Por último los RLO, son capaces de ocasionar directamente alteraciones en los sistemas enzimáticos celulares y provocar mutaciones del DNA (Figura 12). Todo esto contribuirá al trastorno en la función celular y a su posterior necrosis, fenómeno esencial que acompaña a la reperusión de los tejidos isquémicos⁹².

Se ha comprobado cómo la actividad de la mieloperoxidasa en el tejido reperfundido, marcador de presencia neutrofílica, se intensifica más de 4 veces respecto de la fase de isquemia en modelos experimentales de I/R en distintos tejidos, incluido el riñón^{95,96}. Por otro lado, la masiva ausencia de neutrófilos del suero, el bloqueo en la producción de los radicales libres del oxígeno o el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína de membrana neutrofílica (CD18) responsable de la adhesión del leucocito al endotelio disminuyen la infiltración neutrofílica y con ello la lesión microvascular⁶⁷. También se ha demostrado que el uso de L-NAME y de anticuerpos dirigidos contra el CD-18, disminuyen la lesión. La producción de RLO parece conducir también a la activación del complemento sérico⁹⁷. Por fragmentación de la molécula de C5, origina una molécula similar a C5a (C5a-like) con la subsiguiente generación de anafilotoxinas (C3a y C5a) con acción quimiotáctica y capacidad para incrementar la permeabilidad vascular y favorecer la adherencia leucocitaria⁹⁸. De hecho, la inactivación del complemento disminuye la lesión por reperfusión en los tejidos⁹⁹.

Durante la reperfusión, la liberación de citocinas por los leucocitos activados, especialmente factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interferón- γ (IFN- γ), y la liberación del factor activador de las plaquetas (PAF), influirán en la lesión postisquémica favoreciendo la adhesión leucocito-endotelio, y multiplicarán el fenómeno inflamatorio iniciado⁸⁶. (Figura 14)

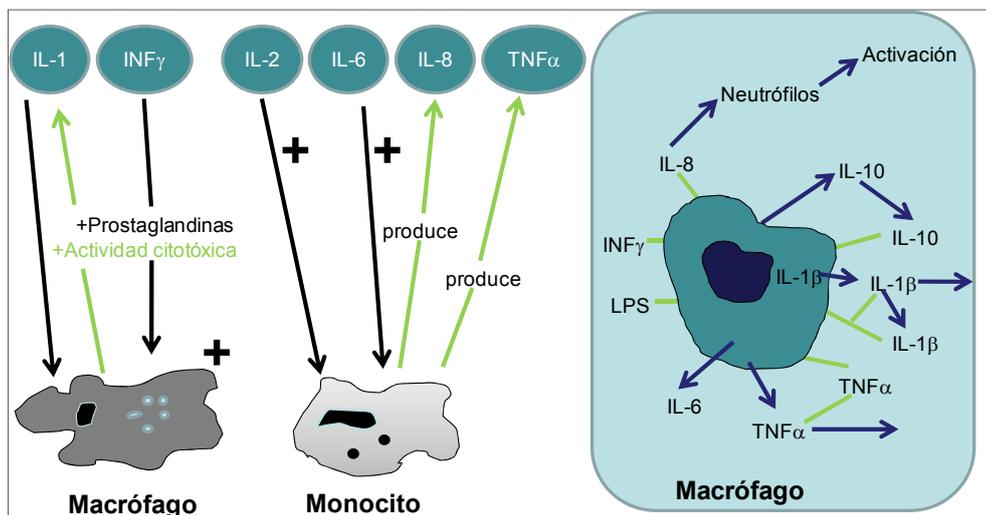


Figura 14.- Producción y efectos de las citocinas proinflamatorias.

El daño causado por la secuencia de I/R en el tejido renal se manifiesta como daño esencialmente tubular, originando una IRA con incremento de la morbi-mortalidad y está correlacionado con la incidencia de rechazo agudo en varias series clínicas.

3.-Necrosis Tubular Aguda (NTA)

La NTA es un síndrome caracterizado por pérdida de la función renal y muerte de las células túbulares del riñón.

La mayor parte de los casos de IRA intrínseca están asociados con NTA, derivado de una isquemia prolongada o lesión tóxica. Se utilizan con frecuencia sinónimos de NTA, como IRA isquémica o IRA nefrotóxica. La NTA es la causa más frecuente de IRA intrínseca, representando el 70% de los casos. Al igual que con otras causas de IRA, las complicaciones asociadas con la NTA a menudo son mortales. El índice de mortalidad de los pacientes hospitalizados con NTA es aproximadamente un 50%

La NTA se caracteriza clínicamente por IRA, y se define como una rápida (horas o días) disminución de la TFG, que conduce a la retención de los productos de desecho como la urea y la creatinina. Las diversas etiologías de IRA, como ya hemos descrito anteriormente, se pueden agrupar en tres grandes categorías: prerrenal, renal intrínseca, y posrenal. De mantenerse estas, la isquemia continuada puede terminar lesionando el parénquima renal, conduciendo a la situación de NTA isquémica. Por lo tanto la IRA prerrenal y la NTA isquémica son parte de un mismo espectro de hipoperfusión renal, que en casos extremos puede llegar a la necrosis cortical⁹.

Siendo la IRA prerrenal consecuencia de una hipoperfusión suave o moderada y la NTA de una hipoperfusión más prolongada o severa. La diferencia fundamental entre las formas prerrenales y parenquimatosas (cuyo representante más frecuente e importante es la NTA) es que debido al daño histológico que ocurre en la NTA, la insuficiencia renal no se resuelve inmediatamente al restaurar la perfusión renal, lo que sí ocurre en la IRA prerrenal, pero cuando el daño es particularmente extenso, puede desarrollarse una necrosis cortical renal bilateral y la IRA no ser reversible.

Por lo tanto, las causas de NTA son prácticamente las mismas que en la IRA prerrenal, variando únicamente la duración e intensidad de la hipoperfusión. No obstante, con frecuencia

estos casos se acompañan de otras causas de daño renal como nefrotoxinas y sepsis, por ejemplo cuando ocurre en el medio hospitalario y en especial en la UCI.

En cuanto a los productos nefrotóxicos es preciso decir que el riñón es particularmente susceptible a su acción ya que recibe el 25% del volumen cardiaco y concentra las toxinas a altos niveles en el intersticio medular por un mecanismo de contracorriente y en las células epiteliales renales mediante unos transportadores específicos. Además el potencial nefrotóxico de muchos fármacos aumenta en presencia de isquemia renal, sepsis y otras situaciones que provocan daño renal.

En algunos pacientes la administración de agentes de contraste para estudios radiológicos induce un cuadro de IRA, típicamente oligúrico, aunque muchos de ellos no llegan a necesitar diálisis. El mecanismo de producción del daño renal no es bien conocido y no existe tratamiento específico, reduciéndose este a las medidas de soporte y preventivas ⁴.

3.1.- Morfología de la NTA.

El lugar fundamental de la lesión en la NTA de origen isquémico es el segmento recto del túbulo proximal (S3), existiendo ocasionalmente lesión concomitante en la parte gruesa ascendente del asa de Henle (mTAL).

Pese al calificativo de “necrosis tubular aguda” la necrosis propiamente dicha es poco frecuente y a veces incluso está ausente. El cuadro histológico predominante es la pérdida focal de células del epitelio tubular proximal, con falta de continuidad del mismo, exposición de la membrana basal tubular y pérdida difusa del borde en cepillo de las células tubulares.

La NTA se caracteriza por la heterogeneidad en la respuesta morfológica de los diversos segmentos de la nefrona. Las células que revisten los túbulos del conducto colector dentro de la médula interna y de la rama cortical ascendente no se lesiona con frecuencia. Las células del S3 y del mTAL muestran cambios acordes con la gravedad de la lesión, la mayoría de las células están dañadas con capacidad de recuperarse por completo.

Los cambios morfológicos característicos de las células del túbulo en la NTA son:

3.1.1.- Lesión del citoesqueleto de actina.

La integridad del citoesqueleto de actina es crucial para llevar a cabo la función de las células epiteliales del túbulo renal, incluyendo el mantenimiento de la distribución asimétrica (polaridad) de las proteínas de membrana, el mantenimiento de las uniones estrechas (función de barrera), la estructura de las microvellosidades, y las interacciones célula-célula y célula-sustrato. La lesión renal isquémica tiene como resultado, entre otros, la ruptura de los microfilamentos de actina, junto con una serie de cambios celulares que impiden el mantenimiento de las funciones de las células tubulares ¹⁰⁰.

El agotamiento de ATP, altera la ultraestructura de la actina, los acúmulos de actina desaparecen de los microvillis y del polo apical, redistribuyéndose hacia el citoplasma. Estos cambios parecen indicar daño celular reversible, ya que si se restituye el nivel normal de ATP antes de que muera la célula, se da paso a una normalización en la distribución de la actina al cabo de 30 minutos, sobreviviendo la célula. Por lo tanto, la redistribución de la actina no es una manifestación de muerte celular ¹⁰¹.

3.1.2.- Pérdida de polaridad celular.

En las células tubulares renales, la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, está restringida a la porción basolateral pero, en situación de isquemia, se redistribuye a las porciones apicales celulares, en donde conserva su función; lo mismo ocurre con la distribución de esfingomielina, colesterol, fosfatilcolina y fosfatilinositol, se trasladan desde la membrana basolateral a la apical ^{75,102}.

Estos cambios de polaridad celular explican las alteraciones de reabsorción de Na^+ , agua y otros solutos que ocurren en la NTA, funciones que se restablecen después de la isquemia, de la recuperación del nivel celular de ATP y del citoesqueleto de actina, lo que conlleva una reparación definitiva de la polaridad celular ¹⁰³.

3.1.3.- Pérdida de la integridad del borde en cepillo.

De todo lo expuesto puede deducirse que el borde en cepillo de las células tubulares proximales pierde su estructura y función en condiciones isquémicas. Además los fragmentos de

epitelios dañados y desprendidos a la luz tubular, pueden obstruir la misma, al compactarse en segmentos tubulares más distales.

3.1.4.- Alteración de la unión entre las células tubulares y de estas a las membranas basales tubulares.

La unión íntima entre células tubulares adyacentes y el sustrato de la membrana basal tubular, está normalmente asegurado por las integrinas 1α , proteínas transmembrana con una localización extracelular que unen las células a la membrana basal tubular basolateral.

Una vez más el daño isquémico altera estos mecanismos de unión y anclaje celular, produciéndose el desprendimiento de las células tubulares con dos consecuencias fundamentales:

- a) Permitir la salida del filtrado glomerular al intersticio renal (back leakage)¹⁰⁴.
- b) Desprendimiento celular a la luz tubular, con posibilidad de obstrucción tubular más distal.

3.1.5.- Alteración funcional de las uniones intercelulares.

En condiciones normales, las células tubulares adyacentes están unidas firmemente entre sí por sus caras laterales, con la porción más próxima a la luz tubular impidiendo el paso directo del contenido tubular entre las células, aunque los solutos de la luz tubular pueden emplear esta vía de paso se crea un gradiente electroquímico y la sustancia en cuestión es capaz de atravesar esta unión intercelular.

El citoesqueleto de actina juega un importante papel en estas uniones. Una vez más la isquemia dañando el citoesqueleto de actina, aumenta la permeabilidad paracelular, aumentando el flujo de moléculas. Como hemos dicho antes, estos cambios son reversibles si se aumentan los niveles de ATP antes de que la célula muera.

3.1.6.- Formación de cilindros intratubulares y obstrucción tubular.

Las células epiteliales desprendidas por cualquiera de los mecanismos expuestos, muestran una tendencia a unirse entre sí o a células dañadas que permanecen unidas aún a la pared tubular. La consecuencia de ello es la obstrucción tubular típica de la NTA. Esta adherencia intercelular anormal puede estar mediada por la integrina $\alpha_1\beta_1$ expresada en las zonas apicales de las células dañadas o por sus receptores presentes en la matriz proteica. Esta interacción requiere la presencia de los motivos arginina-glicerol-asparaginasa (Arg-Gly-Asp o RGD) motivos que se encuentran en los receptores de la integrina. En NTA experimental, la administración de péptidos cortos que contienen el motivo RGD mejora significativamente la formación de cilindros y deterioro funcional, evitando la adhesión entre las células dañadas ¹⁰⁵.

La muerte de las células del túbulo letalmente dañadas se lleva a cabo a través de dos mecanismos distintos. Las células con lesiones más graves muestran una profunda disminución de los niveles de ATP y sufren necrosis. Se caracteriza por el edema celular, la alteración mitocondrial, y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, que conduce a la liberación de componentes intracelulares al espacio extracelular y la activación de una respuesta inflamatoria.

Las células menos dañadas presentan una disminución parcial del ATP, y activan las vías apoptóticas. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso que requiere energía caracterizado por activación de caspasas, la progresiva contracción celular, condensación y fragmentación nuclear, exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos, que son fagocitados rápidamente sin provocar una respuesta inflamatoria. Una serie de evidencias sugieren el papel crítico que juega la apoptosis, tanto en la IRA y la NTA experimental como en humanos ¹⁰⁶.

Después de breves períodos de isquemia renal, las células apoptóticas se hacen evidentes dentro de las primeras 24 horas de reperfusión. Una segunda concentración de células apoptóticas se ha observado durante la fase de recuperación de la IRA, cuando probablemente representa un mecanismo para la eliminación del exceso de células tras la proliferación, facilitando así la remodelación de los túbulos dañados. Los mecanismos moleculares que subyacen a la primera ola de la apoptosis son actualmente objeto de investigación intensa ya que la inhibición selectiva de estas vías puede constituir una nueva estrategia de gran alcance para la disminución de la muerte celular en NTA.

Coexistiendo con todo lo anterior, es frecuente encontrar en la pared tubular zonas de regeneración celular con citoplasmas basófilos, núcleos grandes hipercromáticos y mitosis. Esta coexistencia de lesiones destructivas y regenerativas, indica posiblemente que en el desarrollo de la NTA se suceden varios ciclos de necrosis, exfoliación y regeneración de las células epiteliales.

Algunos estudios han encontrado en los riñones con función renal retardada comparados con riñones con función renal normal, pérdida del borde en cepillo, necrosis tubular, edema celular, dilatación tubular e inflamación intersticial, mientras que otros han observado una morfología muy similar en biopsias de estos riñones en reperfusión. En general, en estas biopsias no se observa gran cantidad de necrosis de las células tubulares por lo que no se explica el gran deterioro funcional de los injertos con disfunción renal temprana. El flujo sanguíneo cortical renal tanto el total como el regional en las primeras horas y días después de la reperfusión es generalmente menor en los riñones con función renal retardada que en trasplantes funcionando inmediatamente ¹⁰⁷. Las reducciones relativamente pequeñas en el flujo sanguíneo renal mantienen tasas de filtración glomerular muy bajas en pacientes con principio de disfunción del injerto. De acuerdo con modelos matemáticos, la reducción de la TFG, es causada principalmente por una disminución en la fuerza neta de ultrafiltración glomerular. Así se ha observado en pacientes con principio de disfunción del injerto, que la diferencia de presión hidráulica glomerular transcápilar supera la presión oncótica glomerular por sólo 2 mmHg, en comparación con los 12 mmHg que se observa en pacientes con una función adecuada de los injertos ⁵⁰.

La disminución en la presión de ultrafiltración neta podría ser causada por una obstrucción tubular debido a los desechos necróticos y desechos de las células epiteliales tubulares o por vasoconstricción de las arteriolas aferentes glomerulares. La dilatación tubular, que puede ser interpretada como un incremento de la presión intraluminal debido a una obstrucción descendente, disminuye durante la primera semana de trasplante en biopsias renales de injertos en recuperación, y se mantiene constante en injertos con disfunción sostenida. Sin embargo, el número de células tubulares que han sufrido necrosis o la presencia de desechos en el lumen tubular en biopsias renales, es bajo (1-4%). Además, el número de células epiteliales necrosadas en los riñones trasplantados con función renal retardada, es muy variable y no es significativamente diferente de los pacientes trasplantados con función normal de los riñones trasplantados. Como resumen, estos resultados no apoyan la hipótesis de que la obstrucción tubular es una causa importante de disfunción renal después de la I/R. De lo comentado hasta ahora se hace evidente la disparidad entre lo poco representativo de los cambios histológicos en biopsias de riñones con función renal retardada y la gravedad de la alteración funcional ⁷⁴, lo que

sugiere la importancia de otras alteraciones funcionales,⁹ que serán estudiadas en apartados sucesivos.

3.2.- Fisiopatología del daño renal

La isquemia y la hipoperfusión provocan dos alteraciones fundamentales en el riñón: Alteraciones hemodinámicas que, a través de vasoconstricción, contracción mensangial y congestión medular, conducen a una reducción del filtrado glomerular importante y daño tubular isquémico, al cual son más sensibles la S3 y la mTAL, probablemente por sus mayores requerimientos de ATP (transporte activo de solutos muy importantes a estos niveles), y porque la zona medular externa, tiene peor aporte vascular que otras zonas renales. La NTA causa obstrucción tubular lo que permite el paso del ultrafiltrado hacia el tejido intersticial al perder el túbulo la integridad de su pared¹⁰⁸. (Figura 15)

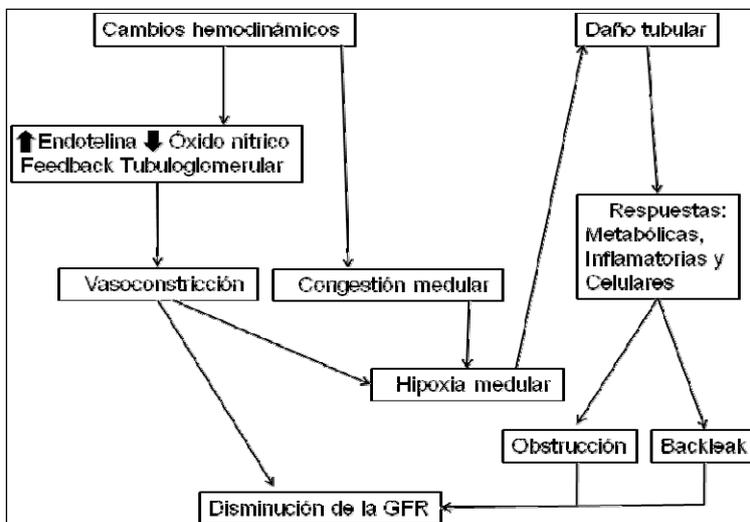


Figura 15.- Patogénesis de la NTA (cambios macrovasculares)

3.2.1.- Alteraciones hemodinámicas

Una vasoconstricción renal intensa y persistente que reduce el flujo total de sangre del riñón a aproximadamente el 50% de lo normal, se ha considerado durante mucho tiempo una

característica intrínseca de la IRA, lo que llevó a denominarla "nefropatía vasomotora" ¹³. Además, el riñón postisquémico también muestra alteraciones regionales en los patrones de distribución de flujo sanguíneo ^{82,86,95}.

Diversos estudios sugieren que las anomalías persistentes en el flujo sanguíneo intrarenal que afectan a la región medular externa pueden contribuir a la reducción de la TFG ^{82,86,95}. Los segmentos tubulares situados en la región medular externa (segmento S3 del túbulo proximal y mTAL) son particularmente vulnerables a la isquemia debido a que la presión parcial de oxígeno es baja, de 10-20 mm Hg frente a 50-60 mm Hg en la corteza, incluso en condiciones normales, y los dos segmentos tienen una alta tasa de consumo de oxígeno. En consecuencia, estos segmentos tubulares son extremadamente susceptibles a la isquemia y a las nefrotoxinas que interrumpen la producción de energía o de la función mitocondrial ⁷⁴.

Incluso después de la recuperación del flujo sanguíneo renal tanto la hipoxia como la vasoconstricción persisten en la región medular externa, dando como resultado una lesión tubular mayor. Las técnicas de imagen sofisticadas han documentado esos cambios en el flujo sanguíneo renal regional en animales con IRA y en humanos. Los mecanismos que subyacen a estas alteraciones hemodinámicas parecen basarse en un desequilibrio local de sustancias vasoactivas, con una mayor liberación de vasoconstrictores y con una significativa disminución en la cantidad de vasodilatadores ⁸⁰. Los mediadores tanto de la vasoconstricción renal como de la persistente reducción en el flujo sanguíneo medular son muy probablemente, la endotelina-1, angiotensina II, prostaglandinas, adenosina y óxido nítrico ⁸⁰.

- ✚ Se ha demostrado, en pacientes con IRA de diversas etiologías, elevados niveles de endotelina-1, un potente vasoconstrictor renal, y que los antagonistas de los receptores de endotelina mejoran la IRA experimental ¹⁰⁹.
- ✚ El papel de la angiotensina II, otro potente vasoconstrictor renal, se ha demostrado en pacientes con IRA; sin embargo, la inhibición de la angiotensina II no disminuye la extensión de la lesión renal en la IRA experimental e incluso podría acelerar la IRA en pacientes con volumen sanguíneo efectivo reducido. Esto hace que el papel de la angiotensina II en NTA en humanos sea dudoso ^{74,110}.
- ✚ La adenosina es un potente vasoconstrictor renal ¹¹¹ y se ha propuesto que juega un papel en la nefropatía de contraste. El tratamiento previo con antagonistas de los receptores de adenosina, como la teofilina, pueden amortiguar la fuerte reducción de la TFG inducida

por agentes de contraste, pero estos fármacos no son eficaces una vez establecida la NTA¹¹².

- ✚ Una disminución en los vasodilatadores renales, como el óxido nítrico derivado del endotelio (NO) y las prostaglandinas, también pueden desempeñar un papel en el inicio de la NTA, pero no hay pruebas que indiquen que la administración de cualquier mediador altere el curso de la NTA establecida. La incapacidad de los donadores de NO, como el nitroprusiato, para mejorar el curso de la IRA isquémica puede estar relacionado con los efectos tóxicos paradójicos del NO sobre las células del túbulo proximal a través de la generación de RLO, una vez que ya está establecida la NTA⁹².

Del mismo modo, tanto monóxido de carbono como compuestos liberadores de monóxido de carbono son protectores en modelos animales de IRA isquémica¹¹³, probablemente a través de la vasodilatación y la preservación del flujo sanguíneo medular, pero no han sido probadas en seres humanos. Por lo tanto, estas anomalías macro hemodinámicas no son consideradas plenamente responsables de la profunda pérdida de la función renal, y varios ensayos en humanos con vasodilatadores como la dopamina no han podido demostrar una mejoría de la TFG en la IRA establecida a pesar del aumento flujo sanguíneo renal total^{114,115}.

Sin embargo se sabe, que las alteraciones microvasculares desempeñan un papel importante, como se comentará en el apartado “3.2.4”.

3.2.2.- Alteraciones en la función tubular

En la NTA experimental y humana, están bien demostradas tres tipos de lesiones tubulares:

- ✚ Necrosis y desprendimiento del epitelio tubular, con la consiguiente obstrucción del túbulo y aumento de presión proximal a la obstrucción.
- ✚ Pérdida de integridad de la pared tubular, comunicándose la luz tubular con el intersticio.
- ✚ Escape del ultrafiltrado que circula por los túbulos al tejido intersticial.

Las alteraciones histológicas antes comentadas (áreas de necrosis tubular, pérdida celular epitelial tubular, cilindros en túbulos distales, etc), forman la base morfológica de estas alteraciones que los estudios clínicos parecen confirmar.

La obstrucción tubular contribuye a la reducción de la TFG. Se origina a partir de detritus celulares procedentes de las células tubulares dañadas y de precipitación de proteínas dejando zonas de la membrana basal desnudas ⁸⁷. Otro factor que conduce a la reducción de la TFG es la combinación de la membrana basal desnuda y la pérdida de uniones estrechas en las células del túbulo proximal que posteriormente dan lugar al retorno del ultrafiltrado urinario hacia la circulación renal (back-leakage) de diversas de sustancias, incluyendo creatinina y urea.

La activación del sistema de retroalimentación túbulo glomerular también puede contribuir a la reducción de la TFG ¹¹⁶. La activación de la retroalimentación túbulo glomerular después de una lesión isquémica podría representar un fenómeno beneficioso que limita la liberación excesiva de iones y solutos a los túbulos proximales dañados, reduciendo así la demanda de los procesos de reabsorción dependiente de ATP.

Las anomalías en la función de la célula epitelial tubular que conlleva a obstrucción y back-leakage de ultrafiltrado, pueden ser entendidas solo comprendiendo las alteraciones en la biología celular que resultan de la privación de oxígeno. (Figura16)

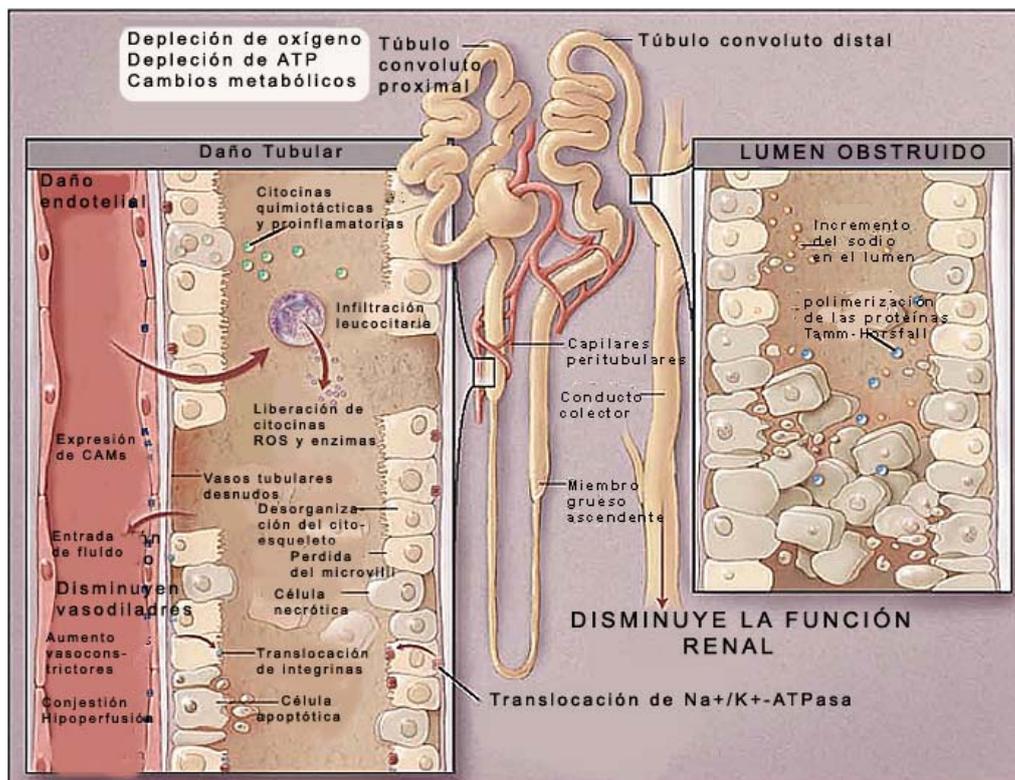


Figura 16.- Patofisiología de los mecanismos de NTA. Modificada de ⁸⁷. El daño tubular es una consecuencia directa de las vías metabólicas activadas por la isquemia pero es potenciado por la inflamación y la obstrucción microvascular.

3.2.3.- Alteraciones en el metabolismo de las células del túbulo

La disminución del contenido de ATP intracelular, se produce poco después de la lesión isquémica renal, dando lugar a un gran número de reacciones bioquímicas con consecuencias metabólicas críticas de las células del túbulo ¹¹⁷.

Enumeramos a continuación, las consecuencias principales de la ausencia de ATP y su interrelación. (Figura 17)

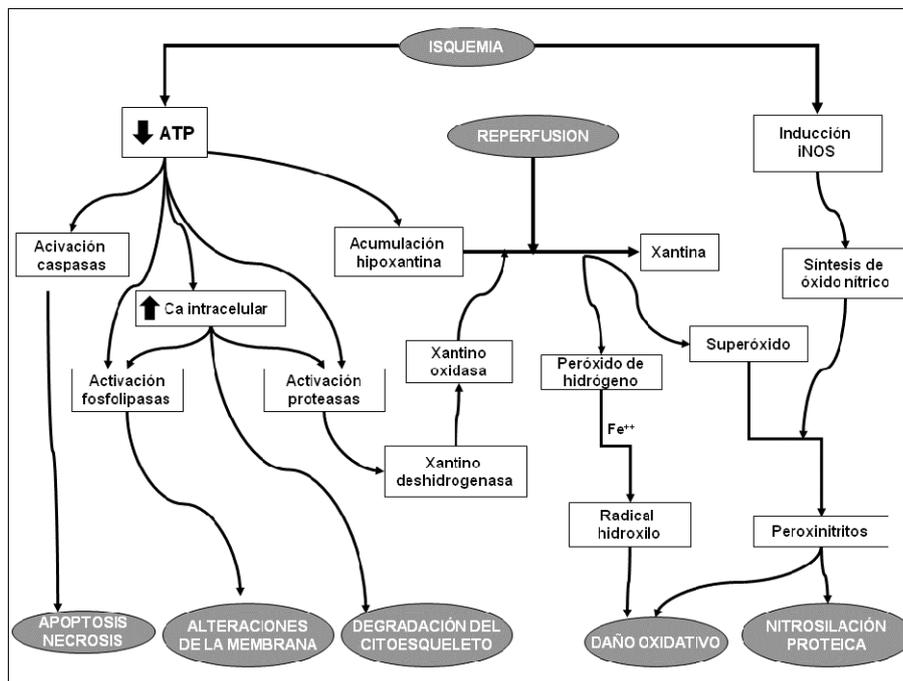


Figura 17.- Alteraciones metabólicas en las células del túbulo posterior a la NTA.

3.2.3.1.- Alteraciones en el metabolismo de nucleótidos de Adenina.

La disminución del ATP juega un papel fundamental en la lesión de las células renales. En general, el ATP celular es producido por la fosforilación oxidativa mitocondrial y por la glucólisis en el retículo endoplásmico. Las células del túbulo proximal dependen principalmente de la mitocondria para la síntesis de ATP, lo que las hace especialmente susceptibles a la ausencia de oxígeno en NTA isquémica y a las nefrotoxinas que causan daño mitocondrial. Como comentaremos posteriormente, la ausencia prolongada de ATP celular inicia una secuencia de sucesos, que incluyen, la inhibición de los mecanismos de transporte dependiente de ATP, la

activación de las proteasas y las alteraciones del citoesqueleto, con lo que la célula se hincha, lo que contribuye a aumentar la obstrucción tubular y la congestión vascular de la médula externa⁶⁷.

3.2.3.2.- Alteraciones de Ca^{+2} intracelular

Como ya hemos descrito antes (apartado “2.1.2”) el Ca^{+2} citosólico libre aumentado es recaptado por las mitocondrias, lo que provoca su hinchazón y la activación de la fosfolipasa mitocondrial, que alterará la fosforilación oxidativa¹¹⁷. Esto tiene como resultado el daño mitocondrial, la activación de las proteasas y fosfolipasas, la generación de RLO y la alteración del citoesqueleto.

3.2.3.3.- Acidosis intracelular

La acidosis intracelular resultante del daño isquémico, es en un principio beneficioso, pues protege a la célula del daño isquémico, ya que reduce el metabolismo del AMP, reduce la afinidad del Ca^{++} por la calmodulina, lo que enlentece la formación de la xantinaoxidasa y reduce la producción de los RLO. Por lo tanto, durante la fase de reperfusión, la rápida corrección del pH intracelular se convierte en perjudicial para la célula¹¹⁸.

3.2.3.4.-Generación de los RLO

Los RLO son producidos fundamentalmente por varios complejos enzimáticos:

- ✚ Xantinaoxidasa: Es una enzima que tiene capacidad de generar RLO durante la oxidación de hipoxantina a xantina.
- ✚ NADPHoxidasa: Reduce al oxígeno molecular hasta el anión superóxido.
- ✚ Mieloperoxidasa: Cataliza la formación de ácido hipocloroso, HOCl, a partir del peróxido de hidrógeno y de iones cloruro.

En el transcurso de la isquemia, y durante la reperfusión, la xantinaoxidasa utiliza el oxígeno molecular como un receptor de electrones, mientras transforma la hipoxantina a xantina y por lo tanto, genera excesivo anión superóxido y tras la interacción con el NO se producen los peroxinitritos (Figura 18). La NADPH oxidasa, la xantinaoxidasa, COX-2, iNOS, eNOS, el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la activación de la cascada del ácido araquidónico son las principales fuentes de los RLO¹¹⁹. En el tejido reperfundido solo las dos primeras parecen estar particularmente implicadas. El anión superóxido formado por la NADPH oxidasa o la xantinaoxidasa es rápidamente transformado a H_2O_2 por la superóxidodismutasa, el cual en

presencia del hierro (Fe^{2+}) o del cobre (Cu^+) se transforma en un radical hidroxilo. (Figura 18) Por lo tanto, la lesión mediada por los RLO también se encuentra asociada a condiciones de excesiva disponibilidad de Fe^{++} libre, tales como hemoglobinuria, mioglobinuria, la gentamicina y la nefrotoxicidad de cisplatino.

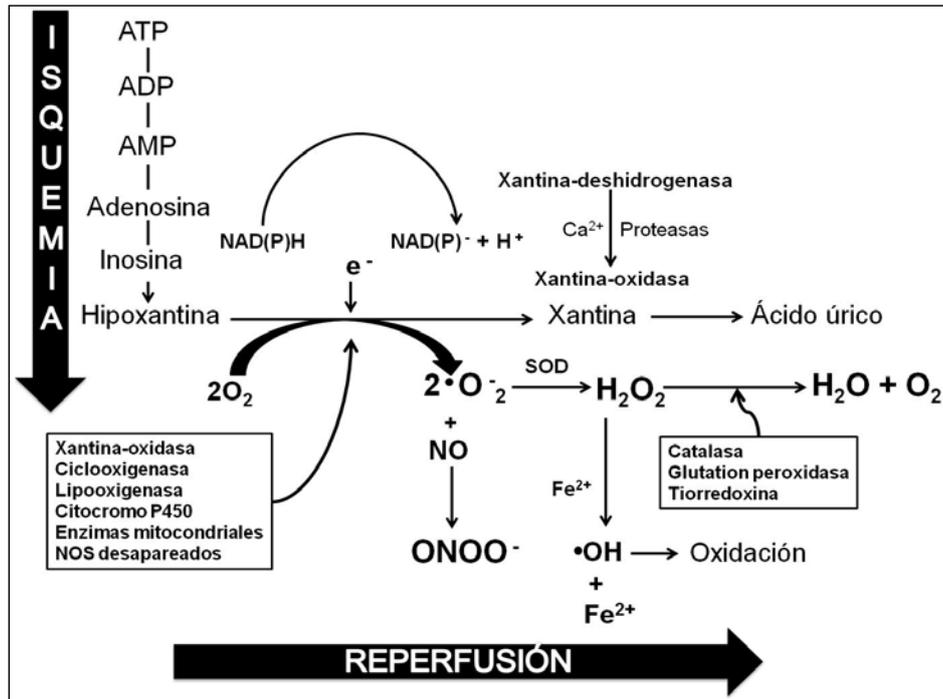


Figura 18.- Formación de O_2^- y H_2O_2 desde el O_2 en células vasculares.

Otras fuentes de RLO son las mitocondrias dañadas durante la I/R y los neutrófilos que se activan tras la I/R. Los neutrófilos, tienen en su membrana sarcoplásmica un sistema NADPHoxidasa que producen aniones superóxido en el ambiente externo. La secreción simultánea de mieloperoxidasa por exocitosis desde los gránulos azurófilos cataliza la formación del ácido hipocloroso en presencia de haluros. Los RLO producidos, entre otros, por neutrófilos y macrófagos, pueden ser liberados tras la exposición a los agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o ante la fagocitosis, y están implicados en:

- ✚ Inactivación de proteasas como la alfa-1 antitripsina que puede dar lugar a un aumento en la destrucción de los componentes estructurales tisulares, como la elastina. La inactivación puede ser debida a la oxidación de los residuos metionil en la molécula antiproteasa a sulfóxido, con pérdida de la actividad biológica.
- ✚ Lesión de las células endoteliales con aumento de la permeabilidad vascular.

- ✚ Lesión de otros tipos celulares (hematíes, células tumorales, células parenquimatosas).

El PAF, TNF- α , IL-6, IL-1 β , factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), la fracción C5a del complemento y los RLO estimulan la producción endotelial de los RLO¹²⁰. A su vez los RLO también pueden actuar como señalizadores en la transcripción molecular para regular la transcripción génica y activar factores de transcripción como NF- κ B y AP-1¹²¹ y activar a los neutrófilos, estimulando la producción de citocinas (TNF- α , IL-6, PAF y otras), la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión a la superficie del endotelio^{122,123}.

El organismo posee diferentes mecanismos, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, que lo protegen de la acción de los RLO. Los antioxidantes primarios, que previenen la formación de nuevos radicales libres son la Superoxido dismutasa (SOD mitocondrial y citosólica), Glutacion peroxidasa, la catalasa (lisosomal) y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina)¹²⁴. Los antioxidantes secundarios que son captadores no enzimáticos de RLO como la vitamina E, vitamina C, betacaroteno, ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina y los antioxidantes terciarios que reparan las moléculas dañadas por los RLO (las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa)¹²⁵. Varios estudios en animales evidencian la generación de RLO en la lesión renal por I/R y un efecto protector de los antioxidantes administrados exógenamente¹²⁶.

Queda claro que del balance en la producción de todas estas sustancias dependerá el estado final de la microcirculación y principalmente de las células endoteliales que es el principal blanco de toda la agresión¹²⁵.

3.2.4.- Alteraciones en la microvasculatura

Una de las principales funciones de la microcirculación (red de vasos que comprenden arteriolas, capilares y vénulas) es asegurar el O₂ suficiente para satisfacer la demanda metabólica de cada célula.

Hasta ahora, las investigaciones se han centrado principalmente en la lesión tubular como la principal causa de isquemia relacionada con la IRA, pero cada vez más pruebas implican en ella a las alteraciones en la microcirculación intrarenal¹²⁷ y al mantenimiento del O₂¹²⁸.

Como ya hemos comentado anteriormente los riñones son particularmente susceptibles a la lesión isquémica y una de las razones es que la microvasculatura renal, es muy compleja con una demanda muy alta de energía ⁸⁴.

A pesar de que la NTA ha sido considerada la principal causa de IRA ^{13,129}, el papel desempeñado por la disfunción microvascular ha generado un gran interés. El endotelio juega un importante papel en el desarrollo de la disfunción microvascular y por lo tanto en la IRA isquémica ⁹².

La reperfusión después de la lesión isquémica, tiene como resultado la recuperación incompleta del flujo sanguíneo renal. Esta reducción persistente de flujo sanguíneo total y regional ¹³⁰ fue descrito hace varias décadas como el fenómeno de “no-reflujo” ¹³¹.

Trabajos recientes utilizando técnicas de microscopía intravital han proporcionado nuevos conocimientos sobre el papel de las alteraciones microvasculares y daño tubular en la lesión renal isquémica que conducen a la disfunción renal ⁸⁴. Se han propuesto muchos factores para explicar este fenómeno, entre ellos un desequilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores, congestión endotelial, aumento de la permeabilidad endotelial que conduce al edema intersticial que comprime los capilares peritubulares, incrementando la adherencia leucocitaria y la acumulación extravascular de los leucocitos ¹³².

La mayoría de los vasos rectos descendentes que suministran sangre a la médula surgen de las arteriolas eferentes de los glomérulos yuxtamedulares. Las células musculares lisas vasculares (incluyendo pericitos) en torno a estos vasos rectos descendentes tienen propiedades vasoconstrictoras. Por lo tanto la modulación del tono vascular de las arteriolas aferentes y eferentes y del vaso recto descendente contribuye a la regulación del suministro renal de O₂ y del flujo sanguíneo medular, respectivamente.

En estudios de trasplante renal en animales y humanos, utilizando técnicas de análisis de imagen, muestran la fisiopatología de la lesión por I/R mostrando signos morfológicos de daño vascular y ausencia de flujo tanto en capilares peri tubulares como glomerulares ¹⁰⁷.

La ruptura de las uniones de las células endoteliales, las alteraciones del glicocalix endotelial y del citoesqueleto de actina endotelial aparece en el IRA, y esto conduce a un incremento de la permeabilidad microcirculatoria y al edema intersticial ¹³³. Como la hinchazón de las células endoteliales, la activación de la vía de coagulación y el consiguiente acúmulo de eritrocitos tiene como resultado la obstrucción del lumen microvascular. Estas alteraciones

morfológicas de la arquitectura microcirculatoria y la falta de perfusión a nivel microcirculatorio afecta al suministro de O_2 a las células y promueve el daño del órgano ¹³⁴. (Figura 19)

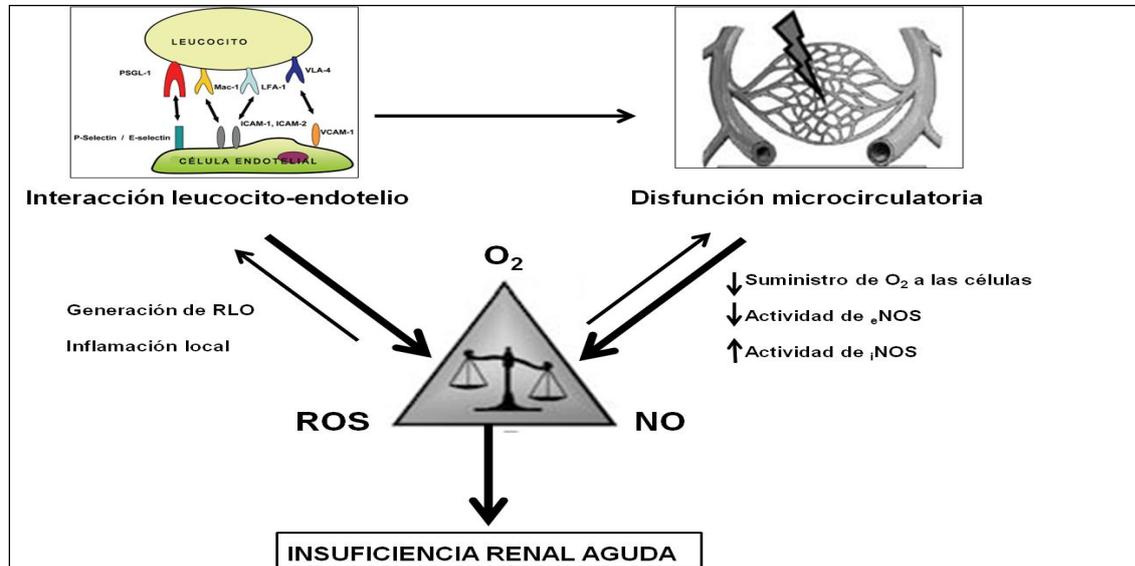


Figura 19.- Relación entre la microcirculación y la inflamación en el desarrollo de la IRA

El endotelio juega un papel clave en la regulación del flujo, permeabilidad, tráfico celular, señalización y funciones inmunológicas. En este contexto, la disfunción endotelial se define como vasorelajación alterada en respuesta a los vasodilatadores dependientes del endotelio, tales como la Acetilcolina (ACh). Esta disfunción endotelial se ha demostrado que participa en la vasoconstricción postisquémica tras la reperfusión. Asimismo, la disfunción endotelial produce la adhesión de plaquetas al endotelio, con la consiguiente adhesión leucocitaria, y la adhesión de plaquetas a neutrófilos, llevando a un estrechamiento de la luz de los capilares peritubulares ¹³⁵. Aunque el mecanismo de esta disfunción no está claro, parece ser que el NO juega un papel principal ¹³⁶. El NO es conocido por su papel en la regulación del tono vascular, actuando sobre las células del músculo liso vasculares para inducir vasodilatación. El sistema del NO está gravemente alterado en IRA ¹³⁶. El NO derivado de la eNOS, es esencial para mantener el suministro de O_2 renal. Actúa de forma paracrina, sobre las células circundantes y previene de la disfunción vascular por un efecto directo de vasodilatación, y por inhibición tanto de la agregación plaquetaria como de la activación de los leucocitos. Además, los inhibidores no selectivos de eNOS exacerbaban el daño isquémico en el órgano ¹³⁷.

Por otra parte, la activación de iNOS inducida por la isquemia, principalmente en los leucocitos, células vasculares lisas y en las células epiteliales tubulares, participan en la disfunción

vascular. La inhibición selectiva de la síntesis de NO por la iNOS puede prevenir la lesión renal tras la I/R. Las dos vías principales de daño provocado por la síntesis de NO derivado de la iNOS se piensa que son; la inhibición de la síntesis de NO por la eNOS y la formación de RLO como peroxinitritos¹³⁷. Además, hay una interacción entre el sistema de NO y el estrés oxidativo ya que el anión superóxido se une rápidamente con el NO y da como resultado una disminución en la disponibilidad del NO y un aumento en la producción de peroxinitritos dañinos para la célula¹²¹. De hecho, la unión del NO al anión superóxido parece ser el responsable de la disminución en la vasorelajación provocada por el NO después de la I/R¹³⁸. Diversas estrategias de uso de antioxidantes, como el tempol, han demostrado producir efectos beneficiosos en IRA.

Los RLO ejercen daño directamente sobre el endotelio a través de las estructuras extracelulares como las membranas celulares y glicocalix. Los RLO también pueden perjudicar mediante la vasoreactividad dependiente del endotelio. Además, los RLO median la acción vasoconstrictora de otros agonistas como endotelina-1¹³⁹.

La activación de la inflamación es muy importante tanto en el inicio como en la extensión del daño en IRA. Es evidente que la disfunción microcirculatoria interacciona con la respuesta inflamatoria a través de las lesiones hipóxicas resultante de la disminución de flujo microcirculatorio. Numerosos estudios en modelos animales han demostrado que la lesión endotelial inducida por la isquemia aumenta la expresión endotelial de CAMs que incrementan la adherencia de leucocitos; el primer paso es el proceso de diapédesis que conduce a la infiltración en el tejido¹⁴⁰.

La adhesión de los leucocitos al endotelio es mediada por las selectinas cuyo bloqueo ha demostrado atenuar la lesión de I/R. La E-selectina, inducida específicamente sobre el endotelio bajo estimulación inflamatoria, ha demostrado desempeñar un papel importante en la extravasación de leucocitos a sitios inflamatorios¹⁴¹. La ICAM-1 parece ser particularmente importante en la adhesión firme y en la migración transendotelial de leucocitos.

La fractalquina, es una quimiocina expresada en el endotelio lesionado, y actúa como una molécula quimioatrayente y de adherencia y se ha demostrado que su inhibición protege de la lesión renal, principalmente a través de la ausencia de macrófagos¹⁴².

La vía de coestimulación B7-CD28 es otro ejemplo del importante papel del endotelio en el incremento de la respuesta inflamatoria: B7-1 se expresa en las células endoteliales e interactúa con CD28 expresada en células T activadas y monocitos a nivel del vaso recto ascendente de la circulación medular.

La contribución relativa de los neutrófilos, monocitos y linfocitos en el daño y disfunción renal inducida por la isquemia sigue siendo un tema de debate. La infiltración neutrofílica se cree que ocurre de manera temprana en el curso de la IRA isquémica, considerando que los macrófagos y linfocitos T se infiltran más tarde y persisten en la fase de recuperación. Este punto de vista ha sido cuestionado recientemente con la observación de infiltración de células T en el inicio de la IRA. Más detalles pueden encontrarse en las revisiones dedicados a este tema ¹⁴³.

También se ha demostrado que la activación de las moléculas de adhesión se asocia con cambios en el glicocalix, recubrimiento la superficie luminal de los capilares y teniendo un impacto significativo en la hemodinámica, coagulación, inflamación y permeabilidad vascular. La membrana basal vascular se compone de varios componentes, incluido proteoglicanos tales como heparina sulfato, los cuales son conocidos por su capacidad para unir proteínas importantes para la respuesta inflamatoria, incluida la L-selectina expresada en leucocitos activados y monocitos quimioatrayentes proteína-1 (MCP-1), expresado en monocitos activados ¹⁴⁴.

3.3.- Fases de la NTA

El curso clínico de la necrosis tubular aguda puede ser dividido en tres fases: Iniciación, mantenimiento y recuperación. Cada una de ellas tiene unas características fisiopatológicas propias.

3.3.1.- Fase de inicio

Es el periodo de tiempo que media desde la exposición al agente etiológico y comienzo del daño parenquimatoso, que aún no está establecido. Durante este periodo, que dura horas o días, la NTA puede aún evitarse, especialmente si se restaura el flujo sanguíneo renal cuando la causa es isquémica. La tasa de filtración glomerular desciende debido a la caída del flujo sanguíneo renal y de la presión de ultrafiltración glomerular. Así mismo intervienen la pérdida de integridad del epitelio tubular, lo que origina fuga del líquido filtrado glomerular al intersticio, y la obstrucción al paso de la orina en los tubulos obstruidos por las células tubulares dañadas. Como

se ha comentado, la porción terminal del tubulo proximal (segmento S3 o *pars recta*) y la porción medular de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, son los segmentos de la nefrona mas vulnerables a la isquemia debido a que ambas tienen una alta tasa de transporte activo de solutos, que es ATP dependiente, y por tanto también un elevado consumo de oxígeno. Además ambas están localizadas en la parte externa de la medula renal que es una zona relativamente hipóxica comparada con otras regiones del riñón, incluso en condiciones basales¹⁴⁵.

3.3.2.- Fase de mantenimiento

Durante la fase de mantenimiento, las lesiones del túbulo renal están establecidas, la TFG se estabiliza en un nivel muy por debajo de lo normal, y la producción de orina es baja o ausente. A pesar de que la oliguria (o anuria) es una de las señales clínicas de NTA, en algunos pacientes con NTA no se produce y se denomina NTA no oligúrica. La IRA producida por nefrotoxinas es típicamente no oligúrica. La segunda fase de la NTA suele durar 1-2 semanas pero puede extenderse hasta unos pocos meses. Durante esta fase, es cuando aparecen las complicaciones urémicas. No se conoce con exactitud porqué la tasa de filtrado glomerular permanece baja a pesar de que se corrija la causa del fracaso renal (por ejemplo se establezca la situación hemodinámica). Posiblemente intervengan varios mecanismos ya mencionados entre los que se incluyen la vasoconstricción renal persistente y la isquemia medular desencadenada por una alteración en el equilibrio entre mediadores vasoactivos por las células endoteliales dañadas, congestión de los vasos sanguíneos medulares y lesión por reperfusión, provocada por mediadores liberados desde los leucocitos o desde otras células del parenquima renal^{82,86,95}.

3.3.3.- Fase de recuperación

La fase de recuperación de NTA se caracteriza por poliuria y por una normalización gradual de la tasa de filtración glomerular, sin embargo, cuando se produce NTA, como ocurre a menudo, en un contexto de disfunción multiorgánica, la regeneración del tejido renal puede verse gravemente afectada y la función renal no volvería a recuperarse. La morbi-mortalidad en este tipo de situaciones sigue siendo alta a pesar de los significativos avances científicos y tecnológicos.

En ausencia de fallo multiorgánico, la mayoría de los pacientes con NTA recuperan la función renal. La fase de recuperación consiste en la restitución de la polaridad celular y la integridad de la unión estrecha en las células dañadas, la eliminación de células tubulares por apoptosis, eliminación de cilindros intratubulares mediante el restablecimiento del flujo de líquido tubular, y la regeneración de las células epiteliales renales. Después de la I/R, una marcada sobreexpresión de numerosos genes juega un papel importante en la proliferación de las células del túbulo renal, entre los que destacamos los factores de crecimiento, (EGF, IGF-1, FGF, y HGF). En animales, la administración exógena de varios de estos factores de crecimiento han demostrado buena eficacia en la recuperación de la IRA isquémica; sin embargo, en un único ensayo en seres humanos, el IGF-1 no ha demostrado ser beneficioso cuando se administra a los adultos con IRA de diversas etiologías⁸⁷.

4.- Endotelio

El endotelio vascular, es un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo. Lejos de ser sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos, es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. El endotelio está estratégicamente situado y lo constituye una monocapa de células endoteliales, que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos del árbol vascular (endocardio, arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas), cubierto por el glicocalix y subyacente a la membrana basal. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, algunas de las cuales tienen funciones antagónicas como vasodilatadores y vasoconstrictores o hemostáticos y antihemostáticos. (Tabla III)

Las sustancias liberadas, a través de efectos autocrinos (sobre la misma célula que las produjo) o paracrinos (sobre diversas células vecinas), determinan la participación activa del endotelio en la homeostasis vascular. Fisiológicamente, las diversas funciones que cumple el endotelio no son más que la expresión del balance en las acciones de los distintos principios activos que produce.

Respecto a su actividad metabólica se comporta como secretor, implicado en numerosos mecanismos bioquímicos y fisiológicos, incluyendo: regulación del tono vascular, adhesión y transferencia de leucocitos en la inflamación, protección local de los tejidos en situaciones de isquemia, regulación del crecimiento de las células musculares lisas, así como productor y regulador de la matriz extracelular.

Teniendo un origen común, las células endoteliales presentan diferentes fenotipos con especializaciones según el territorio u órgano por el que discurren. Su participación directa en la protección del funcionalismo vascular viene mediada por su capacidad de segregar metabolitos extremadamente activos y antagónicos, como el óxido nítrico y la endotelina para la regulación de la contracción de las células musculares lisas, o la de activadores de la fibrinólisis como el t-PA o el u-PA y de su inhibidor el PAI-1, que controlan la fibrinólisis^{109,113}.

Tabla III.- Principios activos del endotelio vascular

PRINCIPIOS ACTIVOS DEL ENDOTELIO VASCULAR	
Antihemostáticos	Trombomodulina Proteína C Proteína S Activador tisular de plasminógeno Prostaciclina(PGI ₂) Óxido nítrico Heparansulfatos
Hemostáticos	Factor de von Willebrand Factor V Factor III (tisular) Inhibidor del activador de plasminógeno Tromboxano A ₂
Vasodilatadores	Óxido nítrico Prostaciclina (PGI ₂) EDHF (factor hiperpolarizante derivado del endotelio) CNP
Vasoconstrictores	Endotelina Angiotensina II Tromboxano A ₂ Anión superóxido
Promotores de crecimiento	Endotelina Angiotensina II VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) PDGF (Platelet Derived GF) bFGF (Fibroblast GF Basic) Anión superóxido
Inhibidores de crecimiento	Óxido nítrico Heparansulfatos TGF-β (Transforming GF-β)
Inmunológicos	E-selectina. P-selectina ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) Interleucinas 1, 6, 18 NF-κB TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

El resultado neto de ese balance muestra que el endotelio disminuye el tono vascular, debido a que relaja el músculo liso de la pared del vaso, y es inhibidor de la proliferación de ese tejido, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, deprime la activación del sistema de coagulación, estimula la fibrinólisis, disminuye la permeabilidad capilar e inhibe la adhesión y migración de neutrófilos y macrófagos generadores de inflamación. (Figura 20)

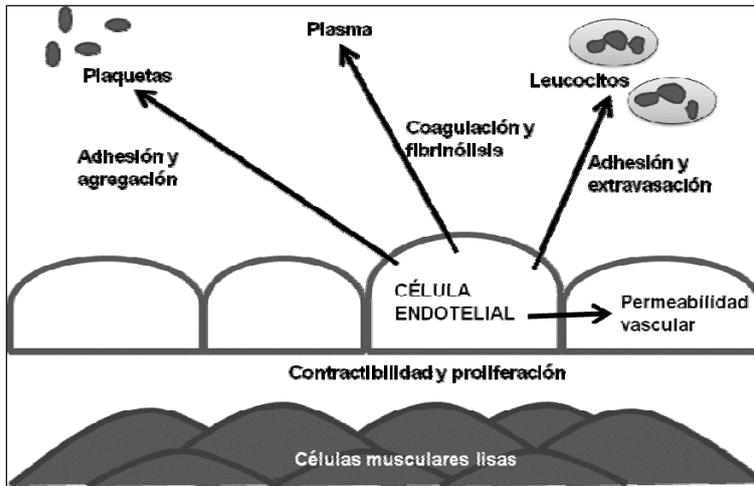


Figura 20.- Funciones del endotelio vascular

Los daños estructurales tanto de las células del músculo liso vascular como de la endoteliales se producen rápidamente después del daño isquémico ¹⁴⁶. Las células del endotelio vascular renal inician la respuesta inflamatoria en el riñón dañado debido a su contacto directo con los agentes lesivos ⁸². Morfológicamente, la desorganización del citoesqueleto de actina y los complejos de unión en el endotelio son similares a los previamente descritos en las células epiteliales tubulares ¹⁴⁶.

4.1.- Disfunción endotelial

El término disfunción endotelial indica que, ya sea en condiciones basales o posterior a la estimulación, el endotelio no cumple apropiadamente sus funciones ¹⁴⁷. Una menor disponibilidad de NO, una alteración en la producción de prostanoides (incluyendo prostaciclina, tromboxano-A2 y/o isoprostanos), un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio, así como una mayor liberación de endotelina-1, pueden individualmente o asociados contribuir a la disfunción endotelial. Sin embargo, la menor disponibilidad de NO, constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial. La alteración de la función endotelial, que se manifiesta por el desorden del control del tono vasomotor, está presente, tanto en grandes arterias y venas como en la microvasculatura ¹⁴⁸.

La ausencia de la respuesta relajante mediada por NO, se manifiesta también en un aumento de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a diversos vasoconstrictores

como, endotelina, serotonina y noradrenalina. Si bien el deterioro de la relajación vascular dependiente del endotelio es un marcador de disfunción, la menor disponibilidad de NO también genera un endotelio con efectos pro-inflamatorios, pro-trombóticos y pro-coagulantes.

Esto hace que la disminución de la vasodilatación mediada por flujo o por acetilcolina se encuentre asociada con el aumento de marcadores plasmáticos de disfunción endotelial, como el factor de von Willebrand y CAMs endoteliales. El incremento de células endoteliales circulantes parece ser una manifestación de daño endotelial severo ¹⁴⁹.

La comprensión de las vías exactas involucradas en la isquemia renal y la disfunción de las células endoteliales tras I/R sigue siendo muy incompleta. Cabe destacar que, aunque a menudo es descrito como un órgano, el endotelio no puede ser visto como una estructura homogénea. De hecho, las células endoteliales se diferencian en estructura y función en diferentes sitios del árbol vascular y demuestran diversas respuestas a los estímulos de hipoxia. Debido a esta heterogeneidad del endotelio y la amplia gama de tejidos sometidos a la presión de O₂, a través del riñón, las células endoteliales en las diferentes regiones del riñón es probable que muestren diferentes niveles de susceptibilidad a la lesión isquémica o hipóxica. La administración sistémica o intrarenal de células endoteliales completamente diferenciadas en riñones de rata postisquémicos producen una protección funcional importante. También se ha logrado una mejoría importante administrando células que expresan óxido nítrico sintasa endotelial. Sin embargo el daño isquémico lleva a la expresión de un factor antiangiogénico que es la angiostatina que induce apoptosis de las células endoteliales ¹⁵⁰. Algunos estudios proponen el uso de agentes proangiogénicos que puedan incrementar la reserva o la movilización de células progenitoras endoteliales, como la eritropoyetina, factor de crecimiento endotelial vascular y estatinas ⁸⁰.

Después de la I/R renal se producen complejas interacciones entre lesión tubular, lesiones microvasculares, e inflamación. Como consecuencia del daño por I/R, se produce la muerte de las células endoteliales, y los sitios del endotelio de los capilares peritubulares que han quedado desnudos son propensos a prolongar la vasoconstricción ⁸². Debido a la desorganización en la integridad del endotelio se produce una disfunción como barrera, ya que las uniones celulares desaparecen, esta desintegración endotelial incrementa la permeabilidad vascular y la infiltración leucocitaria hacia el parénquima renal. La lesión endotelial conduce a una vasoconstricción intensa, sedimentación microvascular y congestión microvascular mediante los leucocitos. Los leucocitos activados producen una serie de mediadores inflamatorios y de RLO que potencian el

daño celular tubular. Además, las células del túbulo van a llevar a cabo una respuesta mayor, mediante la generación de citocinas y quimiocinas que amplifican aún más la inflamación (Figura 21)

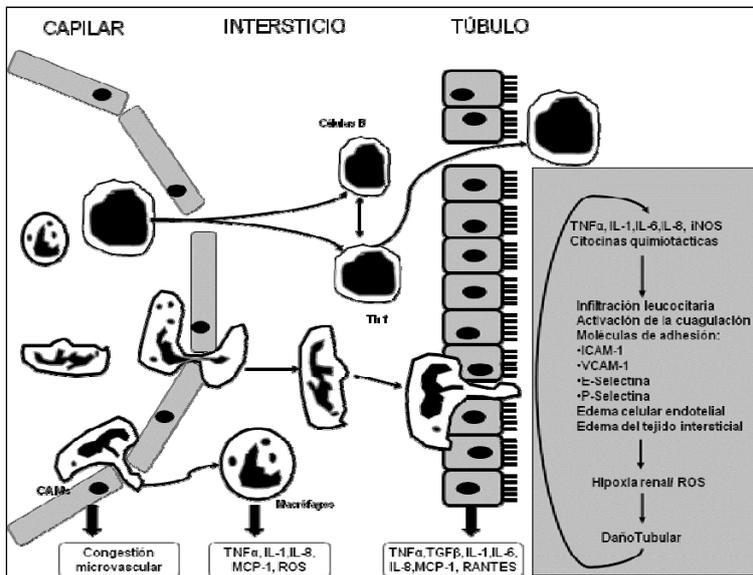


Figura 21.-.Interacción entre daño microvascular y daño tubular.

Las cascadas inflamatorias que se inician por la disfunción endotelial pueden aumentar dramáticamente debido a la generación de una serie de potentes mediadores por parte del epitelio tubular renal isquémico^{86,95,151,152}. Estos incluyen citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β) y citocinas quimiotácticas (proteína quimiotáctica de monocitos-1 [MCP-1], IL-8, RANTES). Estudios en humanos han demostrado recientemente que los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 en el plasma pueden pronosticar la mortalidad en pacientes con IRA¹⁵², y los niveles del receptor de quimiocinas CXCR3 en orina puede predecir IRA después de trasplante de riñón¹⁵³, lo que demuestra la importancia clínica de estos mecanismos.

La producción de las quimiocinas promueve aun más las interacciones leucocito-endotelio y la activación de leucocitos, lo que resulta en el deterioro del flujo sanguíneo renal y la expansión del daño tubular.

En resumen, la isquemia renal desencadena la activación de múltiples mecanismos que conducen a la disfunción vascular. Estos mecanismos incluyen la disfunción endotelial funcional, en el que probablemente esté implicado el NO como mediador central. La disfunción endotelial se correlaciona con la lesión endotelial directa y con el daño estructural asociado a aumento de la permeabilidad vascular, la congestión de los tejidos, los trastornos vasomotores y la activación hemostática e inflamatoria. (Figura 21) En conjunto, estas alteraciones ponen en peligro la

perfusión renal tanto global como local, y disminuye el aporte de oxígeno renal durante períodos prolongados de tiempo después de la lesión isquémica inicial.

5.- Inflamación en la Lesión por I/R

5.1.- Generalidades

La inflamación se puede definir como la reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local. La respuesta inflamatoria está íntimamente ligada con el proceso de reparación. La inflamación va a poner en marcha una serie de procesos con el fin de destruir o aislar el agente lesivo y reparar el tejido lesionado. Debemos tener en cuenta que sin la inflamación, las infecciones no serían autocontroladas, pero también es verdad, que en ocasiones la inflamación y la reparación pueden ser potencialmente perjudiciales ⁶⁵.

Si la inflamación se resuelve, el tejido se puede recuperar sin secuelas. Sin embargo, si la respuesta inflamatoria no se resuelve, por ejemplo, debido a que la lesión tisular se mantiene, la inflamación puede ser crónica, y, la estimulación permanente de la reparación tisular finalmente puede dar lugar a la fibrosis del órgano con la consecuente pérdida de la función y el fracaso del injerto

Además de los efectos citotóxicos directos de la hipoxia, la I/R renal induce una reacción inflamatoria en el parénquima renal ⁸⁶. Durante la I/R renal se produce síntesis de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6 y TNF- α . Las quimiocinas también son generadas rápidamente en el riñón después de la I/R ⁷³, y la quimiocina derivada de queratinocitos (KC), un análogo de ratón de la IL-8, es un marcador biológico precoz de la IRA isquémica ¹⁵⁴. La isquemia también causa la infiltración de leucocitos en el riñón. Los macrófagos y las células T se infiltran más adelante durante el curso de la enfermedad, y persisten hasta bien entrada la fase de recuperación. También varios estudios han sugerido que las células del epitelio tubular renal juegan un papel proinflamatorio ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

El NF- κ B juega un papel central en la generación de una respuesta inflamatoria, ya que es activado bajo condiciones de estrés celular e inflamación, y resulta en una activación y formación de otros factores pro-inflamatorios como la IL-1 β , TNF- α , o IFN- γ y quimiocinas como la IL-8, MCP-

1, o RANTES potenciando la respuesta inflamatoria, seguida en este proceso de una infiltración de linfocitos, macrófagos y granulocitos en el tejido lesionado. Aquí, las moléculas de adhesión como el LFA-1 o la ICAM-1 desempeñan un papel importante. El infiltrado celular junto con la expresión de citocinas/quimiocinas agrava el edema intersticial del tejido inflamado.

Un efecto importante de la hipoxia sobre el tejido es el desarrollo de la acidosis metabólica que puede inducir una respuesta inflamatoria cuando la perfusión de los tejidos respectivos se restablece³⁴. Sin embargo, no sólo los mediadores inflamatorios generados localmente como las citocinas/quimiocinas, derivados de la lesión de I/R, sino también los mediadores inflamatorios sistémicos del donante afectan al injerto después del trasplante¹⁵⁸. Por ejemplo, la muerte cerebral profunda contribuye a una respuesta inflamatoria sistémica a través de la liberación de citocinas desde el cerebro. Esta "explosión de citocinas" deteriora la función del órgano que da lugar a más episodios de rechazo agudo y la disminución de la función a largo plazo^{159,160}. La importancia de estos efectos es subrayada por experimentos que demuestran la influencia de la muerte cerebral en la función del injerto también a largo plazo, incluso cuando la isquemia fría ha sido eliminada¹⁶¹.

Por otra parte las células no sólo producen factores nocivos que promueven la muerte celular y la inflamación durante la hipoxia, sino que también forman factores de protección para poder sobrevivir a los episodios de hipoxia, de los cuales, el factor de transcripción HIF (factor inducible por hipoxia-1) juega un papel importante¹⁶². Curiosamente el sistema de HIF-1 no sólo se activa bajo condiciones de hipoxia, también lo hace en condiciones inflamatorias. En condiciones normales, los niveles celulares de HIF-1 son muy bajos y aumentan progresivamente en condiciones de hipoxia para aumentar la angiogénesis, eritropoyesis, control vasomotor de los vasos y alterar el metabolismo energético celular, y las vías de supervivencia con el fin de proteger a las células contra los efectos de la hipoxia. Además de los factores de transcripción también hay genes protectores como la hemoxygenasa-1, bcl-2 o A20 que se inducen para proteger a las células, después de la hipoxia. Una gran cantidad de trabajos en modelos animales, así como un análisis patológico de biopsias humanas demuestran que la IRA isquémica se caracteriza por una respuesta inflamatoria fuerte¹⁴³. Las terapias que se dirigen a tipos específicos de células inflamatorias o proteínas efectoras, tales como las proteínas del complemento, quimiocinas, o CAMs mejoran la IRA isquémica en modelos animales¹⁶³. Para estas terapias es importante entender las señales que inician la inflamación en respuesta a la I/R. Focalizar los factores que inician la inflamación puede ser más eficaz que tener como objetivo los efectores intermedios ya que a menudo estos tienen funciones redundantes. Además, las células

o los factores que causan daño tisular en una etapa de la respuesta inflamatoria pueden ser importantes para la terminación de la inflamación y para la reparación de tejidos en etapas posteriores. El sistema del complemento, por ejemplo, es un importante iniciador de la respuesta inmune, pero también participa a veces en la regeneración tisular. Componentes celulares de la respuesta inflamatoria, como los neutrófilos y los macrófagos, también pueden contribuir a la destrucción del tejido durante la primera etapa de la lesión, pero más tarde proporcionar señales necesarias para la resolución de la lesión⁷³. Debido a esto, la inhibición de una vía en la fase inicial de la lesión puede ser beneficiosa, pero podría ser perjudicial si se realiza más adelante en la fase de resolución de la lesión.

Revisaremos los mediadores de la inflamación que son liberados por las células epiteliales tubulares del riñón, las células endoteliales renales y las células inflamatorias.

5.2.- Mediadores Químicos de la Inflamación

Dentro de los mediadores químicos de la inflamación⁷³ vamos a destacar los siguientes:

5.2.1.- Aminas vasoactivas

- a) Histamina: La histamina o sustancia H está siempre presente en las fases iniciales de la inflamación. Se encuentra almacenada, de forma inactiva, en los gránulos de las células cebadas, leucocitos, basófilos, eosinófilos y plaquetas. En menor cantidad se halla en diversos tejidos como piel, mucosa intestinal y pulmones¹⁶⁴.

El papel de la histamina, su relación directa con las células cebadas, la degranulación de éstas en las fases iniciales de la inflamación y la supresión de la respuesta vascular por los antihistamínicos están suficientemente demostrados, induciendo dilatación de las vénulas y capilares, con aumento de la permeabilidad y contracción del músculo liso. Es el principal mediador de la primera fase de la inflamación, aunque tiene una acción muy fugaz, inactivándose a los 15 minutos.

La degranulación de las células cebadas es un proceso muy complejo, que puede ser desencadenado por una gran variedad de causas: agentes físicos, inmunocomplejos,

factores del complemento, toxinas bacterianas y fracciones lisosómicas de las células inflamatorias. Su liberación está regulada por el nivel intracelular del 3'-5' adenosinmonofosfato cíclico (AMPC).

- b) Serotonina (5-hidroxitriptamina): Se identificó en las células cromafines intestinales. Aunque es uno de los mediadores químicos más importantes en algunos animales, su papel en el fenómeno inflamatorio humano es de menor importancia. Se encuentra en los gránulos de las células cebadas, en las plaquetas y también en el intestino, bazo y tejido nervioso. Tiene menor importancia que la anterior en la respuesta inflamatoria¹⁶⁵.

5.2.2.- Mediadores químicos del plasma

5.2.2.1.- Sistema de las cininas

Las cininas son pequeños polipéptidos, con una potente acción vasodilatadora prolongada. La acción de estas sustancias consiste en vasodilatación arteriolar, contracción lenta del músculo liso, aumento de la permeabilidad, sobre todo en el lecho capilar y efecto hipotensor. También producen un efecto similar al de la histamina y serotonina en las vénulas, con separación de las uniones intercelulares de las células endoteliales. Son las responsables del dolor en el foco inflamatorio.

La formación de las cininas se inicia por la activación del factor de Hageman (factor XII) cuando se pone en contacto con superficies de carga negativa, como la membrana basal o el colágeno. Un fragmento, el factor XIIa, transforma a la precalicreína plasmática en la enzima activa calicreína. Ésta actúa sobre los cininógenos y los escinde dando como producto final la bradicinina, potente mediador químico de la inflamación, pero de acción corta, ya que es inactivado por una enzima denominada cininasa. La calicreína es además un potente activador del factor de Hageman, lo que permite la autoactivación del sistema. (Figura 22)

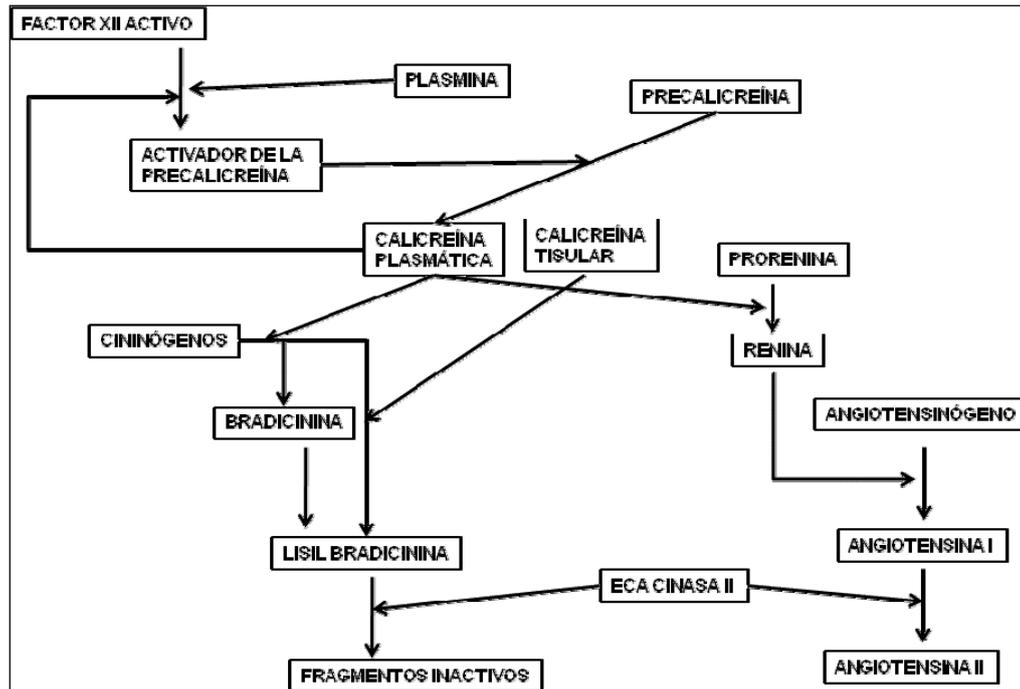


Figura 22.- Formación de las cininas

5.2.2.2.- Sistema del complemento

El sistema del complemento es un complejo formado por más de 28 proteínas plasmáticas que circulan de forma inactiva y que una vez activadas forman parte de un sistema de amplificación en cascada muy complejo, que juega un papel muy importante en las defensas del individuo. La activación del sistema del complemento puede iniciarse y desarrollarse por dos vías diferentes, la clásica o vía MB-lectina (vía de la lectina de unión a manano) y la alternativa, estas proteínas del sistema del complemento cuando se activan se convierten en enzimas protolíticas que degradan otras proteínas del complemento, formando una cascada, los elementos que participan en el proceso inflamatorio son C3a, C5a y C4a, denominadas anafilotoxinas. Ambas vías, terminan en una vía final común, cuyo objetivo es llegar a formar un complejo proteico denominado complejo de ataque de membrana (C5b-9 o MAC), muy inestable, que es el que posee la capacidad de perforar la membrana de la célula atacada creando canales que permiten el paso libre de agua y de iones y la consiguiente lisis celular. El C5b-9, es un agente quimiotáctico muy potente, el cual causa lesiones directas sobre las células endoteliales, y estimula la producción endotelial de IL-8, MCP-1 y RLO e inhibe la vasodilatación dependiente del endotelio¹⁴³. Los componentes del sistema del complemento son activados por diferentes estímulos como,

agentes infecciosos (bacterias o virus) o estímulos no infecciosos entre los que se encuentra el daño por I/R^{140,166,167}.

Este conjunto de proteínas séricas se sintetiza fundamentalmente en el hígado y también en linfocitos, macrófagos y células del sistema linforreticular. Al ser activadas, interaccionan entre sí de forma secuencial originando una serie de reacciones en cascada con la producción de diferentes fragmentos proteicos, capaz de ejercer diversos efectos biológicos entre los que destacan, la lisis de membranas celulares, el incremento de la eficacia fagocítica celular y la inducción de reacción inflamatoria⁹⁷.

El sistema del complemento desempeña un papel muy importante en la respuesta inmunitaria y desde luego en el proceso inflamatorio, componente inespecífico de dicha respuesta. Las proteínas del complemento pertenecen al grupo de defensas inmunitarias inespecíficas del organismo, aunque actúa muy integradamente con las defensas específicas adquiridas, como Igs, especialmente la IgG y la IgM. Durante el desarrollo de la inflamación se incrementa la síntesis de estas, bajo la estimulación de citocinas, como la IL-1 y el INF- γ .

Papel del complemento en el daño por I/R

La I/R es un potente inductor de la activación del complemento. La reperfusión tras la isquemia produce la activación local del sistema del complemento por ambas vías, clásica y alternativa, además de llevar a la producción de factores quimiotácticos, tales como el C5a y probablemente C3a, y a la expresión de las CAMs.

La activación del complemento durante el daño por I/R puede producir daño tisular de un modo directo a través del C5b-9 o MAC pero, además, el C5b-9 o MAC altera la función celular normal, modulando la transcripción de genes involucrados en la codificación de mediadores proinflamatorios.

Las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a, poseen una importante actividad quimiotáctica, reclutan y estimulan las células inflamatorias e incrementan la expresión de las CAMs como la VCAM-1, la ICAM-1, la E-selectina y la P-selectina sobre la superficie del endotelio y de los neutrófilos⁹⁷. La C5a es un factor quimiotáctico que estimula directamente la síntesis y secreción por parte de los leucocitos de las citocinas como IL-1 e IL-6, la proteína MIP-1 y TNF- α . La C3b toma parte en la adhesión de los neutrófilos sobre el endotelio. El sistema del complemento identifica y elimina eficazmente los agentes perjudiciales así como las células dañadas. La activación descontrolada del mismo también puede contribuir al daño del tejido. El sistema del

complemento se activa en el riñón después de la I/R, y como resultado se produce una deposición de C3a lo largo de la membrana basal tubular y el aumento en la circulación de C3a.

Se ha propuesto la inhibición del sistema del complemento para reducir el daño por I/R en modelos experimentales ¹⁶⁸. En un modelo experimental de daño por I/R en trasplante la inhibición del componente C5, reduce dicho daño ¹⁶⁹. El tratamiento con un inhibidor para el factor B de ratón, un componente necesario de la vía alternativa, evita la activación del complemento en el riñón después de la I/R y protege al ratón de la apoptosis y de la necrosis tubular. El Inhibidor del Complemento (Crry), se expresa sobre la membrana basolateral de los túbulos proximales renales. Después de la I/R, se modifica la expresión tubular renal de Crry, para permitir la activación del complemento. Los ratones deficientes en Crry son más susceptibles a la isquemia confirmando un papel protector de la expresión de Crry. Un reciente estudio demuestra que C3a (el primer componente de la vía alternativa) es necesario para la producción de la proteína MIP-2/CXCL2 y de KC/CXCL1/IL-8 por las células epiteliales del túbulo proximal después de la I/R renal. Los antagonistas específicos del receptor de C3a disminuye significativamente la producción de MIP-2 y de KC, sin embargo el antagonista del receptor de C5a y la prevención de la formación del C5b-9 o MAC no tienen un efecto significativo sobre la producción de MIP-2 y KC¹⁷⁰.

5.2.2.3.- Sistema de la coagulación

El grupo de proteínas plasmáticas que forman este sistema, pueden ser activadas por el factor XII. El punto final es la transformación del fibrinógeno en fibrina, con liberación de fibrinopéptidos que producen aumento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis de los leucocitos.

El sistema fibrinolítico puede participar también en el fenómeno inflamatorio, a través de su relación con el sistema de las cininas. La calicreína transforma el plasminógeno en plasmina; ésta, además de disolver el coágulo de fibrina, actúa en el foco inflamatorio al iniciar la formación de bradicinina por activar el factor de Hageman, cerrando el ciclo de activación mutua de ambos sistemas. La plasmina puede también activar el sistema del complemento por la vía alterna. Los productos de la degradación de la fibrina producen alteraciones de la permeabilidad ¹⁷¹.

5.2.2.4.- Derivados del ácido araquidónico

Prostaglandinas y leucotrienos. El ácido araquidónico es un ácido graso insaturado que procede de la dieta o del metabolismo del ácido linoleico. ⁹¹ No se encuentra libre en las células,

sino formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Para su utilización por la célula, debe ser liberado de los fosfolípidos mediante la activación de una fosfolipasa. Esta activación se va a desencadenar mediante una serie de estímulos físicos, mecánicos o químicos (C5a). Una vez liberado, puede seguir dos vías metabólicas.(Figura 23)

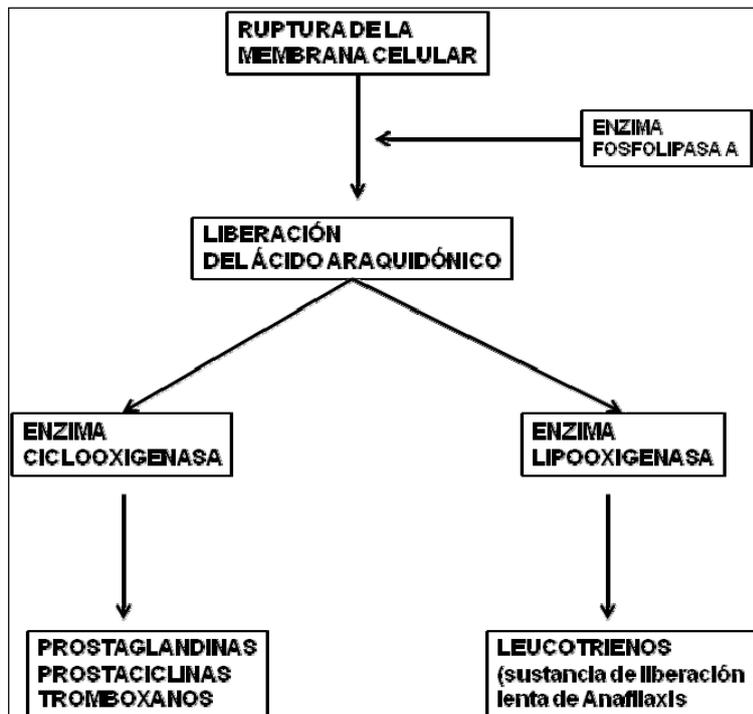


Figura 23.- Derivados del ácido araquidónico

Vía de la ciclooxigenasa

La vía de la ciclooxigenasa da lugar a prostaglandinas, que se consideran hormonas de acción local, corta y rápida que poseen varias actividades farmacológicas y regulan las funciones celulares a través del sistema del AMP cíclico. En el foco inflamatorio, actúan como mediadores y reguladores de la inflamación; a veces con acciones antagónicas. La ciclooxigenasa transforma el ácido araquidónico en un endoperóxido, la PGG₂, que es transformada por oxidación enzimática en PGH₂. Ambas prostaglandinas producen agregación plaquetaria y contracción del músculo liso.

La PGH se transforma en tres sustancias diversas según su localización:

- ✚ PGI₂ o prostaciclina, presente en la pared vascular y, más concretamente, en el endotelio. Es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y posee acción vasodilatadora.
- ✚ Tromboxano A₂, se localiza en las plaquetas. Tiene una acción muy corta con un efecto antagónico a la anterior: favorece la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.

- ✚ PGE₂, PGD₂ y PGF₂. Son otras prostaglandinas más estables y presentes en diversos tejidos. Entre sus acciones destaca la vasodilatación. Inducen también la formación de colágeno y están implicadas en la aparición de la fiebre (PGE₂) y el dolor.

Se han descrito dos isoenzimas de ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2. Tienen un 60% de similitud y presentan diferentes propiedades biológicas y farmacológicas. COX-1 es constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos y está involucrada en la producción fisiológica de las prostaglandinas. La forma inducible, COX-2, está presente en las células expuestas a agentes proinflamatorios, incluyendo citocinas, y es expresada en procesos inflamatorios¹⁷². La inhibición de la COX-2 por AINES puede utilizarse como medida terapéutica, mientras que la COX-1 nos podría explicar los efectos no deseados de los AINES en estómago y riñón.

Entre las propiedades biológicas de la prostaciclina, se encuentran, además de las ya citadas, vasodilatación y antiagregación plaquetaria. Mantiene el flujo sanguíneo renal (más importante en la médula que en el córtex) y la filtración glomerular, regulan la eliminación de Na⁺ y agua debido a su efecto tubular directo, más evidente en la porción gruesa del asa ascendente de Henle. Existe una importante interacción entre el NO y las PGS en la regulación aguda y a largo plazo de la función renal: las prostaglandinas contribuyen a mantener la hemodinámica y la función excretora renal cuando se reduce la producción de NO.

El balance entre la prostaciclina y el tromboxano es un factor importante respecto a la modulación del daño producido por la I/R. Inhibidores de la tromboxanosintasa pero no de la ciclooxigenasa previenen del daño tras la isquemia renal. Se cree que es debido a la estimulación de la producción endógena de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE₁, PG₂).

Son numerosos los trabajos que indican que la administración de inhibidores de la síntesis del TXA₂ tiene un efecto citoprotector en el daño por I/R no sólo en el riñón, sino también en el hígado y en páncreas¹⁷³. También, la administración de análogos de la prostaciclina atenúan el daño por I/R mejorando el flujo renal y la filtración glomerular, facilitando la recuperación de las células tubulares dañadas a nivel renal, mejorando la microcirculación hepática y atenuando la depleción energética y la lipoperoxidación.

La estimulación de los receptores de las células endoteliales por serotonina (5HT) o adenosindifosfato (ADP) liberados de las plaquetas, trombina y bradiquinina, o sustancias liberadas por situaciones de estrés, activan la célula que, a partir del ácido araquidónico, genera prostaciclina (PGI₂). Esta, relaja el músculo liso vascular e inhibe la agregación plaquetaria

incrementando los niveles de AMP_c¹³⁴. El aumento simultáneo de AMP_c y GMP_c, por parte de NO y de PGI₂, hace que de forma sinérgica, estos inhiban la agregación plaquetaria. La hemoglobina inactiva al NO. (Figura 24)

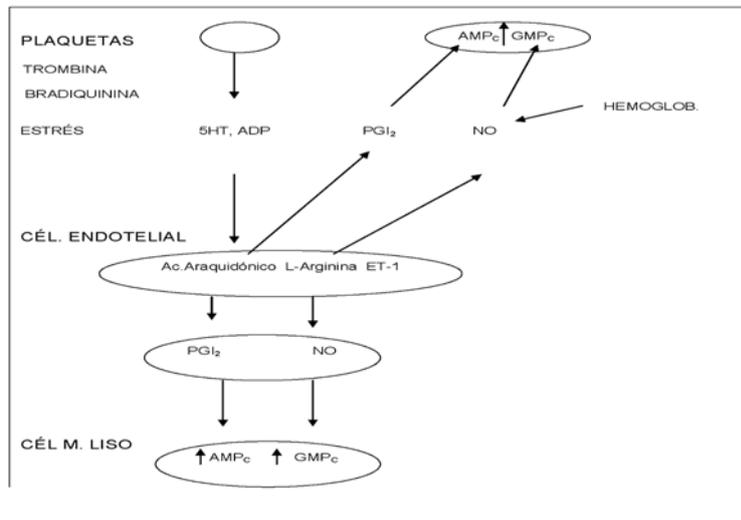


Figura 24.-Interacción entre el NO y la PGI₂ y aumento de AMP_c y GMP_c.

Vía de la lipooxigenasa

El ácido araquidónico, bajo la acción de la lipooxigenasa, se transforma en una serie de productos denominados leucotrienos. Estas sustancias pueden originarse también en macrófagos, células cebadas y otras células del tejido conjuntivo.

Alguno de los leucotrienos (LTB₄, LTD₄, LTE₄) produce broncoespasmo, vasoconstricción y aumento de la permeabilidad. El LTE₄ tiene una acción similar a la histamina pero mucho más potente. Actúan sobre los leucocitos promoviendo su adherencia al endotelio y su extravasación al espacio tisular. Además, el LTB₄ es un potente quimiotáctico para neutrófilos, eosinófilos y monocitos y favorece la liberación de enzimas lisosómicas¹⁷⁴.

5.2.2.5.- Factor activador de las plaquetas (PAF)

Mediador derivado de los fosfolípidos que ejerce una acción mucho más potente que la histamina sobre la permeabilidad vascular y, a concentraciones bajas, produce vasodilatación. Produce agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, activación de neutrófilos y además aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio, quimiotaxis, liberación de enzimas lisosomiales y broncoespasmo. El PAF puede ser producido por una serie de células como los basófilos, neutrófilos, monocitos y endotelio¹⁷⁵. En el riñón, aunque

las células endoteliales son capaces de producir grandes cantidades de PAF son las células mesangiales, las que van a producir mayores cantidades de PAF tanto en condiciones basales como después de la activación en respuesta a la isquemia o a sustancias tóxicas. En modelos de IRA, el PAF parece ser el responsable tanto de las alteraciones hemodinámicas renales como de otras alteraciones asociadas con la IRA. Se ha demostrado como el tratamiento con varios antagonistas de PAF protege significativamente de la IRA isquémica. Los riñones reperfundidos con neutrófilos producen más PAF que los reperfundidos sin neutrófilos, y cuando los riñones se reperfunden con un antagonista del PAF se observa un incremento en la función renal con respecto a los que no se le administra el antagonista, lo que sugiere que los neutrófilos contribuyen al daño renal por I/R a través de mecanismos mediados por la liberación del PAF¹⁷⁶.

Se ha demostrado que la endotelina induce la síntesis y liberación del PAF por las células endoteliales, al igual que otros vasoconstrictores como la angiotensina II y la vasopresina también involucrados en la IRA isquémica.

En cuanto a los RLO, el peróxido de hidrógeno produce contracción de las células mesangiales y fosforilación de la cadena ligera de la miosina y ambos efectos son disminuidos con antagonistas del PAF. El peróxido de hidrógeno también estimula la síntesis de PAF por las células mesangiales. Por ello, el posible efecto del incremento en la producción de RLO sobre la contracción celular mesangial, un importante determinante de la reducción del coeficiente de ultrafiltración y reducción de la TFG, podría ser mediado por la síntesis y liberación del PAF por el mesangio glomerular estimulado por los RLO.

Todo esto sugiere que la generación del PAF local en respuesta a la isquemia o secundaria otros mediadores vasoactivos juega un papel muy importante en las alteraciones hemodinámicas renales e intraglomerulares en modelos experimentales de IRA isquémica¹⁷⁶.

5.2.2.6.- Citocinas

Son un grupo de polipéptidos producidos por varios tipos de células, especialmente por monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales. Bajo el término citocina se engloba un grupo heterogéneo de factores que, por motivos históricos, presenta una nomenclatura diversa y poco esclarecedora, bien basada en el tipo celular en la que fueron inicialmente aisladas (monocinas, linfocinas) o bien por la primera acción descrita para cada una de ellas (oncoestatina, TNF), y que no siempre se corresponde con su acción principal. Pese a la complejidad y diversidad existente entre citocinas, se han podido establecer unas características generales, que, aún

existiendo excepciones, ayudan a definir que factores pueden considerarse citocinas, diferenciándolos de otros tipos de mediadores solubles como las hormonas.

Las citocinas son proteínas generalmente secretadas, de bajo peso molecular y que son producidas *de novo* en respuesta a un estímulo inmune y su secreción suele ser breve. Normalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, aunque en determinados casos puedan incrementarse notablemente los niveles en respuesta a agresiones ¹⁵².

Su acción es en general autocrina (producen sus efectos en las propias células donde se originan) o paracrina (producen sus efectos en las células vecinas), aunque en casos en los cuales hay una concentración elevada pueden actuar de manera endocrina (sobre órganos o tejidos diana). De igual forma que otros factores peptídicos, las citocinas inician sus acciones mediante la unión a receptores de membrana específicos, habitualmente con una gran afinidad, lo que explica que se necesitan cantidades muy pequeñas para producir un efecto biológico.

Es también muy habitual que una misma citocina presente diversas acciones (pleiotropismo) así como que se den acciones redundantes entre diferentes citocinas. El pleiotropismo puede explicarse por la existencia de receptores para una misma citocina en diferentes tipos celulares y/o por la existencia de diferentes cascadas de señalización intracelular. La redundancia puede ser explicada, por lo menos en parte, por la existencia de receptores o vías de señalización compartidas por diferentes citocinas. En este sentido es importante comentar que la activación de las vías de señalización de las citocinas viene determinada por la formación de un complejo receptor inducido por el ligando, lo que inducirá a su vez la agrupación de las porciones citoplasmáticas de dos o más moléculas receptoras promoviendo el reclutamiento de los factores de señalización intracelular.

Por último como consecuencia de toda esta variedad en la señalización, es muy habitual encontrar casos de antagonismo o sinergismo en las acciones de diferentes pares de citocinas. Son muy importantes tanto en la iniciación como en la prolongación de la respuesta inflamatoria en la IRA ¹⁷⁷.

Muchas citocinas son liberadas por leucocitos y por células del túbulo renal en el riñón dañado. Las citocinas y quimiocinas proinflamatorias INF- γ , IL-2, IL-10, GM-CSF, TGF- β , CXCL1, IL-6, MIP-2 y MCP-1 son incrementados en el riñón isquémico con IRA ¹⁴³. En la actualidad se han descrito más de 20 citocinas. Detallaremos a continuación las más importantes relacionadas con el proceso inflamatorio en la reperfusión ¹⁷⁸.

Interleucina-1 (IL-1)

Es un polipéptido del que se conocen dos formas moleculares, α y β , codificadas por genes localizados en el cromosoma 2. La homología entre ambas formas de IL-1 únicamente es del 26%, pero interactúan con el mismo receptor y comparten muchas actividades biológicas.

Es producida por macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, y por otros tipos celulares relacionados con la respuesta inmune (linfocitos B, células NK, etc.).

Dentro de la respuesta inflamatoria destacamos las siguientes funciones:

- ✚ Es capaz de activar los macrófagos, siendo también producida por ellos, por lo que es uno de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
- ✚ Aumenta la producción de prostaglandinas y la actividad citotóxica del macrófago.
- ✚ Junto a otras citocinas, factores de crecimiento y el factor estimulador de la mielopoiesis (FEM) liberados en el foco inflamatorio, incrementan la actividad de la médula ósea para aumentar la producción de la serie blanca.
- ✚ Estimula a células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, etc. incrementando la producción de diferentes factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.).
- ✚ Induce la proliferación de los fibroblastos.
- ✚ Actuando sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE_2 , apareciendo así fiebre y dolor.
- ✚ Provoca el aumento de la expresión de diferentes CAMs sobre las células endoteliales.
- ✚ Aumenta la producción de moléculas de Clase II del MHC y provoca la activación de la ciclooxigenasa.
- ✚ Causa la activación de la iNOS incrementando así la producción de óxido nítrico.

La activación de la citocina IL-1 β e IL-18 se lleva a cabo a través de la caspasa proinflamatoria, caspasa-1. Los ratones deficientes en IL-1 β están protegidos del daño renal agudo por isquemia¹⁷⁹.

La acción de IL-1 se inhibe fisiológicamente por el antagonista del receptor de IL-1 (IL1-RA)¹⁸⁰. En un modelo de isquemia reperfusión renal en rata, se observó que en los animales tratados con IL1-RA el daño renal, la infiltración neutrofílica y el número de células apoptóticas, eran mucho menores comparados con el grupo control¹⁸¹.

Interleucina-18 (IL-18)

IL-18 es una citocina proinflamatoria producida por los túbulos proximales, linfocitos, neutrófilos, y macrófagos ¹⁸² en situaciones de daño renal agudo producido por la isquemia. La activación de IL-18 por caspasa-1 tiene como resultado la activación de varias citocinas y quimiocinas, activación de las T helper cell, y la proliferación de linfocitos. Se ha demostrado que los ratones deficientes en caspasa-1 están funcionalmente e histológicamente protegidos contra el daño isquémico y esta protección está asociada con una disminución en la conversión del precursor de IL-18 a la forma madura en el riñón. También han observado como la administración de inhibidores de IL-18 protege contra la IRA por isquemia ¹⁸².

Interleucina-6 (IL-6)

Es una glicoproteína producida por diversos tipos celulares entre los que se incluyen macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T. Su producción en el proceso inflamatorio induce activación de los monocitos y disminución de la producción de otras citocinas como IL-1 y TNF- α , es una de las citocinas más importantes en la regulación negativa del fenómeno inflamatorio. También posee una relevante función reguladora sobre la diferenciación de los linfocitos B, y parece que modula la activación de las células T.

La IL-6 es una citocina pleiotrópica y se ha descrito que posee propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Se ha demostrado que IL-6 actúa como regulador tanto en la IRA isquémica ¹⁸³ como en el daño pulmonar en ratones con IRA ¹⁸⁴. Los mecanismos por los cuales se llevan a cabo los efectos de IL-6 en la IRA isquémica podrían ser por trans-señalización y por activación de STAT-3 en células tubulares renales.

Interleucina-10 (IL-10)

Es producida, entre otros, por macrófagos y células T. Entre sus funciones en la respuesta inflamatoria destacamos la capacidad de activar o inhibir los macrófagos (dependiendo de su concentración) convirtiéndose, junto con la IL-6 en otra de las citocinas moduladoras del fenómeno inflamatorio. Parece que también ejerce su acción estimulando la proliferación de células B y T, tanto maduras como inmaduras.

La IL-10 es una potente citocina antiinflamatoria que inhibe la inflamación y las vías citotóxicas implicadas en el daño renal agudo. IL-10 podría actuar en parte, por la inhibición en la activación de genes implicados en la activación de leucocitos y moléculas de adhesión ¹⁸⁵.

Factor de necrosis tumoral (TNF)

Es una citocina segregada fundamentalmente por los monocitos y macrófagos, aunque también la pueden producir los linfocitos T y las células NK, cuyo gen se localiza en el cromosoma 6. Presenta dos formas la α y la β que aunque poseen funciones similares (en la inflamación) las desarrollan con diferente intensidad.

Dentro del fenómeno inflamatorio destacamos las siguientes funciones del TNF: ¹⁸⁶

- ✚ Es capaz de activar los macrófagos, y al ser también producida por ellos se convierte en uno de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
- ✚ Junto a otras citocinas, factores de crecimiento y el factor estimulador de la monocitosis (FEM) liberados en el foco inflamatorio, incrementan la actividad de la médula ósea para aumentar la producción de la serie blanca.
- ✚ Estimula a células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, etc. incrementando la producción de diferentes factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.).
- ✚ Induce la proliferación de los fibroblastos.
- ✚ Actuando sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE_2 , apareciendo así fiebre y dolor.
- ✚ Provoca el aumento de la expresión de diferentes CAMs como veremos más adelante.
- ✚ Aumenta la producción de moléculas de Clase II del MHC y provoca la activación de la ciclooxigenasa.
- ✚ Causa la activación de la iNOS incrementando así la producción de óxido nítrico.
- ✚ Incrementa la producción de RLO especialmente del anión superóxido ¹⁸⁷.
- ✚ Estimula la síntesis de PAF.

Se ha demostrado que TNF- α está involucrado en la apoptosis después de la I/R ¹⁸⁸ y que p38 de la vía MAPK y NF- $\kappa\beta$ son cruciales para la producción de TNF- α y la apoptosis mediada por TNF- α ¹⁸⁹.

Interferón (INF)

En la actualidad, y por los progresos conseguidos en el clonaje de los genes que codifican los diferentes polipéptidos que forman esta familia molecular, se identifican tres clases de interferones, denominados alfa, beta y gamma (α , β , γ). El α y el β forman el previamente llamado INF de tipo 1 y los producen con preferencia los leucocitos y fibroblastos, respectivamente. El INF-

γ , es segregado por los macrófagos, linfocitos T y por las células NK, es el anteriormente denominado de tipo 2 o inmune que tiene una importante actuación en la respuesta inflamatoria.

Los INF- α y - β comparten una homología de al menos el 30% en su estructura proteica primaria; sin embargo, la secuencia de aminoácidos del INF- γ no guarda ninguna relación con la de los otros dos tipos citados previamente. El INF- γ es una glicoproteína cuya síntesis está codificada por un gen localizado en el cromosoma 12. Hasta la actualidad, se han caracterizados dos formas moleculares diferentes. Dentro de sus acciones en la inflamación destacamos el aumento de la producción de macrófagos y su activación y el incremento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular como veremos posteriormente. Sus funciones en el sistema inmunitario son de gran importancia, regulando la función de diferentes células del mismo como los linfocitos T y B, las células NK y los ya comentados macrófagos^{86,95}.

5.2.2.7.- Productos lisosómicos de los leucocitos

La liberación de las sustancias contenidas en los lisosomas de las células que forman parte del exudado inflamatorio, neutrófilos y monocitos, puede contribuir al mantenimiento de la respuesta inflamatoria e inducir la destrucción tisular que aparece después de la reperusión. Dentro de este grupo tenemos a las proteínas catiónicas que aumentan la permeabilidad vascular y tienen poder quimiotáctico para los monocitos; las proteasas neutras que pueden degradar sustancias extracelulares (colágeno, membranas basales, fibrina, elastina, etc.) y activar directamente el C3 y C5 y; las proteasas ácidas que degradan las proteínas en un medio ácido. Todas estas enzimas son inhibidas por antiproteasas dentro de las cuales tenemos a la alfa-1 antitripsina que es el principal inhibidor de la elastasa de los neutrófilos.

5.2.2.8.- Quimiocinas

Las quimiocinas son un gran subgrupo de moléculas que actúan como quimioatrayente en el reclutamiento de leucocitos en la inflamación y en la regulación de la respuesta inmune de los linfocitos T (T helper-1 y T helper-2).

Las quimiocinas han sido divididas en cuatro subfamilias CXC, CC, C y CX3C de acuerdo con el número y separación en sus secuencias de los residuos de cisteínas conservados.

Las quimiocinas son inducidas por citocinas (TNF- α e IL-1 β), activación del complemento, especies reactivas del oxígeno, NF κ B y vías de señalización relacionadas con receptores tipo Toll

(TLR)^{158,190}. Se ha investigado sobre quimiocinas y receptores de quimiocinas que contribuyen en el daño del tejido en modelos animales de enfermedades renales inflamatorias.

El receptor de quimiocinas CCR1 regula el tráfico de macrófagos y neutrófilos al riñón en un modelo de daño por I/R renal en ratón^{158,190}. Los ratones wild-type pretratados con el antagonista específico de CCR1 (BX471) y los ratones deficientes en el receptor CCR1 tienen menos neutrófilos y macrófagos que los controles. También los ratones deficientes en CCR1 tienen reducido el índice de los ligandos de CCR1, el ligando CCL3 (MIP-1 α) y CCL5 (RANTES). La quimiocina fractalquina fue la primera quimiocina-CX3C que se describió. Se expresa como una molécula transmembrana y su expresión en células endoteliales se induce por citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 y el IFN- γ o el ligando CD40. La fractalquina soluble puede ser liberada de la superficie de la célula por proteólisis exhibiendo actividad quimiotáctica eficiente. El receptor de fractalquina (CX3CR1) se expresa en los linfocitos natural killer (NK), monocitos, y algunos linfocitos T CD8+. La fractalquina cumple una función dual en el proceso de extravasación de leucocitos actuando a la vez como molécula de adhesión y como quimiocina.

La interacción entre la fractalquina y CX3CR1, puede producir la adhesión celular sin involucrar a las selectinas, pudiendo también producir el proceso de transducción de señales para la activación de las integrinas. Es un importante quimiotrayente para células NK y monocitos pero no para neutrófilos.

En la IRA isquémica su expresión está incrementada en el endotelio de grandes vasos sanguíneos, capilares y glomérulos y la inhibición del receptor de la fractalquina disminuye el daño¹⁴².

CXCL1 (también conocido como KC o IL-8), un prototipo de quimiocina CXC, es un quimiotractante y atrayente tanto neutrofílico como de linfocitos T al lugar de la inflamación. El CXCL1 se sintetiza en monocitos/macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, y células endoteliales. CXCL1 se une a los receptores de quimiocinas CXCR1 y CXCR2. En un modelo de trasplante renal en rata, un inhibidor de CXCR2 previene de la infiltración de granulocitos en el riñón y previene del deterioro de la función renal.

Se ha demostrado anteriormente que CXCL1 está incrementado en riñón en la IRA isquémica¹⁴³. Hay estudios que sugieren que CXCL1 es un mediador de la IRA isquémica. La administración de un inhibidor de CXCL1 en ratón disminuye la infiltración neutrofílica en el riñón y lo protege del daño renal isquémico agudo. En IRA isquémica CXCL1 se detectó en macrófagos y células epiteliales tubulares. Se ha demostrado que la reducción de los macrófagos protege contra

la IRA isquémica en ratón y el mecanismo protector podría ser debido a la inhibición de la producción de CXCL1 por los macrófagos en la IRA isquémica, ya que se ha demostrado que los macrófagos son la fuente principal de CXCL1 en el riñón tras la IRA isquémica ¹⁹¹.

5.2.2.9.- Radicales libres del oxígeno (RLO)

La acción directa contra los RLO sería un blanco terapéutico en la disminución del daño por reperfusión. La administración de antioxidantes endógenos está siendo estudiado ampliamente en la prevención del daño por I/R. En estudios *in vivo* ¹²³ la administración durante la reperfusión de enzimas como, la superóxido dismutasa o la catalasa, o de agentes quelantes como deferoxamina o manitol, agentes antioxidantes como vitaminas C y E o inhibidores de la xantino oxidasa, como alopurinol, disminuye el impacto de los RLO. Sin embargo, estudios en humanos muestran resultados menos claros, lo cual limita su uso terapéutico ¹⁹².

5.2.2.10.- Óxido nítrico (NO)

El NO es una molécula que tiene una variedad de efectos en función de las concentraciones relativas de NO y las del medio circundante en el que se ha producido el NO. Se llevan a cabo tanto efectos directos del NO que están mediadas por si mismo, y efectos indirectos del NO que están mediados por las especies reactivas de nitrógeno producidos por la interacción del NO con anión superóxido o con oxígeno.

Los mecanismos moleculares que median las actividades biológicas de se puede dividir en tres categorías. *En primer lugar*, el NO reacciona fácilmente con metales de transición, tales como hierro, cobre y zinc. Estos metales son abundantes en grupos prostéticos de las enzimas y otras proteínas, y por ese mecanismo, el NO regula la actividad de varias enzimas.

En segundo lugar, el NO es capaz de inducir la formación de S-nitrosotioles en una reacción llamada S-nitrosilación. Se ha demostrado que la Nitrosilación modifica la actividad de varias proteínas que participan en mecanismos de regulación celulares ¹⁹³.

En tercer lugar, el NO reacciona muy rápidamente con el anión superóxido (O_2^-) y como resultado la formación de peroxinitritos (ONOO⁻). El primer mecanismo representa los efectos directos de NO y los dos últimos mecanismos se conocen como efectos indirectos del NO. A bajas concentraciones de NO (<1 μ M), los efectos directos predominan, mientras que a mayor concentraciones (>1 μ M), los efectos indirectos van a ser más importantes ¹⁹³.

Muchas investigaciones sobre el papel del NO en el fenómeno inflamatorio le otorgan un efecto protector. Ahora bien, el balance final de su actividad, los diferentes caminos en los que se encuentra implicado y los efectos que pudiese ejercer, aún no están completamente dilucidados y son tema de la controversia ¹⁹⁴.

Entre los efectos beneficiosos, parecen demostrados los siguientes (Tabla IV):

- ✚ Es un potente vasodilatador al traducir la señal desde la célula endotelial a la musculatura lisa vascular gracias a la difusibilidad del NO y actuar sobre la guanilatociclasa citosólica presente en el interior del músculo liso. Esta enzima produce GMPc, el cual media una señal de transducción en el músculo liso, disminuye la concentración de Ca^{2+} citosólico libre y produce vasorrelajación ¹⁹⁴.
- ✚ Inhibe la adhesión y agregación plaquetaria mediante el incremento de los niveles intracelulares de GMPc, evitando así la trombosis del vaso ¹⁹⁵.
- ✚ Hace disminuir la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, acumulado durante el proceso inflamatorio.
- ✚ Bloquea la adherencia y posible migración de los monocitos, hecho demostrado “*in vitro*”.
- ✚ Inhibe la activación neutrofílica que conduce a la adhesión celular al endotelio, así como la generación de RLO; además bloquea la liberación de productos con acciones vasoconstrictoras, citotóxicas y multiplicadoras de la reacción inflamatoria (leucotrienos, citocinas, prostaglandinas, etc.) y parece ejercer un efecto citoprotector directo sobre las células endoteliales. ¹⁹⁶

En relación con estos aspectos, cabe destacar que:

- ✚ Algunos autores le otorgan además un efecto directo sobre la adhesión celular. Al bloquear la producción de NO, se producirá un incremento en la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales y, cuando se induce la producción de NO, disminuye la expresión de ICAM-1.
- ✚ Se ha demostrado como el NO inhibe directamente la NADPH-oxidasa, inhibiendo entonces la producción de RLO por parte de los neutrófilos. ¹⁹⁵
- ✚ Al reaccionar con el anión superóxido, genera peroxinitritos que son transformados en nitratos con la liberación del radical hidroxilo. Esta actuación inactiva los efectos directos del anión superóxido. ¹⁹⁷
- ✚ Modula las hemoproteínas que pueden actuar como receptores de los RLO.
 - Actúa como un mensajero intracelular sin requerir transportador de membrana.

- Es un protector de la mucosa intestinal, favoreciendo la función de barrera.

Tabla IV.-Algunas de las acciones biomoleculares del NO

DIANA	RESPUESTA
Guanilato ciclasa.	Elevación del GMP _c .
Plaquetas.	Inhibición de la agregación y adhesión. Relajación.
Células musculares lisas.	
Leucocitos.	Inhibición de la NADH-oxidasa y activación de la prostaglandin-sintetasa.
Radicales libres.	“Barrendero” formando peroxinitritos.
Metaloproteínas.	A altas concentraciones, inhibición directa de la citocromo C oxidasa y otros enzimas que las contienen.
Lípidos.	Formación de peróxidos lipídicos, a través de su descomposición, para formar productos lipídicos vasoactivos.

La modulación de la producción endógena de NO, mediante la administración de su precursor, la L-arginina, puede conducir a una disminución del daño en los tejidos isquémicos que son reperfundidos. En experiencias consistentes en la administración de NO exógeno, se ha observado una disminución de la actividad de la enzima neutrofílica mieloperoxidasa (marcador sensible de la infiltración neutrofílica), un mantenimiento de los requerimientos locales de oxígeno (sin ejercer acción alguna sobre la situación hemodinámica sistémica o local en el transcurso del proceso inflamatorio, aunque este hecho contradice los hallazgos de algunos autores que en modelos de I/R intestinal, el NO genera una reducción de las resistencias vasculares periféricas produciendo una marcada hipotensión que incrementa el daño) y también se ha comprobado una disminución de la producción de RLO y de citocinas proinflamatorias.

Se ha considerado que esos efectos contrarios podrían deberse a un exceso de producción de NO, a su vez secundaria a la estimulación de la producción de la iNOS en las células endoteliales y en los macrófagos¹⁹⁸. La expresión de eNOS está incrementada durante la I/R renal, sin embargo, está reducida su actividad, posiblemente debido a altas concentraciones de NO generadas por la iNOS que contribuyen a la disfunción y al daño provocando vasoconstricción en la circulación renal. Además de reducirse la actividad de eNOS se incrementa la producción de endotelina-1 provocando vasoconstricción¹⁹⁹. Recientes estudios demuestran la capacidad del NO de reducir la producción excesiva de endotelina-1 durante la I/R renal ejerciendo sus efectos protectores¹⁹⁹. En modelos de I/R renal, se ha comprobado como el NO juega un papel muy importante en la regulación del flujo renal, así como en la excreción de Na⁺ y H₂O₂ tanto en condiciones fisiológicas como durante el fallo renal agudo secundario a I/R. (Figura.25)

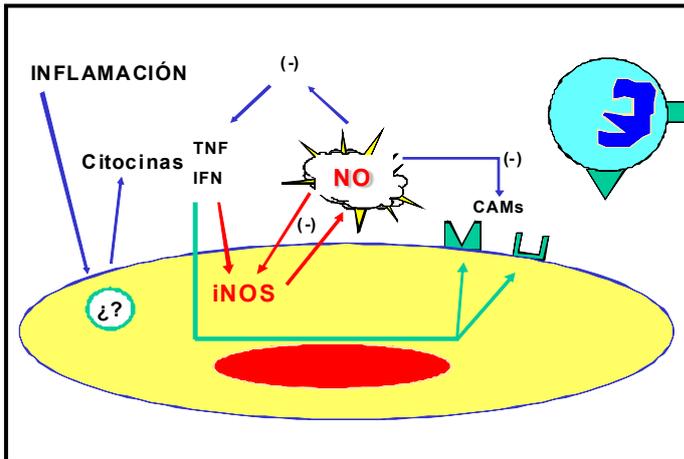


Figura 25.- Posible mecanismo de acción del NO en la inflamación

Hay evidencias en modelos experimentales de trasplante renal que muestran que el NO tiene un papel clave en el trasplante renal y en fenómeno de rechazo agudo. El NO puede jugar un importante papel en la protección del órgano contra el daño vascular y ser una molécula clave en la reparación tisular tras el daño por I/R o por el contrario, puede predominar su acción citotóxica¹⁹⁹. (Figura 26)

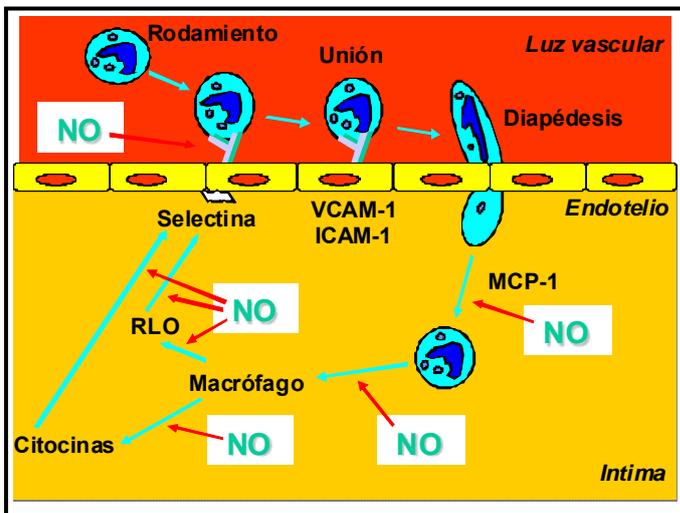


Figura 26.- Infiltración de monocitos.

El juicio sobre las distintas acciones del NO en el proceso de I/R, ha evolucionado con los hallazgos de las distintas investigaciones. Las primeras publicaciones describen sus efectos eminentemente perjudiciales, según los resultados inicialmente obtenidos en estudios realizados sobre cultivos celulares y tejidos.

El carácter lesivo del NO, parece estar en relación con la formación de los peroxinitros que, al reaccionar con el anión superóxido, condicionan la lipoperoxidación de las membranas celulares; demostrado por distintos autores²⁰⁰.

El conocimiento a escala molecular de las fuentes de producción de NO y sus papeles en el transcurso de la inflamación durante el fenómeno de I/R han ido poniendo de manifiesto un comportamiento distinto en función de la enzima productora, su cantidad y el momento de su liberación o administración; así por ejemplo, sobre un modelo de I/R en riñón de rata, se describe su producción mantenida a bajos niveles por la cNOS, y se correlaciona con una importante mejora de la función renal^{201,202}. La elevadísima producción de NO por la iNOS, estimulada durante el proceso inflamatorio, parece ser altamente lesivo. Por el contrario, la tasa fisiológica de producción a bajas dosis por parte de la cNOS parece jugar un papel predominantemente protector y modulador de la respuesta inflamatoria; esa producción basal es la que justifica su efecto protector, descrito en trabajos sobre I/R renal en ratas^{102,203}.

Por otra parte, el desequilibrio entre la expresión y la actividad de eNOS e iNOS es muy importante en la patofisiología de la IRA, que se asocia a una disminución en la actividad de la eNOS y a un incremento importante en la expresión de iNOS²⁰⁴.

Algunos investigadores han demostrado que las bajas concentraciones (μM) de NO generadas directamente por donadores de NO (Molsidomina, trinitrato glicerol, nitroprusiato sódico y otros) o de la L-arginina, pueden proteger el riñón contra el daño por I/R^{75,102,205}.

5.3.- Factores de transcripción

5.3.1.- El factor de transcripción inducible por hipoxia

Las células no sólo producen factores nocivos para promover la muerte celular y la inflamación durante la hipoxia, sino que también forman factores de protección para poder sobrevivir a los episodios de hipoxia. Aquí el factor de transcripción inducible por hipoxia-1, (HIF-1), juega un papel importante¹⁶². Curiosamente, el sistema de HIF-1 no sólo puede activarse en condiciones de hipoxia, sino también en condiciones inflamatorias.

El HIF es una proteína ubicua y heterodimérica compuesto por dos subunidades: HIF-1a y HIF-1b. En una situación de normoxia, HIF-1a se degrada por hidroxilación y es destruido, mientras que cuando se encuentra en una situación de falta de oxígeno como es el caso de la hipoxia, HIF-1a no se degrada, sino que uniéndose a HIF-1b da lugar a HIF y es cuando realmente induce la activación y estimulación de diferentes genes. En este momento son más de 24 los genes regulados por HIF-1 pero parece que pueden ser muchos más ^{206,207}.

Dependiendo del tipo celular en el que se produzca la inflamación, el HIF puede actuar como proinflamatorio o como antiinflamatorio ²⁰⁸. Básicamente los niveles celulares de HIF-1 son bajos en condiciones normales, mientras que aumentan progresivamente en condiciones de hipoxia para aumentar la angiogénesis, eritropoyesis, control vasomotor de los vasos y altera el metabolismo celular, así como los programas de supervivencia con el fin de proteger las células contra los efectos de la hipoxia ²⁰⁹.

5.3.2.- El factor de transcripción κ B (NF- κ B)

El NF- κ B, es una familia de factores de transcripción con importantes funciones en diversos procesos fisiológicos y patológicos, y en la respuesta celular a la hipoxia, estrés e isquemia. Además el papel de NF- κ B en la inflamación se ha demostrado con estudios genéticos e inhibidores químicos, y ha sido punto focal de atención en el intento de comprender cómo las señales extracelulares inducen la expresión específica de grupos de genes ²¹⁰.

El NF- κ B forma parte de la familia Rel de factores transcripcionales, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros ²¹¹. Estas proteínas son: p50 (NF- κ B1 y su precursor p105), p52 (NF- κ B2 y su precursor p100), p65 (también llamado RelA), c-Rel y RelB; que están caracterizados por la presencia de un dominio homólogo N-terminal, denominado Rel (RHD), responsable tanto de la homo como heterodimerización, así como de la unión a la secuencia específica del DNA. RelA, c-Rel, y RelB también contienen un dominio C-terminal de activación de la transcripción (TAD), sin embargo las subunidades p52 y p50 no tienen el dominio TAD y la transcripción la llevan a cabo por la unión con otros factores que regulan la transcripción ²¹⁰.

La formación del homodímero o heterodímero es determinante en la actividad transcripcional, en los promotores de los genes diana. El heterodímero p50/p65 es el más común

y su actividad transcripcional ocurre gracias a la proteína p65. Aunque los homodímeros p50 y p52 no poseen actividad transcripcional, pueden estimular la transcripción cuando se unen a la proteína nuclear BCL-3²¹².

Los precursores p105 y p100, procesados por el proteosoma, dan lugar a las formas activas p50 y p52 respectivamente.

5.3.2.1- Proteínas IκBs

En células que no han sido activadas, el NF-κB se encuentra en el citoplasma en forma inactiva debido a la asociación con las proteínas inhibitorias (IκBs)²¹⁰.

Las proteínas IκBs se caracterizan por tener secuencias repetidas de ankirina que son esenciales para su interacción con los dímeros de NF-κB, y comprenden tres grupos funcionales:

- ✚ Las proteínas IκB típicas IκBα, IκBβ e IκBε,²¹² que se encuentran en el citoplasma de células no estimuladas y bajo un estímulo se produce la degradación y resíntesis.
- ✚ Las proteínas precursoras p100 y p105 que pueden ser procesadas para formar los miembros de la familia NF-κB, p52 y p50, respectivamente, o pueden ser degradadas.
- ✚ Y las proteínas atípicas IκBζ, BCL-3 y IκBNS, que generalmente no se expresan en células no activadas, pero una vez activadas llevan a cabo sus efectos en el núcleo.

Aunque los IκBs son similares en su estructura, cada uno de ellos tiene preferencia en sus propias uniones: la clásica (el heterodímero RelA/p50) predominantemente regulados por IκBα (miembro de la familia IκB mejor estudiado), y por otra parte, IκB-ε, regula preferencialmente la unión RelA/RelA, así como los dímeros c-Rel/RelA. IκB-β es el menos conocido, aunque se ha demostrado que se une al heterodímero RelA/p50 asociado con sitios κB sobre el DNA, sugiriendo que podría regular su función nuclear. Las tres IκBs tienen distintas cinéticas en cuanto a la degradación por el proteosoma una vez estimuladas. IκB-α, es degradada más rápidamente que IκB-β e IκB-ε, en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS y TNF-α y es resintetizada de manera NF-κB dependiente para constituir un circuito de retroalimentación negativa en el cual se sintetiza nuevamente IκB-α, entra en el núcleo para unirse al heterodímero RelA/p50 y vuelve al citoplasma de manera rápida y continua. Por lo tanto, la ausencia de IκB-α deteriora la terminación de la actividad de NF-κB seguida de la estimulación con LPS y TNF-α²¹³. En cuanto a IκB-β e IκB-ε tanto la resíntesis como la degradación se produce con una cinética menor.

Las proteínas atípicas $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$, BCL-3 y $\text{I}\kappa\text{BNS}$ tienen una regulación y funciones muy diferentes²¹².

5.3.2.2- Proteínas IKKs

La familia de las cinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKKs) está constituida por $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ e $\text{IKK}\gamma$ también llamado [modulador esencial de NF- κ B (NEMO)]. Los inductores de NF- κ B, a través de diferentes receptores y proteínas adaptadoras, desencadenan señales que convergen en la activación del complejo IKK. El mecanismo por el cual el complejo IKK es activado es muy complejo y es diferente dependiendo del tipo de estímulo que lo active²¹⁴.

Los homodímeros o heterodímeros de $\text{IKK}\alpha$ o $\text{IKK}\beta$ fosforilan a las proteínas $\text{I}\kappa\text{B}$, induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma permitiendo así la liberación de NF- κ B que se transloca a núcleo²¹⁵.

Aunque otras cinasas están involucradas en la fosforilación de las $\text{I}\kappa\text{B}$ s, las IKKs se caracterizan por la rapidez de su activación, la acción simultánea sobre ambos residuos de las Serinas (Ser) en las $\text{I}\kappa\text{B}$ s y una preferencia por las Ser en relación a las treoninas (Thr).

En la literatura está bien establecido que el NF- κ B es activado por una amplia variedad de estímulos, que incluyen agentes biológicos como lipopolisacáridos, citocinas inflamatorias, ésteres de forbol y estímulos citotóxicos como agentes de quimioterapia, luz ultravioleta y radiaciones ionizantes entre otros²¹⁶.

Dado que existen tantos activadores de NF- κ B, es de esperar que este factor de transcripción controle diversos genes y se encuentre involucrado en varios procesos biológicos y enfermedades, incluyendo desarrollo embriológico, respuesta inmune, respuestas inflamatorias, proliferación, cáncer, arteriosclerosis entre otras.

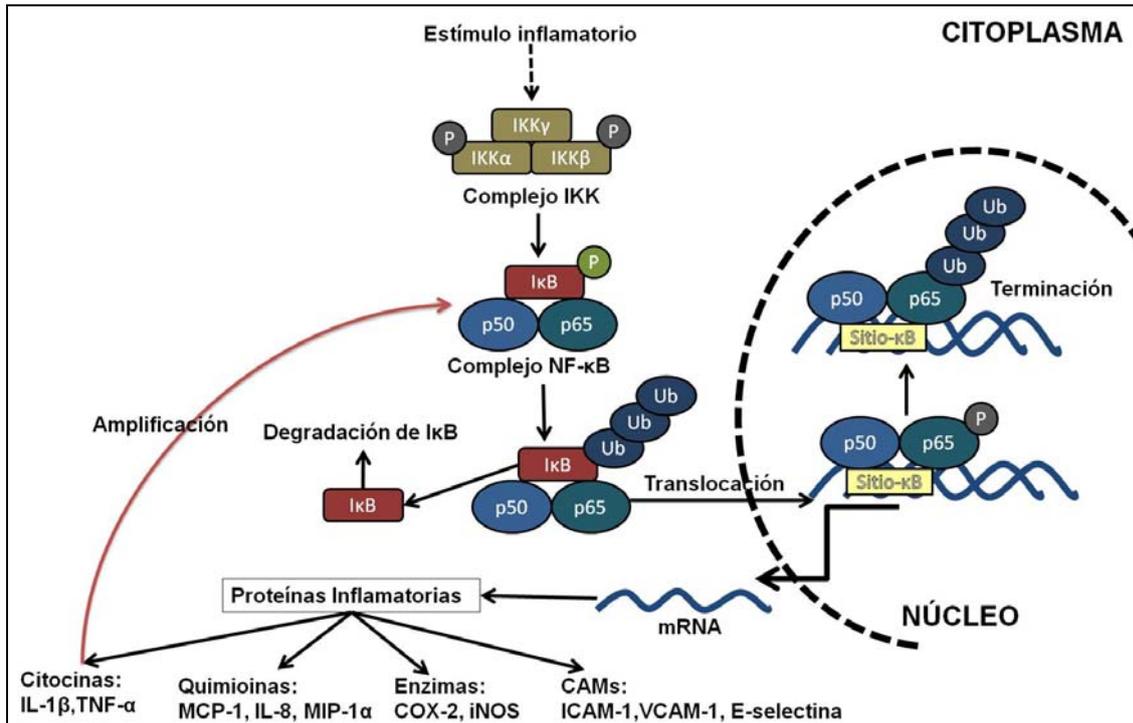


Figura 27.- En condiciones normales, NFκB (p65-p50) se encuentra atrapado en el citoplasma, formando un complejo inactivo con la subunidad inhibitoria IκB. Después de su activación, IκB es primero fosforilada y posteriormente ubiquitinizada. El fosfato verde significa fosforilación que tiene como resultado una regulación negativa de la proteína fosforilada, mientras que el fosfato gris indica activación.

5.3.2.3- Vías de señalización

Vía clásica o canónica

La vía de señalización más importante y mejor estudiada, utilizada por la mayoría de estímulos es la clásica, la cual se lleva a cabo principalmente por los heterodímeros RelA/p50 y c-Rel/p50. Esta vía se centra en la activación del complejo trimérico de la IκB cinasa (IKK), complejo formado como ya hemos dicho de dos subunidades catalíticas (IKK-β, IKK-α) y una subunidad reguladora NEMO²¹⁴.

Una vez que el complejo IKK es activado, se fosforila la IκB-α en la Ser32 y en la Ser36, llevando a su poliubiquitinación y su posterior degradación por el proteosoma 26S, permitiendo así, la liberación de NF-κB (representada principalmente por los heterodímeros p65/p50) que se transloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción mediante la unión a secuencias de DNA conocidas como sitios κB, para llevar a cabo la transcripción de genes específicos, entre ellos, genes de aproximadamente 27 citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión, receptores

de citocinas, moléculas de histocompatibilidad y otras, incluyendo el de I κ B- α como hemos dicho anteriormente, el cual facilita la terminación de la respuesta transcripcional por la unión a los dímeros de NF- κ B en el citoplasma²¹⁰. Los genes regulados por NF- κ B son los responsables de la codificación de proteínas inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, la proteína inflamatoria del macrófago 1 alfa (MIP-1 α) y de la proteína quimiotáctica (MCPs), de las moléculas de adhesión celular de superficie, tales como E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, de las enzimas inducibles incluyendo COX2 y la iNOS, y de las moléculas de supervivencia, como la molécula inhibidora de la apoptosis celular 1 y 2 (IAPs), y BCL-XL.

Una serie de estímulos se ha demostrado que activan NF- κ B a través de la vía clásica, incluyendo citocinas proinflamatorias, productos bacterianos, factores de crecimiento y la hipoxia²¹⁶ NF- κ B también es activado por la luz ultravioleta, por el estrés oxidativo, daño endotelial y por otros mecanismos .

Vía alternativa o no canónica

Junto a esta activación clásica de NF- κ B, hay una vía de activación de NF- κ B independiente de IKK- γ (NEMO) importante para el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, la homeostasis y la inmunidad adaptativa. Es inducida por; el factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF (BAFF), linfotóxina β (LT β), CD40, T-virus linfotrópico humano y virus de Epstein-Barr (EBV), y en ella participa la cinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK fosforila al homodímero IKK α desencadenando su interacción con la proteína p100 que está unida a RelB. La fosforilación de p100 es seguida de su procesamiento en el proteosoma a p52 y por la translocación del complejo RelB/ p52 al núcleo²¹⁰.

5.3.2.4.- NF- κ B e hipoxia

Mientras que varios grupos han descrito previamente, que la hipoxia juega un papel en la señalización de NF- κ B no está claro el mecanismo por el cual una disminución del oxígeno disponible, puede inducir la activación de este factor de transcripción.

Trabajos sobre IKK β y la respuesta inflamatoria apoyan la teoría de que la hipoxia tiene el potencial de modular la respuesta de NF- κ B a estímulos inflamatorios a través de la sobrerregulación catalítica de IKK β ²¹⁶. Recientemente, se ha demostrado un mecanismo por el cual la hipoxia activa NF- κ B a través de la activación de IKK β , que depende de la fosforilación y

degradación de la I κ B- α y la activación de NF- κ B. La expresión y la actividad de IKK β se encuentran aumentadas por la hipoxia.

Hay un trabajo *in vivo* en el que se demuestra una relación cruzada entre NF- κ B y el factor transcripcional inducido por la hipoxia (HIF-1) ²¹⁶.

En el promotor del gen HIF-1 α se han encontrado elementos de respuesta a varias subunidades de NF- κ B (RelA, RelB, c-Rel, p50, p52), indicando que los niveles basales del mRNA de HIF-1 α son directamente modulados por NF- κ B ²⁰⁶.

5.3.2.5.- NF- κ B y la resolución de la inflamación

Como ya hemos dicho la hipoxia activa el sistema de NF- κ B en el riñón de rata y provoca la producción de factores inflamatorios ^{218,219}. En un estudio *in vivo* se ha demostrado ²¹⁹ que durante la isquemia renal se produjo la activación de NF- κ B y alcanzó su punto máximo después de 15 minutos de la reperusión, lo que tuvo como consecuencia la liberación de los mediadores de la inflamación.

Aunque el NF- κ B actúa principalmente como iniciador de la inflamación, hay estudios que sugieren que también puede actuar en la modulación de esta ²²⁰. La inhibición de NF- κ B después del inicio de la agresión inflamatoria, y durante la fase de resolución, podría en ciertas condiciones prolongar la inflamación más que inhibirla, retrasando en este caso la reparación del tejido ²²⁰.

La ablación de IKK demuestra que esta cinasa tiene un papel en la respuesta inflamatoria pero, sorprendentemente, también es necesaria para la reparación del tejido, incluso en condiciones en las cuales la inflamación es el principal mediador del tejido dañado, en un modelo de I/R ²²¹.

Se ha demostrado que la activación de NF- κ B en los leucocitos reclutados durante el inicio de la inflamación se asocia con la expresión de genes pro-inflamatorios, mientras que la activación durante la resolución de la inflamación se asocia con la expresión de genes anti-inflamatorios y la inducción de apoptosis. La inhibición de NF- κ B en la resolución de la inflamación prolonga la respuesta inflamatoria y previene la apoptosis. Esto sugiere que NF- κ B tiene un papel anti-inflamatorio *in vivo* participando en la regulación de la resolución inflamatoria ²²⁰.

5.4.- Receptores tipo toll (TLRs)

Los TLRs son una familia de receptores transmembrana expresados en leucocitos y células epiteliales del riñón que regulan las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas.

El receptor TLR2 podría ser un componente de la respuesta proinflamatoria, ya que su expresión tubular aumenta en la IRA isquémica, y el silenciamiento del gen TLR2 previene la disfunción renal, la infiltración neutrofílica, la apoptosis tubular, y de la inducción de MCP-1, TNF-, IL-6 e IL-1 β inducida por isquemia. Las células epiteliales de los túbulos renales expresan TLR-2 y TLR-4, y dicha expresión está incrementada durante la IRA provocado por isquemia, endotoxemia y nefrotoxicidad. Los ratones deficientes en TLR-2 y los tratados con un oligonucleótido antisentido para TLR-2 están protegidos del daño renal isquémico ²²². Se ha observado un incremento significativo de la expresión de TLR-4 en las células epiteliales tubulares e infiltración de leucocitos riñones isquémicos. La proteína THP es una glicoproteína con funciones no claras expresada en el túbulo distal recto del riñón. Se han utilizado ratones knockout de THP para estudiar el papel de THP y TLR-4 en el daño por I/R renal y se ha demostrado que THP protege al riñón del daño isquémico por disminución de la inflamación y los cambios en la expresión de TLR-4 ²²³. Un estudio reciente muestra el efecto de un inhibidor de TLR-3, 7, 8, y 9 en un modelo de sepsis en ratón y se observa una mejoría en la función renal y disminuye las citocinas pro y antiinflamatorias en suero como el TNF- α e IL-10. La supresión genética de TLR-2 y TLR-4 disminuye el daño en modelos de I/R experimental. ²²⁴ En recientes observaciones clínicas se ha demostrado que los injertos con supresión en la señalización TLR-4 tienen mejor función y una menor expresión de las citocinas proinflamatorias después del trasplante comparados con injertos con una señalización normal de TLR-4 ²²⁵.

5.5.- Células inflamatorias

Son varios los tipos de células inflamatorias que se han involucrado en el daño por I/R renal. Entre ellos hay que destacar los neutrófilos, linfocitos, células natural killer, macrófagos y células dendríticas.

4.5.1.- Neutrófilos

La unión de los neutrófilos al endotelio vascular es el primer paso en la extravasación de estas células al tejido dañado. Después de la adherencia y de la quimiotaxis, la infiltración neutrofílica puede liberar RLO que dañan las células tubulares. (Figura 28)

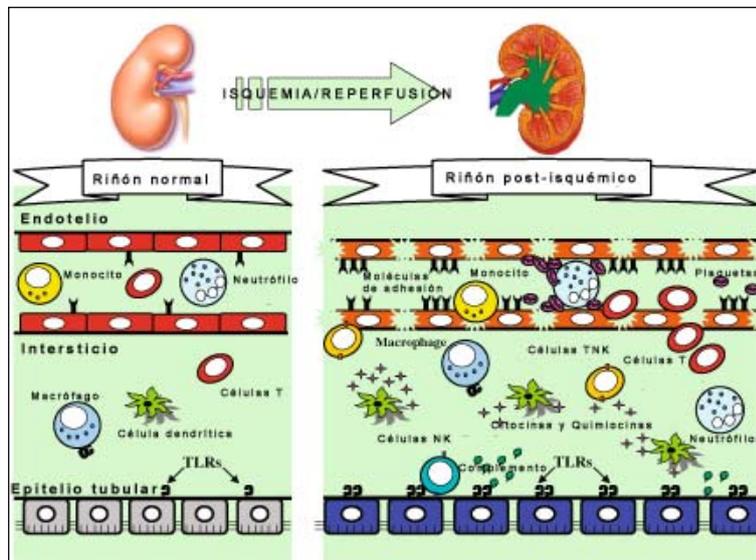


Figura 28.- Células inflamatorias en un riñón normal y post-isquémico¹⁶⁷

Se han llevado a cabo numerosos estudios para conocer el papel exacto de los neutrófilos en IRA y permanece en controversia²²⁶. La IRA inducida por la isquemia, nefrotoxicidad y endotoxemia está asociada con un incremento de la filtración de neutrófilos en el riñón²²⁷. Está demostrado que los neutrófilos están involucrados en el daño tubular y juegan un importante papel en la IRA. Múltiples estudios demuestran la acumulación de neutrófilos en la IRA isquémica demostrando un efecto beneficioso de las terapias anti-ICAM-1 y en ratones en los que se les han disminuido los neutrófilos periféricos en IRA.

La rápida sobrerregulación de CD44 en las células endoteliales de los capilares renales, median el reclutamiento de neutrófilos al tejido postisquémico en un modelo de I/R renal en ratón. Los ratones deficientes en CD44 o la administración de un anti-CD44 reducen la entrada de neutrófilos al tejido postisquémico, asociado a una preservación de la función del riñón²²⁸. Sin embargo, en otro estudio, las ratas a las que se les ha disminuido los neutrófilos periféricos no estaban protegidas de la IRA isquémica.

También los ratones a los que se les ha administrado un anticuerpo monoclonal (RB6-8C5) que produce una disminución en los neutrófilos en sangre periférica, presentan una pequeña disminución en la creatinina en plasma durante la IRA isquémica pero no se observa una

reducción en la NTA a pesar de la ausencia de infiltración neutrofílica en el riñón. Además, la actividad de la caspasa-1 y de IL-18 estaba significativamente incrementada.

Un estudio reciente investiga el papel de la catepsina G liberada por los neutrófilos activados utilizando ratones knockout de catepsina G en daño por I/R renal, y demuestra que la ausencia de catepsina G, disminuye en un 70% la apoptosis tubular²²⁹. Por lo tanto, hay estudios que demuestran tanto papeles perjudiciales como beneficiosos de los neutrófilos en la IRA.

5.5.2.- Linfocitos

Se ha demostrado que los linfocitos son importantes moduladores en la respuesta inflamatoria tanto innata como adaptativa en modelos de IRA. En un estudio, los ratones deficientes en células T CD4 y en células T CD8 estaban protegidos de la IRA isquémica. Los linfocitos T helper (células T CD4) se subdividen en TH1 (IL-2, IFN- γ) y TH2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) dependiendo del patrón de citocinas que secretan. Un estudio sobre linfocitos T helper en daño renal agudo inducido por I/R demuestra que TH1 es patogénico y TH2 puede ser protector. Los ratones deficientes solo en linfocitos B están también protegidos contra la IRA isquémica.

Se ha investigado en ratones deficientes, en CD3, CD4 y CD8, los efectos de los células T sobre la permeabilidad vascular renal en IRA por I/R, demostrando que se incrementa probablemente por la vía de las células T en la producción de las citocinas (TNF- α , IFN- γ)²³⁰.

Recientes estudios, han demostrado que las células T reguladoras (Tregs) son potentes inmunosupresoras y con propiedades antiinflamatorias. Las Tregs son identificadas por la expresión de CD4 y CD25 sobre la superficie celular y la sobreexpresión de FoxP3, un único marcador para las células Tregs que es esencial para su función y desarrollo. Las Tregs median la IRA isquémica a través de la IL-10 mediante la supresión del sistema inmune innato. La ausencia parcial de las Tregs con un anti-CD25 empeora la IRA isquémica resultando en una mayor infiltración neutrofílica y macrofágica en el riñón y un incremento de la transcripción de citocinas innatas en el riñón²³¹.

5.5.3.- Células natural killer (NK)

Las células NK son un tipo de linfocitos del sistema inmune innato a través de su capacidad de secretar citocinas. Las NK son únicas en su expresión constitutiva de receptores para citocinas y quimiocinas. La mayoría de los receptores expresados por las células NK en ratón son las mismas que en humanos incluyendo NK1.1. Una vez que las células NK llegan al tejido dañado

activan y liberan citocinas como IL-8, por lo que juega un importante papel en numerosos procesos de daño.

Un estudio ha investigado el papel de las NK en la muerte de las células epiteliales tubulares renales *in vitro* e *in vivo* en ratón. El estudio demuestra por primera vez como las NK pueden destruir e inducir apoptosis directamente de las células epiteliales tubulares y contribuyen con el daño por I/R renal. En ausencia de las NK en ratones wild-type, estos eran protegidos de la IRA ²³².

Las células NKT son otro subtipo de linfocitos interesante y tienen características de las T y de las NK; tienen funciones reguladoras por liberación de citocinas y de INF- γ . La activación de las células NKT está involucrada en la producción de neutrófilos e INF- γ en IRA en ratón. Se ha demostrado que la anestesia con isoflurano protege contra la IRA isquémica ya que reduce la inflamación y la modulación neutrofílica y macrofágica renal, y la afluencia de las células NKT al riñón del ratón ²³³.

5.5.4.- Macrófagos

La infiltración macrofágica en el riñón ha sido descrita en varios tipos de daño renal como glomerulonefritis, nefropatía diabética, ablación renal y obstrucción ureteral unilateral. En varios modelos de glomerulonefritis, la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias por los macrófagos, como por ejemplo, iNOS, TNF- α , IL-1 β , MCP-1, MIF, y NF- κ B, se cree que juegan un importante papel en la patogénesis del daño.

La inflamación mediada por los macrófagos en el intersticio de la franja exterior de la médula externa ha sido descrito en el curso de la IRA isquémica en la rata, y en el ratón ^{94,234}. La ausencia de los macrófagos en el riñón inducida, utilizando clodronato encapsulado en liposomas o técnicas genéticas da como resultado la protección frente a la IRA isquémica ^{94,142}.

Un anticuerpo anti-B7-1 bloquea la adherencia celular mononuclear en vasos rectos en ratas y atenúa la IRA isquémica tanto funcional como histológicamente. Asimismo en ratones knockout en osteopontina se disminuye la infiltración macrofágica postisquémica y la fibrosis intersticial. Los mecanismos de protección contra la IRA isquémico por la ausencia de macrófagos todavía no se conocen. Se ha estudiado la IL-18 liberada por los macrófagos en el desarrollo de la IRA en ratones, y se ha demostrado que no está involucrada en el desarrollo de la IRA ¹⁸².

5.5.5.- Células dendríticas (CD)

La principal función de las CD es la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Los precursores de las CD son derivados de la médula espinal y entran en el riñón desde la sangre. La inflamación local o el tejido dañado inducen la maduración de las CDs, lo cual tiene como resultado la pérdida de actividad fagocítica, expresión de moléculas coestimuladoras e interacción con células T²³⁵.

Las CDs están presentes de forma abundante en el intersticio de riñones de ratón normal, esas CDs expresan el marcador CD11c, y también expresan el MHC. Las CDs forman una cadena contigua a través de todo el riñón, y juegan un importante papel en la IRA isquémica. Después de la I/R renal, las CDs residentes liberan TNF- α , IL-6, MCP-1 y RANTES y la ausencia de CDs antes del daño isquémico reduce significativamente los niveles de TNF- α en el riñón¹⁸⁶.

Hay interacciones entre las CDs y las NK que son importantes en la respuesta inflamatoria. La activación de las NK induce la maduración de las CDs. Las CDs inmaduras son vulnerables a las citolisis autólogas mediadas por las NK, mientras que las CDs maduras están protegidas. La activación de las CDs mediada por las NK es dependiente de la activación de TNF- α e INF- γ . *In vitro*, la producción de IL-12, IL-18, IL-15 e INF- γ por CDs activados aumenta la producción de NK, de INF- γ , proliferación y citotoxicidad²³⁶.

5.6.- Activación de la Inflamación

La inflamación es una compleja serie de reacciones homeostáticas que involucra a los mecanismos inmunológicos humorales y celulares para proteger al organismo. Si esta reacción resulta exagerada o crónica, no cumple su función, y ocurren cambios patológicos.

La inflamación se caracteriza por una reacción vascular a un estímulo localizado (reconocimiento antigénico), produciéndose cambios del flujo y del calibre vascular. Inicialmente se va a producir una vasoconstricción transitoria de las arteriolas seguida de una vasodilatación que hace incrementar el flujo vascular (hecho fundamental de los cambios hemodinámicos precoces en la inflamación aguda). Esto se sigue de una reacción celular, la disminución en la velocidad de la circulación determina que los leucocitos, principalmente neutrófilos, se desplacen

hacia el endotelio vascular, iniciándose una reacción tisular en la que los leucocitos liberan mediadores inflamatorios, provocando los efectos deseados (eliminación del antígeno) o los efectos no deseados (destrucción tisular). Estos leucocitos se adhieren al endotelio, inicialmente de forma transitoria y luego más fuertemente, migrando a través de la pared vascular hacia el espacio intersticial²³⁷. Además se van a producir cambios en la permeabilidad vascular que se manifiestan clínicamente como edema¹⁴³. (Figura 29)



Figura 29.- Respuestas ante la inflamación

Las células que van a participar en el proceso inflamatorio son principalmente leucocitos (neutrófilos y monocitos) y el endotelio.⁹⁵ Los leucocitos van a englobar y degradar las bacterias, inmunocomplejos y restos celulares necróticos contribuyendo sus enzimas lisosómicas en la respuesta defensiva. Sin embargo debemos tener en cuenta que los leucocitos a su vez, pueden prolongar la inflamación y aumentar el daño tisular por la liberación de mediadores químicos, enzimas y RLO²²⁸. (Figura 30)

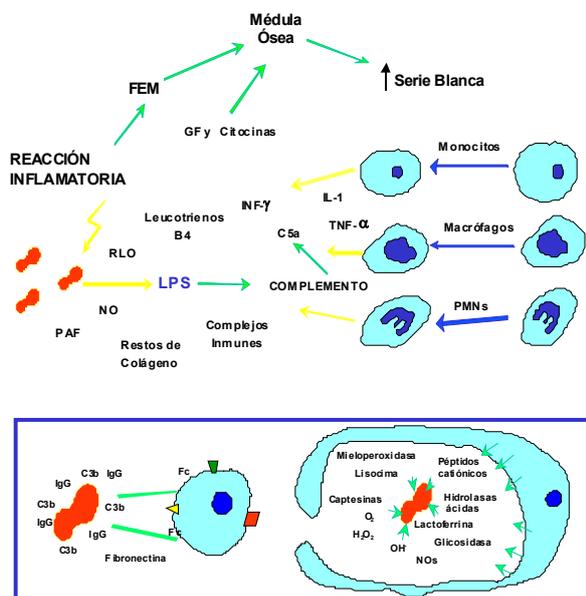


Figura 30.- Esquema de la respuesta inflamatoria.

5.6.2.- Interacción Leucocito-Endotelio

La interacción leucocito-endotelio juega un importante papel en la patogénesis de la inflamación. Se ha demostrado una masiva infiltración de leucocitos en el tejido postisquémico paralela a la lesión en el mismo ²³⁸.

El fenómeno inflamatorio se desencadena por diferentes estímulos que inducen la liberación de mediadores proinflamatorios endógenos, que a su vez inducen la activación endotelial. El endotelio activado expresa *de novo* o incrementa la expresión de diferentes moléculas de adhesión, que incluyen la E y P-selectinas, VCAM-1 e ICAM-1. Además, las células endoteliales activadas liberan factores quimiotácticos con efectos sobre la síntesis de factores procoagulantes y una mayor susceptibilidad a la apoptosis. Los factores endógenos que inducen activación endotelial son sintetizados principalmente por los macrófagos como el TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ . El TNF- α es el principal estímulo que induce la expresión de las CAMs en el endotelio activado. Una vez que el endotelio es activado, la extravasación de los leucocitos transita por los 4 pasos conocidos de: rodamiento, activación, adhesión y migración transendotelial. Es importante mencionar que otro elemento clave en el fenómeno inflamatorio es el estímulo quimiotáctico, responsable de la atracción de los leucocitos al foco inflamatorio. Diferentes factores solubles son capaces de inducir quimiotaxis, incluyendo el factor de activación plaquetario (PAF), algunos leucotrienos, las prostaglandinas y el fragmento del complemento C5a. Sin embargo, el principal estímulo de extravasación leucocitaria son las quimocinas, sintetizados por una amplia variedad de tipos celulares, como las células endoteliales, las plaquetas y los leucocitos.

Los principales efectos de las quimocinas sobre los leucocitos son la quimioatracción, la inducción de activación celular, la regulación de la actividad de integrina leucocitaria y aquellos fenómenos como consecuencia de las vías de activación a través de las proteínas G, que incluye el AMPc y fosfolipasas con activación de la PKC y un incremento del Ca²⁺ libre intracelular.

La secuencia de este proceso va a ser la siguiente: (Figura 31)

Marginación y Rodamiento: Es la primera interacción entre leucocitos y las células endoteliales. Los leucocitos, debido a las alteraciones del flujo laminar, disminuyen sensiblemente su velocidad y quedan marginados en la periferia rodando sobre el endotelio vascular y siendo expuestos a los mediadores de la inflamación liberados por el endotelio activado. Esta fase es rápidamente inducida y varios estudios han sugerido el papel de los receptores de selectinas en el rodamiento de los leucocitos ²³⁹.

Activación y quimiotaxis: Los leucocitos, debido a la disminución de su velocidad, marginación y rodamiento, están expuestos a los mediadores de la inflamación de forma más intensa y esto provocará la expresión/activación de las moléculas de adhesión celular (CAM) presentes tanto en ellos mismos como en el endotelio vascular. La expresión de estas CAM es inducida, aumentada o alterada por los agentes inflamatorios y mediadores químicos.

Adherencia: Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular debido a la activación de una serie de moléculas de adhesión presentes en el leucocito y el endotelio vascular. La expresión de estas moléculas es inducida, aumentada o alterada por los agentes inflamatorios y mediadores químicos²⁴⁰.

Migración: Los leucocitos se desplazan por la superficie endotelial y finalmente atraviesan la membrana basal pasando al espacio extravascular inflamado. Una vez fuera, responden a estímulos quimiotácticos siendo los más significativos para los neutrófilos: productos bacterianos, componentes del sistema del complemento principalmente C5a y productos de la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B.

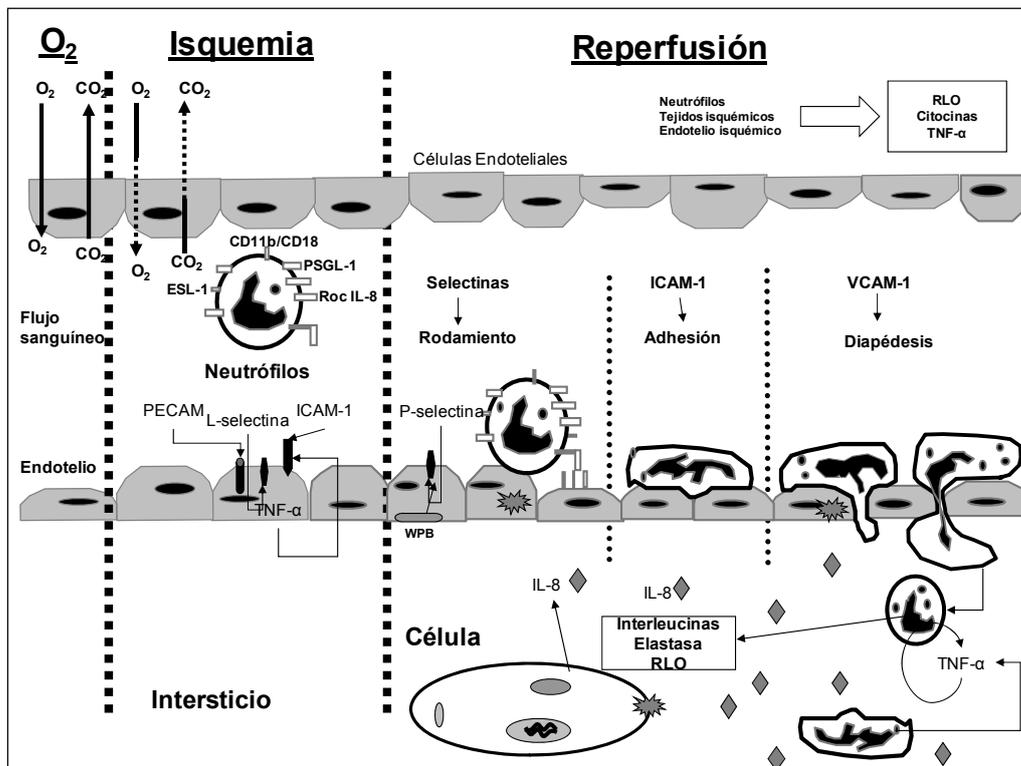


Figura 31.- Proceso secuencial y moléculas de adhesión implicadas en las interacciones leucocito-endotelio. En la parte superior de la figura están representadas las moléculas dependientes del leucocito y en la parte inferior las moléculas que se encuentran en la célula endotelial.

Las interacciones entre leucocitos y endotelio son cruciales en el mecanismo de lesión en la I/R y su conocimiento será determinante para el tratamiento del fenómeno inflamatorio en general y de la lesión por reperfusión en particular ¹³⁵.

Este proceso implica múltiples moléculas de adhesión celular, que se expresan tanto en la superficie de los leucocitos como en la de las células endoteliales, y que son las responsables de la interacción leucocito-endotelio. (Figura 32)

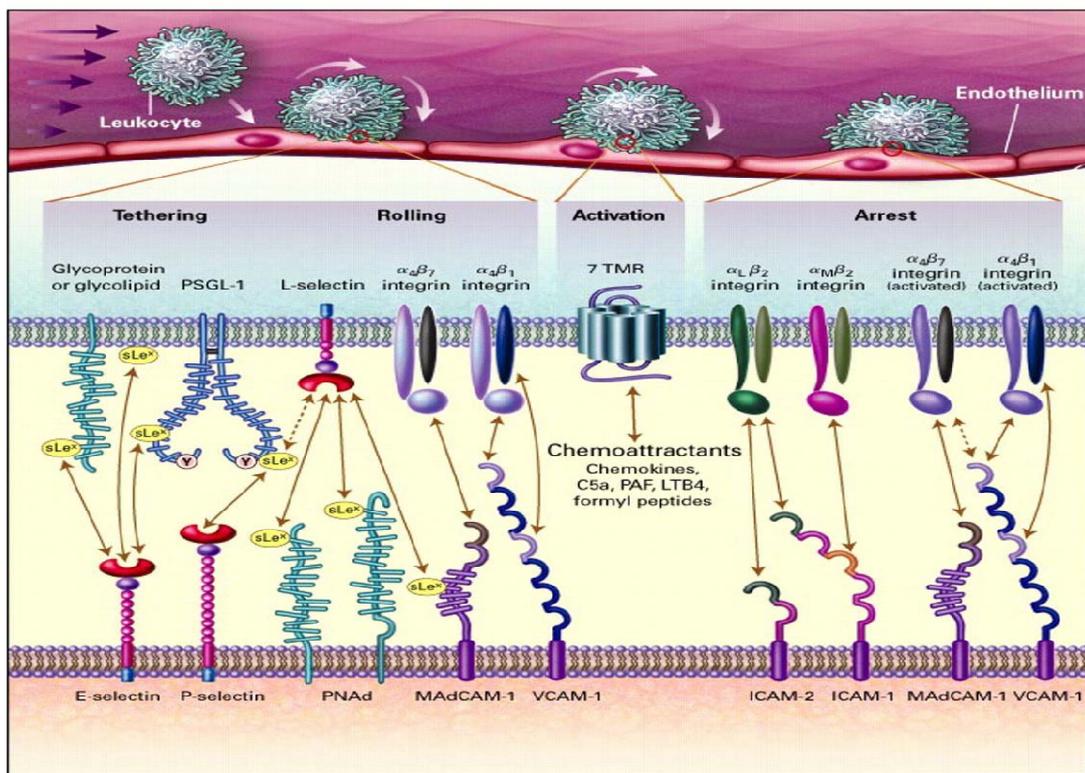


Figura 32.- CAMs implicadas en la Interacción leucocito-endotelio. ²⁴¹

5.6.2.- Moléculas de adhesión celular (CAMs)

El proceso por el cual las células de un organismo multicelular se reconocen entre sí y se adhieren específicamente está basado en la presencia de moléculas específicas, denominadas CAMs, las cuales forman parte de un conjunto muy complejo cuyas funciones van más allá del simple reconocimiento y adherencia celular y que poseen enorme importancia en múltiples procesos biológicos tanto normales como patológicos ²⁴².

Las CAMs son glicoproteínas que se expresan tanto en la superficie de los leucocitos como en la de las células endoteliales, aunque también se encuentran en la matriz tisular, y mediante las cuales se efectúan las interacciones específicas célula-célula y célula-matriz. Estas glicoproteínas tienen en un extremo un grupo carboxilo, el llamado carboxi-terminal, que se encuentra fijo en el citoplasma y en el cito-esqueleto. Inmediatamente después del carboxi-terminal se encuentra la región transmembrana, que atraviesa la membrana celular. El resto de la glicoproteína se ubica extracelularmente y termina en un grupo amino, el amino-terminal que da la especificidad a la molécula para unirse a otras CAMs.

Todas las funciones biológicas parecen estar influenciadas por estas interacciones, por lo tanto las CAMs regulan muchos procesos biológicos tales como la activación, migración, crecimiento, diferenciación y muerte celular mediante la transducción directa de señales y la modulación de otras cascadas de señalización intracelular desencadenadas por diferentes factores de crecimiento.

En el momento de la respuesta inflamatoria durante la reperfusión, tanto el endotelio isquémico como los leucocitos, expresan en la superficie de sus membranas celulares las CAMs, las cuales inducen infiltración neutrofílica y lesión tisular. La comprensión de los mecanismos en los cuales se basa la adhesión de los leucocitos al endotelio aportará las bases necesarias para el tratamiento antiadhesivo del proceso inflamatorio. A pesar de que la mayoría de los estudios se han desarrollado en modelos de experimentación animal, han aportado las primeras evidencias significativas de la adhesión como un paso esencial en la progresión de la lesión postisquémica²⁴².

Las CAMs se han clasificado estructuralmente en cinco familias (Cadherinas, Inmunoglobulinas, Integrinas, Selectinas y Proteoglicano). De ellas, las relacionadas con el fenómeno de la inflamación son: selectinas, β 2-integrinas e inmunoglobulinas de las cuales a continuación exponemos sus componentes y características.

5.6.2.1.- Familia de las selectinas

Son las moléculas de adhesión celular que vehiculizan el contacto inicial en las interacciones leucocito-endotelio. Son glucoproteínas transmembrana de tipo I que comparten un dominio aminoterminal tipo lectina, por donde se unen a hidratos de carbono específicos presentes en sus ligandos, de forma dependiente de Ca^{+2} . Las selectinas reconocen oligosacáridos sialilados o sulfatados relacionados con los antígenos Lewis^a o Lewis^x que pueden formar parte de

la porción glucídica de diversas glucoproteínas. Son proteínas relacionadas con las mucinas y un elevado porcentaje de su peso molecular corresponde a su parte glucídica.

Las interacciones mediadas por esta familia de moléculas de adhesión celular son de una gran complejidad y redundancia, siendo las responsables del inicio de las interacciones leucocito-endotelio en la respuesta inflamatoria. Hasta el momento se conocen tres selectinas²⁴³ (Tabla V):

- ✚ Molécula de adhesión leucocitaria (L-selectina).
- ✚ Molécula de adhesión endotelial leucocitaria (E-selectina).
- ✚ Activador plaquetario dependiente del gránulo de membrana (P-selectina).

La L-selectina se expresa en la mayoría de los leucocitos, mientras que las E y las P-selectinas se expresan en células endoteliales activadas por estímulos proinflamatorios, y en el caso de la P-selectina también es expresada por plaquetas activadas²⁴⁴.

Tabla V.- Familia de las selectinas

CAMs	SINÓNIMOS	CÉLULA EXPRESA	LIGANDO	CÉLULA EXPRESA LIGANDO	FUNCIÓN
L-selectina*		Linfocito	CD34, MAdCAM-1, E-Selectina, P-Selectina, PSGL-1	Endotelial	Rodamiento
E-selectina**		Endotelial	PSGL-1, L-Selectina, ESL-1	Neutrófilo Monocito	Rodamiento
P-selectina***		Plaquetas Endotelial	PSGL-1, L-Selectina, CD24	Plaqueta Neutrófilo Monocito	Rodamiento

* Disminuida por citocinas; ** Inducida por citocinas; *** Liberada por citocinas

5.6.2.2.-Familia de las integrinas

Son glucoproteínas que constituyen una familia de 24 receptores heterodiméricos, compuesto cada uno de ellos por una subunidad α y otra β . Son moléculas que regulan dinámicamente sus propiedades adhesivas mediante cambios conformacionales, así como por redistribución espacial en la superficie celular.

Las integrinas se expresan constitutivamente en los leucocitos y las observaciones recientes muestran la existencia de tres estados conformacionales (plegado con baja afinidad, extendido con afinidad intermedia y extendido con alta afinidad) ²⁴⁵.

Las integrinas son moléculas fundamentales en la migración celular que controlan las interacciones intercelulares y célula-matriz extracelular durante la recirculación y la inflamación. Una de sus características más importantes es la regulación de su actividad adherente, independientemente de su grado de expresión en la membrana. Así, los leucocitos circulantes en sangre mantienen sus integrinas en conformación inactiva para evitar contactos inespecíficos con paredes vasculares no inflamadas, pero cuando encuentran un foco inflamatorio, se produce una rápida activación *in situ* de sus integrinas.

Como en el caso de las selectinas, la distribución espacial de las integrinas y sus ligandos en estructuras de membrana especializadas es esencial para su funcionamiento adecuado. Esta organización requiere una precisa regulación del citoesqueleto para permitir el reclutamiento de intermediarios de señalización y segundos mensajeros que desencadenen la activación celular. ²⁴⁶.

Nos centraremos, a continuación, en las más importantes relacionadas con el fenómeno inflamatorio. (Tabla VI):

- ✚ α L β 2-integrina [Antígeno relacionado con la función linfocítica-1 (LFA-1), CD11a/CD18].
- ✚ α M β 2-integrina [Integrina específica de linaje mielóide (Mac-1), CD11b/CD18].
- ✚ α X β 2-integrina (p150.95, CD11c/CD18).
- ✚ α 4 β 1-integrina [Antígeno de activación muy tardía-4 (VLA-4), CD49d/CD29].
- ✚ α 4 β 7-integrina.
- ✚ α D β 2-integrina (CD11d/CD18).

Las integrinas más relevantes para la adhesión leucocitaria al endotelio son miembros de la subfamilia β 2, particularmente LFA-1 y la integrina específica de linaje mielóide Mac-1, así como las integrinas α 4 (VLA-4 y α 4 β 7). La mayoría de sus ligandos son proteínas transmembrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. LFA-1 puede unirse a cinco moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1 a ICAM-5), aunque las más relevantes son ICAM-1 e ICAM-3.

ICAM-1 se expresa en leucocitos, células dendríticas y células epiteliales. Además, su expresión es baja en células endoteliales quiescentes y aumenta con estímulos proinflamatorios. ICAM-3 se expresa constitutivamente en todos los leucocitos.

Un ligando adicional de LFA-1, es la molécula de adhesión de uniones intercelulares JAM-A, que se concentra selectivamente en la región apical de las uniones estrechas endoteliales y se redistribuye parcialmente a la cara apical del endotelio con ciertos estímulos proinflamatorios. Por otra parte, Mac-1 interacciona con ICAM-1, JAM-C y el receptor RAGE ²⁴⁷.

La integrina VLA-4 interacciona con VCAM-1, que es una molécula de adhesión que se expresa *de novo* tras la activación endotelial y también se une a JAM-B.

Tabla VI.- Familia de las integrinas

CAMs	SINÓNIMOS	CÉLULA EXPRESA	LIGANDO	CÉLULA EXPRESA LIGANDO	FUNCIÓN
$\alpha\text{L}\beta\text{2}^*$	LFA-1 CD11a/CD18	Leucocito	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, JAM-A	Endotelial	Adhesión Rodamiento lento
$\alpha\text{M}\beta\text{2}^{**}$	Mac-1 CD11b/CD18 CR3	Monocito Neutrófilo	ICAM-1, ICAM-2, iC3b, Heparina, Fibrinógeno, JAM-C, Vitronectina	Endotelial	Adhesión
$\alpha\text{X}\beta\text{2}^{***}$	P150.95 CD11c/CD18	Monocito Neutrófilo	Fibrinógeno iC3b JAM-C	Endotelial	Activación
$\alpha\text{4}\beta\text{1}^{***}$	VLA-4 CD49d/CD29	Monocito Linfocitos Neutrófilo	VCAM-1, Fibronectina	Endotelial	Adhesión
$\alpha\text{4}\beta\text{7}^{**}$		Linfocitos	MAdCAM-1	Endotelial	Adhesión
$\alpha\text{D}\beta\text{2}$	CD11d/CD18	Monocito	ICAM-3, Fibrinógeno, Vitronectina	Endotelial	Adhesión

* Inducible por citocinas; ** Constitutiva, *** Liberada por citocinas

5.6.2.3.- Superfamilia de las inmunoglobulinas

Los miembros de esta familia se caracterizan por contener los llamados dominios inmunoglobulínicos, que consisten en dos láminas peptídicas en estructura β -plegada y en

disposición antiparalela estabilizadas por puentes disulfuro. Estas características estructurales son compartidas por moléculas que participan en el reconocimiento antigénico y en la activación linfocitaria como los anticuerpos, el receptor T, los antígenos de clases I y II del sistema mayor de histocompatibilidad y sus contrarreceptores CD8 y CD4. En general, las moléculas de esta familia se hallan presentes en células presentadoras de antígenos y tienen un papel crucial como moléculas accesorias en el reconocimiento antigénico y la activación linfocitaria. Los principales ligandos de las integrinas implicados en la adhesión de los leucocitos pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Entre sus componentes, teniendo en cuenta su importancia en el fenómeno inflamatorio, destacamos las siguientes ²⁴⁸ (Tabla VII):

- ✚ Molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1, CD54).
- ✚ Molécula de adhesión intracelular-2 (ICAM-2).
- ✚ Molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, INCAM-110).
- ✚ Molécula de adhesión celular plaquetaria-endotelial-1 (PECAM-1, CD31).
- ✚ MAdCAM-1.
- ✚ CD99.
- ✚ Molécula de adhesión celular endotelial (ESAM).
- ✚ Molécula de adhesión de uniones intercelulares (JAM-A).
- ✚ Molécula de adhesión de uniones intercelulares JAM-B.
- ✚ Molécula de adhesión de uniones intercelulares JAM-C.

ICAM-1 e ICAM-2 se expresan constitutivamente pero ICAM-1 aumenta con estímulos proinflamatorios.

PECAM-1, es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas formado por 6 dominios Ig que está expresada en los bordes intercelulares de células endoteliales así como en las plaquetas, neutrófilos, monocitos, y algunas células T ²⁴⁹.

Las JAMs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas contituidas por dos dominios Ig extracelulares ²⁴⁸.

La CD99 es una molécula expresada tanto en neutrófilos como otros leucocitos y en las uniones interendoteliales y participan en la trans migración leucocitaria ²⁵⁰.

Tabla VII.- Superfamilia de las inmunoglobulinas

CAMs	SINÓNIMOS	CÉLULA EXPRESA	LIGANDO	CÉLULA EXPRESA LIGANDO	FUNCIÓN
ICAM-1*	CD54	Endotelial, Monocito, Linfocito T y B, Dendrítica	α L β 2 α M β 2	Leucocitos, Monocitos, Endotelio	Adhesión, Transmigración
ICAM-2**	CD102	Endotelial, Monocito, Dendrítica	α L β 2 α M β 2	Leucocitos, Endotelio	Adhesión, Transmigración
VCAM-1*	CD106	Endotelial	α 4 β 1 α 4 β 7	Linfocitos, Monocitos	Adhesión, Transmigración
PECAM-1*	CD31	Endotelio, Monocitos, Linfocitos	PECAM-1	Endotelio, Plaquetas	Adhesión, Transmigración
MAdCAM-1*		Endotelio	α 4 β 7, L-selectina	Endotelio	Adhesión, Transmigración
CD99		Leucocito, Neutrófilo	CD99	Endotelio	Transmigración
ESAM		Endotelio	ESAM		Transmigración
JAM-A		Uniones intercelulares, Endotelio, Epitelio, Plaquetas, Neutrófilos, Monocitos, Linfocitos	JAM-A, LFA-1	Leucocitos	Adhesión, Transmigración
JAM-B		Uniones endoteliales	VLA-4, JAM-B, JAM-C	Leucocitos	
JAM-C		Endotelio, Plaquets, Células dendríticas	JAM-B, JAM-C, Mac-1	Leucocitos	Adhesión, Transmigración

* Inducible por citocinas; ** Constitutiva

5.6.3.- Etapas de la interacción Leucocito-Endotelio.

5.6.3.1.- Marginación y rodamiento.

Los leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo deben establecer contacto con la pared vascular y adherirse a ella para iniciar la respuesta inflamatoria. Los leucocitos, debido a las alteraciones del flujo laminar, disminuyen sensiblemente su velocidad y quedan marginados en la periferia rodando sobre el endotelio vascular, siendo así expuestos a los mediadores de la inflamación liberados por el endotelio. El contacto y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio activado son los primeros pasos del proceso secuencial de extravasación, seguidos de la

adhesión firme y la migración transendotelial. Estos contactos iniciales están mediados esencialmente por selectinas y sus ligandos, y requieren que haya flujo para ser eficientes²³⁹.

Aunque las selectinas y sus ligandos tienden a interactuar con afinidad variable, la elevada frecuencia de asociación-disociación de sus interacciones les permite mediar contactos lábiles y transitorios entre leucocitos y endotelio. Estos contactos producen la disminución de velocidad de los leucocitos y permiten su rodamiento sobre la superficie endotelial, favorecen las interacciones posteriores mediadas por integrinas y sus ligandos aumentando la adherencia de los leucocitos, lo que finalmente los detiene en la pared vascular²⁴⁰.

Las selectinas (P, E y L) son glucoproteínas transmembrana de tipo I que se unen a hidratos de carbono presentes en sus ligandos, de forma dependiente de Ca^{+2} . La L-selectina se expresa en la mayoría de los leucocitos, mientras que las E y las P- selectinas se expresan en células endoteliales activadas por estímulos proinflamatorios, y en el caso de la P-selectina también es expresada por plaquetas activadas.

Aparte de la interacción de la L-selectina leucocitaria con las E y las P-selectinas endoteliales, la proteína PSGL1 tiene un papel dominante como ligando de las tres selectinas. De hecho, la unión de PSGL1 a las E y P selectinas promueve la interacción de los leucocitos con el endotelio, mientras que la unión de PSGL1 a la L-selectina permite la interacción entre leucocitos, por la cual los leucocitos adheridos facilitan la captura de otros leucocitos circulantes en zonas de endotelio inflamado, independientemente de que éstos expresen ligandos para las selectinas endoteliales, proceso denominado reclutamiento secundario. Aparte de PSGL1, las selectinas también pueden unirse a otras glucoproteínas, como CD44 o ESL1 (Ligando de la E-selectina1) en el caso de la E-selectina. Cada ligando parece desempeñar un papel diferencial durante el proceso de captura de neutrófilos. Así, PSGL1 es el principal ligando implicado en la captura inicial de los leucocitos, mientras que ESL1 es necesario para convertir las uniones transitorias iniciales en un rodamiento más lento y estable. Por último, CD44 controla la velocidad de rodamiento e interviene en la polarización de PSGL1 y L-selectina, probablemente para permitir el reclutamiento secundario. Las plaquetas también pueden actuar como reclutadores secundarios de leucocitos debido a su capacidad de interactuar con ellos y con el endotelio simultáneamente. Además, son capaces de secretar quimiocinas que se inmovilizan en la superficie luminal endotelial favoreciendo el proceso de adhesión²⁵¹.

Aparte de las selectinas y sus ligandos, las integrinas $\alpha4\beta1$ y $\alpha4\beta7$, a través de su interacción con VCAM-1 y MAdCAM-1 respectivamente, pueden mediar de manera

independiente estos contactos iniciales. Por otra parte, la interacción LFA-1/ICAM-1 coopera con la función de la L-selectina estabilizando la fase de contacto transitorio y disminuyendo la velocidad de rodamiento.

La localización de los receptores de adhesión es necesaria para su correcto funcionamiento durante el tráfico leucocitario. Por ello, las selectinas, sus ligandos y las integrinas $\alpha 4$ se encuentran agrupadas en los extremos de los *microvilli* de los leucocitos. Por otra parte, el anclaje de las selectinas al citoesqueleto de actina mediante proteínas como alpha-actinina o ERM (ezrin/radixin/moesin) es necesario para su adecuado funcionamiento²⁵².

Se ha demostrado que las selectinas activan múltiples rutas de señalización, que conectan con procesos como la reorganización del citoesqueleto de actina, tales como la cascada de MAPK, p56lck, Ras o Rac2²⁴⁴.

Por otra parte, PSGL-1 activa también diferentes rutas de señalización intracelular que tienen un efecto inductor de la activación de los leucocitos aumentando la expresión de diferentes moléculas que están implicadas en los pasos siguientes del proceso de extravasación y en funciones efectoras, así como un papel inesperado en la inducción de funciones tolerogénicas en células dendríticas²⁵³.

5.6.2.2.- Activación y quimiotaxis

Modulación de la actividad de las integrinas mediada por quimiocinas

Durante el establecimiento de los contactos iniciales con el endotelio vascular, los leucocitos disminuyen su velocidad de rodamiento y se activan al encontrar quimiocinas inmovilizadas y ligandos de integrinas expuestos en la superficie apical endotelial.

Este paso de activación permite la parada y la adhesión firme de los leucocitos al endotelio en condiciones de flujo fisiológico. La activación del leucocito implica un marcado cambio morfológico: la célula redondeada circulante se transforma en una célula promigratoria con morfología polarizada, en la cual se distinguen al menos dos regiones, el frente de avance y el urópodo. La polarización del leucocito permite a la célula la coordinación de las fuerzas intracelulares para producir la locomoción celular necesaria durante el proceso de extravasación.

Las quimiocinas secretadas en un entorno inflamado pueden pasar a través del endotelio y aparecer en la superficie de las células endoteliales asociadas con proteoglicanos provocando el

rodamiento de los leucocitos ²⁵⁴. Las quimiocinas unidas a los glucosaminoglucanos de la membrana apical endotelial, actúan señalizando a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) localizados en los *microvilli* del leucocito, induciendo una gran variedad de señales, del interior al exterior, en fracciones de segundo, que conducen a múltiples cambios conformacionales en las integrinas ²⁵⁴, y la adhesión firme de los leucocitos así como cambios conformacionales y la formación de pseudópodos. Estos cambios de forma están asociados con la conversión de G-actina a F-actina permitiendo a la célula para entrar en el proceso de adherencia y más tarde de trans migración. La complejidad y el corto margen de tiempo de los mecanismos de señalización inducidos por las quimiocinas que controlan la activación de integrinas son compatibles con la existencia de redes proteínicas compartimentadas y preformadas en los leucocitos. La presencia de quimiocinas específicas en diferentes lechos vasculares contribuye a orquestar el reclutamiento selectivo de las diferentes subpoblaciones leucocitarias a los focos inflamatorios o a los órganos linfoides secundarios. Además, las quimiocinas pueden producir un efecto diferencial en integrinas específicas dentro del mismo microambiente ²⁵⁵.

Modulación de la afinidad de las integrinas mediada por sus ligandos

Tras la activación de los leucocitos, inducida por la unión de las quimiocinas a sus receptores y la señalización del interior al exterior, se lleva a cabo la activación de las integrinas de los leucocitos [la integrina beta1 y las integrinas beta2 LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta\text{2}$) y Mac-1 ($\alpha\text{M}\beta\text{2}$)], la conformación de las integrinas cambia de manera reversible de inactiva (plegada) a extendida con afinidad intermedia. Este evento prepara a la integrina para unirse a su ligando endotelial, que culmina con la activación total de la integrina y la firme adhesión del leucocito. Por lo tanto, el estado conformacional de alta afinidad para la parada inmediata del leucocito en el endotelio requiere de las quimiocinas inmovilizadas y los ligandos de integrinas, una inducción bidireccional²⁵⁶.

Sin embargo, las integrinas- α4 , que contienen un dominio *I-like* en sus cadenas β , pueden interaccionar espontáneamente con sus ligandos endoteliales sin estimulación quimiotáctica previa.

Además, la unión al ligando aumenta el reclutamiento de integrinas adicionales para incrementar la adhesión firme del leucocito en condiciones de estrés de flujo. Por otra parte, varios estudios indican que el estrés de flujo también regula las integrinas reforzando sus enlaces e incluso aumentando su afinidad.

5.6.3.3.- Adhesión

Regulación de la migración de los leucocitos por integrinas

Las señales implicadas en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio mediadas por integrinas deben ser atenuadas y debilitar las uniones para permitir la migración del leucocito hacia un sitio apropiado para iniciar el proceso de trans migración endotelial. Las integrinas $\beta 2$ parecen tener una implicación importante en este proceso de migración, ya que su bloqueo o el de sus ligandos generan migración al azar, fallo de posicionamiento en las uniones interendoteliales y diapédesis defectuosa ²⁵⁷.

Los estudios *in vivo* utilizando ratones genéticamente modificados deficientes en LFA-1 o Mac-1 claramente demostraron mecanismos fundamentalmente diferentes para cada una de estas integrinas $\beta 2$. Mientras la adhesión firme está mediada por LFA-1, la locomoción depende de Mac-1; ambos procesos contribuyen a una eficiente trans migración. Tras su activación por unión a ligando, las integrinas regulan diferentes efectores de contractilidad de miosina, GTPasas remodeladoras de actina y moléculas implicadas en la regulación de la red de microtúbulos tanto en el frente de avance como en el urópodo. Así, la integración de señales generadas en ambos polos celulares conduce a un movimiento coordinado del leucocito ²⁵⁸.

Papel funcional de las CAMs endoteliales VCAM-1 e ICAM-1.

Las moléculas VCAM-1 e ICAM-1, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, son las principales moléculas de adhesión endotelial implicadas en la unión a las integrinas VLA-4 y LFA-1, respectivamente ²⁵⁹. Solo ICAM-1 se expresa escasamente en el endotelio quiescente, mientras que se induce la expresión de ambas moléculas tras la activación celular por citocinas proinflamatorias tales como la IL-1 y el TNF- α .

Además, se ha descrito la unión de VCAM-1 e ICAM-1 al citoesqueleto de actina a través de dos miembros de la familia ERM, (ezrina y moesina) ²⁶⁰. Estas moléculas funcionan como conectores de la membrana con el citoesqueleto de actina regulando la morfogénesis cortical y la adhesión celular.

Se ha estudiado la dinámica de VCAM-1 e ICAM-1 en células HUVEC (células primarias de vena de cordón umbilical) activadas con TNF- α durante el proceso de interacción leucocito-endotelio. Se ha observado que, tras la parada de los leucocitos en el endotelio, la unión de VCAM-1 e ICAM-1 con sus ligandos desencadena la reorganización del citoesqueleto cortical

endotelial de actina y genera una estructura tridimensional de anclaje que rodea el leucocito y previene la separación de los leucocitos adheridos en condiciones de flujo fisiológico.

Dicha estructura contiene gran acumulación de dichos receptores de adhesión, así como las proteínas ezrina y moesina activadas. La estructura endotelial de anclaje se sostiene por el citoesqueleto de actina, y otra serie de proteínas. También, segundos mensajeros tales como PI (4,5)P2 o la ruta de señalización Rho/160ROCK son importantes para la generación y el mantenimiento de la estructura endotelial de anclaje.

Además, ambos receptores, ICAM-1 y VCAM-1, se agrupan de manera conjunta en la estructura endotelial de anclaje, aunque uno de ellos no se encuentre unido a su correspondiente ligando. Este reclutamiento conjunto también es independiente del anclaje del citoesqueleto de actina y de la formación de heterodímeros ICAM-1/VCAM-1, ya que se debe a la inclusión de VCAM-1 e ICAM-1 en microdominios ricos en tetraspaninas, que actúan como plataformas endoteliales de adhesión especializadas ²⁶¹.

Las tetraspaninas son pequeñas proteínas que atraviesan cuatro veces la membrana y se asocian lateralmente a través de su segundo dominio extracelular con otras proteínas integrales de membrana, regulan su función y forman dominios multiproteínicos en la membrana plasmática. Se les ha implicado en varias funciones celulares, entre otras, migración, adhesión intercelular homotípica y heterotípica. Por lo tanto, la inclusión de ICAM-1 y VCAM-1 en dominios de tetraspaninas es necesaria para su adecuado funcionamiento en condiciones dinámicas estrictas como el estrés de flujo. No solamente VCAM-1 e ICAM-1 interactúan con microdominios de tetraspaninas, sino también otros receptores de adhesión tales como JAM-A, PECAM-1, ICAM-2 o CD44. Así pues, podría postularse que los microdominios de tetraspaninas actuarían como plataformas especializadas que organizarían de manera constitutiva en la membrana los receptores de adhesión apropiados para la rápida cinética y eficiente consecución del proceso de extravasación leucocitaria ²⁶¹.

Los receptores endoteliales de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 son capaces de transmitir señales tras su unión con el ligando. La molécula VCAM-1 está implicada en la apertura de las uniones interendoteliales para facilitar la extravasación de los leucocitos. De hecho, VCAM-1 induce la activación de la NADPH oxidasa (NOX2 posiblemente) y la producción de RLO de manera dependiente de la GTPasa Rac, con la consiguiente activación de metaloproteinasas de matriz y pérdida de la adhesión mediada por VE-cadherina, lo que favorece el proceso de extravasación. Por otra parte, VCAM-1 e ICAM-1 son capaces de inducir un rápido incremento de las

concentraciones de Ca^{+2} intracelular, produciendo la activación de rutas que incrementan la permeabilidad endotelial y conllevan a un aumento de la migración transendotelial leucocitaria^{262,263}.

Finalmente, ICAM-1 también puede inducir su propia expresión y la de VCAM-1, actuando como un mecanismo de regulación para facilitar la transmigración leucocitaria.

5.6.3.4.- Migración

El proceso de transmigración leucocitaria, que tiene lugar durante la respuesta inflamatoria, requiere de importantes cambios morfológicos que implican el agrupamiento de receptores de adhesión en estructuras protusivas de la membrana plasmática, tanto en leucocitos como en células endoteliales.

La transmigración es un proceso activo no solo para los leucocitos sino también para el endotelio, lo que promueve la rápida y eficiente llegada de los leucocitos a los focos de la inflamación sin comprometer la integridad de la barrera endotelial.

El funcionamiento coordinado de los receptores de adhesión, el citoesqueleto y las moléculas de señalización es crucial para la transmigración leucocitaria. Así la correcta integración de señales “del exterior al interior” y del “interior al exterior” en leucocitos y endotelio durante cada paso de la transmigraciones es crítico para permitir la consecución de este fenómeno.

Las señales implicadas en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio deben ser reversibles, debilitando los contactos originales lo suficiente para permitir la migración y extravasación de los leucocitos. Durante la transmigración endotelial, las uniones endoteliales se deshacen parcialmente evitando el daño de la monocapa o importantes cambios de permeabilidad. Así, las membranas del leucocito y el endotelio se mantienen en estrecho contacto durante la diapédesis y, posteriormente, las membranas endoteliales vuelven a sellar sus conexiones.

En el proceso de la transmigración leucocitaria, además de la ruta clásica de diapédesis, en la que los leucocitos cruzan a través de uniones interendoteliales (ruta paracelular), existen evidencias que indican la existencia de una ruta alternativa, en la que los leucocitos podrían migrar a través de células endoteliales individuales (ruta transcelular) sin perturbar las uniones interendoteliales²⁶⁴. Este proceso tiene lugar preferentemente en la microvasculatura. (Figura 33)

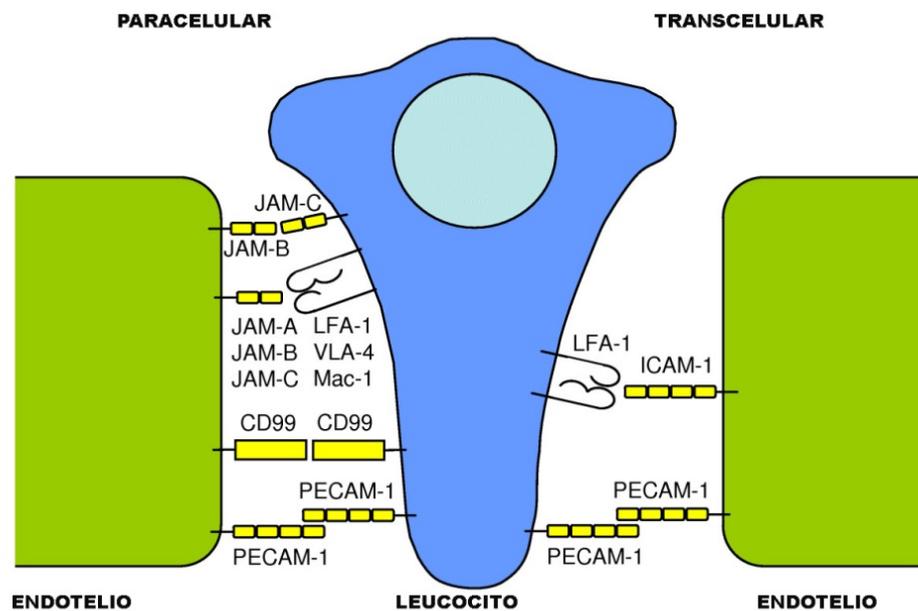


Figura.33.- Trans migración leucocitaria

✓ Ruta paracelular

El factor determinante en la vía paracelular son las uniones intercelulares endoteliales, así como los cambios en la integridad de la barrera endotelial en vénulas postcapilares que afectan al reclutamiento de células inflamatorias ²⁴⁸.

Una vez que los leucocitos encuentran un sitio apropiado para trans migrar (preferentemente en las uniones intercelulares), extienden pseudópodos exploratorios entre dos células endoteliales adyacentes.

A continuación, los pseudópodos evolucionan a una lamela que va atravesando el espacio abierto en la monocapa. Durante este proceso, la molécula LFA-1 es la integrina que tiene el papel preponderante. Esta molécula se relocaliza rápidamente, formando un agrupamiento en forma de anillo en la interfase de contacto entre leucocito y endotelio, donde interacciona con ICAM-1 y, en algunos otros modelos celulares, con JAM-A.

Otras proteínas implicadas en el proceso de trans migración son ICAM-2, JAM-B, JAM-C, PECAM-1 (CD31), ESAM, CD99, etc. Muchas de ellas son capaces de interactuar homofílica y heterofílicamente manteniendo las uniones interendoteliales o las interacciones leucocito-endotelio ²⁶⁵.

Dos tipos de uniones interendoteliales son relevantes para el proceso de trans migración. (Figura 34)

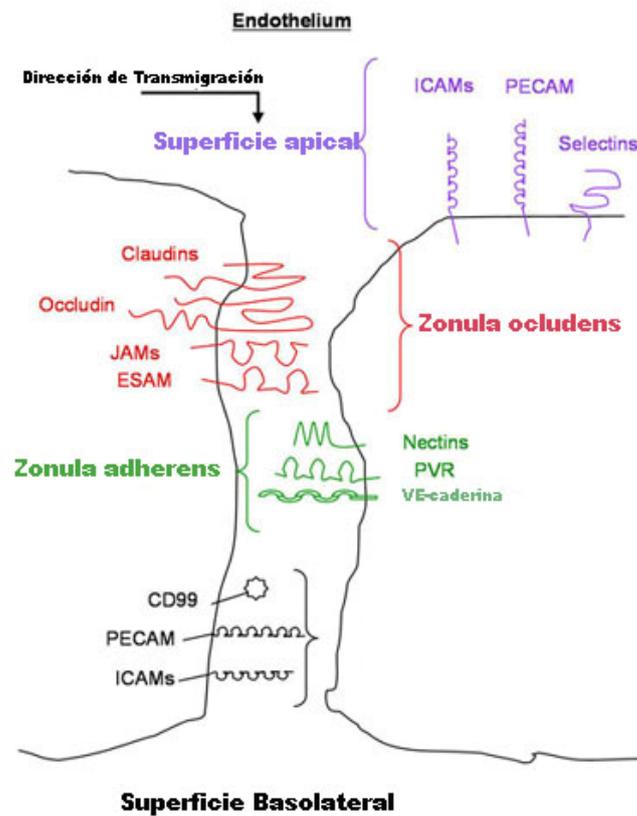


Figura 34.- Uniones interendoteliales: “zónula ocludens y zónula adherens”

Las uniones estrechas (zonula ocludens) se encuentran en la zona apical y contienen tres tipos de proteínas transmembrana, ocludina, claudina y moléculas de adhesión de unión celular (JAMs). Estas moléculas transmembrana están vinculadas con el citoesqueleto de actina a través de la interacción con las moléculas que contienen dominios PDZ, tales como ZO-1²⁴⁸.

Jerárquicamente, el determinante más importante de la barrera endotelial son las zonulas adherens que se forman por la interacción homofílica de VE-cadherina²⁶⁶. VE-cadherina actúa como un guardián para el paso de leucocitos y la inhibición de la VE-cadherina aumenta la permeabilidad de la monocapa de células endoteliales y la tasa de extravasación neutrófilica *in*

vivo. Estudios *in vitro* indican que huecos de VE-caderina pueden formarse transitoriamente durante la diapédesis de leucocitos.

La función de VE-caderina para regular la barrera endotelial o la trans migración de leucocitos puede ser modulada por la fosforilación de la cola citoplasmática de VE-caderina, que puede ser estimulado por la adhesión de los neutrófilo a las células endoteliales, mediada por la ICAM-1. La trans migración de leucocitos implica interacciones homofílicas y heterofílicas entre los receptores de adhesión en los leucocitos y el endotelio ^{248,267}.

Las JAMs además de interactuar de manera homofílica, JAMs participan como receptores para integrinas de los leucocitos. Se ha demostrado que JAM-A interactúa con LFA-1, JAM-B se une al VLA-4 y JAM-C interactúa con Mac-1 ²⁶⁸. La función de JAM-A en la diapédesis de leucocitos *in vivo* ha sido demostrada por los experimentos con anticuerpos de inhibición, así como por la evaluación de los ratones que presentan deficiencia de JAM-A, mostrando que JAM-A sobre los neutrófilos, así como sobre las células endoteliales participan en la extravasación neutrofílica. JAM-C mediante la interacción heterofílica con la integrina Mac-1 lleva a cabo la interacción firme de plaquetas-neutrófilo. Además, la JAM-C soluble o anticuerpos para JAM-C bloquean la trans migración neutrofílica a través de las células endoteliales, considerando que la acumulación de neutrófilos *in vivo* fue reforzada por la sobreexpresión de JAM-C específicos de las células endoteliales, en ratones. Por lo tanto, JAMs son receptores importantes en la migración de leucocitos a través de la barrera endotelial ^{248,265}.

Otra molécula de adhesión importante en la regulación de la trans migración de leucocitos es PECAM-1 ²⁴⁹. Varios estudios indican que la trans migración endotelial de los leucocitos está mediada por la interacción homofílica de PECAM-1, como se demuestra con anticuerpos de bloqueo tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* ²⁴⁹. Las PECAM-1 endoteliales, son inducidas por la IL-1 β , pero no por el TNF- α , para el reclutamiento de células inflamatorias. Recientemente era identificada una proteína de anclaje glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), la CD177 expresada exclusivamente sobre neutrófilos identificado como un nuevo ligando de PECAM-1 de adhesión heterofílica involucrada en migración trans endotelial de neutrófilos ²⁶⁹.

La ICAM-1 de las células endoteliales ha sido implicada en la trans migración. La ICAM-1 se une a la LFA-1 de los leucocitos en forma de anillo, durante la trans migración. Además otra estructura trans migratoria formada por ICAM-1 y proyecciones en forma microvellosidades, se demostró que rodeaban a los neutrófilos trans migratorios durante la diapédesis ²⁷⁰.

✓ Ruta transcelular

Las observaciones recientes sobre el mecanismo de este proceso de migración transcelular indican que inicialmente los leucocitos generan podosomas invasivos dependientes de la actividad de Src cinasa y la proteína reguladora del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para entrar en contacto con la superficie endotelial, que después evolucionan para formar el poro transcelular. En el endotelio es necesaria la fusión de membranas regulada por Ca^{+2} y por complejos que contienen las proteínas SNARE.

También se ha descrito la translocación de ICAM-1 a caveolas tras la adhesión leucocitaria y la posterior formación de una especie de canal multivesicular, que contiene ICAM-1 y caveolina-1, alrededor del seudópodo leucocitario que penetra a través de la célula endotelial. Ambas proteínas, ICAM-1 y caveolina, siguen el paso de todo el leucocito moviéndose hacia la membrana endotelial basal. Recientemente se ha descrito la existencia *in vivo* de estructuras endoteliales en forma de cúpula que cubren al leucocito durante la migración transendotelial²⁷¹.

Estas observaciones parecen indicar que las estructuras endoteliales de anclaje podrían llegar a ser cúpulas que envolvieran totalmente los leucocitos en la cara luminal del endotelio, lo que permitiría la ruptura de la membrana basolateral sin poner en peligro la función de barrera endotelial. (Figura 33)

6.-Cardiotrofina-1 (CT-1)

6.1.- Introducción

La proteína denominada CT-1 es un mediador de comunicación celular, caracterizada e identificada en 1995 por Pennica y cols., por su actividad hipertrófica en cultivos de cardiomiocitos embrionarios de ratón ²⁷².

La CT-1 pertenece a la familia de interleucina-6 (IL-6), junto con: el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M (OSM), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), citocina similar a la cardiotrofina (CLC), interleucina 11 (IL-11), e interleucina 31 (IL-31) ²⁷³⁻²⁷⁶.

Esta familia de citocinas, se caracteriza porque en su complejo de receptores, poseen una subunidad común, la glicoproteína gp130, encargada de traducir la señal al interior de la célula ²⁷⁷.

Poseen efectos pleiotrópicos y redundantes ^{274,278} en el organismo y están involucradas en una gran variedad de respuestas biológicas, incluyendo respuesta inmune, inflamación, desarrollo neuronal y hematopoyesis ²⁷³. Además, activan genes involucrados en crecimiento, diferenciación, supervivencia, apoptosis y proliferación. Los miembros de la familia de la IL-6 son muy distintos en cuanto a la secuencia primaria de aminoácidos (15-20% aminoácidos idénticos), pero tienen estructuras terciarias similares conteniendo 4 hélices anfipáticas.

6.2.- Estructura de la cardiotrofina-1

6.2.1.- Estructura molecular. Biosíntesis

El gen que codifica la síntesis de CT-1 de ratón, localizado en el cromosoma 7F3, está constituido por 5,4 kilobases (kb), y consta de 3 exones y 2 intrones ²⁷⁹. El mRNA de CT-1 contiene

1,4 kb y está expresado en corazón, pulmón, hígado, riñón, y músculo esquelético de ratón y rata^{272,274}. La proteína se biosintetiza como una proteína de 21,5 kDa.

En 1996 Pennica y cols,²⁷⁸ aislaron el gen humano y lo localizaron en el cromosoma 16, en la región 16p11.1-16p11.2. con un tamaño de 6-7 kilobases (kb) y consta de 3 exones y 2 intrones. La similitud en la secuencia entre rata y ratón es de un 94%, siendo superior a la homología con humano, 80%²⁷⁴.

El tamaño del RNA mensajero (mRNA) de humano adulto es de 1.7 kb y se caracteriza por altos niveles de expresión constitutiva en en tejido de corazón, músculo esquelético, próstata y ovario, bajos niveles de expresión constitutiva en pulmón, riñón, páncreas, timo, testículos e intestino delgado y poca expresión o ninguna en cerebro, placenta, hígado, bazo, colon, y en leucocitos de sangre periférica. Este patrón es similar al que se encontró en tejidos de ratón, y rata^{272,274}, con la excepción del hígado, en que es menor en humano que en ratón. También se encontró una fuerte expresión en pulmón y riñón en fetos humanos²⁷⁵.

Para poder aclarar los mecanismos de acción, así como el papel patológico y fisiológico de la CT-1 se aisló el gen y se observó que su expresión se regula a nivel transcripcional de forma diferente a otras citocinas de la familia de IL-6. El promotor de la CT-1 de ratón, situado a 2.2 kb desde el sitio de iniciación de la transcripción 5', contiene varios motivos de unión de factores de transcripción (CREB, HIF-1, MyoD, NF-IL6, Nkx2.5, y GATA) (Figura 35). Algunos de los sitios de unión para estos factores de transcripción se han descrito también en la región promotora 1.1 kb del humano. Estas secuencias de nucleótidos altamente conservados entre ratón y humano en el gen de la CT-1 (55%) podrían indicar mecanismos reguladores muy conservados para la expresión del gen de la CT-1. La expresión de Nkx2.5 es crítica para la propia formación del corazón. Durante la embriogénesis del corazón, GATA4 es la responsable de la génesis de las miofibrillas y la formación de los sarcómeros y juega un importante papel en la morfogénesis cardíaca normal²⁷⁹.

El promotor de IL-6 está bien caracterizado²⁸⁰ y en miocitos cardíacos en hipoxia, es regulada por NF-κB y NF-IL6 cuyos sitios de unión están localizados cerca del TATA box. Por el contrario el gen promotor de CT-1 en ratón no posee ni sitio de unión para TATA box ni para NF-κB. Eso demuestra que CT-1 es regulada de diferente manera que IL-6 y el resto de los miembros, de la superfamilia²⁷⁹.

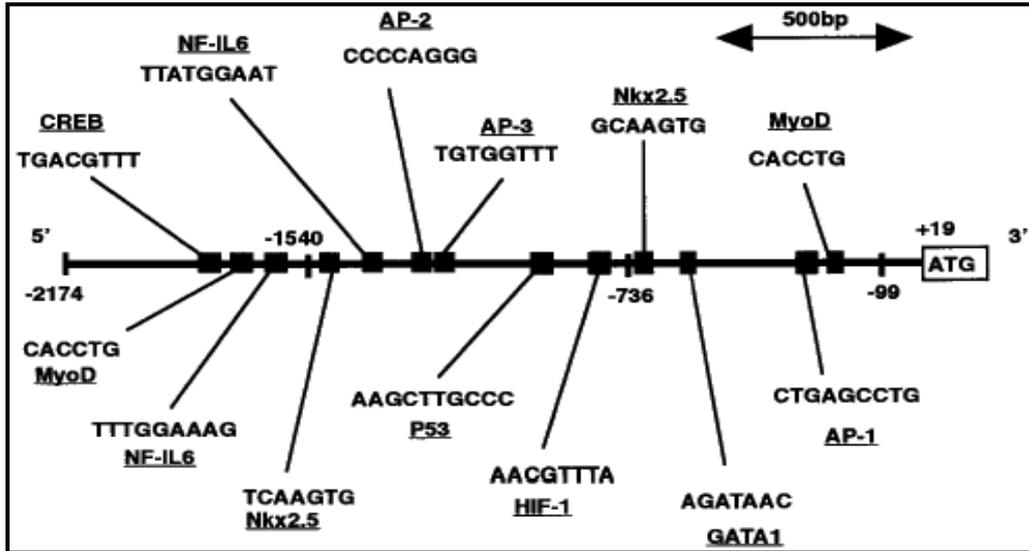


Figura 35.- Posibles elementos reguladores en el extremo 5' del gen de CT-1 de ratón. Posibles sitios de unión para algunos factores de transcripción ubicuos desde el extremo 5' alargándose 2174-pares de bases desde el lugar de iniciación de la transcripción²⁷⁹.

Respecto a su estructura terciaria, CT-1 tiene cuatro largas hélices- α anfipáticas, denominadas A, B, C, y D, unidas por plegamientos que le confieren una estructura característica²⁸¹ (Figura 36).

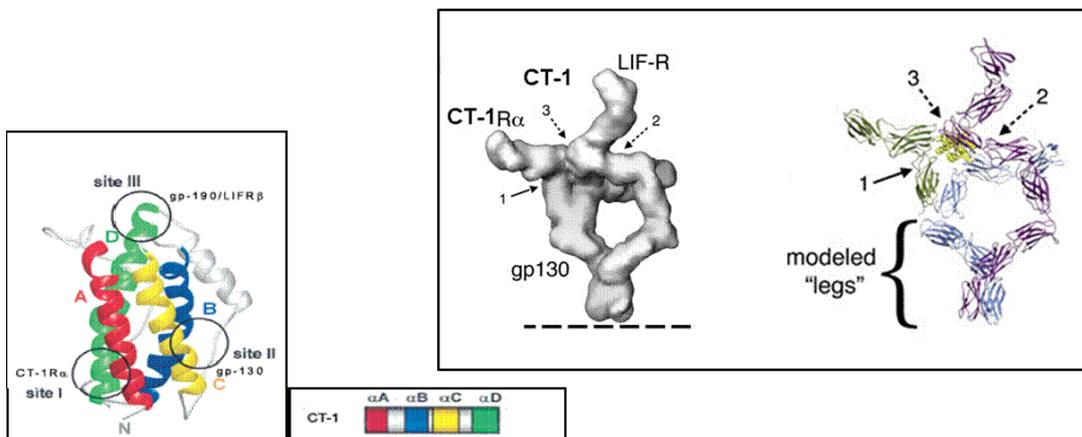


Figura 36.- Las cuatro largas hélices A, B, C y D están marcadas en diferentes colores. Los lugares de unión de los receptores I= CT-1R α , II= gp-130 interacciona con el CBM (módulo de unión a la citocina) de gp-130 y III= gp-190/LIF-R están indicados por círculos^{277,280}.

Se han identificado distintas áreas sobre la superficie de las citocinas denominadas "sitios de unión" las cuales interaccionan de manera específica con sus receptores.

- El sitio de unión 1 se corresponde con los residuos C-terminales de la hélice D y los restos C-terminales del bucle AB. Esta interacción se realiza mediante una asparragina que

queda expuesta hacia el receptor gracias a la concavidad hidrofóbica que generan restos de glicina. La interacción se produce con el dominio del receptor carente de señalización intracelular, CT-1R α . Este lugar determina la especificidad.

- ✚ El sitio de unión 2 se corresponde con residuos localizados en el medio de las hélices A y C y puede ser el lugar de unión de la subunidad del receptor gp 130. Esta interacción se realiza por medio de dos aminoácidos: uno hidrófobo como es la fenilalanina, y otro básico como es la arginina vecina.
- ✚ El sitio 3, suele corresponderse con la unión a la subunidad del receptor LIFR β ²⁸⁰.

6.2.2.- Complejo receptor

6.2.2.1.- Formación del complejo receptor

El receptor de CT-1 es un complejo de 3 proteínas transmembrana altamente glicosiladas compuesto por la cadena gp130, la subunidad β del receptor LIF (LIFR β) y un tercer componente conocido como la subunidad α del receptor CT-1(CT-1R α) (Figura 37). La unión de la CT-1 a sus receptores induce heterodimerización de gp130 y LIFR β .

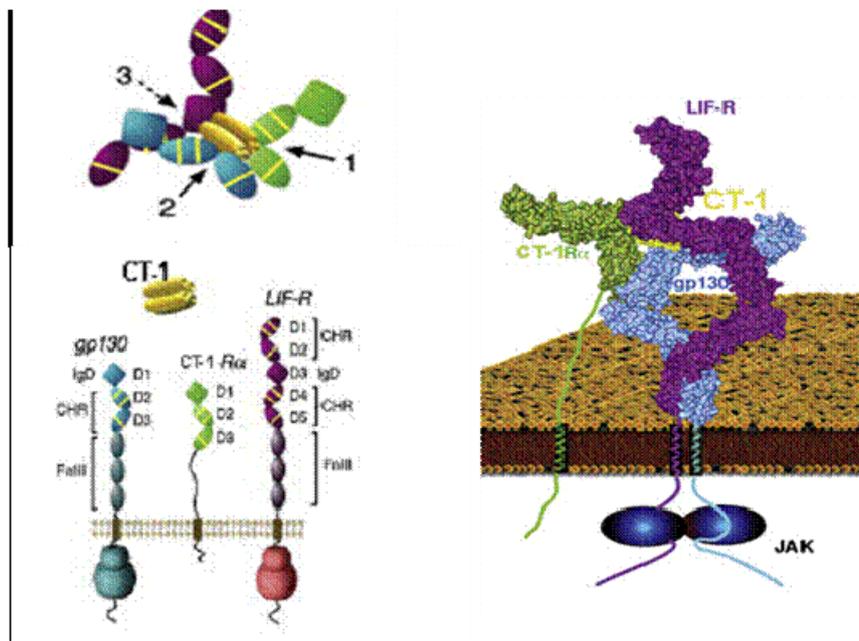


Figura 37.- La CT-1 se une a un complejo trimérico de receptores para activar la cascada de señalización, formado por los receptores: gp130, CT-1R α , LIFR β (Modificada de Skiniotis G, 2008)²⁸⁰.

Vamos a describir las tres cadenas proteicas por separado (Figura 38):

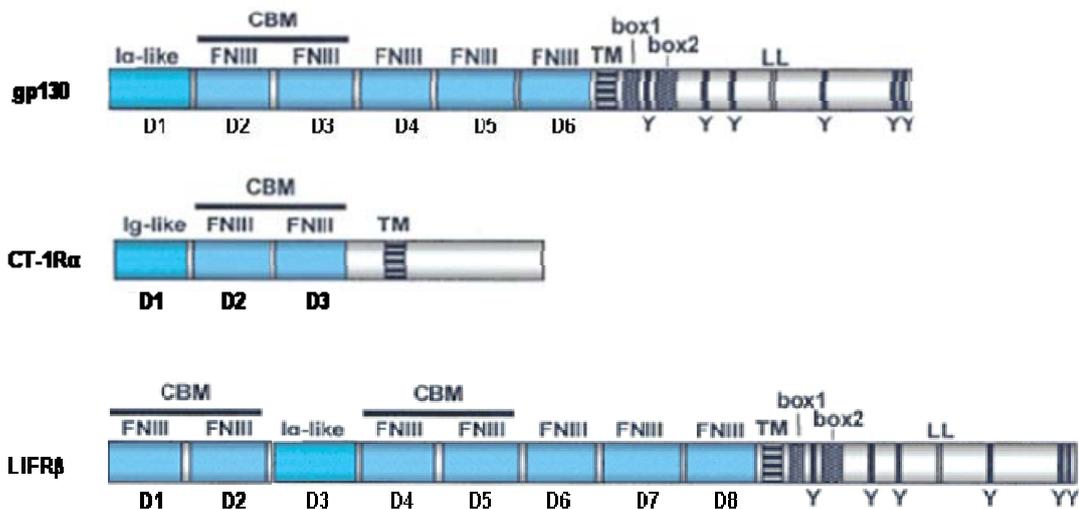


Figura 38.- Dominios estructurales de las tres cadenas proteicas

Glicoproteína gp130

La glicoproteína gp130 se encuentra formando parte del receptor y es la encargada de iniciar el mecanismo de acción²⁸².

Consta de (Figura 38):

- ✚ El **dominio extracelular** que está compuesto por 597 aminoácidos divididos en seis dominios: Cinco dominios de fibronectina tipo III y un dominio tipo inmunoglobulina (Ig-like)
 - Un dominio **Ig-like** localizado en el N-terminal. (D1)
 - Dominio **CHR** (Regiones homólogas de unión a la citocina)= **CBM** (módulo de unión a la citocina) que comprende dos dominios FNIII (fibronectina tipo III).^{280,283}
- El extremo N-terminal en su región extracelular posee dos pares de residuos de cisteínas conservados y un motivo Tryp-Ser-X-Tryp-Ser (WSXWS, donde X es un aminoácido no conservado) en su extremo carboxi-terminal. La unión del ligando a la subunidad del receptor gp130, ocurre a través de los tres dominios distales de la membrana (D1-D3).

- Tres dominios FNIII adicionales. Estos tres dominios proximales a la membrana (D4-D6) no juegan un importante papel en el reconocimiento del ligando, pero se necesitan para la señalización ²⁸⁰.

✚ **Dominio transmembrana (TM)**

✚ **Región citoplasmática.** No se han encontrado secuencias con actividad catalítica pero existen aminoácidos hidrofóbicos denominados respectivamente *box1* y *box2* que son necesarios para la unión a JAK1 y 2 (inactivas) y la transducción de señales al interior de la célula.

CT-1R α

CT-1R α ó gp80R, es la subunidad α específica de la citocina, sin capacidad de enviar señales al citoplasma. Su región extracelular es la de unión con la CT-1 (Figura 38). CT-1R α participa en la formación de este complejo trimérico y es la que le confiere una alta sensibilidad y especificidad para la CT-1, está altamente glicosilado y tiene un peso molecular de 80kDa (gp80)²⁸⁴.

La presencia de este receptor adicional específico para CT-1 fue descubierto en células neuronales, anclado a la membrana mediante un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) ^{283,285}.

Receptor del factor LIF (LIFR β)

El receptor LIFR β , también denominado gp190, es la subunidad transductora de señal al interior de la célula, que a menudo no es específica de la CT-1, sino que es compartida por receptores de otras citocinas. LIFR difiere de gp130 en que tiene dos dominios CBM (D1-D2 y D4-D5) añadidos al dominio Ig y tres dominios FNIII (D6-D7-D8) (Figura 38).

Las cadenas polipeptídicas de estos receptores se caracterizan por poseer en su región extracelular dos pares de residuos de cisteínas conservados en el extremo N-terminal y un motivo Tryp-Ser-X-Tryp-Ser (WSXWS, donde X es un aminoácido no conservado) en su extremo carboxi-terminal. La presencia de este dominio permite la unión eficiente del ligando al receptor ²⁸⁶.

6.2.2.2.- Activación del complejo receptor

Tras la unión de CT-1, ambos gp130 y LIFR- β son fosforilados en residuos tirosina, haciendo más evidente que la señalización de CT-1 es a través del heterodímero gp130/LIFR- β ²⁸⁷.

La activación de gp130 por CT-1 se lleva a cabo de manera secuencial. La CT-1 interaccionaría con su receptor específico vía “sitio I”. Este complejo binario (CT-1/CT-1R α) es entonces competente para acoplarse a la región CBM de la subunidad del receptor gp130, localizado en el dominio D2-D3, permitiendo la unión de gp130 vía “sitio II” de la CT-1, para formar un complejo trimolecular intermedio sin capacidad de señalización.

El complejo trimolecular luego heterodimeriza vía la interacción del “sitio III” de la CT-1 con LIFR en la posición D3 ²⁸⁶. Por lo tanto la unión de la CT-1 a sus receptores, produce la heterodimerización ²⁸⁷ de gp130, LIFR y la tercera subunidad del receptor (Figura 39), provocando cambios bioquímicos en el interior de la célula e induciendo una serie de señales intracelulares que incluyen la activación temprana de tirosina cinasas de la familia de las janus cinasas (JAK-1, JAK-2 y Tyk2).

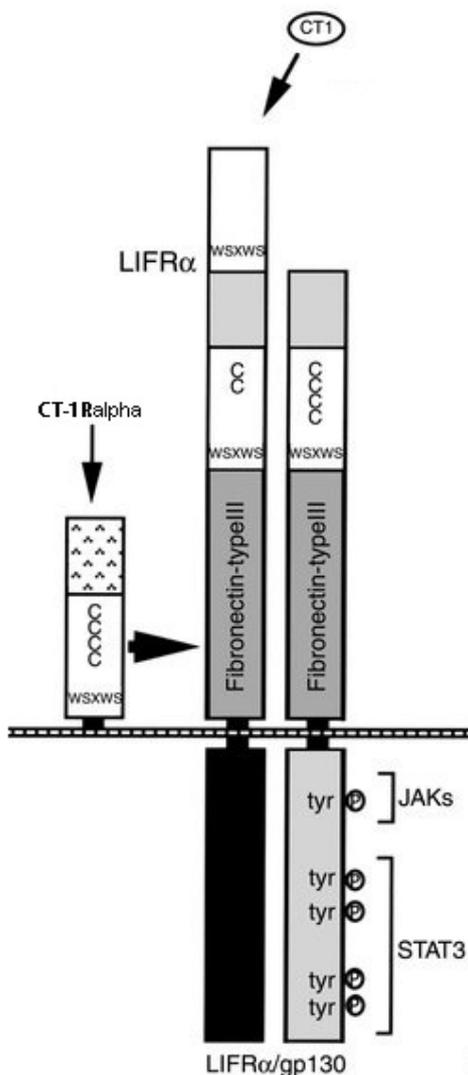


Figura 39.- Complejo receptor de la CT-1 ²⁸⁸.

Estructura y función de las JAKs

Las Janus cinasas (JAKs) son una familia de proteínas con actividad tirosina-cinasa²⁸⁸. En mamíferos, la familia de las JAKs está constituida por 4 miembros denominados JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2, que presentan un grado de homología, y funciones en gran medida redundantes. La expresión de JAK1, JAK2 y Tyk2 es ubicua, mientras que JAK3 se expresa únicamente en células hemáticas de estirpe mieloide.

Las JAKs son cinasas relativamente grandes, de unos 1.150 aminoácidos, y con un peso molecular de entre 120-140 kDa aproximadamente, que presentan un elevado grado de homología, y funciones en gran medida redundantes. Desde el punto de vista estructural, las JAKs se caracterizan por poseer 7 regiones conservadas, denominados JH (JAK homology) desde el extremo carboxi-terminal al amino-terminal (JH1-JH7) (Figura 40)

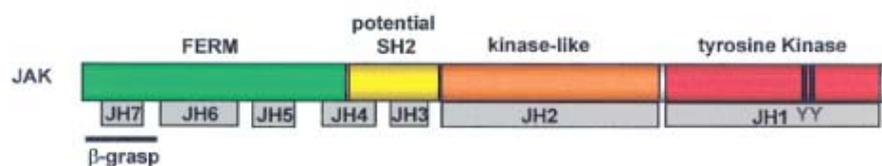


Figura 40.- Representación esquemática de la estructura de la janus cinasa²⁷⁷.

La característica principal que define la estructura de estas proteínas es la existencia de un dominio cinasa (JH1) y un dominio pseudocinasa (JH2). Esta dualidad es la que precisamente da el nombre a esta familia de tirosina cinasas ya que al igual que el dios romano de las puertas Jano (Janus), las JAK cinasas “tienen dos caras”.

El dominio JH1 es un dominio C Terminal que presenta la actividad tirosina-cinasa, mientras que el dominio **JH2** o dominio pseudocinasa ejerce una función reguladora de dicha actividad. Algunos estudios indican que este dominio JH2 puede tener una función reguladora sobre la actividad catalítica inhibiéndola²⁸⁹, mientras que en otros estudios, se postula la necesidad de este dominio precisamente para mantener la función cinasa de las JAK. Otra de las funciones en las que se ha implicado al dominio JH2 es el de ser el potencial sitio de unión para las STAT.

El extremo amino-terminal de las JAKs poseen el dominio SH2 (**JH3-JH4**), dominios muy conservados encargados de la unión a las fosfotirosinas, cuyo nombre proviene de región

homóloga para Src ya que inicialmente fueron identificados en la proteína Scr (Sarcoma). Por último, los dominios (**JH5-JH7**) forman el denominado dominio FERM formado por tres subdominios que juntos forman una estructura de trébol compacta, responsable de la asociación con el receptor de la citocina y que además regula la actividad catalítica²⁹⁰.

Como ya hemos dicho antes, la vía de señalización empleada por la CT-1 la componen las kinasas JAK-1, JAK-2 y Tyk2.

JAK-1 es una proteína de un peso molecular de 130kDa que se asocia con los receptores conteniendo gp-130; JAK-2 es una proteína de un peso molecular de 130kDa que está involucrada en la señalización a través de los receptores de la cadena β ; Tyk-2, es una cinasa de un peso molecular de 140kDa.

Los principales efectores de las JAK son el grupo de factores de transcripción citosólicos STATs, (proteínas activadoras de la transcripción y transductoras de la señal).

Estructura y función de las STATs

Las STATs son proteínas con una longitud de entre 750 y 850 aminoácidos. Hasta el momento hay siete STAT identificadas (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6).

Aunque las diferentes STATs presentan un menor grado de homología que las Jaks, es posible distinguir en todas ellas 7 dominios conservados (Figura 41):

-  **Dominio N-terminal (Dominio de interacción dímero-dímero).** Es, probablemente, el encargado de regular la traslocación nuclear, además de favorecer la interacción de las STATs con otras proteínas y con el DNA.
-  **Dominio CCD (coiled-coil domain).** Interviene en la interacción de las STATs con otras proteínas y, probablemente, también en la unión de las STATs al receptor de citocinas. También se ha involucrado a este dominio en el transporte de las STAT fuera del núcleo celular²⁹⁰.
-  **Dominio DBD (dominio de unión al DNA).** Es el encargado de reconocer las secuencias específicas de DNA a las que se unen las STATs.
-  **Domino de unión (linker).** Su función es conectar el DBD con el domino SH2.
-  **Domino SH2.** Es el dominio que posee capacidad de reconocer residuos de fosfotirosina. Este dominio SH2 es el más conservado y por su capacidad de reconocer residuos de fosfotirosina resulta fundamental para el reclutamiento de las STATs por los receptores de

citocinas y para su unión con las JAKs. Además, la interacción entre dominios SH2, es la responsable de la dimerización de las STATs ²⁹¹.

✚ **Dominio de transactivación.** Es el dominio encargado de regular la transcripción.

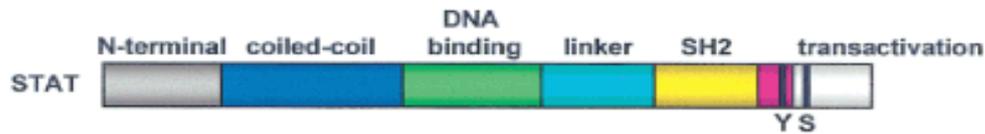


Figura 41.- Estructura de los STAT.

6.2.3- Vías de señalización

6.2.3.1.- JAK-STAT

La activación de esta vía se inicia por la unión de CT-1 a sus receptores, y depende principalmente de la activación de las dos familias de proteínas intracelulares que hemos descrito anteriormente, las *janus cinasas* (JAK-1, JAK-2 y Tyk2) y el grupo de factores de transcripción citosólicos STATs (STAT-1, STAT-3, STAT-5). Por este motivo, a la vía de señalización de la CT-1 se la conoce como vía **JAK/STAT**, representando una forma de señalización desde la membrana celular hasta el núcleo extraordinariamente rápida. De acuerdo con el término utilizado en urgencias clínicas, refiriéndose a una emergencia “STAT” (del latín statim= inmediatamente), el acrónimo STAT parece adecuado pues refleja la rapidez en su activación y su habilidad para ejercer sus funciones biológicas.

Las JAKs están constitutivamente asociadas a las regiones box-1 y box-2 del dominio intracelular del receptor, de forma que el cambio conformacional que se produce en el receptor tras la unión de la CT-1 hace que las JAKs se aproximen, lo que permite su transactivación, (es decir su fosforilación recíproca en residuos de tirosina). Estos residuos de tirosina se encuentran en su asa de activación dentro del dominio JH1 ²⁷⁷. Las JAK cinasas son activadas por oligomerización del receptor de una manera parcialmente específica ya que diferentes citocinas pueden activar las mismas JAK. Una vez activadas, las JAKs van a fosforilar tanto al receptor (en su dominio intracelular) como a los STATs. Esta fosforilación induce el reclutamiento del factor de transcripción STAT3, que mediante un dominio SH2 se unirá a los residuos de fosfotirosina de gp130. La cadena de gp130 fosforilada puede atraer, además de STAT3 a STAT1, aunque de manera minoritaria ²⁹².

En ausencia de estimulación, las STATs se encuentran latentes en el citoplasma y por lo tanto están transcripcionalmente inactivas. Pero una vez que son fosforiladas por las JAK a través de la fosforilación de sus residuos de tirosina conservados, (en el caso de STAT3 en la tirosina 705 y en la Ser 727), se lleva a cabo la dimerización con otros STATs formando homo o heterodímeros a través de sus dominios SH2.

El reclutamiento de un único grupo de STAT para cada familia de receptores de citocinas supone un hecho crítico para definir la especificidad de la respuesta biológica. Algunos receptores de citocinas tienen un único sitio de anclaje para STAT mientras que otros poseen más de un sitio de unión. La presencia de más de un sitio de unión permite que dos moléculas de STAT puedan ser activadas simultáneamente facilitando la dimerización. Las JAK son las que proporcionan el sitio de unión para los STAT²⁹³ (Figura 42).

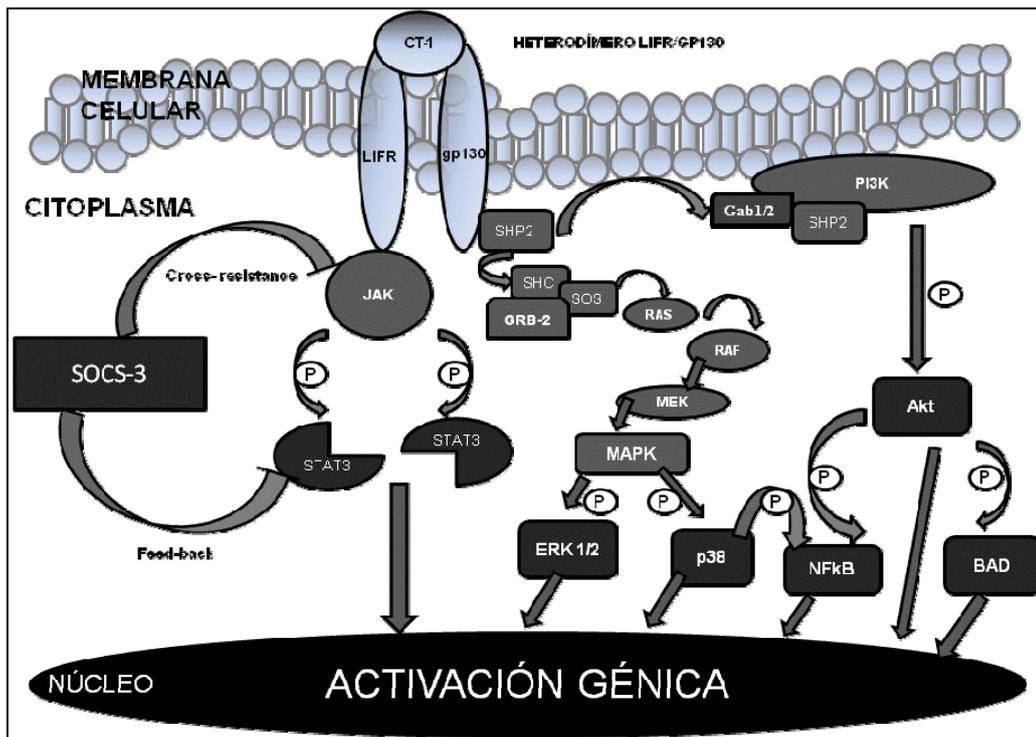


Figura 42.- Receptor de la CT-1, compuesto por el heterodímero LIFR/gp130, y las vías intracelulares activadas por CT-1.

Por lo tanto, la dimerización se produce por interacción entre el dominio SH2 de una de las moléculas de STAT con la tirosina fosforilada de la otra molécula. Puesto que cada molécula de STAT posee un dominio SH2 y un residuo tirosina fosforilado la interacción que estabiliza los dímeros formados es bivalente. Esta naturaleza bivalente de la interacción ayuda a entender por

qué la dimerización de STAT se ve favorecida sobre la interacción monovalente entre la molécula de STAT y la cadena fosforilada del receptor.

La homodimerización o heterodimerización se basa en la especificidad del dominio SH2. Cuando STAT1 ó STAT3 se une a los receptores (LIF β ó gp130) que han sido fosforilados en residuos tirosina, estos son activados y forman dímeros STAT1-STAT1, STAT1-STAT3 o STAT3-STAT3 los cuales son translocados a el núcleo para unirse a promotores específicos en el DNA genómico, de ese modo es estimulada la transcripción de diferentes genes previstos. (Figura 43) Una vez defosforilados se inactivan y vuelven al citoplasma²⁹⁴.

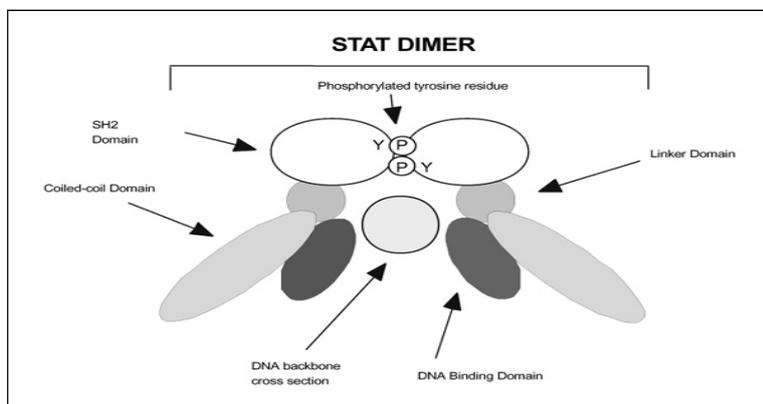


Figura 43.- Interacción del dímero con el ADN

En cuanto a la translocación al núcleo y la actividad transcripcional de los STAT, los STAT carecen de una señal de localización nuclear y aunque se cree que la fosforilación del residuo tirosina y la dimerización son esenciales para la translocación nuclear, no parecen ser suficientes. De hecho, la fosforilación de la tirosina es necesaria para retener STAT en el núcleo teniendo que ser defosforilada para que lo abandone²⁹⁵. La porción amino terminal de la molécula cuyos últimos 125 aminoácidos están bien conservados, contribuye a regular la translocación al núcleo. La translocación al núcleo es dependiente de la actividad de una GTPasa denominada Ran y de la imputación, a través de los complejos de poros nucleares (NPC), por un mecanismo regulado por las importinas²⁹⁵.

La importina α reconoce una secuencia específica en las STATS y se une a una importina β que es la encargada de translocar las STATS a través del NPC. La energía necesaria para este proceso procede de la hidrólisis de GTP catalizada por Ran, una GTPasa de la familia Ras²⁹⁵.

Una vez en el núcleo celular, los dímeros de STATs se unen a elementos de respuesta específicos, regulando la transcripción de genes diana. La actividad transcripcional de los dímeros

de STAT es regulada por la fosforilación de un residuo serina situado en el dominio de transactivación. Este residuo serina se ha identificado en todos los STAT (con la excepción de STAT2 y STAT6 que carecen del mismo). En STAT1 y STAT3 la alteración de esta serina reduce su actividad transcripcional a un 20%. Entre otras, STAT3 esta implicada en la regulación de los genes c-jun, c-myc, o JunB. Además, la señalización mediada por STAT3 está involucrada en diversas funciones biológicas tal como la biosíntesis de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 and Bcl-xL,²⁹⁴ la hipertrofia de miocardio e hígado y la activación de genes en respuesta a factores de crecimiento que aumentan la proliferación celular. En algunos tipos celulares, estos receptores activan otras vías de señalización como la PI-3K/PKB y la Ras/MAPK, ya que componentes de estas vías como Shc, también reconocen los dominios SH2²⁹⁶.

6.2.3.2.- Regulación negativa de la vía JAK-STAT

Tan importante como la capacidad para iniciar la respuesta frente al estímulo producido por la CT-1, resulta la terminación de la misma (Figura 44). De hecho, resulta lógico pensar que la falta de la regulación de las vías JAK/STAT puede ser importante en la patogénesis de distintas enfermedades de índole variada. La duración de la activación de los STAT es limitada decayendo su respuesta en un tiempo limitado²⁹⁷.

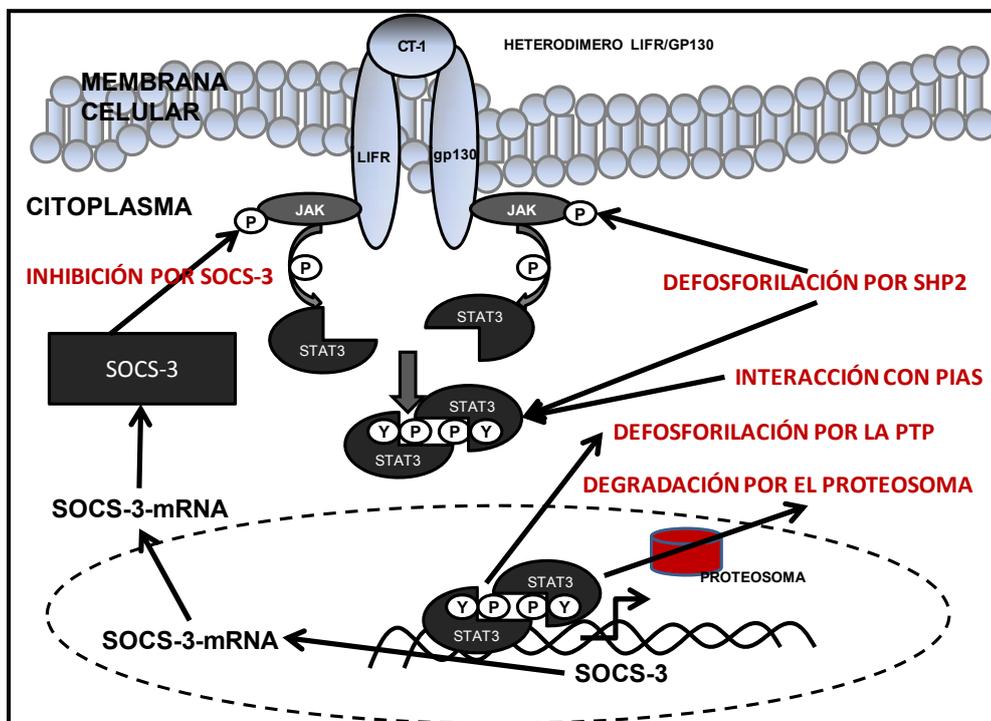


Figura 44.- Regulación negativa de la vía JAK/STAT

Representación esquemática de algunas de las vías de regulación de la vía JAK/STAT. Las JAK kinasas pueden ser reguladas a distintos niveles: proteínas SOCS, PTP (proteínas tirosinas fosfatasa) y mediante degradación mediada por conjugación con ubiquitininas. Los STAT pueden ser regulados a través de las proteínas PIAS y también por las PTP que pueden actuar tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear.

En los apartados siguientes vamos a hacer una breve descripción de los mecanismos más importantes de regulación negativa de STAT3.

Existen 3 familias principales de reguladores negativos de esta vía de señalización: **PTPs** (proteína fosfatasa de residuos de tirosina), **SOCS** (familia de supresores de señalización de citocinas) y **PIAS** (proteína inhibidora de las STATs activadas).

La familia SOCS

La familia de proteínas con un dominio SH2 se denominó SOCS (supresor de la señalización por citocinas) (Figura 45) y está constituida por 8 miembros. El primer miembro de la familia identificado se denomina CIS (citocina-SH2 inducible) y el resto de componentes se denominan SOCS1-SOCS7. Una importante característica de estas proteínas es que su expresión está regulada positivamente por las STATs, estableciéndose así un circuito de retroalimentación negativa²⁹⁷.



Figura.45.- Estructura de la proteína SOCS. Posee en su extremo carboxi-terminal una región de unos 40 aminoácidos que se denominan SOCS box. En la región central presentan un dominio SH2. El extremo amino terminal es variable en longitud, desde 50 hasta 380 aminoácidos (dependiendo SOCS1-SOCS7).

Todos los miembros de la familia SOCS poseen un dominio SH2 y un SOCSbox en el extremo C-terminal. La función del dominio SH2 es unirse a las proteínas, a través de la interacción con los residuos de tirosina fosforilados del circuito de activación de las JAK e inhibir su activación, mientras que la unión de las proteínas al SOCSbox, se lleva a cabo mediante la asociación de las elonginas B y C con el SOCS box y la unión a sus sustratos para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. Por lo tanto, las proteínas SOCS inhiben la señalización de las citocinas a través de varios mecanismos; mediante la unión e inhibición de la actividad de las JAKs, evitando la dimerización de los STAT y uniéndose a los receptores de citocina y a las JAKs para la ubiquitinización y posterior degradación por el proteosoma²⁹⁸.

La administración intravenosa de CT-1 induce un incremento notable y transitorio en la activación de STAT3 en varios tejidos y posteriormente la sobreexpresión de dos miembros de la familia CIS (citosina inducible por la proteína SH2) la SOCS-1 y SOCS-3 y se ha observado que SOCS-3 está directamente asociado con la activación de JAK2 *in vivo*. Una segunda administración de CT-1 produce una disminución en la fosforilación de STAT3.

Por lo tanto, SOCS-1 y SOCS-3 inhiben la señalización por unión al circuito de activación de las JAK y por unión directa al receptor gp130.²⁹⁸ Además del dominio SH2 y del SOCSbox, SOCS-1 y SOCS-3 contienen una región inhibitoria cinasa (KIR) situada en el extremo N-terminal del dominio SH2, que actúa como un pseudo-substrato de JAKs²⁹⁹.

La expresión forzada de SOCS-1 y SOCS-3, pero no otras SOCS, bloquea directamente la activación de STAT3 inducida por la CT-1 *in vitro*, por lo que SOCS-1 y SOCS-3 pueden actuar como inhibidores endógenos de la vía de señalización JAK/STAT, inducida por la CT-1 *in vivo*.³⁰⁰ Otros trabajos sugieren que la CT-1 también confiere resistencia cruzada frente a otros grupos de citocinas como IL-1 β e INF- γ ²⁹⁹.

La familia PIAS

El segundo tipo de reguladores negativos de la vía JAK -STAT son las PIAS (Proteínas inhibidoras de la actividad de STAT). Hasta el momento se han identificado 5 miembros en esta familia: PIAS1, PIAS2, PIAS α , PIAS β y PIAS γ . Las PIAS se unen a los dímeros de STATs activos, bloqueando su unión al DNA.

La interacción de las proteínas PIAS con los distintos STAT muestra cierta especificidad y es dependiente del estímulo por citocinas, de modo que en células sin estimular no se produce la interacción PIAS-STAT. Se han descrito distintos mecanismos de acción de las proteínas PIAS, como la inhibición de la unión a ADN de los STAT o el reclutamiento de histonas deacetilasas que actuarían como moléculas corepresoras. Las proteínas PIAS tienen actividad SUMO (small ubiquitin-like modifier) de modo que las proteínas PIAS pueden llevar a cabo la conjugación de STAT1 con la molécula SUMO³⁰¹.

Tirosina fosfatasa (PTPs)

Otro de los mecanismos de regulación de la vía JAK/STAT supone la desfosforilación de sus componentes activados. Varias son las tirosina fosfatasas que han sido identificadas regulando tanto a las JAK como a los STAT. Las principales PTPs implicadas en la regulación de la señalización de los receptores de citocinas son SHP1 (SH2-containing phosphatase 1) y SHP2 (Fosfotirosina

fosfatasa) (Figura 46). Ambas proteínas se encargan de defosforilar las JAKs, aunque recientemente se ha sugerido que pueden actuar también defosforilando STATs tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear³⁰². SHP2 es una proteína expresada en múltiples tejidos, mientras que SHP1 está restringida al sistema hematopoyético.



Figura 46.- SHP2 (proteína citoplasmática tirosina-fosfatasa que contiene un dominio SH2).

6.2.3.3.- ERK1/2

Además de la vía JAK/STAT, la unión de la CT-1 a sus receptores puede activar otras vías de señalización como la **p42/44 MAPK** (p42/44 proteína cinasa activada por mitógenos), la cual también es conocida como **ERK1/2**³⁰³.

ERK1/2 es un miembro de la familia de las proteínas cinasas (MAP). La estimulación celular que conduce a la fosforilación de gp130 también induce la unión de la tirosina fosfatasa **SHP-2** llevando a la activación secuencial de SHP2, Ras, Raf, MAP cinasa/ERK1/2(MEK) y ERK1/2. La activación de ERK requiere dos fosforilaciones en un residuo de tirosina y otro de treonina³⁰³. Específicamente, SOCS-3 compete con SHP2 por el sitio de unión a la tirosina 757 fosforilada del gp130 y como consecuencia disminuye la fosforilación de la tirosina de unión de la SHP2 y por lo tanto disminuye la señalización de ERK.

La vía MAPK es directamente responsable de la fosforilación y activación de NF-IL6 (factor nuclear IL-6), un factor involucrado en la señal de traducción de citocinas³⁰⁴.

Mientras que la activación de la vía **JAK-STAT** se cree que está relacionada con las acciones proinflamatorias de la CT-1, existen otras moléculas que son activadas por los mismos receptores, las cuales podrían estar implicadas en funciones sobre el crecimiento celular y supervivencia, como la vía **SHP2/MAPK**. Los dos sistemas no son excluyentes, observándose regulación cruzada entre ellos pudiendo compensar una de las vías un déficit en la otra³⁰⁵.

Cuando las cinasas de la familia SRC (SHP2, Shc...), se unen a los receptores (LIFRβ o gp130) que ya han sido fosforilados en residuos tirosina, estas son también fosforiladas y activadas. Una vez activada SHP2 se asocia al complejo de proteínas Shc-Grb2-Sos, para inducir el intercambio de nucleótidos GDP-GTP en la proteína Ras. El factor intercambiador de nucleótidos

de guanina (GEFs) participa en la disociación de GDP y posterior captación de GTP desde el citosol activando por tanto Ras. Ras es una GTPasa cuya función principal es la de actuar como transductora de la señal iniciada por los receptores tirosina cinasa, transmitiéndola a través de múltiples vías al interior de la célula, participando así en el control de procesos como la proliferación celular y/o diferenciación. GAPs (proteínas activadoras de GTPasas) que incrementan la hidrólisis del GTP asociada a Ras inactivándola (Figura 47).

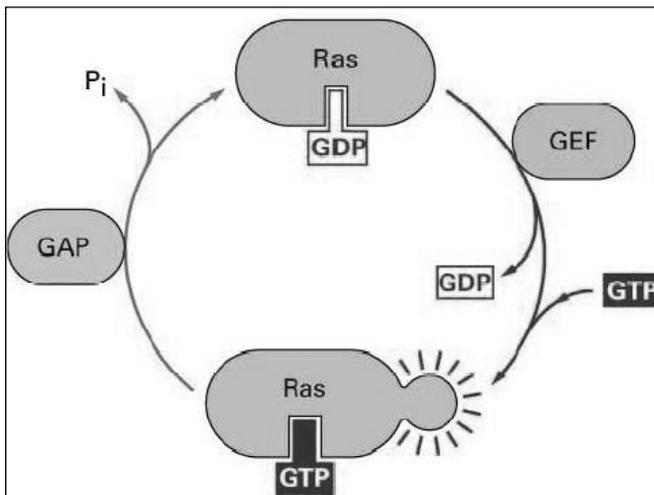


Figura 47.- Ciclo de activación de Ras. Ras-GDP: inactiva, Ras-GTP: forma activa, GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina, GAP: proteína activadora de GTPasa

Una vez que Ras es activado, multitud de vías transmitirán esta señal al interior de la célula. Entre las vías dependientes de Ras podemos citar la vía Ras/MAPKs. La vía de las MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos) (Figura 48) transducen señales desde la membrana celular al núcleo en respuesta a un amplio rango de estímulos, incluido el stress³⁰⁶.

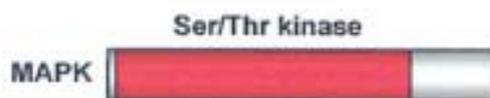


Figura 48.- MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos)

La proteína Ras-GTP se une y activa a la proteína Raf (una serina/treonina cinasa, MAPKKK), a su vez la proteína Raf activada, fosforila y activa las MEK1 y MEK2 (serina/treonina y tirosina cinasas, MAPKKs), que a su vez fosforilan y activan las MAPKs. En mamíferos existen cuatro grupos de MAPK: ERK (ERK1/2), p38, JNK y ERK5. Las MAPK son translocadas al interior del núcleo y activan los factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en multitud de procesos celulares como son diferenciación celular, motilidad, proliferación y

apoptosis. La vía de señalización de ERK fue la primera vía de señalización de MAPK estudiada en mamíferos. ERK 1/2 se ha relacionado preferentemente con proliferación, diferenciación y supervivencia, y JNK y p38, preferentemente con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis, aunque hay excepciones, y tanto JNK como p38 pueden mediar proliferación. La señalización a través de ERK1/2 es crítica para la regulación de la evolución del ciclo celular, favorece la supervivencia celular evitando la apoptosis inducida por la fosforilación de Bad que con frecuencia libera Bcl-xL en el citosol, de esta manera esta molécula puede ejercer sus efectos antiapoptóticos. ERK también activa Mcl-1, una proteína que pertenece a la familia de Bcl2 con función antiapoptótica³⁰⁶.

6.2.3.4.- PI3K-Akt

Otra de las vías de señalización activada por la CT-1 es la **PI3K-Akt** (fosfatidil inositol 3 cinasa/proteína cinasa B)³⁰⁷.

Una vez que la citocina se une a su receptor y éste fosforila los residuos tirosina de su cola citoplasmática se produce un rápido incremento en los niveles de actividad de la PI3K. La vía de señalización de la PI3K/Akt rige diversos procesos celulares como la proliferación y la tasa de supervivencia o la remodelación del citoesqueleto y el tráfico de orgánulos intracelulares PI3K es un complejo heterodimérico que comprende una subunidad reguladora de 85 kDa y una catalítica de 110 kDa que se encarga de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles PI: PI(3)P, PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3. Éstos se unen a una gran variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización celular. La regulación de la supervivencia por PI3K, en particular, está mediada por la activación de AKT, la cual requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473)³⁰⁸. Las dianas de AKT son diversas y se han asociado a respuestas metabólicas y de supervivencia celular. Los sustratos de AKT incluyen la inactivación de mediadores proapoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53) y la activación de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR) que en conjunto determinan las diversas funciones de la vía PI3K/AKT. La vía PI3K/AKT puede ser activada por gran número de hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Esta vía está asociada con supervivencia celular y patogénesis de gran número de enfermedades incluyendo cáncer³⁰⁹ y fibrosis renal^{310,311}. La activación de AKT por PI3K media la fosforilación de diversos sustratos involucrados en crecimiento celular, supervivencia, proliferación y apoptosis.

6.2.3.5.- Vías de señalización y su implicación

Es probable que CT-1 lleve a cabo sus efectos vía una combinación de las rutas de señalización, antes mencionadas y es muy importante determinar que ruta o rutas están involucradas en cada efecto particular de la CT-1 ³¹²⁻³¹⁷ (Figura 49).

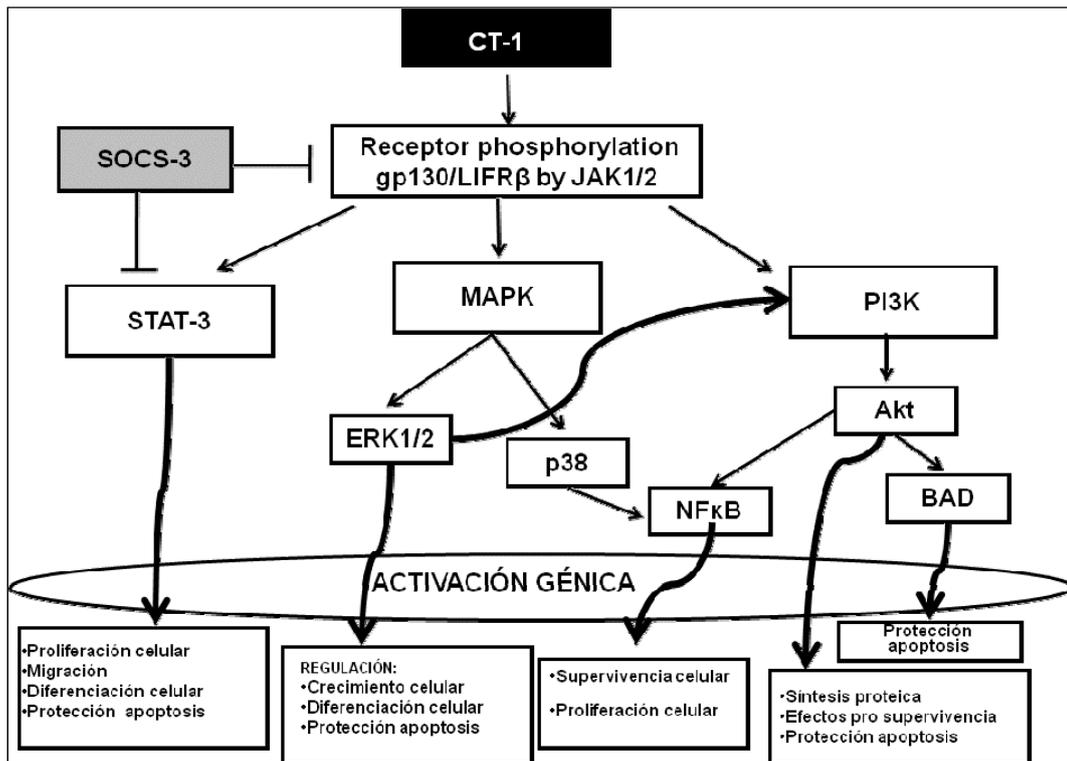


Figura 49.- Vías de señalización activadas por la CT-1.

La vía JAK/STAT transduce señales de protección contra la respuesta inflamatoria, ³¹⁸ protege de la isquemia ³¹⁹⁻³²¹, y del estrés oxidativo ³²² promueve la angiogénesis y, consecuentemente, la oxigenación del tejido durante la reperfusión. También controla el metabolismo del colágeno intersticial, con una reducción en la fibrosis cardíaca ³¹⁹.

Respecto a la vía PI3K/Akt, estimula, al igual que la ruta p42/44 MAPK, la supervivencia de miocitos cardíacos contra la apoptosis inducida por la respuesta inflamatoria ³²³.

Ni la activación de la vía MEK/ERK1/2 ni PI3K/Akt por sí solas son suficientes, en cuanto a la protección cardíaca contra estímulos no isquémicos ³²⁴ y reoxigenación ³¹² mediados por CT-1, por lo tanto MAPK y PI3K/Akt podrían cooperar en los efectos pro-supervivencia mediados por la CT-1 ^{313,324}.

Una de las vías claramente implicadas en la inhibición de la señal apoptótica es la vía de la PI-3K/AKT. La activación de PI-3K induce la activación por fosforilación de AKT en la serina 475 y treonina 308. La activación de AKT provoca a su vez la fosforilación de BAD en las serinas 112 y 136. BAD es un miembro de la familia de Bcl-2 y es un regulador importante de la señal de supervivencia. BAD inactivo dimeriza con las proteínas Bcl-x o Bcl-2 neutralizando su actividad antiapoptótica. La fosforilación de BAD conlleva la liberación de Bcl-2 o Bcl-x que suprimirán la vía de apoptosis. Por lo tanto la CT-1 también fosforila el factor proapoptótico, BAD³⁰⁷, por la vía PI3K/Akt, ejerciendo protección atribuida en parte a la sobreexpresión del gen antiapoptótico bcl-2 y la disminución del proapoptótico bax³²⁵.

También, se ha demostrado que CT-1 activa el factor nuclear kappa B (NFkB) en cardiomiocitos³²⁶, hepatocitos³²⁷, células endoteliales de la vena umbilical³²⁸ y neuronas sensoriales³²⁹.

Los factores de transcripción tienen un importante papel en el balance apoptosis/supervivencia. NFkB es activado a través de diferentes cascadas de señalización tales como Akt y ERK que fosforilan IκB.

6.3.- Efectos de la cardiotrofina-1

Se ha demostrado que CT-1 tiene efectos múltiples sobre una gran variedad de tejidos incluyendo corazón, hígado, sistema neuronal, etc.³³⁰⁻³³⁵.

6.3.1.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el corazón

En el corazón la CT-1 es sintetizada por cardiomiocitos y por otras células “no cardiomiocitos” siendo secretada vía seno coronario hacia la circulación periférica³³⁶.

CT-1 es de gran importancia en el desarrollo cardíaco, aumenta la proliferación de miocitos embrionarios cardíacos y la supervivencia de cardiomiocitos de neonatos en cultivo. La CT-1 juega un papel autocrino durante el crecimiento y la morfogénesis del corazón, por lo que no solo actúa por mecanismos paracrinos, sino también por mecanismos autocrinos^{276,337}.

Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo* que CT-1 tiene un gran número de funciones diferentes, entre ellas, protección de miocardio, induce efectos hemodinámicos, y tiene propiedades endocrinas. CT-1 también está involucrada en patologías cardiovasculares como hipertensión, enfermedades valvulares, fallo cardíaco y enfermedades de arterias coronarias³³⁸, y la administración crónica de la CT-1 incrementa el peso del corazón y el ventricular^{331,339}.

6.3.1.1.- Efectos cardioprotectores

Hipoxia de miocardio

Se ha demostrado un aumento de la expresión de CT-1 en diversas situaciones fisiopatológicas de hipoxia cardíaca: 1) durante enfermedades cardíacas como la angina de pecho, infarto cardíaco e insuficiencia cardíaca³³⁹, 2) en el corazón embrionario donde la masa del corazón incrementa a través de hiperplasia celular cardíaca³⁴⁰, 3) durante el crecimiento de células madre embrionarias de ratón (ES) en tejidos embrionarios³⁴⁰.

La hipoxia está asociada con incremento de los RLO producidos a través de la cadena respiratoria mitocondrial o de la actividad de la NADPH oxidasa³⁴¹.

Los RLO, producidos tanto endógenamente como exógenamente, activan las distintas MAPKS (ERK 1/2, JNK y p38 MAPK), que juegan un importante papel en la diferenciación celular^{342,343}.

Durante el infarto de miocardio aumenta la producción de RLO³⁴⁴ y se ha demostrado que la hipoxia y los RLO generados por la NADPH oxidasa podrían regular la expresión de la CT-1^{340,345,346}, a su vez la CT-1 activa las vías de señalización MAPKs (ERK1/2, JNK, p38) y PI3K a través de los RLO³⁴⁷. (Figura 50)

Se ha demostrado que tanto los pro-oxidantes como la hipoxia fisiológica así como el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), incrementan los niveles tanto de proteína como de ARNm de CT-1, indicando que la expresión de CT-1 es regulada por los RLO y la hipoxia³⁴⁵. El tratamiento con pro-oxidantes incrementa la fosforilación de gp130 y la expresión de las subunidades p22-phox, p47-phox, p67-phox, de la NADPH oxidasa, así como el ARNm de Nox1 y Nox4. Consecuentemente, la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa por inhibidores como diphenyleneiodonium (DPI) y otros, anulan la sobrerregulación de CT-1 inducida por prooxidantes e hipoxia química. Los pro-oxidantes activan ERK1, 2, JNK y p38 así como PI3-K²⁷⁷, y la sobreexpresión de CT-1 mediada por prooxidantes se inhibe en presencia de antagonistas de ERK1/2, JNK, p38, PI3K y Jak-2 así como de sequestradores de radicales libres³⁴⁶⁻³⁴⁸.

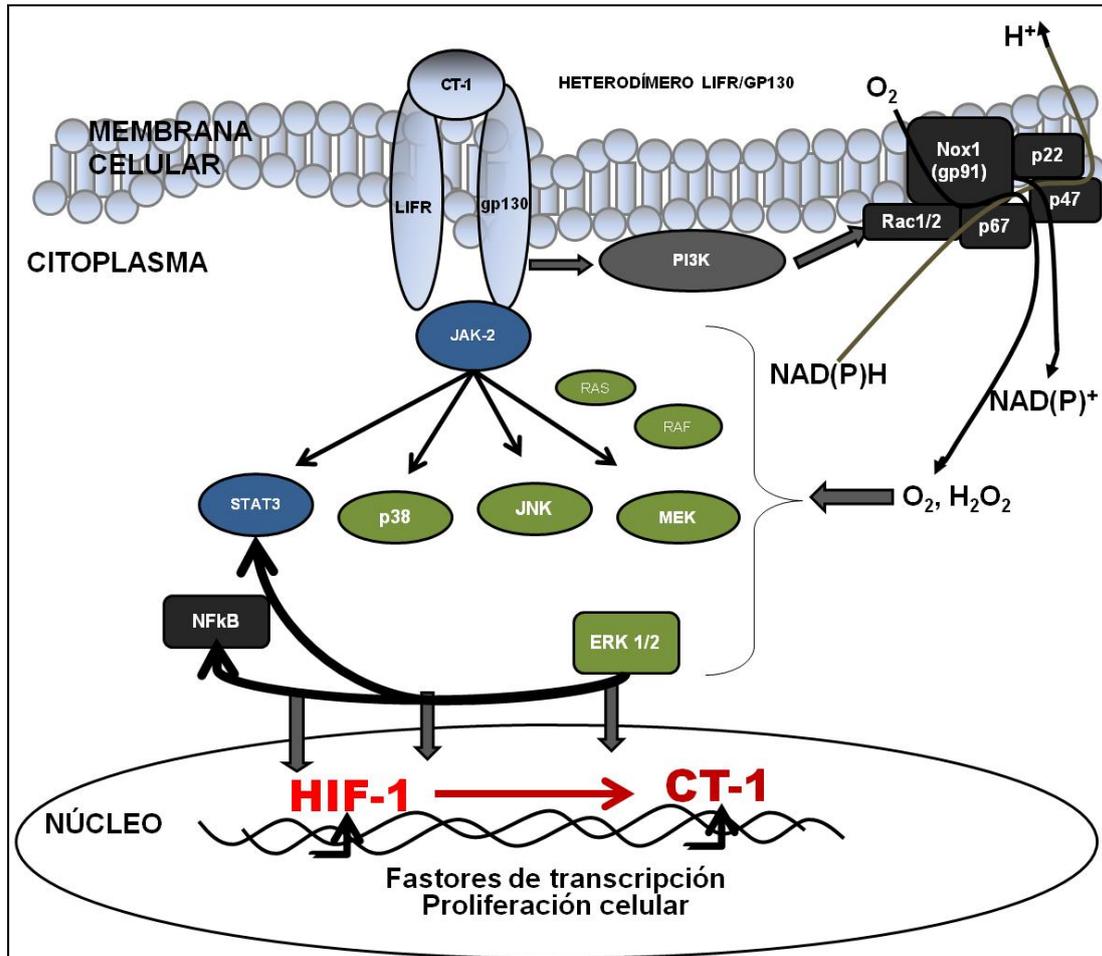


Figura 50.- Esquema de las vías de señalización activadas por RLO e hipoxia. Modificada ³⁴⁷

La CT-1 está implicada en el crecimiento y la supervivencia de las células cardíacas. Se ha demostrado recientemente en cultivos de células madre murinas embrionarias (ES), que la CT-1 estimula significativamente la cardiomiogénesis y la proliferación celular por un mecanismo en el que están involucradas la activación de las cascadas de señalización molecular JAK/STAT, MAPK y NF- κ B, y en el que también están implicados los RLO ³⁴⁶, ya que el aumento de la proliferación se inhibió con el tratamiento previo con vitamina E, (secuestrador de los RLO), lo que indica un papel para los RLO en la cascada de señalización de la CT-1 ³⁴⁶.

La expresión de CT-1 aumenta después de un estímulo hipóxico y en este medio hipóxico se incrementa la capacidad para la activación de STAT3 en miocitos cardíacos. ³⁴⁵

También, se ha investigado sobre los efectos de la CT-1 en la diferenciación y maduración de células madre *in vitro*, (de la médula ósea mesenquimal de rata; BMMSCs), y los resultados indican que la CT-1 mejora la diferenciación y maduración de las células BMMSCs a células

semejantes a cardiomiocitos. Este efecto de la CT-1 podría ayudar a encontrar un nuevo método en la terapia celular en infarto de miocardio a partir de BMMSCs^{349,350}.

Daño por isquemia/reperfusión

CT-1 ha demostrado ser capaz de promover tanto la proliferación como la supervivencia de miocitos cardiacos tanto embrionarios como neonatales en concentraciones subnanomolares³³⁷. En numerosos estudios experimentales la CT-1 actúa como un potente factor de supervivencia cardíaca, y promueve la proliferación de cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro*^{316,331,351,352}.

Estudios sobre la CT-1 en el corazón postinfarto revelan una elevada expresión en la zona del infarto desde las 24 horas a las 8 semanas, así como una elevada expresión de la CT-1 en el miocardio viable en la fase crónica de restauración del daño³³⁹. Hay claras evidencias que apoyan los efectos beneficiosos de la CT-1 durante el período temprano después del infarto de miocardio en la reparación del daño a través de las siguientes acciones: 1) promover la supervivencia celular del miocardio, 2) inducir hipertrofia de los miocitos que sobrevivieron, 3) inducir la proliferación y migración de fibroblastos desde la zona contigua del miocardio viable. La CT-1 reduce la pérdida de miocitos con la regeneración de la cicatriz del infarto y una mejoría en el funcionamiento ventricular^{339,353}. Además, la CT-1 induce proliferación, migración de fibroblastos^{354,355} y síntesis de colágeno^{339,353,356,357}. Por lo tanto, en modelos de ratas con isquemia de miocardio, la CT-1 juega un papel muy importante en la reparación del tejido y su cicatrización³⁵⁶.

Varios estudios, han demostrado, que tanto en células cardiacas neonatales como adultas, que la CT-1 tiene efectos citoprotectores contra la isquemia, tanto si se añade antes como después del estímulo hipóxico³⁵⁸. Además también protege a células cardiacas neonatales de la muerte, provocada por estímulos no isquémicos como angiotensina II y peróxido de hidrógeno^{312,313,324,359}.

En el corazón adulto en ratas se ha observado un incremento de la expresión de CT-1 en cardiomiocitos y fibroblastos después del infarto de miocardio³⁶⁰. El pretratamiento con CT-1 en ratas sometidas a una ligadura de la arteria coronaria izquierda hace que el número de cardiomiocitos apoptóticos también sea menor, junto con una inhibición significativa de P53, Fas y Bax y un incremento de la expresión Bcl-2 en el miocardio³⁶¹. En otro estudio se ha demostrado que la CT-1 tiene un efecto cardioprotector importante en un modelo murino de infarto de miocardio, observando como el índice de apoptosis fue inferior en el grupo tratado con un adenovirus de CT-1 (AdCT-1), inyectado directamente en la zona del miocardio isquémico.

También se observó como en el grupo tratado se inhibía significativamente Fax, Bax y P53 y aumentaba la expresión de la CT-1 y Bcl-2, junto con una disminución en la activación de caspasa-3 y en la liberación del citocromo C³⁶².

Se investigaron también los efectos protectores de la CT-1 en el miocardio humano sometido a un preconditionamiento isquémico (PC). CT-1 induce una protección significativa del miocardio humano contra la lesión isquémica cuando el tejido está expuesto a este factor por un período largo (por ejemplo, 24 h), pero no cuando se expone durante un corto período (por ejemplo, 2 h). Además, la protección conferida por una exposición larga a CT-1 es tan potente o incluso mayor que la obtenida por un segundo PC. La protección inducida por la CT-1, pero no la inducida por el PC, puede ser abolida por anticuerpos contra la CT-1, lo que sugiere que su acción beneficiosa se lleva a cabo por diferentes mecanismos³⁶³. Ratones knock-out de gp130 mostraron un incremento significativo en la apoptosis de miocitos cardiacos. Esos resultados indican que las vías dependientes de gp130 son esenciales para la supervivencia de miocitos y para disminuir la apoptosis en mecanismos de estrés³⁶⁴.

STAT-3 no afecta al proceso antiapoptótico llevado a cabo por la CT-1 en cardiomiocitos³⁶⁵. En cardiomiocitos los efectos antiapoptóticos de la CT-1 son predominantemente transmitidos vía MAPK y necesariamente requieren la activación de ERK1/2^{324,366}. Estudios sobre daño por I/R en ratas revelan que la activación de ERK1/2 por la CT-1 protege los cardiomiocitos de la apoptosis, tanto si es añadida antes de la isquemia o durante la reperfusión, por lo que podría tener un potencial terapéutico este proceso^{312,313}, y esos efectos protectores se bloquearían si se administra un inhibidor de la vía p42/p44 MAPK^{313,316,324,326,337,359,367,368}. Los efectos de la CT-1 en la supervivencia celular se llevan también a cabo a través de la vía de señalización p38 MAPK y PI3K/Akt^{313,324,326} y es necesaria la activación de NF-kappa B, mientras son independientes en gran parte de STAT3^{316,326,337,367,368}.

Parece ser que la señalización a través de la cual CT-1 ejerce su papel en la supervivencia celular es la vía PI3K/Akt mediante la fosforilación del factor proapoptótico BAD^{307,325,352,365,369-371}. Si se administra el inhibidor de PI3K/Akt (LY294002) se inhibe la fosforilación de BAD y el efecto antiapoptótico, sugiriendo que la fosforilación de BAD es uno de los pasos clave por los cuales PI3K/Akt lleva a cabo los efectos de supervivencia inducidos por CT-1³⁰⁷. (Figura 51)

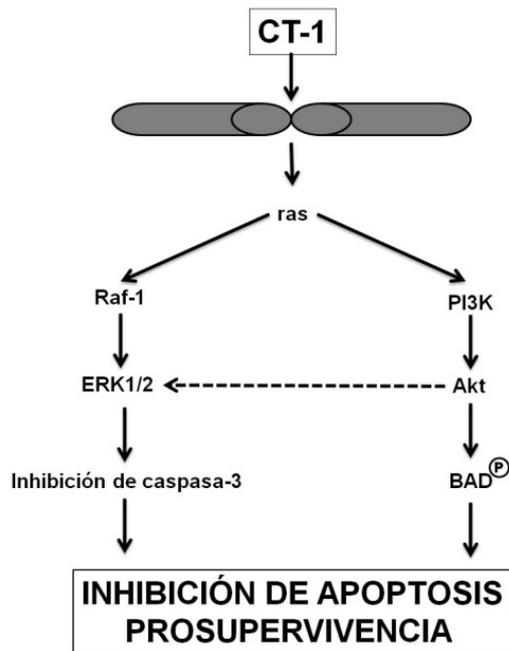


Figura 51.- Vía de la fosforilación de BAD a través de la CT-1.

El tratamiento, de cultivos celulares de cardiomiocitos de neonatos con CT-1, induce un aumento en la síntesis de las proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90)³⁵² y se ha demostrado que debido a la expresión de estas proteínas hsp70 y hsp90, los cardiomiocitos tratados con CT-1 están protegidos del estrés isquémico y del estrés térmico^{275,352,356,368-371}. Los efectos de la CT-1 no van acompañados de un aumento en los niveles del mRNA de hsp y estos efectos de la CT-1 son insensibles a un inhibidor de la síntesis del mRNA, (la actinomicina D), sugiriendo que ocurren a nivel post-transcripcional. El pre-tratamiento con la CT-1 reduce la capacidad del shock térmico para inducir la expresión de hsp y este efecto ocurre a nivel transcripcional. Por lo tanto, la CT-1 y el estrés inducen las hsp por vías diferentes que unas pueden ser antagonistas de las otras³⁵².

Hipertrofia cardiaca

La CT-1 se aisló en 1995 basada en su capacidad de causar hipertrofia en cultivos de miocitos cardíacos²⁷². La hipertrofia inducida por la CT-1 es mayor que la inducida por otros miembros de la familia IL-6 o que otros mediadores conocidos que producen hipertrofia cardíaca^{356,368}.

Estudios previos han indicado que el CT-1 induce un aumento en el tamaño del miocito, caracterizado por un incremento significativo en la longitud de la célula, sin embargo poco o ningún cambio en el ancho de la célula debido a la adición en serie de nuevas unidades de

sarcómeros, lo que lo hace diferente de los fenotipos hipertróficos inducidos por otros estímulos²⁸⁷.

A pesar de años de intensa investigación, los mecanismos exactos por los que CT-1 induce hipertrofia en cardiomiocitos no están del todo claros. Una serie de experimentos han identificado a GATA4, (miembro de la familia de factores de transcripción zinc finger GATA), como un regulador transcripcional para la generación de hipertrofia cardíaca, ya que regula directamente genes hipertróficos como ANF y BNP. Además la CT-1, durante la hipertrofia cardíaca, aumenta la expresión de GATA4 de manera concentración y tiempo dependiente, por lo que GATA4 podría ser el principal inductor de la hipertrofia cardíaca inducida por la CT-1³⁶⁵.

El incremento significativo del ARNm de GATA4 sugiere un mecanismo regulador, en el que el contenido total de GATA4 es sobrerregulado por CT-1 y puede estimular los fibroblastos cardíacos para producir más síntesis de colágeno extracelular y participar en la remodelación del corazón. La expresión del ARNm de GATA4 podría desempeñar el papel principal de la hipertrofia de cardiomiocitos inducida por CT-1³⁶⁵.

A la activación de la vía JAK/STAT3 se le asignó el papel de producir la hipertrofia cardíaca en respuesta a la estimulación con CT-1, porque la hipertrofia producida por CT-1 se inhibe cuando se usa partenolide (un inhibidor de STAT)^{303,316,365,368,372}. La expresión de GATA4 en respuesta a CT-1 también se inhibe significativamente cuando se utiliza partenolide³⁶⁵. STAT3 desempeña un papel principal en la hipertrofia cardíaca inducida por CT-1. Ya se ha visto antes, que la activación de la vía ERK1/2 era necesaria para la protección cardíaca inducida por CT-1, pero no para la hipertrofia^{316,368}. Otros estudios más recientes, sugieren que en la señalización intracelular dependientes de la gp130, la actividad de STAT3 podría ser regulada negativamente por ERK1/2^{277,373,374}. Hasta la fecha, la importancia de la vía de la ERK1/2 sigue estando en controversia. Se ha demostrado que cuando se añade un inhibidor de ERK1/2 (U0126) a cardiomiocitos estimulados con la CT-1, se incrementa la expresión de GATA4 y este incremento era menor, si además se añade un inhibidor de STAT3 (partenolide)³⁶⁵. ERK1/2 parece ser un elemento autorregulador de la cascada de señalización de CT-1, pudiendo inhibir la fosforilación de STAT3 y actuando como regulador negativo en la respuesta hipertrófica inducida por la CT-1^{303,375}.

Este resultado sugiere que la vía de señalización de ERK podría desempeñar un papel indirecto en este proceso por regulación negativa de STAT3. La hipertrofia cardíaca podría ser beneficiosa como compensación de las funciones cardíacas, cuando se produce en el período

inicial, o perjudicial cuando este proceso se prolonga. Por lo tanto, la regulación negativa de STAT3 por ERK1/2 en la respuesta de GATA4, inducida por CT-1, podría ayudar a la CT-1 a ejercer un efecto hipertrófico adecuado. Sin embargo, hay resultados que sugieren que la vía responsable de la respuesta hipertrófica de la CT-1 no es la vía JAK/STAT3, ni la vía MEK/ERK1/2, sino por la ruta MEK5/ERK5^{303,376}.

También se ha descrito que los efectos hipertróficos de la CT-1 en células cardiacas son dependientes de la síntesis de hsp56 a través de la activación de JAK/STAT, MEK/ERK y PI3-K/Akt³⁷⁷.

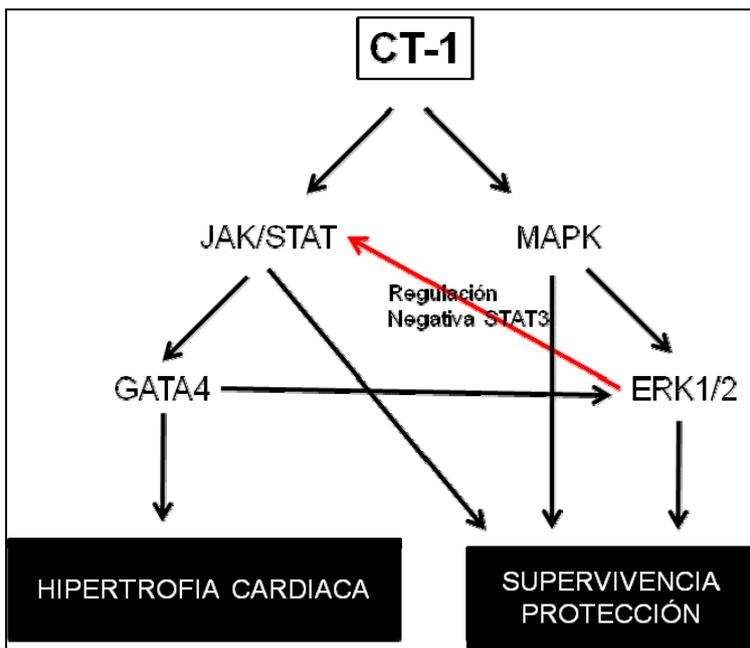


Figura 52.- Vías de señalización mediante las cuales podría llevar a cabo la CT-1 sus efectos, en hipertrofia y supervivencia

Estudios previos también indican que GATA4 podría jugar un importante papel en la regulación de la apoptosis y supervivencia de cardiomiocitos adultos vía fosforilación de la serina 105 de ERK1/2^{378,379}.

En resumen como podemos ver en la (Figura 52) 1) MAPK/ERK juega un papel esencial en la función de supervivencia de la CT-1; 2) la regulación de la CT-1 sobre los procesos apoptóticos es mediada en parte por GATA4 y por otras vías que tienen sus efectos a través de de ERK1/2 y 3) las vías de señalización STAT3 y ERK juegan diferentes papeles en procesos hipertróficos y antiapoptóticos mediados por la CT-1^{279,351,378,380-384}. Por ello, podemos deducir, que la CT-1 utiliza vías divergentes para la activación de hipertrofia y supervivencia³⁸³.

Estudios sobre la remodelación ventricular en ratas y conejos hipertensos demuestran que la expresión del mRNA de CT-1, está incrementado en estados tempranos de hipertrofia ventricular ³⁵¹, y permanece elevado después de la hipertrofia ³⁸¹. Interesantemente, se ha demostrado que el mRNA y la proteína de CT-1 junto con la expresión de gp130 están significativamente incrementados en la transición de la hipertrofia ventricular izquierda a la insuficiencia cardiaca congestiva ³⁸⁴.

La noradrenalina también tiene efectos hipertróficos cardiacos, tanto *in vivo* como *in vitro* y se ha visto que la expresión del mRNA de CT-1 aumenta tanto en miocitos como en células “no miocitos” estimulados con noradrenalina³⁸². Por lo que la CT-1 podría actuar tanto de forma autocrina como paracrina en el corazón^{279,380}. También se ha visto que la CT-1 podría estar involucrada en la hipertrofia de miocardio inducida por altos niveles de glucosa e insulina e inhibe los efectos de pioglitazón en la hipertrofia de miocardio ³⁸⁵.

En el corazón de animales con carditis chagástica el mRNA y la proteína de CT-1 era mayor que en el control, y esta sobreexpresión podría proporcionar un mecanismo de protección para los miocitos, y explicar el desarrollo de la hipertrofia cardiaca compensatoria ³⁸⁶.

CT-1 en hipertrofia cardiaca asociada a otras patologías cardiovasculares

La CT-1 también está involucrada en hipertrofia cardiaca asociada a patologías cardiovasculares como hipertensión, enfermedades valvulares, fallo cardíaco y enfermedades de arterias coronarias ³³¹.

Hipertensión

Los niveles de CT-1 en plasma parecen ser más altos, en humanos hipertensos tanto con tratamiento como sin tratamiento, que en normotensos ³⁸⁷⁻³⁹⁰.

La enfermedad hipertensiva cardiaca se caracteriza por la presencia de hipertrofia ventricular izquierda (LVH) en ausencia de una causa diferente a la hipertensión arterial. Junto con el crecimiento de los cardiomiocitos, la deposición exagerada de fibras de colágeno, que produce una fibrosis miocárdica, también contribuye a una reestructuración ventricular en hipertensión arterial ^{387,391}. Se ha propuesto la participación de las vías dependientes de gp130 en este fenómeno ³⁸⁹. Un experimento en ratas, indica que las citocinas relacionadas con IL-6 podrían participar en el desarrollo de la hipertensión en LVH. ³⁹² En efecto los niveles de CT-1 en plasma parecen ser más altos, en humanos hipertensos tanto con tratamiento como sin tratamiento, que

en normotensos^{390,393}. Además, entre pacientes hipertensos, CT-1 es más elevada en pacientes con LVH que en aquellos que muestran un espesor ventricular normal³⁹³.

En pacientes con cardiomiopatía dilatada, los niveles de CT-1 en plasma están aumentados, siendo significativamente más altos en el grupo de mayor masa del ventrículo izquierdo que en el grupo de menor masa del ventrículo izquierdo. Hay una correlación positiva significativa entre el nivel de CT-1 en plasma y el índice de masa del ventrículo izquierdo. Tras estudiar multitud de factores humorales y factores hemodinámicos, se observa que los altos niveles de CT-1 en plasma de pacientes con cardiomiopatía dilatada e hipertrofia ventricular son independientes de estos factores. Estos resultados indican que CT-1 juega un importante papel en la remodelación estructural del ventrículo izquierdo en pacientes con cardiomiopatía dilatada³⁹⁴.

Por otra parte los niveles de CT-1 en plasma correlacionan mejor con LVH que otros marcadores como el amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)³⁹³. En pacientes con hipertensión esencial, existe una correlación entre los niveles de CT-1 plasma y la masa ventricular izquierda inapropiada (ILVM, definido como el valor entre la masa ventricular izquierda/masa ventricular izquierda pronosticada > 128%)³⁸⁸. Además, en hipertensos tratados, la normalización de CT-1 está asociada con la regresión de LVH/ILVM, sin embargo el incremento de CT-1 está asociado con la persistencia de LVH/ILVM^{388,395}.

La hipertensión sistémica, que produce una sobrepresión mecánica sobre el ventrículo izquierdo, activa varias vías de estrés induciendo un incremento de la masa ventricular izquierda. Con respecto a esto, se ha demostrado que la secreción de CT-1 es estimulada por extensión/presión ventricular³⁹⁰. Un campo muy interesante es el LVH fisiológico, donde la hipertrofia ventricular izquierda representa una respuesta fisiológica y reversible adaptada al ejercicio. De acuerdo con observaciones preliminares³⁹⁶, no hay diferencias entre los niveles de CT-1 basal en plasma en atletas de élite e individuos sanos, lo que parece sugerir que CT-1 no está involucrada en la génesis del LVH fisiológico³⁹⁷.

Enfermedades valvulares

Las enfermedades valvulares representan un grupo heterogéneo de enfermedades cardíacas caracterizadas por una alteración en la morfología y función de una o más válvulas cardíacas. Se ha investigado el potencial papel de la CT-1 en la dilatación ventricular debido a la

regurgitación valvular³⁹⁸. Se ha observado un aumento significativo de CT-1 en plasma en pacientes con regurgitación mitral y función sistólica ventricular izquierda normal. El comportamiento sistólico ventricular izquierda normal se da en individuos con una regurgitación mitral importante y podría ser debido a la adición continua de sarcómeros ordenados en serie para el mantenimiento de la función ventricular izquierda. Esta respuesta compensatoria podría representar una fase temprana del daño. Por otra parte, se han encontrado niveles elevados de BNP en plasma en individuos con regurgitación mitral crónica y además se ha observado un efecto estimulador de CT-1 sobre la expresión del gen BNP y la secreción del péptido³⁹⁸. Este hecho sugiere que los elevados niveles de CT-1 simplemente representan un estado temprano de la cascada neuro-humoral que produce elevados niveles de BNP en plasma.

También, se ha demostrado que el trasplante de mioblastos esqueléticos transfectados con el gen de la CT-1 en ratas hipertensas Dahl salt-sensitive prolonga la expresión de CT-1 y mitiga la transición de hipertrofia compensatoria a fallo cardíaco, preservando la función cardíaca de manera más efectiva³⁹⁹.

La CT-1 ayuda a preservar la contractilidad, debido a los cambios estructurales y a la reducción de la proteína calsecustrina que juega un importante papel en el mantenimiento del Ca^{2+} intracelular, aunque, largas exposiciones a CT-1 inducen disfunción contráctil *in vitro* de manera dosis-dependiente⁴⁰⁰.

Estenosis aórtica

También se ha demostrado que la elevación de CT-1 y NT proBNP en pacientes con estenosis aórtica se correlacionan con el máximo gradiente de presión aórtica transvalvular. También se ha demostrado que CT-1 es el indicador más significativo de la gravedad de la estenosis aórtica. La alta correlación de los niveles de CT-1 con la gravedad de la estenosis aórtica sugiere su uso potencial en el diagnóstico de la progresión del daño cardíaco mediante medios no invasivos⁴⁰¹.

Insuficiencia cardíaca congestiva

La insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) es un estado en el cual la capacidad del corazón para bombear sangre rica en oxígeno al cuerpo es inferior a las necesidades del organismo. Es conocido que diversos factores neuro-humorales incluyendo las citocinas están activadas y juegan un importante papel en la patofisiología del CHF.

ANP y BNP son hormonas producidas por el corazón y se aceptan como marcadores sensibles y específicos para CHF. La expresión del gen de la CT-1 está incrementada en modelos de CHF experimental³⁸¹. Como ya se ha dicho anteriormente el ensanchamiento ventricular estimula la secreción de CT-1³⁹⁰. Sin embargo, el papel de la CT-1 en la patofisiología de CHF o como marcador de CHF no está claro. Los niveles de CT-1 en plasma aumentan con la gravedad del CHF. Por lo tanto, las concentraciones de CT-1 son muy altas en corazones de pacientes con CHF en estado final⁴⁰², Además los niveles de CT-1 en plasma correlacionan con el índice de masa ventricular izquierda en pacientes con cardiomiopatía dilatada (DCM)³⁹⁴, que se caracteriza por sobrecarga en el volumen, sugiriendo un papel importante patofisiológico en la remodelación del ventrículo izquierdo y/o en la hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con DCM. Además, la activación del gen de CT-1 ventricular precede a la activación del gen de BNP en CHF⁴⁰³.

En disfunción ventricular izquierda temprana, la expresión del gen de CT-1 ventricular está aumentada, mientras que la expresión del gen de BNP no lo está. Esas observaciones aumentan la posibilidad que la CT-1 ventricular sea un biomarcador para detectar la disfunción ventricular temprana en CHF, al igual que el BNP es un evidente marcador de CHF. También han demostrado, en pacientes con CHF, un valor de pronóstico adicional de CT-1 sola o combinada con BNP^{404,405}.

Sepsis

El tratamiento con CT-1 inhibe significativamente la producción de TNF- α tanto en el suero como en el corazón en ratones tratados con lipopolisacáridos (LPS). Los efectos parecen ser directos ya que también inhiben la producción de TNF- α en cultivos de células sanguíneas a los que se les añaden LPS. Además CT-1 podría tener un papel protector en algunas enfermedades mediadas por TNF- α ⁴⁰⁶. La CT-1 potencia el aumento de los niveles en suero de corticosterona y de IL-6 inducidos por IL-1 β e induce la proteína de fase aguda amiloide A en suero.

Se han estudiado los efectos de la CT-1 sobre la disfunción cardíaca en un modelo de sepsis inducida por LPS en ratas. LPS provoca una reducción de la función sistólica y dilatación de la cavidad ventricular entre las 3-6 horas después de la administración, acompañados de un incremento en la fosforilación ventricular de STAT1 y STAT3, activación de NF κ B y expresión del mRNA de la iNOS. La administración de CT-1 inmediatamente antes a la administración de LPS inhibe todos esos cambios inducidos por LPS. Para determinar si la expresión de SOCS1 en cardiomiocitos es suficiente para inhibir la expresión del mRNA de iNOS inducida por LPS y

citocinas se investigaron, los efectos de la expresión forzada de SOCS1 en cultivos de cardiomiocitos de neonatos mediante un sistema de transfección por un adenovirus. La expresión forzada de SOCS1 inhibe significativamente la transcripción de iNOS inducida por LPS, TNF- α e INF- γ . Estos datos sugieren que la expresión de SOCS1 mediada por la CT-1 en cardiomiocitos podría ser utilizada para prevenir la depresión miocárdica inducida por la sepsis²⁹⁹.

6.3.1.2.- Efectos hemodinámicos

Además de fomentar el crecimiento y desarrollo cardíaco, CT-1 también tiene efecto sobre funciones hemodinámicas y cardiovasculares. Se ha demostrado que la administración intravenosa de CT-1 (4-100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) a ratas causa hipotensión sistémica dosis dependiente⁴⁰⁷. La respuesta depresora de la CT-1 coincide con una reducción en la resistencia vascular sistémica y da lugar a una significativa elevación en el gasto cardíaco asociado con un incremento concomitante en la frecuencia cardíaca. Esto indica que la hipotensión es causada por vasodilatación. Interesantemente, tanto el efecto depresor de CT-1 sobre la presión sanguínea como los efectos taquicárdicos se reducen significativamente cuando se tratan con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME), sugiriendo que los efectos hemodinámicos de CT-1 podrían ser mediados por el óxido nítrico⁴⁰⁷. Además, la administración aguda de CT-1 produce un aumento significativo en la dP/dt del ventrículo izquierdo, sugiriendo que la administración aguda de CT-1 ayuda a preservar la contractibilidad ventricular. Por el contrario, largas exposiciones a CT-1, inducen disfunción contráctil en tejidos cardíacos reconstituidos con miocitos cardíacos de neonatos de rata⁴⁰⁰.

6.3.1.3.- Propiedades endocrinas cardíacas

La CT-1 también afecta a la función endocrina del corazón ya que, estimula la secreción del péptido natrurético tipo B (BNP) y del péptido natrurético tipo A (ANP). La trascendencia del incremento en la expresión de los genes de ANP y BNP por la CT-1 no está clara todavía. Aunque ANP y BNP tienen propiedades hipotensivas *in vivo*, es poco probable que sean los responsables de la disminución en la presión sanguínea causada por la administración de CT-1, ya que sus efectos hipotensivos no son bloqueados por L-NAME⁴⁰⁸.

Los efectos de la CT-1 sobre el corazón se resumen en la Tabla VIII.

Tabla VIII.- Efectos de la CT-1 en el corazón

EFFECTOS DE LA CT-1 EN EL CORAZÓN

IN VIVO

EFFECTOS CARDIOPROTECTORES

- En hipoxia de miocardio
- En daño por I/R
- En hipertrofia cardiaca
- En sepsis cardiaca

EFFECTOS HEMODINÁMICOS

- Incremento del gasto cardiaco en proporción al ritmo cardiaco
- Incremento del ratio entre el peso del corazón y el corporal y también entre el peso ventricular y el corporal
- Disminución de la presión arterial media y de la resistencia vascular sistémica.

PROPIEDADES ENDOCRINAS

- Incremento en la expresión ventricular del péptido natriurético tipo A y B (ANP-BNP)

CT-1 EN ENFERMEDADES VALVULARES

- **HIPERTENSIÓN** CT-1 en plasma podría ser utilizado para el seguimiento en la clínica .
- **REGURGITACIÓN**CT-1 en plasma podría ser utilizada para observar bioquímicamente la progresión de la regurgitación mitral.
- **ESTENOSIS AÓRTICA** CT-1 podría ser utilizada como un marcador para identificar el momento óptimo para la cirugía en estenosis aórtica
- **INSUFICIENCIA CARDÍACA CONGESTIVA**CT-1 como un biomarcador para detectar la disfunción ventricular temprana en CHF y en la remodelación estructural en CHF.

CT-1 EN ENFERMEDADES DE LAS ARTERIAS CORONARIAS

- **INFARTO DE MIOCARDIO**
- **ANGINA DE PECHO**
La CT-1 induce proliferación de cardiomiocitos y fibroblastos. Induce la proliferación de proteínas de fibroblastos (colágeno). Importante papel en la formación de la cicatriz y en su remodelación. Desarrollo en la remodelación ventricular y del fracaso cardiaco después del infarto de miocardio agudo

IN VITRO

- Hipertrofia de miocitos cardiacos
- Efectos protectores contra estímulos hipóxicos/isquémicos
- Incremento de supervivencia celular y de proteínas de choque térmico (hsp70 y hsp90)
- Síntesis de DNA y de colágeno en fibroblastos cardiacos
- Diferenciación y maduración de células madre a células semejantes a cardiomiocitos.
- Una administración aguda preserva la contractibilidad , largas exposiciones inducen disfunción contráctil

6.3.2.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el pulmón

La CT-1 se detecta en abundancia en pulmón de humano adulto y se expresa en las células del músculo liso bronquial (HBSMC), tanto en humano adulto como en feto⁴⁰⁹.

En un estudio *in vitro*, en células fetales, en ausencia de suero, el TGFβ-2/IL-4 induce la liberación de CT-1 lo que reduce la apoptosis inducida tanto por la deprivación de suero como por el tratamiento con el anticuerpo Fas/TNF-α, con mayor eficacia que el resto de la familia de IL-6^{367,409}. El efecto antiapoptótico de la CT-1 se produce a través de la activación de la vía de señalización MAPK/ERK1/2, ya que un inhibidor de ERK1/2 (PD98059), reduce dicho efecto.

La CT-1 también induce un significativo incremento en el tamaño celular *in vitro*, valorado mediante proteína/ratios DNA y citometría de flujo. Por lo tanto la CT-1 podría contribuir a la

reducción de la apoptosis y al incremento de la masa del músculo liso en daño de la vía respiratoria^{334,409}.

El tratamiento con CT-1, en un modelo de hipertensión con hipoxia pulmonar crónica, protege la función endotelial de la arteria pulmonar; disminuye la presión arterial pulmonar y atenúa la hipertrofia ventricular derecha⁴¹⁰.

La CT-1 previene de la acumulación neutrofílica pulmonar inducida por la administración de endotoxinas (ETX), así como del edema pulmonar. La CT-1 disminuye el deterioro significativo en el endotelio causado por la ETX, además la CT-1 posee propiedades antiinflamatorias en modelos de daño pulmonar agudo inducido por ETX⁴¹¹.

6.3.3.- Efectos de la cardiotrofina-1 en el hígado

6.3.3.1.- Efectos hepatoprotectores

Respuesta inflamatoria hepática

Cuando se añade CT-1 a los cultivos celulares tanto de HepG2 como de H35, se induce la producción de varias proteínas de fase aguda (haptoglobina, fibrinógeno, α 1-acidaglicoproteína, α 2-macroglobulina) de forma dosis dependiente. Sin embargo, si añadimos el anticuerpo neutralizante anti-gp130mAb, en presencia de la CT-1, se inhibe la inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda, indicando que la subunidad gp130 es absolutamente necesaria para la formación de un receptor funcional para la CT-1. Y además esos resultados demuestran que la CT-1 podría tener un importante papel en la regulación del metabolismo de hepatocitos en la respuesta inflamatoria⁴¹².

Apoptosis hepática

Los ratones CT-1(-/-) mueren más rápido que los animales wild-type después de administrar una dosis letal del agonista de Fas (Jo-2). Con una dosis subletal de Jo-2 todos los ratones wild-type sobrevivían. Sin embargo los ratones CT-1(-/-) desarrollan una apoptosis hepatocítica con un 50% de mortalidad a las 24 horas. El pretratamiento con CT-1 mejora la supervivencia y reduce el daño, tanto en animales wild-type como en animales CT-1(-/-)³³².

El análisis del transcriptoma del hígado en los ratones CT-1(-/-) y en los wild-type, muestran 9 genes, expresados diferencialmente en los dos grupos de animales, asociados con

funciones de supervivencia y muerte celular. Cuatro de esos genes [IGFBP1, peroxiredoxin3, TNFR1, y calpastatina (inhibidor endógeno de la calpaína)], tenían disminuída su expresión en ratones CT-1(-/-), siendo modulados con la administración de la CT-1. Además el tratamiento de los ratones CT-1(-/-) con el inhibidor de calpaina MDL28170 proporciona una significativa protección contra el daño inducido en el hígado por Fas³³².

Viendo todo en conjunto, los ratones CT-1(-/-) son altamente sensibles a la muerte por apoptosis mediada por Fas, debido en parte a la deficiente activación de STAT3 y al inadecuado control de la actividad de calpaina durante los procesos apoptóticos. Estos datos demuestran que CT-1 es una defensa natural del hígado contra la apoptosis, pudiendo tener un potencial terapéutico importante³³².

La CT-1 aumenta durante la regeneración del hígado después de la hepatectomía parcial y ejerce potentes efectos antiapoptóticos sobre células hepatocíticas. El tratamiento con un adenovirus que codifica para la CT-1 protege de manera muy eficiente a las ratas contra el fracaso hepático fulminante, después de la hepatectomía subtotal, intervención que causa una mortalidad del 91% en animales controles, mientras que el 54% de los tratados con el gen de la CT-1 sobrevivían a largo plazo. Esos efectos protectores se asociaban a una reducción en la actividad de caspasa-3 y a la activación de las vías de señalización STAT3, ERK1/2 y Akt en el hígado restante⁴¹³.

La transferencia del gen de la CT-1 al hígado también le protege del daño provocado por la concanavalina A (Con-A) y activa vías antiapoptóticas en el tejido hepático. Una protección similar se obtenía en animales tratados con CT-1 recombinante administrada intravenosamente antes de la administración de la Con-A⁴¹³. Por lo tanto, puede deducirse que, la CT-1 es un factor de supervivencia en hepatocitos que reduce de manera eficiente el daño hepatocelular en modelos animales con daño agudo en el hígado⁴¹³.

Las ratas sometidas a hepatectomía parcial y tratadas con NS-398, un inhibidor específico de COX-2, manifiestan una parada en el ciclo celular, incrementándose la apoptosis en los hepatocitos, una continúa activación de ERK1/2 e incremento en la producción de IL-6. Esos cambios están asociados a la disminución en la expresión de la CT-1 y COX-1. La administración de un adenovirus que codifica para la CT-1 a las ratas tratadas con NS-398, reestablece los niveles normales de COX-1, prostaglandinas, y VEGF en el hígado después de la hepatectomía parcial y permite la regeneración normal del hígado⁴¹⁴. Además, la estimulación con CT-1 a hepatocitos

aislados de rata, incrementa el mRNA de COX-1, COX-2 y VEGF y la síntesis de prostaglandinas, y, si añadimos prostaglandina E1 a los cultivos incrementa la producción de CT-1 y VEGF. Por lo tanto, la activación de COX-2 y la producción temprana de prostaglandinas después de la hepatectomía parcial son esenciales para la proliferación de hepatocitos y para correcta inducción tanto de CT-1 como de VEGF.

Considerándolo todo, estos resultados sugieren que la CT-1 puede restablecer la regeneración del hígado después de la inhibición de COX-2 por incremento de VEGF, expresión de COX-1, y síntesis de prostaglandinas⁴¹⁴. (Figura 53)

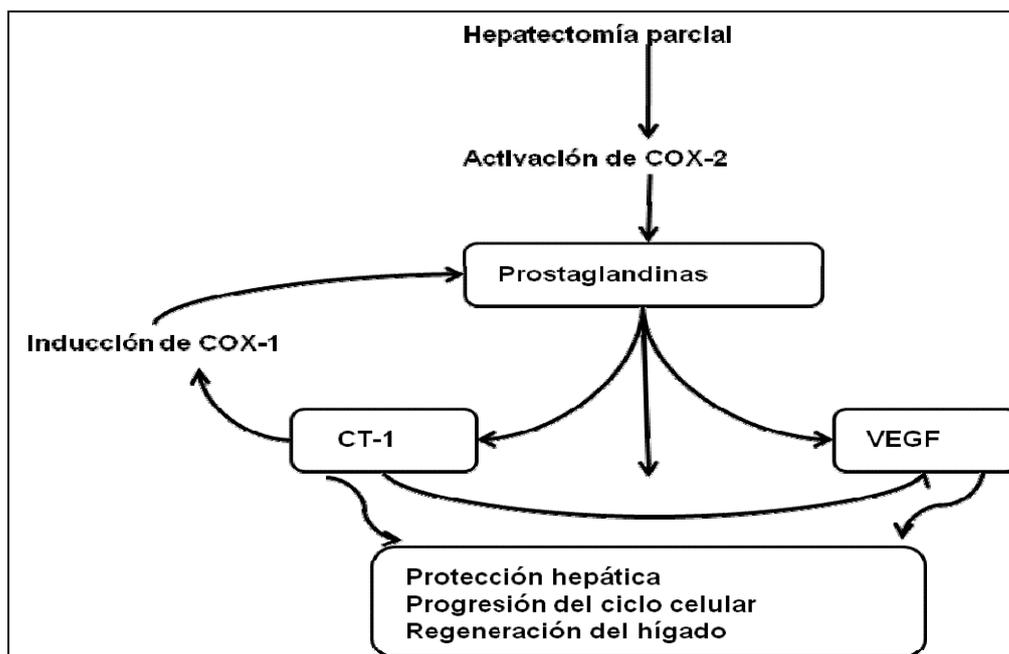


Figura 53.- Representación esquemática de las posibles interacciones entre la CT-1, VEGF y las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2⁴¹⁴.

Se ha llevado a cabo un estudio para investigar el efecto del tratamiento de CT-1 en trasplante de hígado en ratas, administrando en el hígado donante un adenovirus que expresan la CT-1 (AdCT-1). El pretratamiento con AdCT-1 mejoró de manera muy importante la función del hígado y la supervivencia de los injertos. En el grupo tratado con AdCT-1, la arquitectura del hígado estaba bien protegida, la apoptosis y necrosis celular era reducida; la proteína antiapoptótica bcl-2 estaba sobrerregulada y la proapoptótica caspasa-3 activada estaba disminuida, mientras que las vías de señalización ERK1/2, Akt y STAT3 estaban activadas después del trasplante.

Por lo tanto el hígado donante que ha sido transfectado con el AdCT-1 mejora el daño por I/R debido a una disminución en la necrosis y apoptosis hepática del hígado transplantado, mediado en parte por la activación de las vías de supervivencia celular ERK1/2, Akt y STAT3. Estos resultados podrían proporcionar un potencial clínico para mejorar el resultado en el trasplante de hígado³¹⁷.

Isquemia/reperfusión hepática

La administración de la CT-1 a ratas o ratones protege al hígado del daño provocado por la I/R mientras que los ratones deficientes en CT-1 son sumamente sensibles a este tipo de daño³¹⁵. El preconditionamiento isquémico reduce significativamente los niveles de transaminasas e inhibe la activación de la caspasa-3 y de la c-jun-NH2 cinasa después de la I/R en un ratón normal pero no en un ratón CT-1(-/-). Además, los efectos protectores proporcionados por el preconditionamiento isquémico se reducen por la administración previa de un anticuerpo neutralizante de la CT-1 (anti-CT-1). Se observa una importante fosforilación de STAT3 en el tejido hepático después del preconditionamiento isquémico más I/R en ratones normales mientras, que no se observa en ratones CT-1(-/-)³¹⁵.

El estrés oxidativo, es un proceso involucrado en la hepatoprotección inducida por el preconditionamiento isquémico, estímulo que libera CT-1 en hepatocitos aislados.

Interesantemente, la isquemia corta seguida de reperfusión corta causa una moderada elevación de las transaminasas en suero y una fuerte activación de STAT3 en ratones normales y deficientes en IL-6. En cambio en ratones CT-1(-/-), no se produce activación de STAT3 y se produce una importante hipertransaminasemia. Por lo tanto la CT-1 es una defensa endógena esencial para la protección del hígado en el proceso de I/R y un mediador clave en el efecto protector inducido por el preconditionamiento isquémico³¹⁵.

6.3.3.2.- CT-1 en patología hepática

CT-1 en el fracaso hepático fulminante

El fracaso hepático fulminante (FHF) es una enfermedad de rápida evolución, que carece de tratamiento no quirúrgico efectivo. En un modelo de rata con FHF, inducida por la administración intraperitoneal de D-galactosamina (1.4g/Kg). La administración de CT-1 a la 12 y 18 horas indujo una supervivencia del 80% (12/15) y 70% (7/10), respectivamente mucho mayor que en el grupo no tratado 28% (5/18). Además, en los grupos tratados, se observa una mejoría

en las pruebas histológicas del hígado, reducción en el tiempo de activación de la coagulación, y disminución de los niveles de bilirrubina total y de alanina aminotransferasa en suero. La administración de la CT-1 disminuyó las células apoptóticas e incrementó la expresión de marcadores de proliferación celular en el tejido hepático⁴¹⁵.

En un modelo *in vitro* de fallo hepático (FH) inducido por D-galactosamina, la administración de CT-1 disminuyó significativamente las células apoptóticas y la expresión de moléculas proapoptóticas y aumentó la expresión de moléculas antiapoptóticas. Además las células tratadas con CT-1 mostraron un incremento en la expresión de la gp130 y una sobre regulación de la ciclina D1 y de la Hsp90, lo que sugiere que la CT-1 podría proteger parcialmente el hígado del FH inducido por D-gal a través de sus efectos como molécula antiapoptótica e inductora de la reparación celular⁴¹⁵.

También se ha demostrado que CT-1 puede ejercer un efecto protector en la cirrosis hepática inducida por CCL₄ después de una hepatectomía. La administración de la CT-1 en ratas mejora la expresión de NFκB (p65), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), Ciclina D1 y p42/44 en el hígado remanente. Aunque la expresión de la gp130, está disminuida en los hepatocitos aislados de enfermos del hígado cirrótico, CT-1 podría estimular la proliferación celular. La administración de la CT-1 mejora la expresión de NFκB (p65) y VEGF en los hepatocitos enfermos. Por lo tanto la administración de CT-1 podría mejorar la función del hígado remanente en cirróticos y estimular la regeneración del hígado a través del aumento de la angiogénesis y de la proliferación celular³²⁷.

6.3.4.- Efectos de la CT-1 en el tejido neural

Se ha demostrado que la CT-1, protege de la degeneración neuronal inducida por axotomía del nervio ciático de neonatos y de la muerte neuronal por daño en la médula espinal en ratas adultas. [Zhang Z.F. y cols., 2003] La CT-1 reduce la muerte celular neuronal causada por FeSO₄, en cultivos de neuronas corticales y también atenúa los efectos neurotóxicos *in vitro* del agente productor de peroxinitritos 3-morpholinosydnonimina, y del donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (SNP). Así mismo, previene del daño cerebral provocado por una isquemia cerebral focal en ratas. [Sola A. y cols., 2008; Wen T.C. y cols., 2005] El cerebro dañado por Hipoxia/Isquemia (H-I) cerebral y por isquemia cerebral focal, muestra muerte neuronal progresiva por apoptosis⁴¹⁶⁻⁴¹⁹. Numerosos estudios han demostrado que la caspasa-3 efectora y

la caspasa-8 iniciadora, se activan tras la H/I en ratas de 7 días⁴²⁰, mientras que la inhibición de las caspasas 3 y 8 tiene efectos neuroprotectores⁴²¹. La administración de CT-1 reduce la apoptosis neuronal, la actividad de la caspasa 3 y 8 y las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), marcador de daño neuronal, tanto en isquemia cerebral focal *in vivo*, como en cultivos de neuronas corticales expuestas a nitroprusiato sódico *in vitro* y se ha sugerido que lo hace a través de la activación de JAK/STAT3, NF- κ B, ERK1/2, y Akt^{422,423}.

6.3.5.- Efectos de la CT-1 en el sistema neuromuscular

También se ha demostrado la producción de CT-1 en el sistema nervioso central tanto postnatal como de adulto⁴²⁴. CT-1 podría ser importante en el desarrollo normal de la motoneurona y podría servir para retrasar el deterioro de las motoneuronas frente a un daño²⁸³.

La CT-1 juega un papel clave en la regeneración e hipertrofia del músculo esquelético de ratas⁴²⁵. Los fenotipos que se han encontrado para los ratones knock-out de CT-1 son: pérdida de motoneuronas (MNs) en la edad postnatal, reducción del número de MNs durante el desarrollo (parte lumbar).⁴²⁶ En cuanto a los knock-out de los receptores LIFR β , y gp130 se observa pérdida de MNs durante el desarrollo (~ 40%), y muerte al poco de nacer^{333,427}.

El 20% de los casos de esclerosis amiotrófica lateral familiar (FALS), tienen mutaciones en la SOD1. La inyección intramuscular de un vector adenoviral que codifica la CT-1 en ratones recién nacidos con mutación en la SOD1, suministra a las motoneuronas una fuente continua de CT-1 que retrasa el inicio del deterioro motor. La degeneración axonal se relentiza y la atrofia muscular esquelética se reduce por el tratamiento con CT-1^{426,428}.

En ratones recién nacidos con neuropatías motoras, la administración de un vector adenoviral de CT-1 prolonga la supervivencia de los animales y mejora las funciones motoras. Los ratones tratados con CT-1 muestran una reducción significativa en la degeneración de las motoneuronas faciales. La innervación terminal del músculo esquelético, enormemente alterado en ratones no tratados, estaba casi completamente conservada en ratones tratados con CT-1⁴²⁹. Las citocinas CNTF y CT-1 inducen supervivencia a motoneuronas a través de la activación de la PI3K necesitando síntesis de proteínas dependientes de la vía JAK⁴³⁰.

En ratones mutantes con atrofia muscular espinal, la inyección intramuscular del vector adenoviral que expresa CT-1, mejora la media de supervivencia, retrasando el daño motor y

ejerce efectos protectores contra la pérdida de axones proximales motores y contra las anomalías en el citoesqueleto de terminales sinápticas motoras, por lo que la administración de CT-1 podría ser una valiosa propuesta terapéutica en atrofia muscular espinal⁴³¹.

Para caracterizar más el papel de la CT-1 en la supervivencia de MNs, se han examinado: (1) los efectos de la CT-1 sobre cultivos de MNs de pollo y ratón; (2) los efectos del tratamiento con CT-1, en la supervivencia de MNs en el útero de ratón y pollo; y (3) la supervivencia de MNs en ratones con deficiencia en CT-1. Los resultados de los tres enfoques apoyan un papel fisiológico para CT-1 en la supervivencia de subpoblaciones de MNs en desarrollo³³³.

Se ha demostrado también como el cotransplante de neuronas embrionarias, a las que se le añade CT-1 en el medio en el mismo momento del trasplante celular (aproximadamente 90 minutos después de la disociación celular), mejora la supervivencia de las neuronas y la función a largo plazo de los músculos reinervados después de una denervación del músculo⁴³².

Podemos concluir que la CT-1 ejerce efectos miotróficos y neurotróficos en un modelo de ratón con daño espontáneo de motoneuronas, lo que tiene un gran potencial terapéutico en humanos⁴³³.

6.3.6.- Cardiotrofina-1 y otros órganos

6.3.6.1.- Retina

Se ha observado que la CT-1 promueve la supervivencia de los fotorreceptores en ratas transgénicas portadoras de la mutación rodopsina S334ter. Se observó también un aumento significativo de la fosforilación de STAT1 y de STAT3 en la retina después de la inyección de CT-1. El aumento de la STAT3 fosforilada se localizó con la glutamina sintetasa, un marcador de células Müller. Estos resultados indican que la CT-1 promueve la supervivencia de los fotorreceptores y que probablemente las células de Müller median este efecto. También sugieren que la liberación prolongada de la CT-1, es esencial para el rescate de los fotorreceptores a largo plazo⁴³⁴.

6.3.6.2.- Hueso

La CT-1 tiene una función crítica en la biología del hueso, se expresa en los osteoclastos diferenciados, es esencial para la resorción ósea normal y es capaz de estimular la formación del hueso tanto *in vitro* como *in vivo*. La CT-1 podría ser uno de los factores de acoplamiento en la

señalización de los osteoclastos activos a los osteoblastos para promover la formación del hueso⁴³⁵.

6.3.6.3.- Tejido adiposo

La CT-1 se expresa en el tejido adiposo⁴³⁶ y se ha demostrado, en adipocitos 3T3-L1, que la CT-1 activa y transloca al núcleo STAT1,-3,-5A y -5B así como ERK1/2, de manera tiempo y dosis dependiente⁴³⁷.

La capacidad de la CT-1 para inducir señalización en células grasas también se ha demostrado *in vivo*. La CT-1 no afecta a la diferenciación de los adipocitos. Sin embargo el tratamiento agudo con la CT-1 causa un incremento en el mRNA de SOCS-3 en adipocitos y un decremento transitorio del mRNA de PPAR γ ⁴³⁷. Los efectos de la CT-1 sobre la SOCS-3 y el mRNA de PPAR γ eran independientes de la activación de MAPK³³⁵.

La administración crónica de CT-1 a adipocitos 3T3-L1 da lugar a una disminución de la ácido graso sintasa y del receptor de la insulina (IRS-1). Además el tratamiento crónico con la CT-1 desarrolla una resistencia a la insulina. Por lo tanto CT-1 es un potente regulador de señalización en adipocitos tanto *in vitro* como *in vivo*³³⁵.

El tejido adiposo parece ser una fuente de CT-1, ya que su expresión aumenta progresivamente a lo largo de su diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros en cultivos celulares de 3T3-L1. En esas células, la expresión de la CT-1 se incrementa con los niveles de glucosa de manera dosis dependiente. Se ha observado en pacientes con síndrome metabólico mayores niveles de CT-1 en suero que en pacientes control, por lo que la síntesis de CT-1 en el tejido adiposo podría estar relacionado con los elevados niveles de CT-1 en plasma en pacientes con síndrome metabólico⁴³⁶.

6.3.6.4.- Endotelio

En cultivos de células endoteliales la CT-1 aumenta el gen de expresión de la endotelina-1 a través del receptor gp130⁴³⁸. Por otra parte, en cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) la CT-1 aumenta de manera dosis y tiempo dependiente, el mRNA de la proteína quimioatractante de monocitos (MCP1), y parece ser que en ello están involucradas la vía de señalización JAK2/STAT3 y NF- κ B⁴³⁹. También en HUVEC la CT-1 causa un incremento de la IL-6 tanto a nivel de proteína como de mRNA y las vías implicadas son JAK2/STAT3, p38 y NF κ B⁴⁴⁰.

Otro estudio *in vitro* en células endoteliales aórticas humanas (HAECs) demuestra que la CT-1 promueve la adhesión de monocitos y la migración mediante la estimulación de ICAM-1 y MCP-1 a través de mecanismos los cuales involucran a ERK1/2, p38, PI3K/Akt y NFκB⁴⁴¹.

6.3.6.5.- Células sanguíneas

La CT-1 es estable en muestras de sangre tratada con EDTA y aprotinina guardada durante 48 horas a temperatura ambiente o en hielo lo que permite la investigación clínica cotidiana⁴⁴². El corazón es una fuente de CT-1 en la circulación; la concentración de CT-1 en plasma de la aorta y del seno coronario es mayor que en sangre periférica, lo cual indica claramente que el corazón secreta la CT-1 a través del seno coronario hacia la circulación periférica³³⁶. Los leucocitos, plaquetas y la hemoglobina aumentan con la administración de la CT-1³³¹. Además la CT-1 también incrementa la expresión tanto de la proteína como del mRNA de la IL-6 en monocitos y las vías implicadas serían JAK2/STAT3, p38 y NFκB⁴⁴³.

6.3.8.- Otros factores que regulan la expresión de CT-1

Angiotensina II

La Angiotensina II induce expresión de CT-1 en fibroblastos cardíaco⁴⁴⁴ observándose una mayor expresión de mRNA de CT-1 en fibroblastos que en cardiomiocitos³⁸². A su vez la CT-1 aumenta la expresión del mRNA del angiotensinógeno en miocitos cardíacos por la vía de activación STAT3 y el aumento de la regulación del angiotensinógeno y la producción de angiotensina II contribuye con la CT-1 para inducir hipertrofia cardíaca⁴⁴⁵.

Noradrenalina

La noradrenalina aumenta la expresión del mRNA de CT-1 en miocitos cardíacos, tanto *in vivo* como *in vitro*²⁷⁹.

Urocortina

La urocortina aumenta los niveles de expresión de la CT-1 tanto de la proteína como del mRNA. Este efecto es mediado por activación del promotor del gen de la CT-1 y requiere del factor de transcripción C/EBPβ/NF-IL6⁴⁴⁶.

El factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2)

El Hmw-FGF-2 aumenta la regulación de la CT-1 en cardiomiocitos y causa hipertrofia post-infarto de miocardio⁴⁴⁷.

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- Hipótesis

La administración profiláctica de CT-1 disminuirá el daño renal ocasionado por la respuesta inflamatoria inducida por isquemia/reperfusión renal, tanto en la isquemia caliente como en la isquemia fría y posterior reperfusión tras el trasplante renal.

2.- Objetivos

- ❖ Desarrollo de un modelo experimental de I/R renal grave y reversible en rata.
- ❖ Evaluar en dicho modelo experimental el efecto de CT-1 sobre la función renal y la respuesta inflamatoria originada por la I/R renal
- ❖ Desarrollo de un modelo experimental de preservación renal en rata.
- ❖ Evaluar en dicho modelo experimental el efecto de CT-1 sobre la inflamación inducida por la preservación.
- ❖ Desarrollo de un modelo de trasplante renal ortotópico isogénico en ratas.
- ❖ Evaluar en dicho modelo experimental el efecto de CT-1 sobre la función renal y la respuesta inflamatoria originada por la I/R renal post-trasplante.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Materiales

1.1.- Instalaciones:

- ✚ Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (PAE SA-001, Salamanca, España), que proporcionó los animales de experimentación empleados en este estudio y donde permanecieron estabulados, en jaulas metabólicas, para los estudios de supervivencia y función renal.
- ✚ Laboratorios del Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Universidad de Salamanca, donde se realizaron los estudios histológicos de la preservación renal.
- ✚ Laboratorios del Centro del Cáncer, Universidad de Salamanca, donde se realizaron el resto de los estudios histológicos y los de inmunohistoquímica.
- ✚ Laboratorios de Bioquímica del Hospital Universitario de Salamanca, donde se realizaron las determinaciones de creatinina.
- ✚ Laboratorios de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, donde se realizaron las técnicas quirúrgicas y el resto de los estudios:

- Laboratorio 1 para trabajo con animales de experimentación, dotado de instalación fija de aire acondicionado y renovación del mismo, zonas de estabulación, mobiliario y de los elementos necesarios para la realización de modelos experimentales quirúrgicos desarrollados en la Tesis Doctoral.
- Laboratorio 2 para el desarrollo de las técnicas de determinación, en todo tipo de muestras, dotado de instalación fija de aire acondicionado, gases (O₂ y CO₂), vacío, mobiliario y de los instrumentos necesarios para la realización de los estudios de: anión superóxido, mieloperoxidasa, glicoproteína gp130, CT-1 total y marcada con cola de histidina, el supresor de señalización SOCS-3, citocinas pro- y anti-inflamatorias, iNOS, moléculas de adhesión celular, vías de señalización celular y el factor transcripciona κB.
- Laboratorio 3, sala tipo C, dotado de la instalación fija de todos los elementos de una sala limpia, mobiliario y de los elementos precisos para el desarrollo de los estudios de preservación y almacenamiento de muestras
- Seminario para mantener reuniones de trabajo, dotado de sistema informático y proyección, fijos, y mobiliario adecuado para tales fines.
- Almacén para el material fungible

Todas las instalaciones anteriormente mencionadas cumplen con la normativa y legislación vigente para los cometidos que se han desarrollado en cada una de ellas.

1.2.- Animales de experimentación

Empleamos ratas Wistar machos de un peso comprendido entre 225 y 250 g, suministrados por el SEA de la Universidad de Salamanca y ratas Fischer machos de un peso comprendido entre 225 y 250 g, suministrados por CharlesRiver (Barcelona, España). Fueron estabuladas en condiciones adecuadas, según la legislación vigente, y alimentadas, *ad libitum*, con agua y dieta estándar (AØ4, Panlab, Madrid, España), con la siguiente composición: Proteína bruta (17.62% del total), materias grasas brutas (2.50%), celulosa bruta (4.05%), cenizas brutas (4.38%), almidón (43.30%), calcio (0.66%), fósforo (0.49%), sodio (0.14%), humedad (10.54%), lisina

(0.85%), metionina (0.29%), vitamina A (7500 UI), vitamina D (1500 UI) y vitamina E (tocoferol) (15 mg).

Los animales fueron sometidos a dieta absoluta, con agua *ad libitum*, 12 horas antes del experimento correspondiente.

El proyecto cumplió en todo momento con la normativa y legislación vigente sobre el manejo de animales de experimentación.

1.3.- Equipos empleados

Limpieza y esterilización: Sellador de bolsas de autoclave: Selecta Sealcom 600. Esterilizador por gases Amprolene AN74i. Autoclave Raypa Steam Sterilizer. Estufa Heraeus E42. Estufa p-selecta. Baño de ultrasonidos Branson 2510.

Anestesia: Sistema de anestesia por gases MatrX. 2 respiradores volumétricos de aire. 2 respiradores volumétricos de oxígeno y gases. 2 ventiladores para pequeños animales SRI. 4 bombas de infusión Braun.

Cirugía: Lupa LEICA con sistema de vídeo incorporado. Lupa NIKON con sistema de vídeo incorporado. Microscopio quirúrgico Zeiss. 2 aspiradores portátiles semiautomáticos. 2 mesas de quirófano robotizadas. 2 bisturíes eléctricos. 2 bisturíes ultracision. Bomba multicanal Cole-Parmer 74900. Bomba Masterflex + baño termostatzado Medingen. Fuente de luz fría Schott.

Almacenamiento de muestras y reactivos: Contenedor de nitrógeno líquido de 110 litros. Congelador -80°C: Forma Scientific -86 freezer. 3 Congeladores -25°C. 3 Refrigeradores 4°C.

Estabulación de animales: Aislador, con sistema HEPA, para animales TDI.

Equipamiento general: Campana de gases "Cruma". Termodesinfectador Miele. Máquina de hielo automática 85 AS-E. Armario de seguridad para productos inflamables y corrosivos. Balanza de precisión: Precisa 205^a. Balanza Sartorius T2101. Balanza Sartorius T6101. Sistema de purificación de agua Millipore Elix 3. 2 Agitadores orbitales: Cole Parmer Rocker Platform. Agitador magnético: Raypa AG-2. 2 Agitadores calefactados: Eppendorf Mixmate. pHmetro: Oaktlon ph 510 series. Baño de agua: Lauda Ecoline Re 120 desde -30 a 150 °C. Campana de flujo laminar TELSTAR CV-30/70. Campana de flujo laminar TELSTAR. Contenedor de nitrógeno líquido

con sistema de administración THERMO. Contenedor de nitrógeno líquido THERMO 110 l para congelación de muestras. Centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R (volumen 1,5-2 ml). Centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 (volumen 15-50 ml). Centrífuga Eppendorf miniSpin. Ultracentrífuga SORVAL-OTD-COMBI. Sonificador Sonics Vibra Cell Tm. Homogeneizador: Glas Col GKH. Material informático al uso para todos los sistemas especificados. Equipo automatizado de pipeteo Eppendorf opMotion 5057

Equipamiento específico: Espectrofotómetro Unicam Helios α . Lector de placas Thermo Electro Corporation Multiskan ascent (medida fotométrica). Lector de placas Thermo Electro Corporation Varioskan-flashl (lector de escaneado multimodo, incluyendo la intensidad de fluorescencia, con resolución temporal de fluorescencia (TRF), fotométrico, y luminométrico. Equipo de Western Blot: BIO-RAD Miniprotean. Equipo de Western Blot: BIO-RAD Protean-xi cell. Trans-Blot Semi-Dry transfer cell BIO-RAD. 2 Alimentadores Power-Pac HC BIO-RAD/ Thermo-electron corporation. Equipo de PCR Eppendorf. Equipo de revelado y análisis de imagen ImageQuant RT ECL de General Electrics.

Equipamiento informático: Ordenadores, impresoras, periféricos y programas informáticos adaptados a las necesidades propuestas.

Material fungible: Ver las diferentes técnicas ensayadas

2.- Métodos: Diseño Experimental

2.1- Condiciones generales del estudio:

Se realizaron búsquedas bibliográficas en diferentes Bases de Datos (MEDLINE®, MLA Bibliography®, PsycLIT Journal Articles®, CC Search (R) All 7 CC Editions®, U.S. National Library of Medicine®) en el periodo comprendido entre 2005 y 2011, utilizando algunas referencias más antiguas.

El planteamiento del trabajo se realizó siguiendo un estudio randomizado ciego: después de una asignación aleatoria, tanto en el momento de la administración de los fármacos, como en la determinación y valoración estadística de los resultados, no sabíamos qué producto se estaba administrando, a qué grupo pertenecía la muestra que estábamos estudiando, o la identidad de los grupos que se analizaban estadísticamente.

Todas las técnicas anestésicas y quirúrgicas, de obtención de muestras y las determinaciones de las diferentes variables estudiadas fueron realizadas bajo estrictas condiciones de asepsia utilizando todos los medios descritos en los apartados anteriores.

2.1.1.- Técnicas anestésicas empleadas:

- ✚ Inhalatoria con gas isoflurano (Forane®, Abbott Laboratories, IL, USA), para la administración de la cardiotrofina-1, para el trasplante renal y para la extracción de muestras.
- ✚ Intraperitoneal con 75 mg/kg de cloruro de ketamina (Parke-Davis Barcelona, España) + 50 mg/kg de diazepam (Roche Madrid, España) y 20 mg/kg de atropina para la realización de las técnicas quirúrgicas de isquemia/reperfusión.

2.1.2.- Técnicas quirúrgicas empleadas:

Durante los procedimientos, se coloca al animal de experimentación sobre una tabla de microcirugía calefactada, diseñada para minimizar la pérdida de calor del animal de experimentación, en decúbito supino con sujeción de las cuatro extremidades, ofreciendo así una completa exposición del campo quirúrgico abdominal. Como ya hemos comentado todas las técnicas quirúrgicas se realizan bajo estrictas condiciones de asepsia, utilizando material estéril y en campana de flujo laminar. Previa preparación del campo quirúrgico: rasurado de la piel y administrando solución antiséptica de povidona yodada (Betadine, Asta medica) se desarrollan los siguientes procedimientos quirúrgicos según el ensayo correspondiente:

2.1.2.1.- Procedimiento de isquemia y reperfusión

Vía laparotomía media, eviscerando parte del contenido abdominal, se abordó el espacio retroperitoneal, realizándose la disección e identificación del pedículo vascular del riñón izquierdo. Utilizando una micropinzas vascular y preservando el sistema pielocalicial, procedimos a la oclusión del pedículo renal izquierdo (arteria y vena), produciendo de este modo una isquemia renal izquierda completa durante 60 minutos. Se mantiene al animal cubierto con gasas humedecidas en solución salina caliente (37°C), recubiertas con un film plástico para evitar la deshidratación y a una temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar de 28°C.

En los tiempos planteados en los diferentes modelos experimentales se administraron las distintas sustancias ensayadas.

Cinco minutos antes de concluir el tiempo de isquemia, previa disección renal derecha procedimos a la ligadura en bloque del pedículo renal derecho con seda 4/0 y practicamos nefrectomía derecha. A continuación y, según el grupo experimental, se procedió a la retirada del pinzamiento vascular para permitir la reperfusión a los tiempos prefijados. Finalmente se obtuvieron las muestras, efectuando la nefrectomía izquierda y extrayendo sangre total por punción aórtica.

2.1.2.2.- Procedimiento de preservación renal

Bajo condiciones de asepsia, se realiza laparotomía media y disección del retroperitoneo para exponer la aorta abdominal y las arterias renales hasta la bifurcación aórtica (iliacas). Disección de los vasos renales ligando la rama suprarrenal inferior y gonadal. El uréter es disecado

en su mitad proximal, respetando la grasa periureteral. Para la perfusión del órgano se procede al pinzamiento de la aorta por debajo de la salida de la arteria renal izquierda, manteniendo así su vascularización. La cateterización aórtica se efectúa mediante aortotomía transversal en su cara anterior, previa ligadura distal al nivel de su bifurcación. A continuación ligamos la aorta por encima de la arteria renal izquierda, a la vez que retiramos la pinza e iniciamos la perfusión con solución de UW a 4°C y 1mg/Kg de heparina sódica (añadiendo o no la CT-1 a la dosis indicada dependiendo del grupo experimental), se lava el riñón con un volumen de 5-6ml a una velocidad máxima de 20ml/h para no superar los 100mm Hg de presión intra-renal (a pesar de esto nosotros hemos comprobado como hasta los 4ml/min no hay problemas aparentes), drenando a través de la vena renal que se secciona en su unión con la cava. Una vez perfundido el riñón, se secciona el uréter en el trayecto disecado y la arteria renal. El órgano extraído es sumergido en un recipiente rodeado de hielo con 15 ml de solución UW a 4°C (añadiendo o no la CT-1 dependiendo del grupo experimental).

2.1.2.3.- Procedimiento de trasplante renal

Extracción renal en el trasplante de riñón

Preparación donante: Se realiza laparatomía media y se expone el riñón izquierdo. Se disecan los vasos abdominales y se dejan ligaduras preparadas para ser anudadas siguiendo el orden: aorta supra-renal (ligadura 4-0), vena renal en su unión a la cava (ligadura 6-0), aorta infra-renal (ligadura 4-0 para fijar la cánula), aorta+cava infra-renal en bloque (ligadura 3-0).

Heparina: 1000UI administradas iv vena dorsal del pene.

Disección uréter: Mientras esperamos que la heparina se distribuya sistémicamente, se disecciona el uréter con cuidado de no tocarlo directamente sino trabajando con la grasa que lo envuelve. Se secciona cerca de la vejiga. Se separa el riñón del tejido graso peri-renal.

Canulación y lavado: Se ligan en bloque aorta y cava infra-renales. Se pone una pinza vascular en la aorta infra-renal para poder canularla sin interrumpir el flujo sanguíneo renal. Se canula y se fija la cánula con la ligadura de la aorta infra-renal. Se retira la pinza vascular. Se abre el paso de la solución de preservación (UW, 4°C con o sin CT-1 dependiendo del grupo experimental) e inmediatamente se interrumpe el flujo sanguíneo anudando la ligadura de la aorta supra-renal. Se lava el riñón con un volumen de 5-6ml a una velocidad máxima de 20ml/h para no superar los

100mm Hg de presión intra-renal (a pesar de esto nosotros hemos comprobado como hasta los 4ml/min no hay problemas aparentes).

Nefrectomía: Mientras se lava el riñón se liga la vena renal cerca de la unión a la cava y se secciona recta tan cerca de la cava como sea posible, para disponer de la máxima longitud de vena renal en el injerto. Una vez lavado el riñón, la arteria renal se secciona con un parche aórtico. El riñón se preserva en 15 ml de solución de preservación UW (con o sin CT-1 dependiendo del grupo experimental) a 4°C durante 24h.

Preparación del receptor y trasplante

Preparación del receptor: Se realiza laparatomía media y se expone el riñón izquierdo. Se disecciona el uréter con cuidado de no tocarlo directamente, trabajando con la grasa peri-ureteral. Se secciona cerca del hilio renal y se reserva. Se realiza nefrectomía del riñón izquierdo. Se disecan los vasos abdominales y se ponen las pinzas vasculares siguiendo el orden: cava caudal, cava craneal, aorta craneal, aorta caudal. Si quedaran vasos subsidiarios entre las pinzas, ligarlos con sutura 6-0.

Anastomosis vasculares: arteria y vena: Las suturas de la arteria tienen que ser fuertes, tensas y las juntas, tanto si la sutura es continua o discontinua. Empleamos anastomosis arterial término-lateral con parche aórtico y sutura continua con monofilamento no reabsorbible de 9/0 con aguja curva no espatulada. Durante la extracción renal, nos habremos fijado en la forma y tamaño del parche aórtico de manera que al cortar la aorta abdominal hagamos una sección similar en forma y tamaño al del parche del donante. Se encara el parche con la aorta respetando la posición natural de la arteria renal para que no quede contorsionada.

Las suturas de la vena han de ser flojas, laxas y separadas, tanto si la sutura es continua como discontinua. Utilizamos anastomosis venosa término-lateral sin match y con sutura continua con monofilamento no reabsorbible de 9/0 con aguja curva no espatulada. Se encara la vena renal con la cava respetando la posición natural de la renal para que no quede contorsionada. Los pasos a seguir para la anastomosis de la vena son los mismos que para la arteria.

Una vez realizadas las anastomosis vasculares, se retiran las pinzas vasculares siguiendo el flujo natural de la sangre dentro del riñón: aorta craneal, vena craneal, vena caudal, aorta caudal. Comprobamos que las anastomosis no sangran, en caso necesario se añade algún punto extra.

Anastomosis ureteral: La anastomosis ureteral termino-terminal es facilitada por la introducción del *cuff* intraureteral en el uréter receptor para conseguir un uréter funcional y de longitud normal. Con ligadura 6/0 sobre el *cuff* quedan fijados ambos uréteres. El riñón implantado se inmoviliza en el espacio retroperitoneal mediante unos puntos de fijación hasta la grasa perirrenal que habíamos conservado.

Lo más importante al trabajar con el uréter es evitar dañarlo, por eso es necesario trabajar con la grasa que lo envuelve. Es importante que los diámetros de los dos uréteres sean similares. Si hace falta, se secciona el uréter del receptor en diagonal para aumentar su diámetro. También hay que tener cuidado de no contorsionarlos para no impedir el flujo de orina. Se ha de observar que el uréter tiene peristaltismo una vez anastomosado y que no hay fístula que provoque pérdida de orina.

Nefrectomía riñón derecho: Al acabar las anastomosis y comprobar que el injerto se reperfunde correctamente y el uréter tiene peristaltismo, se procede a nefrectomizar el riñón derecho con cuidado de dejar el uréter derecho bien ligado.

2.2- Modelos experimentales

Hemos empleado un total de 449 animales que se han distribuido como sigue:

2.2.1.- Control de dosis

Utilizamos 20 ratas Wistar machos de un peso comprendido entre 225 y 250 g. distribuidas en los siguientes grupos:

- **Simulado:** Después de anestesiado el animal de experimentación se extraen muestras de sangre y renales. (N=5)
- **CT1 200:** Después de anestesiado el animal de experimentación administramos 200 µg/kg de CT-1 iv, a través de la vena dorsal del pene, a las 24 horas se vuelve a anestesiarse al animal y se extraen muestras sanguíneas y renales (N=5).

- **CT1 400:** Después de anestesiado el animal de experimentación administramos 400 µg/kg de CT-1 iv, a través de la vena dorsal del pene, a las 24 horas se vuelve a anestesiarse al animal y se extraen muestras sanguíneas y renales (N=5).
- **CT1 800:** Después de anestesiado el animal de experimentación administramos 800 µg/kg de CT-1 iv, a través de la vena dorsal del pene, a las 24 horas se vuelve a anestesiarse al animal y se extraen muestras sanguíneas y renales (N=5).

Una vez obtenido el riñón se divide sagitalmente en 4 partes iguales, procurando que todas tengan la misma parte de corteza que de médula y se introducen instantáneamente en nitrógeno líquido, conservándolos en tubos de criocongelación a -80°C.

Las muestras sanguíneas, obtenidas por punción aórtica, fueron inmediatamente centrifugadas durante 20 minutos a 4500 rpm y 4°C, extraído el suero y dividido en alícuotas fueron congeladas a -80°C en tubos de criocongelación.

En estos animales se lleva a cabo el estudio del radical libre anión superóxido para evaluar cual de las dosis empleadas es más adecuada para nuestro estudio.

2.2.2.- Estudios de I/R:

Para evaluar el efecto de la CT-1 sobre la respuesta inflamatoria inducida por el fenómeno de I/R renal, realizamos el siguiente experimento utilizando 110 ratas Wistar machos (225-250 g) distribuidas en los siguientes grupos:

- **Simulado:** Después de anestesiado el animal de experimentación se extraen muestras de sangre y renales de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).
- **I/R Control 4h:** Una vez realizada la isquemia renal izquierda se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico izquierdo; a las 4 horas de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).
- **I/R Control 24h:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina a través de la vena

dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a las 24 horas de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).

- **I/R Control 48h:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a las 48 horas de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).
- **I/R Control 14d:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a los 14 días de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 10 animales (de los supervivientes). Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 10 animales (N=20).
- **I/R CT-1 4h:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina con 400 µg/kg de CT-1 a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a las 4 horas de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).
- **I/R CT-1 24h:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina con 400 µg/kg de CT-1 a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a las 24 horas de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).
- **I/R CT-1 48h:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina con 400 µg/kg de CT-1 a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a las 48 horas de reperfusión se

tomarán muestras de sangre y riñón de 5 animales. Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 5 animales (N=10).

- **I/R CT-1 14d:** Una vez realizada la isquemia renal se mantiene durante 1 hora, administrando iv, a los 30 minutos de su inicio, 1 ml de solución salina con 400 µg/kg de CT-1 a través de la vena dorsal del pene. Al finalizar la hora de isquemia se realiza la nefrectomía derecha y se reperfunde el riñón isquémico; a los 14 días de reperfusión se tomarán muestras de sangre y riñón de 10 animales (de los supervivientes). Para el estudio de supervivencia y de función renal emplearemos otro 10 animales (N=20).

Una vez obtenido el riñón se divide sagitalmente en 4 partes iguales, procurando que todas tengan la misma parte de corteza que de médula y se introducen instantáneamente en nitrógeno líquido, conservándolos en tubos de criocongelación a -80°C.

Las muestras sanguíneas, obtenidas por punción aórtica, después de su extracción fueron centrifugadas inmediatamente durante 20 minutos a 4500 rpm y 4°C, extraído el suero y dividido en alícuotas fueron congeladas a -80°C en tubos de criocongelación.

Estudiaremos las siguientes variables: supervivencia, función renal (creatinina y su aclaramiento), el daño histológico con MO (H-E), inmunohistoquímica (iNOS, eNOS, CT-1 marcada con histidina, caspasa-3), estrés oxidativo (radical libre anión superóxido), infiltración neutrofílica (mieloperoxidasa), citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , INF- γ) y antiinflamatorias (IL-6 e IL-10), óxido nítrico (iNOS), moléculas de adhesión celular (P-selectina, ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1), vías de señalización (pSTAT-3, pERK y pAkt), la CT-1 total y la CT-1 marcada con cola de histidina, la glicoproteína gp130, el supresor de señalización de citocinas (SOCS-3), marcador de apoptosis (caspasa-3 activada) y regulación transcripcional (p65, P-p65 e I κ B- α).

2.2.3.- Ensayo de preservación renal:

Para evaluar el efecto de la CT-1 sobre la preservación renal realizamos el siguiente experimento utilizando 50 riñones extraídos de 25 ratas Fischer machos (225-250 g) distribuidas en los siguientes grupos:

- **Control 30m:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 30 min (N=5).

- **Control 6h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 6 horas (N=5).
- **Control 12h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 12 horas (N=5).
- **Control 24h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 24 horas (N=5).
- **Control 48h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 48 horas (N=5).
- **CT-1 30m:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 30 min, tanto en la solución de perfusión como en la de preservación hemos añadido 0,2µg/ml de CT-1 (N=5).
- **CT-1 6h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 6 horas, tanto en la solución de perfusión como en la de preservación hemos añadido 0,2µg/ml de CT-1 (N=5).
- **CT-1 12h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 12 horas, tanto en la solución de perfusión como en la de preservación hemos añadido 0,2µg/ml de CT-1 (N=5).
- **CT-1 24h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 24 horas, tanto en la solución de perfusión como en la de preservación hemos añadido 0,2µg/ml de CT-1 (N=5).
- **CT-1 48h:** Una vez perfundido y extraído el riñón es preservado en 15 ml de solución UW a 4°C durante 48 horas, tanto en la solución de perfusión como en la de preservación hemos añadido 0,2µg/ml de CT-1 (N=5).

Una vez obtenido el riñón se divide sagitalmente en 2 partes iguales introduciendo una de ellas instantáneamente en nitrógeno líquido, conservándose en tubos de criocongelación a -80°C y la otra mitad la sumergimos en formaldehído tamponado.

También se alicuotaron muestras de la solución de preservación que fueron congeladas a -80°C en tubos de criocongelación hasta su estudio.

Estudiaremos las siguientes variables: el daño histológico con MO (H-E), estrés oxidativo (radical libre anión superóxido), la citocina proinflamatoria (TNF-α), óxido nítrico (iNOS), la molécula de adhesión VCAM-1 y los factores de transcripción nuclear (p-65 y P-p65).

2.2.4.- Ensayo de trasplante renal:

Evaluamos la eficacia de la CT-1 en un modelo experimental de trasplante renal homólogo y ortotópico utilizando 264 ratas Fischer machos (225-250g) distribuidas en los grupos:

- **Tx Control 24h:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 24 horas de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. (N=20, N=10 trasplantes).
- **Tx Control 3d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 3 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. (N=20, N=10 trasplantes).
- **Tx Control 7d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 7 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. (N=30, N=15 trasplantes).
- **Tx Control 14d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 14 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. (N=38, N=19 trasplantes).
- **Tx Control 30d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 30 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. (N=52, N=26 trasplantes).
- **Tx CT-1 24h:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 24 horas de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. Se administró 0,2µg/ml de CT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=20, N=10 trasplantes)
- **Tx CT-1 3d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 3 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. Se administró 0,2µg/ml de CT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=20, N=10 trasplantes)
- **Tx CT-1 7d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 7 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. Se administró 0,2µg/ml de CT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=20, N=10 trasplantes)

- **Tx CT-1 14d:** Una vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 14 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. Se administró 0,2µg/ml de CT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=20, N=10 trasplantes)
- **Tx CT-1 30d:** Un a vez realizado el trasplante, según se describe anteriormente, se mantiene 30 días de reperfusión al final de la cual se tomarán muestras de sangre y riñón. Se administró 0,2µg/ml de CT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=24, N=12 trasplantes)

Una vez obtenido el riñón se divide sagitalmente en 4 partes iguales, procurando que todas tengan la misma parte de corteza que de médula, y se introducen instantáneamente en nitrógeno líquido, conservándose en tubos de criocongelación a -80°C.

Las muestras sanguíneas, obtenidas por punción aórtica, inmediatamente después de su extracción fueron centrifugadas durante 20 minutos a 4500 rpm y a 4°C, extraído el suero y dividido en alícuotas fueron congeladas a -80°C en tubos de criocongelación.

Estudiaremos las siguientes variables: Supervivencia, función renal (creatinina y su aclaramiento), estrés oxidativo (radical libre anión superóxido), citocina proinflamatoria (TNF-α), antiinflamatoria (IL-6), moléculas de adhesión celular solubles (sICAM-1 y sVCAM-1) y el factor de transcripción nuclear IκB-α.

2.3.- Técnicas empleadas para el estudio de las variables

1. Supervivencia.
2. Pruebas de Función Renal:
 - a. Creatinina
 - b. Aclaramiento de la creatinina
3. Estudio histológico.
 - a. Tinción con hematoxilina-eosina
 - b. Técnica de Inmunohistoquímica: iNOS/NOS2, eNOS/NOS3, CT-1 marcada con cola de histidina, Caspasa-3.

4. Radical libre: Anión superóxido.
5. Infiltración Neutrófilica: Mieloperoxidasa.
6. Técnica de Elisa para el estudio de:
 - a. Citocinas Proinflamatorias: Factor de necrosis tumoral- α , Interleucina-1 β , e Interferón- γ .
 - b. Citocinas Antiinflamatorias: Interleucina-6 e Interleucina-10.
7. Técnica de Western blot para el estudio de:
 - a. CT-1 total y CT-1 marcada con cola de histidina.
 - b. Supresor de señalización de citocinas SOCS-3.
 - c. Glicoproteína gp130.
 - d. Vías de señalización pSTAT-3, pERK y pAkt.
 - e. Moléculas de adhesión celular: ICAM-1, sICAM-1, PECAM-1, VCAM-1, sVCAM-1 y P-selectina.
 - f. iNOS.
 - g. Factor de transcripción κ B (p65, p-p65, I κ B- α)
8. Técnica de RT-PCR para el estudio de:
 - a. CT-1 total, SOCS-3, gp130.

Supervivencia:

Los animales por grupo detallados en el modelo de I/R y todos los del modelo de trasplante renal, fueron estabulados en jaulas metabólicas siendo observados diariamente hasta el día 30 de evolución para evaluar la mortalidad.

Pruebas de función renal:

Se determinaron como marcadores de la función renal la creatinina y su aclaramiento las cuales fueron procesadas en un analizador automático Hitachi 747-200 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) obteniendo las muestras de los animales estabulados en las jaulas metabólicas descritos anteriormente.

Estudio histológico:

Los animales cuyos riñones están destinados para estudios histológicos se perfunden *in vivo*. Una vez extraídos los riñones, se descapsulan y se cortan sagitalmente en dos partes iguales

para introducirlos a continuación en formaldehído 3,7-4% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol. Una vez fijados tras permanecer en esta solución durante 24 horas, los riñones se deshidratan con una batería de alcoholes de gradación creciente, comenzando con etanol al 60%, y continuando con diluciones del 70%, 80%, 90%, 96% hasta alcanzar el 100 %. Para el aclaramiento del tejido usamos xileno (miscible en alcohol y parafina líquida).

Cada muestra se incluye en parafina fundida a 60° en una estufa durante 1 hora y se deja solidificar a temperatura ambiente obteniendo un bloque. Se realizan secciones de 3µm de grosor con un microtomo y cuchillas de acero, que seguidamente se depositan los cortes sobre un portaobjetos de vidrio.

Los cortes se desparafinan con xileno y la muestra se rehidrata haciéndola pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución 100% de agua destilada.

Tinción con hematoxilina-eosina

Esta técnica pone de manifiesto la estructura morfológica de las células del tejido, tiñendo de azul el núcleo, las zonas ácidas del citoplasma, y la matriz, y de color rosa el citoplasma y todos sus componentes básicos.

Los cortes histológicos renales, preparados como se acaba de indicar, se mantienen cuatro minutos en una solución de hematoxilina y seguidamente se lavan con agua corriente para mantenerlos durante tres minutos en una solución de eosina. Una vez teñidas, las muestras se deshidratan de nuevo mediante alcoholes de concentración creciente (70°, 90° y 100°) para fijarlas de modo permanente con una gota de Bálsamo de Canadá sobre la que se coloca con un cubreobjetos empleando un medio de montaje (*Tissue-Tek*).

Las imágenes se capturan con una vídeo-cámara de alta resolución conectada al microscopio óptico que lleva un objetivo 20X. Se emplea un filtro óptico verde para aumentar el contraste.

Se evaluó el daño renal en todos los grupos del estudio de preservación y en los de I/R de 24 y 48 horas a través de microscopía óptica (H-E).

Técnica de inmunohistoquímica

Fundamento

Esta técnica se basa en la localización específica de proteínas en muestras de tejidos. Consiste en la conjugación de un anticuerpo primario con la proteína que se quiere identificar y su posterior detección mediante anticuerpos secundarios ligados a moléculas sustrato que permitan la visualización microscópica tras la adición de un cromógeno.

Preparación de las muestras

Los cortes histológicos renales una vez rehidratados están preparados para los estudios de microscopía óptica. Inicialmente se aplica un tratamiento recuperador de antígeno, manteniéndose durante 4 minutos en olla a presión y dejando reposar las muestras durante 20 minutos. A continuación se lavan con agua corriente durante tres minutos.

Con el fin de bloquear la posible señal peroxidasa endógena, los cortes renales se mantienen durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno con metanol al 3%.

Tras eliminar la señal endógena de los cortes se realiza un lavado de 5 minutos con PBS. A continuación, se incuban los cortes una hora con suero bloqueante diluido 67 veces, con el fin de que no ocurra un marcaje inespecífico. Se retira el exceso de líquido que queda en las preparaciones y se incuban durante una hora con el anticuerpo primario, en la dilución adecuada para cada molécula.

Anticuerpos

Anticuerpos primarios:

- ✓ Anti-iNOS/NOS2 (N-20 sc-651 rabbit policlonal, 1:50, Santa Cruz Biotechnology)
- ✓ Anti-caspasa-3 (Cleaved Caspase-3 Asp175 #9661, rabbit polyclonal 1:50, Cell Signaling Technology)
- ✓ Anti-histidina (mouse monoclonal 1:100, GE healthcare)

Seguidamente se realiza un lavado de 5 minutos con PBS para incubar a continuación los cortes con un anticuerpo secundario *multilink* durante 30 minutos. Después de lavar con PBS durante 5 minutos, las muestras se incuban con un anticuerpo terciario HPR *multilink* durante 30 minutos y se lavan de nuevo con PBS. Inmediatamente después se añade el cromógeno DAB

durante 10 minutos. La DAB genera un color marrón en el lugar en que está presente el antígeno diana reconocido por el anticuerpo primario. Las preparaciones se lavan con abundante agua corriente y se contrastan ligeramente sumergiéndolas en hematoxilina unos segundos, aclarándolas con agua corriente, para que los núcleos aparezcan teñidos de color azul.

Por último, los cortes se deshidratan mediante alcoholes de concentración creciente, 70º, 80º, 90º y 100º, sobre los que se deposita un cubreobjetos mediante un medio de montaje (*Tissue-Tek*) para que puedan observarse en un microscopio óptico.

Anión superóxido:

Se estudió el radical libre anión superóxido en diferentes momentos dependiendo del modelo experimental.

Procesamiento de las muestras

Una vez tomadas las muestras renales (N=5 por grupo), son introducidas, para su lavado, en el tampón de homogeneizado [fosfato potásico monobásico 0,05M y EDTA 1mM, solución a la que añadimos colato sódico al 0,25% (1+19); pH 7,8], a una temperatura entre 0 y 4º C para minimizar los procesos oxidativos. Posteriormente son pesadas y homogeneizadas con el tampón anteriormente descrito, según la proporción (1/10, Peso/Volumen). El homogeneizado se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos, a una temperatura de 4ºC. La fracción soluble que se obtuvo se dividió en alícuotas y se congeló a -80º C hasta el momento de su estudio.

Técnica de determinación del ritmo de producción del Anión Superóxido

La técnica que es modificación de la descrita por Forman y Boveris⁴⁴⁸ para mitocondrias, se basa en la reducción del citocromo C por el radical O_2^- . Esta reducción del citocromo C no es, naturalmente, específica para el radical superóxido. Esta especificidad es conferida por el uso de superóxido dismutasa (SOD), para lo cual el radical superóxido es el único sustrato conocido. De acuerdo con esto, el ensayo se realiza con y sin SOD, y únicamente la reducción del citocromo C inhibida por SOD se usa para calcular la producción de ASO. Esta reducción del citocromo C se sigue espectrofotométricamente a 550 nm de λ . Precisamos los siguientes reactivos:

- 1.- Tampón fosfato-potásico 0,1 M+0,1 mM EDTA ; pH 7,8.
- 2.- Citocromo C 75 μ M.
- 3.- SOD (aproximadamente 240 U).

La lectura espectrofotométrica se realizó a 550 nm de λ ; pH 7,8 y temperatura de 25° C durante 1 min con intervalos cada 6 seg, en cubetas de 1ml, con un paso de luz de 1cm. Nuestros resultados se expresaron en nmol de $O_2^{\cdot-}$ /mg prot/min. El incremento de unidades de absorbancia en la mezcla de la reacción se convierte en nmol de ASO con el coeficiente de extinción molar:

$$\Delta E_{550}/21,0 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$$

Esta conversión depende del supuesto de que el citocromo C en la cubeta de referencia está totalmente oxidado y, por tanto, de que el incremento de absorbancia observada representa únicamente la absorbancia del producto reducido (Δ absorbancia: reducido-oxidado). Tras el establecimiento de las condiciones óptimas, exponemos a continuación el esquema de desarrollo del experimento. En la cubeta de muestra se añadieron 100 μ l de citocromo C (75 μ M), 20 μ l de SOD (aproximadamente 264 U) y 25 μ l de muestra. La diferencia de volumen hasta 1.000 μ l se completó con tampón fosfato potásico + EDTA. En la cubeta de referencia se sustituyó el volumen de tejido por uno equivalente de tampón. Se registró la lectura a 550 nm de λ en 2 fases:

1º.- Reducción del citocromo C inespecífica: sin SOD.

2º.- Reducción del citocromo C independiente del superóxido: con SOD.

La pendiente máxima se registró en el primer minuto. La temperatura fue de 25° C y pH de 7,8.

Infiltración Neutrófila. Mieloperoxidasa:

Se estudió la actividad de la mieloperoxidasa en diferentes momentos dependiendo del modelo experimental.

La presencia de mieloperoxidasa, una enzima específica de los neutrófilos utilizada como índice para valorar la infiltración neutrófila en el riñón, fue analizada en las muestras renales (N=5 por grupo) mediante el método de Bradley⁴⁴⁹ modificado por Mullane⁴⁵⁰. Una vez obtenidas las muestras son pesadas entre hielo y congeladas en nitrógeno líquido siendo posteriormente almacenadas a -80° C hasta su determinación. Posteriormente las muestras son homogeneizadas en una solución compuesta por un tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,5% de hexadecyltrimethylammonium bromide y 0,146% de EDTA a un pH de 6,0 y en la proporción de un gramo de tejido por 10 ml de solución de homogeneizado. A continuación son homogeneizadas y sometidas a un proceso de sonicación entre hielo 10 veces y cinco segundos cada vez, para de esta forma romper las células, entre ellas los neutrófilos y dejar la mieloperoxidasa libre en la

solución. Este homogeneizado es centrifugado durante 30 minutos a 15.000 g manteniendo la temperatura en el interior de la centrífuga entre 3 y 4º C. El sobrenadante fue decantado e incubado durante 2 horas a 50º C para eliminar otro tipo de peroxidasas y otros compuestos que interfiriesen en la determinación de la mieloperoxidasa. Se prepara el tampón para el ensayo compuesto por tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,167 mg/ml de O-dianisodine dihydrochloride y 0,005% de peróxido de hidrógeno a un pH de 6,0. Contra un blanco con el tampón de ensayo se realizó la curva estándar con cantidades conocidas de MPO a 460 nm de longitud de onda (λ) y a 25º C. Se define la unidad (U) de actividad de la mieloperoxidasa a la cantidad de enzima que degrada 1 μ mol de H₂O₂ / minuto a 25º C.

Técnica de Elisa:

Obtención de las muestras

Utilizamos muestras sanguíneas (N=5 por grupo) no hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción, fueron centrifugadas extraído el suero, dividido en alícuotas y congeladas a -80ºC.

Principios del ensayo

Es un kit ELISA que emplea múltiples anticuerpos con el principio de “sándwich”. En primer lugar se utilizó un plato con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-citocina (TNF- α , IL-1 β , INF- γ , IL-6 e IL-10) adherido en cada uno de ellos para capturar el presente en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos junto con los blancos correspondientes. Después de lavar el plato para eliminar el material no adherido se añadió una peroxidasa conjugada policlonal anti-citocina. A continuación el plato fue lavado de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato que inició la catalización de la peroxidasa. El cambio de color se detuvo por acidificación.

Preparación de la placa y procedimiento del ensayo

Diluimos el Capture Antibody en PBS en la concentración necesaria para trabajar. Inmediatamente cubrimos una placa de 96 pocillos con 100 μ l por pocillo de Capture Antibody diluido. Tapamos la placa e incubamos toda la noche a Tª ambiente. Aspiramos cada pocillo y lavamos con Wash Buffer, repitiendo el proceso 2 veces con un total de tres lavados. Lavamos bien el pocillo con 400 μ l de Wash Buffer con un dispensador múltiple. Eliminar bien el líquido en cada paso es esencial para un buen resultado. Después del último lavado eliminamos bien los

restos de Wash Buffer, mediante aspiración o volcando la placa en papel secante. Añadimos 300 μ l de Reagent Diluent a cada pocillo. Incubamos a Tª ambiente durante un mínimo de una hora. Repetimos el paso aspiración/lavado como en el paso 2, y las placas están listas para añadir la muestra. Añadimos 100 μ l de muestra o Standards en Reagent Diluent o en un diluyente apropiado por pocillo. Cubrimos con una tira adhesiva e incubamos 2 horas a Tª ambiente. Repetimos la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μ l de la Detection Antibody, diluido en Reagent Diluent, por pocillo. Cubrimos con una nueva tira adhesiva e incubamos 2 horas a Tª ambiente. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μ l de la dilución para trabajar de Streptavidin-HRP a cada pocillo. Cubrir la placa e incubamos durante 20 minutos a Tª ambiente. Proteger la placa de la luz directa. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μ l de Substrate Solution a cada pocillo. Incubamos durante 20 minutos a Tª ambiente. Proteger la placa de la luz directa. Añadir 50 μ l de Stop Solution a cada pocillo, suavemente mover la placa con mucho cuidado para que se mezcle bien. Determinar la densidad óptica. La absorbancia fue medida a 450 nm λ siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de citocina de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α): kit comercial DuoSet ELISA Development System rat TNF- α /TNFSF1A, R&D SYSTEMS.

Interleucina-1 β (IL-1 β): kit comercial DuoSet ELISA Development System rat IL-1 β /IL-1F2, R&D SYSTEMS.

Interferón- γ (INF- γ): kit comercial DuoSet ELISA Development System rat INF- γ , R&D SYSTEMS.

Interleucina-6 (IL-6): kit comercial DuoSet ELISA Development System rat IL-6, R&D SYSTEMS.

Interleucina-10 (IL-10): kit comercial DuoSet ELISA Development System rat IL-10, R&D SYSTEMS.

Técnica de estudio de la expresión de proteínas por Western blot

Se evaluaron las variables descritas en diferentes momentos dependiendo del modelo experimental.

Extracción de proteínas de tejido renal para *western blot*:

De los riñones recogidos aproximadamente 1/4 del riñón se congeló instantáneamente introduciéndolo en nitrógeno líquido, conservándolo en tubos de criocongelación a -80°C.

Posteriormente, la muestra congelada se trocea y se toman aproximadamente 100 mg de tejido, a los que se añaden 1000 µL de tampón de lisis, para la homogenización.

Tampón de lisis conteniendo magnesio: MLB (Magnesium-containing Lysis Buffer) 5X (Upstate Biotechnology #20-168)

Preparar el tampón de lisis MLB en hielo: MLB 5x (µL), Agua ultrapura (µL), NaCl 150 mM, glicerol 10%, NaF 25 mM, Na₂VO₄ 1 mM, PMSF 100 mM, leupeptina 10 µg/mL, y aprotinina 10 µg/ml.

Se procedió a la homogenización de las muestras a 4°C, se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y a continuación, el lisado tisular, se centrifugó durante 25 minutos a 12000 g y a 4°C. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización, una alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas.

Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el kit Bio-Rad DC Protein Assay. Esta es una técnica colorimétrica de determinación de proteínas basada en el método de Lowry (1951). El ensayo consta de dos pasos, primero las proteínas reaccionan con cobre en un medio alcalino, solución alcalina de cobre y tartrato, y después las proteínas tratadas con cobre reducen el reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico) dando una reacción coloreada azul con pico máximo de absorbancia a 750 nm.

Para la cuantificación de las proteínas tisulares, las muestras fueron diluidas (1:20) en tampón de lisis y se utilizó un kit de Bio-Rad, basado en el método de Lowry.⁴⁵¹ La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Microtest™ 96, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) utilizando 5 µL tanto para las muestras como para la recta patrón. El ensayo consta de dos pasos, primero las proteínas reaccionan con cobre en un medio alcalino, solución alcalina de cobre y tartrato, y después las proteínas tratadas con cobre reducen el reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico) dando una reacción coloreada azul con pico máximo de absorbancia a 750 nm.

Cada una de las medidas se realizó por triplicado. Se elaboró previamente una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentración conocida de BSA. A continuación se añadieron 25 μL del reactivo A (suplementado con 20 μL del reactivo S por cada mL reactivo A, ya que las muestras contenían detergente: IGEPAL CA-630), posteriormente se añadieron 200 μL del reactivo B. La mezcla se incubó al menos 15 minutos y se midió la absorbancia a 750 nm. La concentración proteica de las muestras se obtiene a partir de los datos de absorbancia por extrapolación en una recta patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de albúmina bovina sérica, en un rango entre 0,2 mg/mL y 1,6 mg/mL. Esta recta patrón se realiza cada vez que mide un grupo de muestras.

Extracción de proteínas del plasma para *western blot*

Del plasma recogido y congelado le eliminamos la albumina en el momento que lo vamos a utilizar, usamos un kit denominado Qproteome Murine Albumin Depletion kit (Qiagen). Diluimos 25 μl del plasma en 75 μl de PBS, a continuación centrifugación breve a 500g de la columna Qproteome Depletion Spin, equilibramos la columna Spin con PBS, posteriormente añadimos la muestra (100 μl) en la columna, mezclamos fuertemente para obtener una suspensión homogénea, incubamos durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Colocamos la columna Spin sobre un eppendorf, centrifugo a 500 g durante 10 segundos y recojemos el líquido que pasa a través de la columna, lavamos la columna Spin dos veces con 100 μl de PBS y recojemos cada fracción de lavado después de haberlo centrifugado a 500 g durante 10 segundos y el líquido recogido contiene la muestra a la que le hemos eliminado la albúmina.

Detección de proteínas por *western blot*.

Fundamento

El método de Western blotting se basa en la separación de proteínas mediante electroforesis en función de su peso molecular, que, una vez separadas, se pueden identificar, localizar y cuantificar por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos.⁴⁵² Los anticuerpos están acoplados a sistemas de detección, que permiten localizar las proteínas y establecer una relación entre la intensidad de la señal del sistema de detección y la cantidad relativa de la proteína en las diferentes muestras. El sistema de detección más utilizado es el quimioluminiscente. En él, el anticuerpo está unido la enzima HRP que, en presencia de un

sustrato apropiado, produce una reacción luminiscente. La luz generada en la membrana se detecta mediante una cámara para capturar la imagen (ImageQuant RT ECL imager, GE Healthcare). La intensidad de la señal queda reflejada como mayor o menor área de impresión, que es proporcional a la cantidad de anticuerpo y, este a su vez, proporcional a la cantidad de proteína. La separación de las proteínas mediante electroforesis se basa en el método de Laemmli.⁴⁵³ Los geles que permiten la separación electroforética de las proteínas se preparan con acrilamida/bisacrilamida al 30% (29,2% acrilamida y 0,8% bisacrilamida).

Electroforesis y transferencia

En primer lugar se prepara el gel separador o *running gel* con un porcentaje entre 6-15% de acrilamida, en función del tamaño de la proteína que se quiera identificar. El gel separador se deja polimerizar durante 20 minutos.

Seguidamente se prepara el gel concentrante o *stacking gel*, que es el que contiene los pocillos para la carga de muestras, con 5% de acrilamida. Dejamos polimerizar 20 minutos. Todos los geles para las distintas proteínas se han preparado con un grosor de 1mm.

Cargamos 150 µg/pocillo de extracto proteico de cada muestra de tejido, o 25 µl de plasma al que hemos eliminado la albúmina, mezclándolo con el mismo volumen de tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de SDS y 0,01% de azul de bromofenol) 2X y el agente reductor 2-mercaptoetanol, previamente desnaturalizado a 100 °C durante 5 minutos.

En estas condiciones (desnaturalización y reducción), se deshicieron las interacciones entre proteínas con objeto de que cada una migrara aproximadamente a la altura del marcador de peso molecular que le correspondía por tamaño, y su identificación pudiera beneficiarse de este criterio. Una vez polimerizados, los geles se colocan en la cubeta de electroforesis que contiene el tampón de electroforesis. En los correspondientes pocillos se cargan las muestras y 10µL de marcador colorimétrico de pesos moleculares. (Low / Broad range, Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

La electroforesis se lleva a cabo mediante una fuente de alimentación, con un voltaje constante de 120V durante 120 minutos aproximadamente, tiempo suficiente para separar las proteínas, con tampón de electroforesis.

Las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. El gel está orientado hacia el polo negativo, mientras que la membrana se sitúa en el positivo. La corriente generada entre los dos electrodos hace que las proteínas se muevan hacia el polo positivo. La transferencia se realizó en un Trans-Blot Semi-Dry transfer cell BIO-RAD con solución de transferencia (glicina 190 mM, Tris 20mM pH 8.3), durante 30 minutos, manteniendo el voltaje de 25 V, que proviene de la fuente de alimentación, habiendo embebido previamente el material y equilibrado el gel y la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL Amersham Biosciences) en el tampón de transferencia durante 15 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado TTBS e inmediatamente se incubó con 10 mL de tampón de bloqueo en agitación constante, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección.

La incubación con el anticuerpo primario, a la dilución y temperatura adecuada en el tampón correspondiente en agitación constante, se realizó durante tiempos diferentes dependiendo de cada proteína. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 4 lavados de 5 minutos con tampón de lavado, y posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario, a la dilución adecuada, durante los tiempos que especificaremos con cada proteína. Al terminar se hicieron otros 4 lavados de 5 minutos con tampón de lavado.

La detección de las bandas específicas de las distintas proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia. Para el revelado se utiliza una solución comercial (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare), en una proporción de 40:1, el volumen final de reactivo por membrana necesario es de 0.1 ml/cm², se pone en contacto con la membrana durante 5 minutos, en agitación constante a Tª ambiente y a continuación se desechó la solución de revelado. Seguidamente se colocó la membrana en una cámara para capturar la imagen (ImageQuant RT ECL imager, GE Healthcare).

Una vez capturada la imagen es cuantificada la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa (ImageQuant TL software).

Después de cada determinación, se realizó un “*stripping*” con una solución comercial (Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution, Chemicon International, CA, USA), para posteriormente rehibridar con el anticuerpo anti- α -tubulina, que se utilizó como control de carga. (Tabla IX)

Tabla IX.- Metodología del Western blot.

	<u>Carga</u>	<u>Bloqueo</u>	<u>Anticuerpo primario</u>	<u>Anticuerpo secundario</u>
<u>STAT3</u> Cell Signaling #9132 Pm:79,86kDa/Gel:8%	150µg	TTBS, 3%BSA, overnight, 4°C	Rabbit policlonal 1:1000 (TTBS, 3%BSA) 1h+30', agitación constante, RT	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074), 1:2000(TTBS 3%BSA), 1h, agitación constante, RT
<u>pSTAT3(p-Y705)</u> Cell Signaling #9145 Pm:79,86kDa/Gel:8%	150µg	TTBS, 3%BSA, Overnight, 4°C	Rabbit monoclonal 1:1000 (TTBS,3%BSA) 1h+30', agitación constante, RT	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074), 1:2000(TTBS 3%BSA),1h, agitación constante, RT
<u>pNF-κB p65</u> Cell Signaling #3031 Pm:65kDa/Gel:12%	150µg	TTBS, 5%Leche, 1h, RT	Rabbit policlonal 1:1000(TTBS 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>IκB-α</u> Cell Signaling #9242 Pm:39kDa/Gel:15%	150µg	TTBS, 5%Leche, 1h, RT	Rabbit policlonal 1:1000(TTBS 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>NF-κB p65</u> Cell Signaling #3034 Pm:65kDa/Gel:12%	150µg	TTBS, 5%Leche, 1h, RT	Rabbit policlonal 1:1000(TTBS 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>PECAM-1</u> Santa Cruz Biotechnology, INC. sc-46694, Pm: 130KDa/Gel: 8%	150µg	TTBS, 3%BSA, 3-6h, RT	Mouse monoclonal 1:500 (TTBS, 3%BSA) overnight, agitación constante, 4°C	Anti-mouse (Cell Signaling #7076),1:2000 (TTBS, 3%BSA) 30', agitación constante, RT
<u>VCAM-1</u> Santa Cruz Biotechnology, INC. sc-1504), Pm: 90-132Kda/Gel: 10%	150µg	TTBS, 3% BSA, 6h, RT	Goat policlonal 1:1000 (TTBS, 3%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Donkey-anti-goat(SantaCruzBiotechnology, #2020),1:5000(TTBS,3%BSA), 30', agitación constante, RT
<u>ICAM-1</u> Santa Cruz Biotechnology, #1511 Pm: 85-110KDa/Gel: 10%	150µg	TTBS 3%BSA, 3h, RT	Goat policlonal 1:500 (TTBS, 3%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Donkey-anti-goat(SantaCruzBiotechnology #2020),1:5000(TTBS,3%BSA),30' agitación constante, RT
<u>P-selectina</u> Santa Cruz Biotechnology, #6941, Pm: 140Kda/Gel: 8%	150µg	TTBS, 5%BSA, 2h, RT	Goat policlonal, 1:200 (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Donkey-anti-goat(SantaCruzBiotechnology #2020),1:2000(TTBS,5%BSA),30', agitación constante, RT
<u>iNOS/NOS II</u> Cell Signaling #2977 Pm:130kDa/Gel:8%	150µg	TTBS, 5%Leche, 2h, RT	Rabbit policlonal, 1:1000 (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante,RT
<u>Caspasa-3</u> Cell Signaling #9665 Pm: 17,19Kda/Gel: 8%	150µg	TTBS, 5%Leche, 2h RT	Rabbit monoclonal, 1:1000 (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>Cardiotrophin-1</u> R&D systems #MAB438 Pm: 24Kda/Gel: 15%	150µg	TTBS, 5%Leche, 2h RT	Rat monoclonal, 2µg/mL (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rat (Cell Signaling #7077),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>Anti-His</u> GE Healthcare #27-4710- 01 Pm:26kDa/Gel:15%	150µg	TTBS, 10%Leche, 1- 16h, RT	Mouse monoclonal, 1:3000 (TTBS, 10%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-mouse 1:10000 (TTBS 5%Leche) 1h agitación constante, RT
<u>GP130</u> Cell Signaling #3732 Pm: 130Kda/Gel: 8%	150µg	TTBS, 5%Leche, 2h RT	Rabbit policlonal, 1:1000 (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>SOCS3</u> Cell Signaling #2923 Pm: 26Kda/Gel: 15%	150µg	TTBS, 5%Leche, 2h RT	Rabbit policlonal, 1:1000 (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT
<u>α-tubulin</u> Cell Signaling #2144 Pm: 52Kda/Gel: 8%	150µg	TTBS, 5%Leche, 2h RT	Rabbit policlonal, 1:1000 (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT

✚ Técnica de estudio de la expresión de genes por RT-PCR.

Fundamento.

La RT-PCR es una técnica semicuantitativa que permite determinar la expresión de genes determinados mediante transcripción inversa (RT, acrónimo del término inglés *reverse transcription*) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) celular al ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), y posterior amplificación de una determinada región de éste mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos⁴⁵⁴. De esta manera, se consigue obtener rápidamente una cantidad de material biológico observable (ADNc) a partir de cantidades muy pequeñas. La presencia o ausencia, o la mayor o menor cantidad del ARNm de un determinado gen se corresponde con una mayor o menor expresión, que se determina por una mayor o menor cantidad de su ADNc amplificado por la PCR. En este trabajo se utilizó la técnica de la RT-PCR para estudiar la expresión de genes que codifican ciertas proteínas, como la CT-1, gp130 y SOCS-3.

Extracción del ácido ribonucleico (ARN) total.

La extracción del ARN del tejido renal se efectuó utilizando el reactivo comercial TriReagent (Molecular Research Center Inc.), basada en el método desnaturalizante del tiocianato de guanidinio y la extracción con fenol/cloroformo^{455,456}, que combina el tiocianato de guanidinio y el fenol en una solución monofásica para facilitar la inhibición efectiva e inmediata de las ARNasas. Este proceso se realizó en varias fases:

- Lisado del tejido. La muestra de riñón congelada se trocea y se toman aproximadamente 100 mg de tejido, a los que se añaden 1000 µL de TriReagent, para la homogenización. La mezcla se incubó durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.
- Separación. A continuación, se añadieron 200 µL de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g a 4 °C, durante 15 minutos. Se obtuvieron 3 fases: una fase orgánica roja (inferior), una interfase blanquecina y una fase acuosa incolora (superior). El ARN queda en la fase acuosa superior, mientras que las proteínas quedan en la inferior y el ácido desoxirribonucleico (ADN) queda retenido a la interfase.
- Precipitación. Se recogió la fase acuosa y se precipitó el ARN con 500 µL de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente o durante varias horas a -20°C o a -80°C. Se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 10 minutos.

- Lavado. Se desechó el sobrenadante, y el ARN precipitado se lavó con 1000 μL de etanol al 70%. Acto seguido se centrifugó todo a 12000 g a 4°C durante 15 minutos.
- Solubilización. Se retiró el etanol, se disolvió el precipitado en 100-150 μL (dependiendo del tamaño del precipitado) de H_2O DEPC (agua con dietil pirocarbonato – un inhibidor de ARNasas-, D-5758, Sigma, al 0.1% v/v), y se incubó a 65° C durante 10 minutos en un baño húmedo con temperatura regulable, para asegurar la completa disolución del ARN.
- Almacenamiento de muestras de ARN. Dada la naturaleza perecedera del ARN, las muestras se congelaron a –80 °C.

Medida de la concentración del ARN.

Se realizó una dilución 1:10 en H_2O DEPC con una fracción (10 μL) de la solución de ARN obtenida para evitar errores derivados de manipular volúmenes muy pequeños. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría utilizando el aparato NANODROP-1000 Spectrophotometer (Technologies, US). Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260nm equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN. Se aseguró la ausencia de elevada contaminación proteica, considerando que la relación adecuada entre las absorbancias a 260nm/280nm y 260nm/230nm estaba comprendida entre 1.6-1.9 y 1,8-2,2 respectivamente.

Retrotranscripción (ARNm \rightarrow ADNc).

En este paso se sintetiza el ADN complementario del ARNm (que es una pequeña parte del ARN total extraído). Esto se consigue mediante un cebador complementario de la cola de poliadenina (poli-A) que contiene el ARNm en el extremo 3' y que está ausente en el resto del ARN celular. Esta secuencia complementaria es la polidesoxitimina (poli-dT).

2 μg de ARN de cada muestra se llevaron a un volumen final de 27,5 μL utilizando agua DEPC y se incubaron a 65°C durante 3 minutos -para que el ARN se desnaturalizara a su estructura primaria- e inmediatamente se pasaron a hielo. Seguidamente se añadió a cada muestra de ARN un volumen de la *premezcla de reacción* de 12,5 μL que contenía: 2 μL de dNTPs (mezcla equimolar de desoxinucleótidostrifosfato –dATP, dCTP, dGTP y dTTP- 10 mM, Applied Biosystems), 8 μL de tampón “M-MLV 5x” (proporcionado por el fabricante, Promega), 1 μL de oligo-dT (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Isogen; oligonucleótido formado por 16 desoxitimas que permite “retrotranscribir” únicamente el ARNm), 0,5 μL del inhibidor de ARNsas “RNAsin” (Promega) y 1 μL de la enzima retrotranscriptasa (RT M-MLV, Promega). Finalmente se llevó a cabo la reacción

de *retrotranscripción* a 42°C durante 90 minutos en un termociclador (MyCycler, BioRad). Una vez obtenido el ADNc correspondiente a cada muestra se almacenó a -20°C.

Determinación de la concentración de ADNc.

Se realizó una dilución 1:10 en H₂O mQ estéril con una fracción (10 µL) de la solución de ADNc obtenida. La concentración de ADNc se determinó por espectrofotometría utilizando el aparato NANODROP-1000 Spectrophotometer (Technologies, US). Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50µg/mL de ADNc. Se aseguró la ausencia de excesiva contaminación proteica o de fenol u otros contaminantes, considerando que la relación adecuada entre las absorbancias a 260 nm/280nm y 260nm/230nm estaba comprendida entre 1.6-1.9 y 1,8-2,2 respectivamente.

PCR (amplificación de secuencias específicas de ADNc).

Igualamos todas las concentraciones de ADNc a la más pequeña de las obtenidas en el paso anterior (7.3.5) en un volumen final de 23µL con agua mQ estéril. A cada muestra de ADNc (10 µL) se añadieron 27µL de la premezcla de reacción formada por los siguientes componentes: 25µL de la enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega) que ya incluye los dNTPS, el tampón de reacción con Mg y la enzima, 1µL de oligonucleótido 3' (cebador directo) y 1µL de oligonucleótido 5' (cebador inverso) (que estaban en un concentración de 100ng/µL) de las secuencias específicas de los genes que se deseaba amplificar (Tabla X).

Las muestras se incubaron en un termociclador (MyCycler, BioRad). Se seleccionó el programa adecuado para cada par de oligonucleótidos añadidos (Figura 54). Todos los programas utilizados tenían en común: (i) una primera fase de desnaturalización del ADNc utilizado como molde (95°C durante 5minutos), única en todo el proceso; (ii) una segunda fase de desnaturalización con la que comienza cada ciclo de amplificación (95°C durante 1minuto); (iii) la fase de hibridación de los oligonucleótidos a una determinada temperatura específica de cada par de oligonucleótidos (T_m, Tabla X), durante 1minuto); (iv) una fase de extensión de la hebra por la Taq polimerasa (a 72 °C durante 1minuto); y (v) una última fase de extensión final que permitía a la enzima sintetizar las hebras inacabadas (72°C durante 5minutos). Las fases de la ii a la iv se repitieron un cierto número de ciclos (Tabla X) específico de cada amplificación, después de completar la fase i y antes de entrar en la fase v. Lo que varió entre unos programas y otros fue la T_m y el número de ciclos que se repetían las fases ii a la iv (Tabla X).

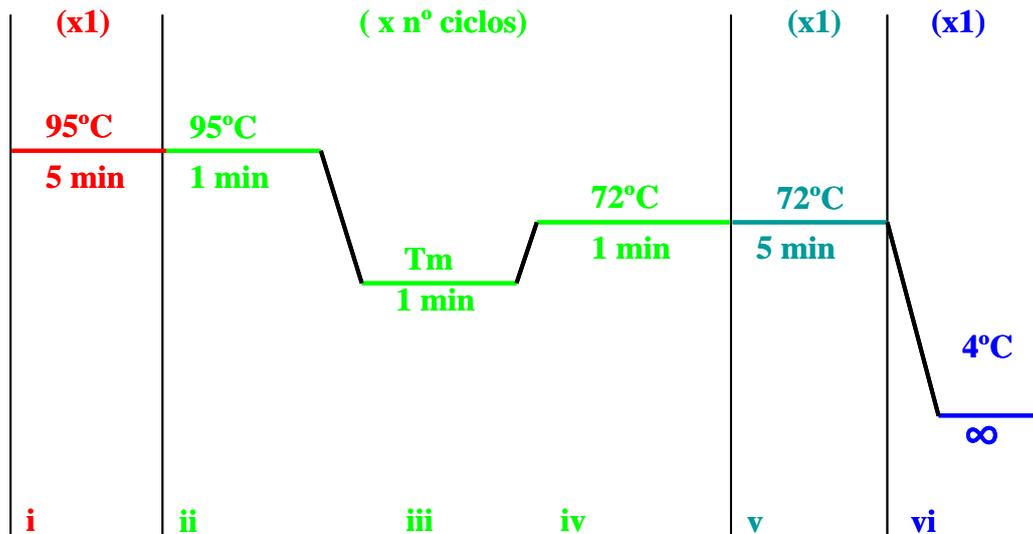


Figura 54.- Esquema de las fases de la amplificación por PCR.

Tabla X.- Oligonucleótidos utilizados. Tm y ciclos de amplificación de cada uno de los genes estudiados. Todos se pidieron a la casa comercial Invitrogen y fueron reconstituídos en TE (Tris pH=8 10 mM, EDTA 1 mM) autoclavado y filtrado a una concentración de 1 µg/µL.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIAS	Tm (°C)	CICLOS
18S ARNr	Directo: 5'-TAG AGC TAA TAC ATG CCG ACG-3'	56	30
	Inverso: 5'-TTA ATC ATG GCC TCA GTT CCG- 3'		
CT-1	Directo: 5'-TCT ATG GCG AGT GGG TGA GC-3'	55	35
	Inverso: 5'-AGC AAG CAA GCA AAG AAA GA-3'		
SOCS-3	Directo: 5'-CCT TTG AGG TTC AGG AGC AG-3'	61,5	35
	Inverso: 5'-GGC TGG ATT TTT GTG CTT GT-3'		
gp130	Directo: 5'-CAT CAA CAG AAC GGC ATC CAG-3'	53	35
	Inverso: 5'-TCA CTT TAT CCA CGG GGT CAA-3'		

Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez realizada la PCR, se cargaron 20 µL de cada muestra obtenida en los pocillos del gel de 2% de agarosa en TBE pH=8,1-8,3 con Syber Safe (0,1 µg/mL de gel de agarosa) como colorante intercalante, que permitió visualizar el ADNc a la luz ultravioleta. En uno de los pocillos, se cargó 1 µL de marcador de pesos moleculares (100bp ladder ADN, Invitrogen). La electroforesis se efectuó aplicando al gel un voltaje constante de 110 V en una cubeta llena de TBE. Para observar las bandas a la luz ultravioleta y para capturar la imagen, se colocaron los geles en un *transiluminador* (ImageQuant RT ECL imager, GE Healthcare).

2.4.- Estudio estadístico

Todos los valores en este trabajo han sido representados como $X \pm DS$ (media \pm desviación estándar).

La inferencia estadística de los resultados presentados (valores numéricos procedentes de muestras aleatorias independientes obtenidas de las poblaciones estudiadas) se realizó con el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) aplicando los siguientes test estadísticos dependiendo del tipo de distribución y de las varianzas:

- ✚ Ante variables Normales con varianzas iguales aplicamos el test de Scheffe
- ✚ Ante variables Normales con varianzas distintas aplicamos transformaciones estabilizadoras de la varianza y posteriormente el test de Scheffe
- ✚ Ante variables de cualquier otra distribución con varianzas iguales o distintas utilizamos métodos no paramétricos: el test Kruskal Wallis

Para la estimación de la función de la supervivencia en las diferentes poblaciones ensayadas

- ✚ Empleamos el método no paramétrico de Kaplan Meier.

Para todos los estudios anteriormente indicados un valor de $p < 0,05$ se aceptó como resultado significativo.

El programa estadístico empleado para la realización de este trabajo fue NCSS 2000 (Dr. Jerry L. Hintze, Utah USA).

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

1.- Fase Control de Dosis para Isquemia/Reperfusión:

1.1.- Anión superóxido:

El estudio del radical libre del oxígeno anión superóxido para evaluar la mejor dosis a emplear en el modelo de I/R demostró una ausencia de eficacia en la disminución de la producción del ASO en el grupo CT200 (pNS) (animales tratados con 200µg/Kg de CT-1), mientras que en los grupos CT400 y CT800 (animales tratados respectivamente con 400µg/Kg y 800µg/Kg de CT-1) se comprobó una disminución significativa ($p < 0,001$) en la disminución de la producción de este radical libre (Figura).

La ausencia de diferencias significativas entre los grupos CT400 y CT800 (pNS) y el no disponer de estudios de toxicidad, nos hizo tomar la decisión de emplear la dosis menor, 400µg/Kg de CT-1, para la realización del modelo de I/R (Figura 55).

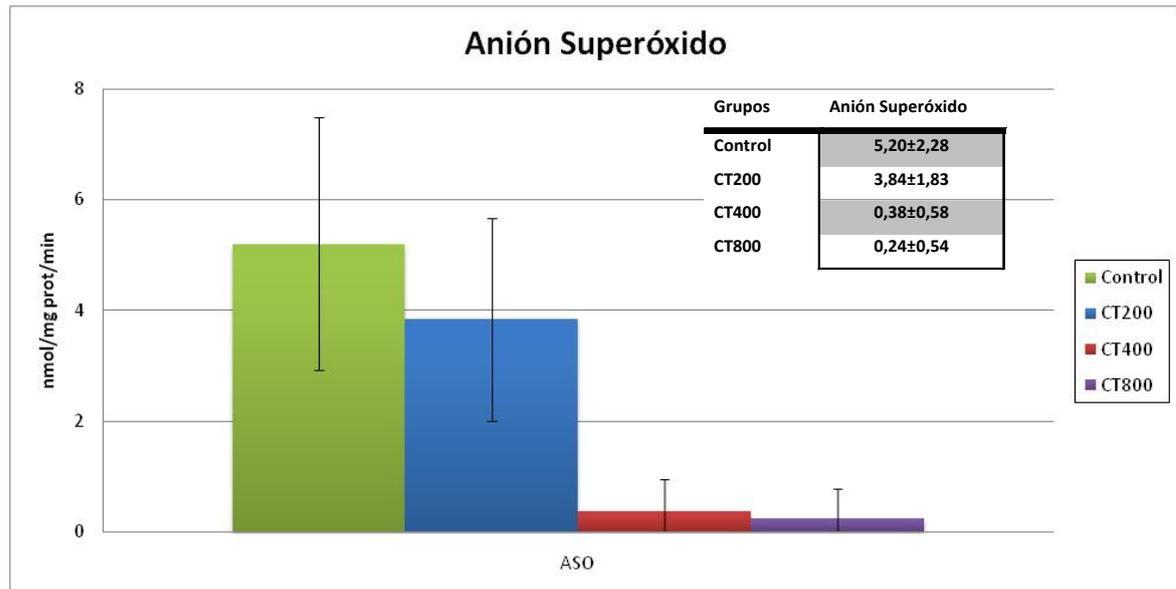


Figura 55 .-Ritmo de producción del Anión Superóxido (nmol/mg prot/min).

2.- Resultados de la fase Isquemia/Reperfusión:

2.1.- Supervivencia

La agresividad del modelo experimental desarrollado queda patente en la mortalidad observada en el Grupo Control (50% a los 5 días de postoperatorio). Al comparar los resultados obtenidos en este grupo con el tratado con CT-1 comprobamos una disminución significativa de la mortalidad en este último grupo (50% vs 20%) ($p < 0,05$).

Por otro lado la valoración de la mortalidad en el grupo Simulado (100% de supervivencia a los 14 días) no tuvo diferencias significativas con el Grupo CT-1 (pNS) presentándolas únicamente con el Grupo Control ($p < 0,01$) (Figura 56).

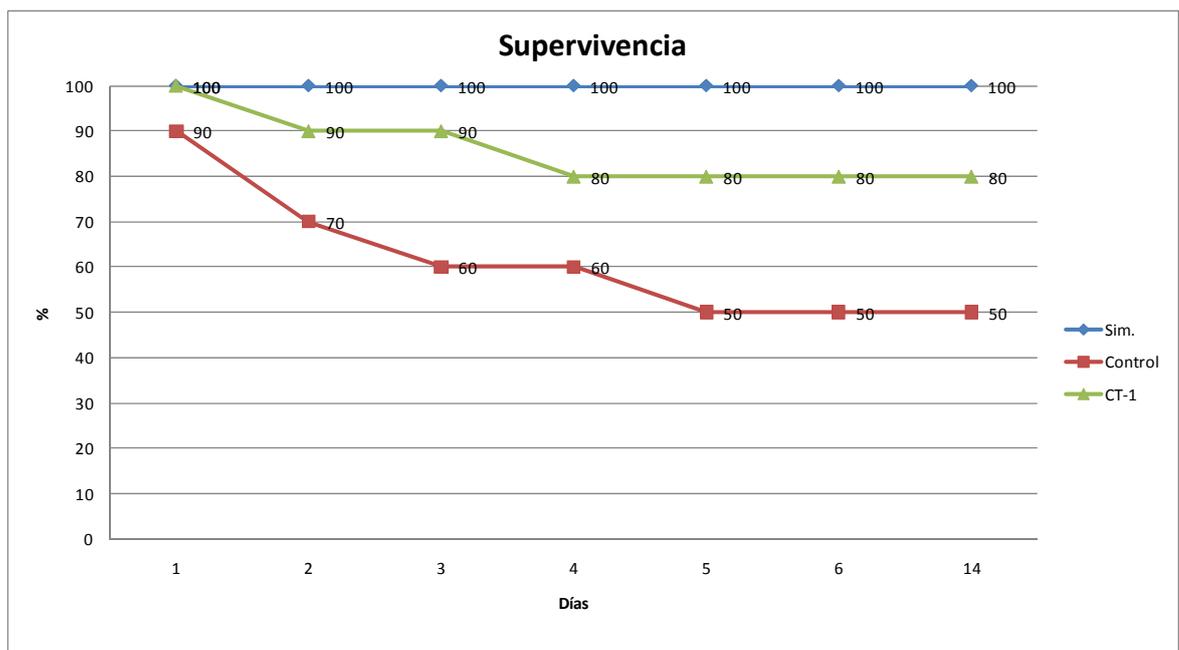


Figura 56.- Supervivencia tras la reperfusión; expresado en % de animales vivos.

2.2.- Estudio histológico

Los estudios histológicos demuestran que, a las 24 horas de la I/R existe una gran cantidad de túbulos con vacuolización citoplásmica (puntas de flecha) que indican una importante daño tubular, y muchos túbulos obstruidos con residuos de restos tubulares (flechas). Estos daños no se ven, o son mucho menores, en los túbulos de los animales tratados con CT-1 (Figuras 57A y 57B)

A las 48 horas de la I/R se observan muchos tubos que han perdido casi completamente su epitelio y que están parcial o totalmente desnudos (asterisco) mientras que este tipo de túbulos son raros en los riñones de los animales tratados con CT1. (Figuras 57C y 57D). También se observa en los riñones de animales con I/R sin tratamiento zonas de abundante infiltración neutrofílica (puntas de flecha Figuras 57A y 57B) que apenas se observan en los animales tratados con CT-1 (Figuras 57C y 57D).

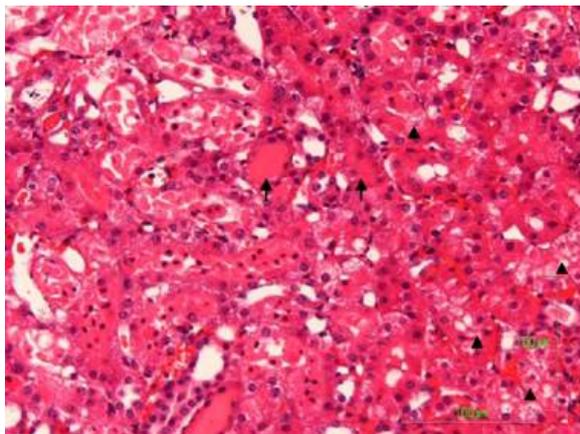


Figura 57A : Grupo Control 24h.

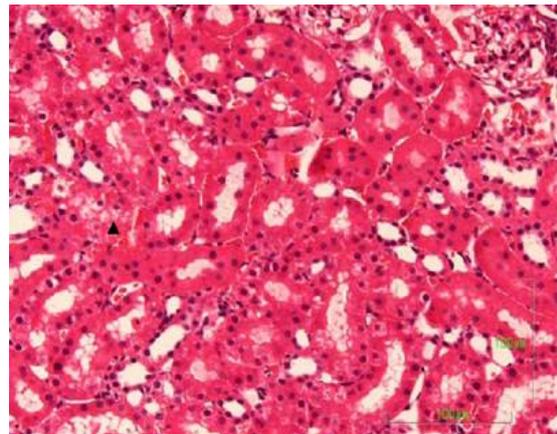


Figura 57B: Grupo CT-1 24h.

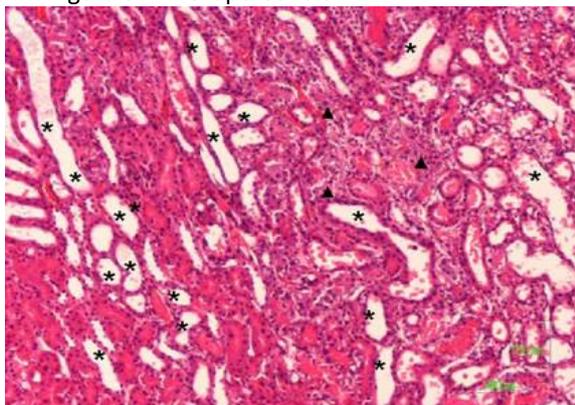


Figura 57C: Grupo Control 48h.

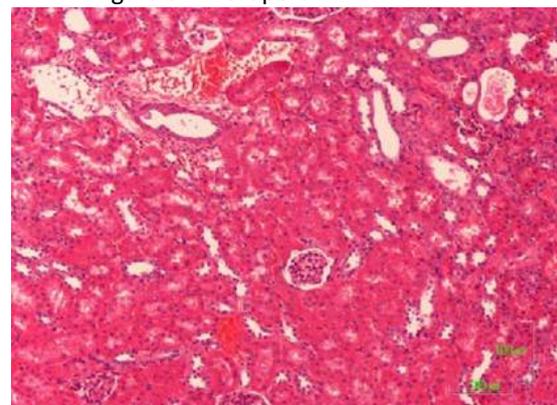


Figura 57D: Grupo CT-1 48h.

2.3.- Función renal

2.3.1.- Creatinina plasmática

En este estudio, realizado hasta los 14 días de postoperatorio, observamos un aumento de los niveles de creatinina plasmática en los animales que sufrieron isquemia renal, mientras que los valores de creatinina plasmática en el Grupo CT-1 se mantenían en valores similares a los del Grupo con operación simulada ($p < 0,01$) (Figura 58).

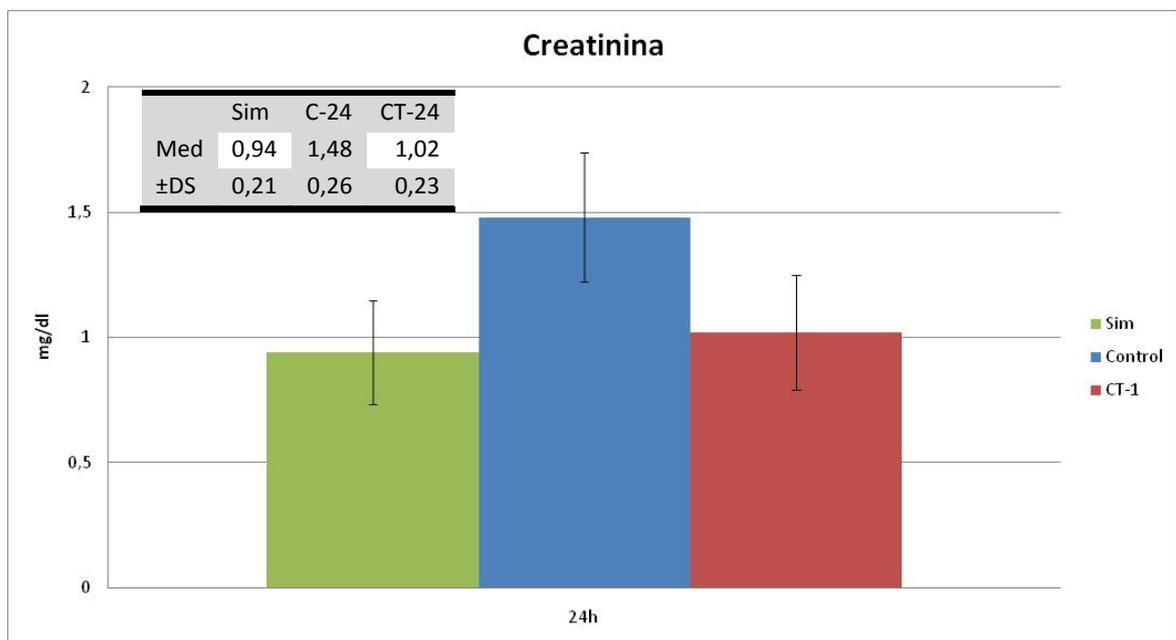


Figura 58.- Concentración de creatinina en plasma (mg/dl) a las 24h postreperusión.

2.3.2.- Aclaramiento de creatinina

El aclaramiento de creatinina corrobora los datos obtenidos con la creatinina plasmática: en el Grupo Control observamos un significativo descenso continuado de este aclaramiento en todos los tiempos estudiados ($p < 0,001$), repitiéndose el mismo patrón en el Grupo CT-1, aunque el descenso fue significativamente menor al del Control ($p < 0,01$), el Grupo CT-1 solamente presenta diferencias significativas con el Grupo Simulado al día 14 ($p < 0,05$) (Figura 59).

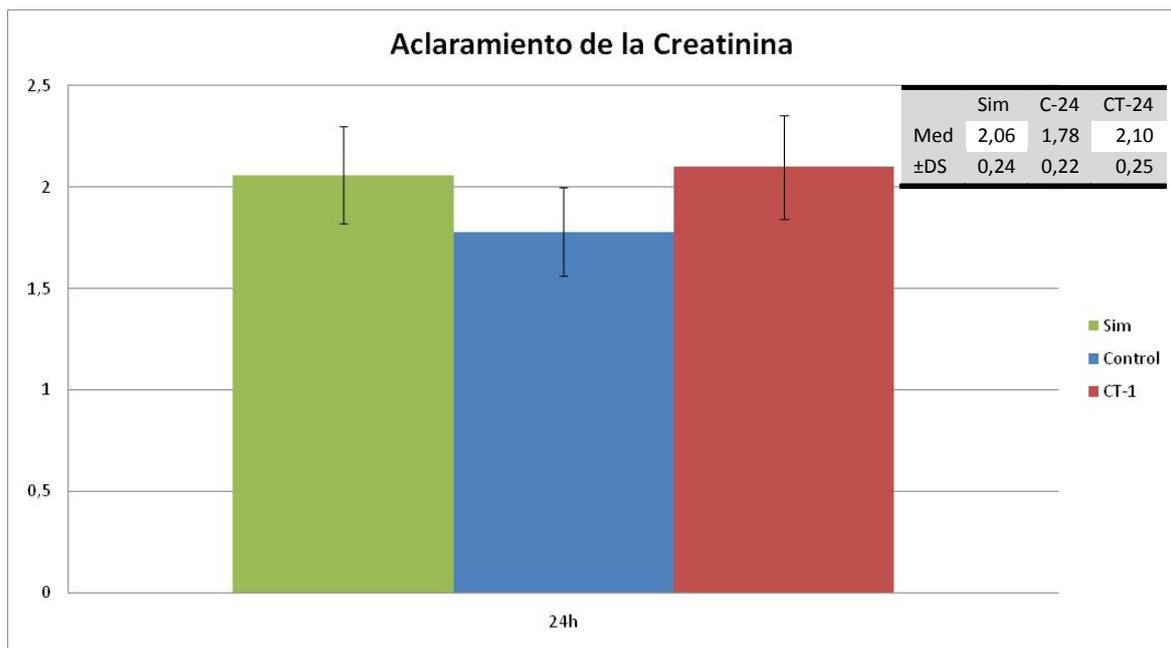


Figura 59.- Aclaramiento de creatinina en plasma a las a las 24h postreperusión.

2.4.- Infiltración neutrofílica: Mieloperoxidasa

La I/R conlleva una elevación significativa de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) a las 24horas postreperusión ($p < 0,001$ del grupo control respecto al simulado). Los valores de actividad de la MPO en el grupo CT-1 son significativamente menores que los del grupo I/R control ($p < 0,001$) sin presentar diferencias con el grupo Simulado. (Figura 60).

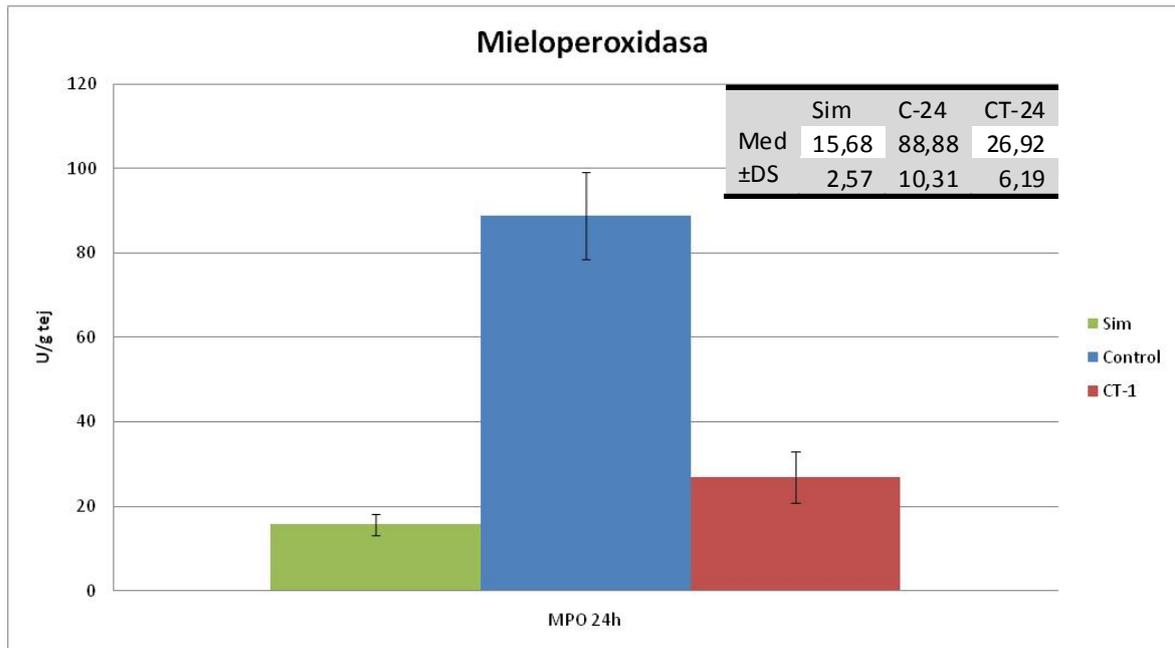


Figura 60.- Actividad de la mieloperoxidasa (UI/g tejido), a las 24h postreperusión.

2.5.- Estudio del estrés oxidativo: Anión superóxido

La I/R en el grupo control induce un incremento altamente significativo en la producción del anión superóxido con respecto al grupo simulado ($p < 0,001$). Los valores de producción de ASO en el grupo CT-1 son significativamente inferiores ($p < 0,001$) con respecto al grupo I/R control pero siguen siendo superiores ($p < 0,01$) a los del grupo Simulado. (Figura 61)

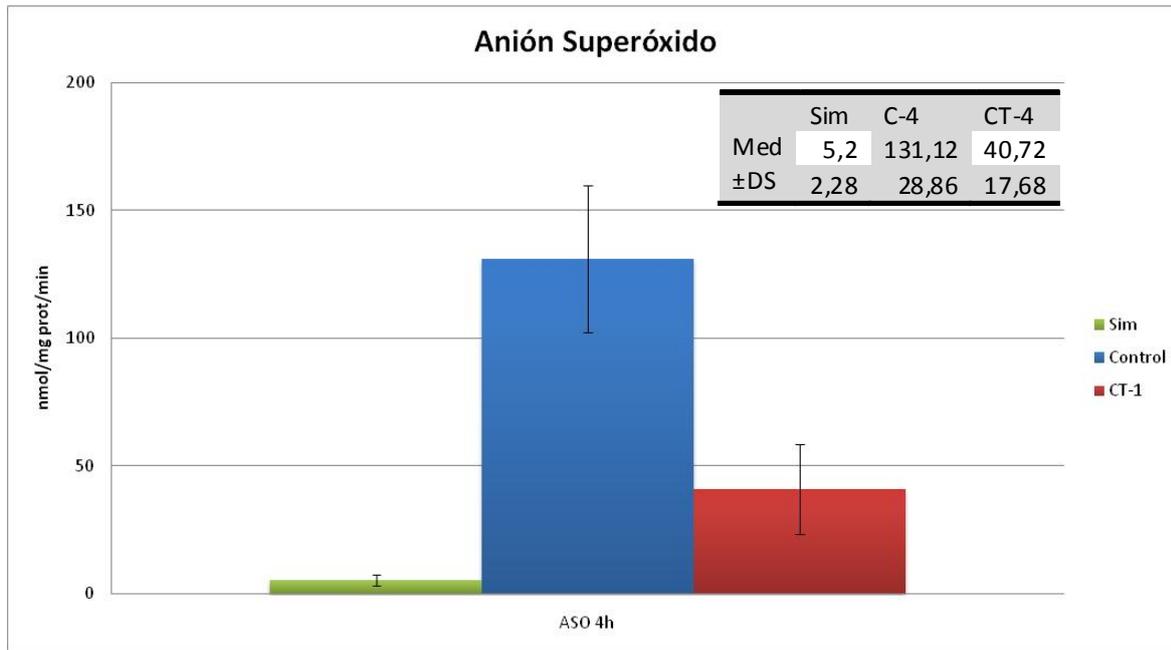


Figura 61.-Niveles de Anión Superóxido (nmol/mg prot/min) a las 4 h de reperusión.

2.6.- Estudio de las Citocinas

2.6.1.- Factor de Necrosis Tumoral- α

La I/R provoca una elevación altamente significativa de los niveles de esta citocina en sangre con respecto al grupo simulado, mientras que los valores de TNF- α en el grupo CT-1 son significativamente inferiores ($p < 0,001$) a los del grupo I/R control, pero siguen siendo superiores ($p < 0,05$) a los del grupo Simulado. (Figura 62).

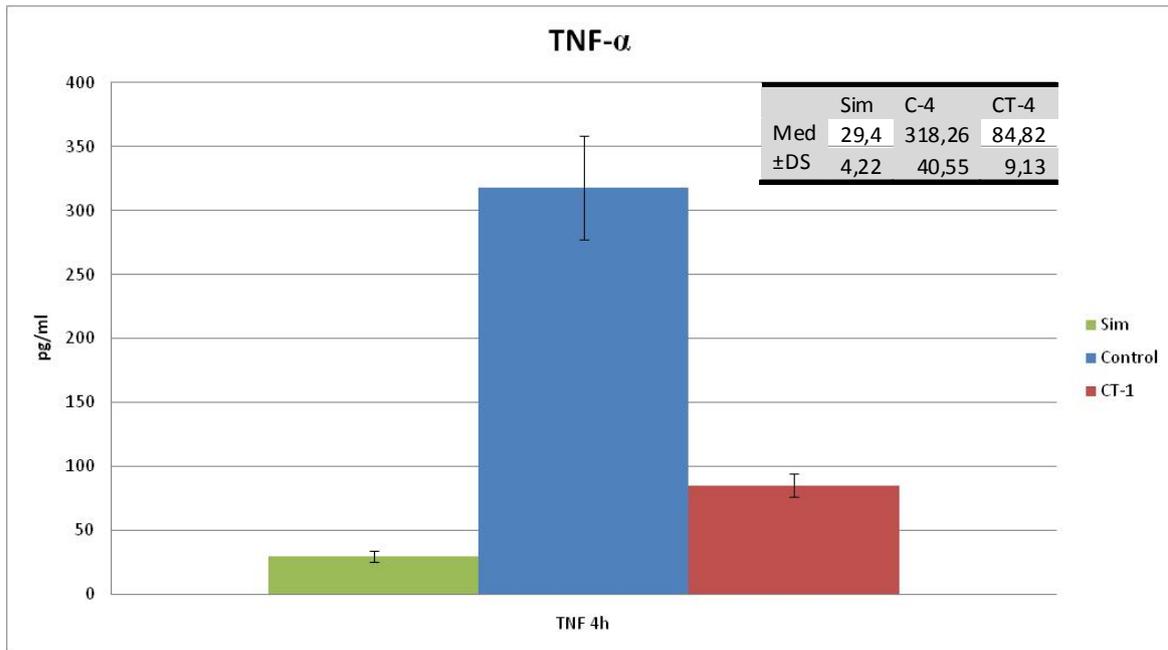


Figura 62.- Niveles de TNF- α (pg/ml) a las 4 h.

2.6.2.- Interleucina-1 β

La I/R provoca una elevación altamente significativa de los niveles de esta citocina en sangre con respecto al grupo simulado ($p < 0,001$), mientras que sus valores en el grupo CT-1 son significativamente inferiores ($p < 0,001$) a los del grupo I/R control, no presentando diferencias (pNS) el grupo CT-1 al grupo Simulado. (Figura).

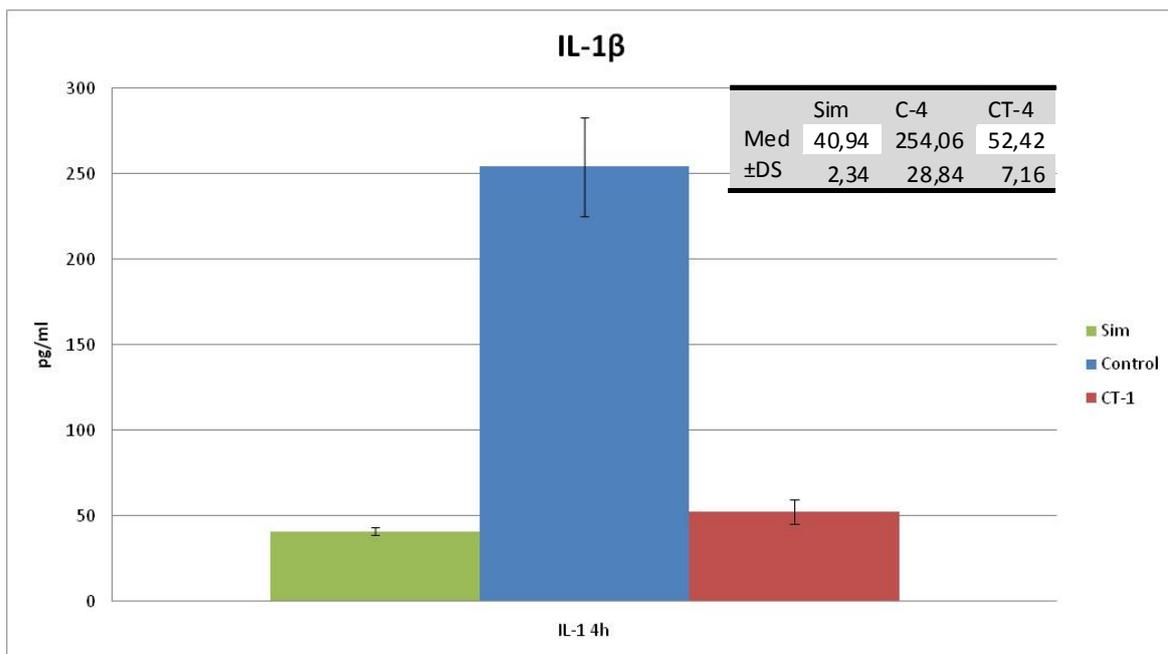


Figura .- Valores de Interleucina-1 β (pg/ml) a las 4h postreperfusión.

2.6.3.- Interferón- γ

La I/R provoca una elevación altamente significativa del INF- γ en sangre con respecto al grupo simulado ($p < 0,001$), mientras que sus valores en el grupo CT-1 son significativamente inferiores ($p < 0,001$) a los del grupo I/R control, no presentando diferencias (pNS) el grupo CT-1 al grupo Simulado. (Figura).

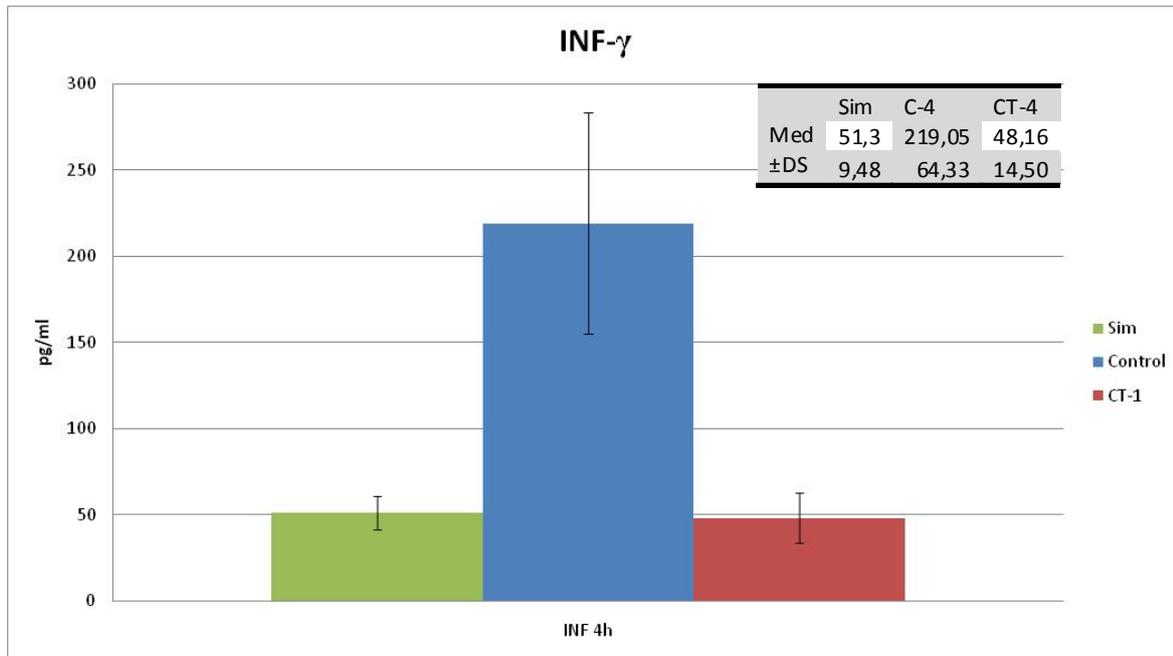


Figura 36.- INF- γ (pg/ml) a las 4 h postreperusión.

2.6.4.- Interleucina-6

La IL-6 no se comporta de forma similar a las anteriores citocinas estudiadas. Los niveles plasmáticos de IL-6 a las 4 horas de la reperusión eran significativamente menores en el grupo I/R control que en el grupo simulado. En los animales que recibieron CT-1, los niveles de IL-6 fueron similares a los del grupo simulado y significativamente mayores que os del grupo control (Figura).

El mantenimiento de los valores de la IL-6 en el grupo CT-1 son significativamente superiores $p < 0,05$ a los observados en el grupo Control. (Figura).

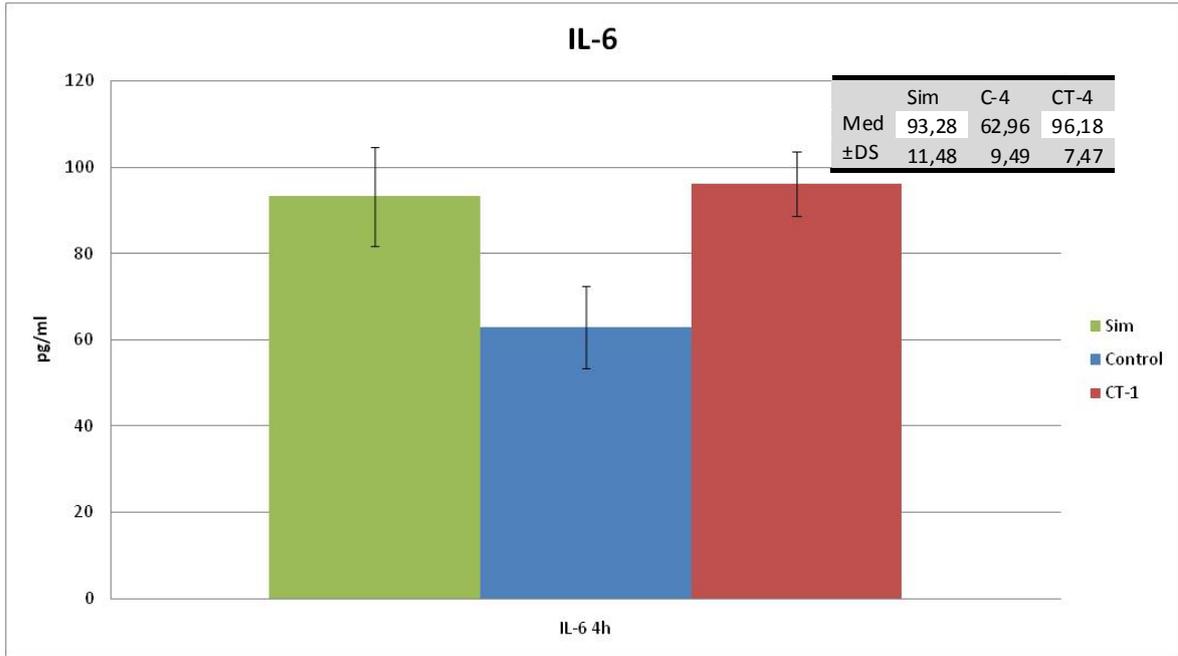


Figura .- IL-6 (pg/ml) a las 4 h postreperusión.

2.6.5.- Interleucina-10

Observamos que los animales del grupo I/R control tenían unos valores significativamente inferiores que los del grupo simulado, mientras que en el grupo CT-1 los valores eran significativamente mayores que el grupo I/R control ($p < 0,001$) incluso mayores que los observados en el grupo Simulado ($p < 0,05$). (Figura)

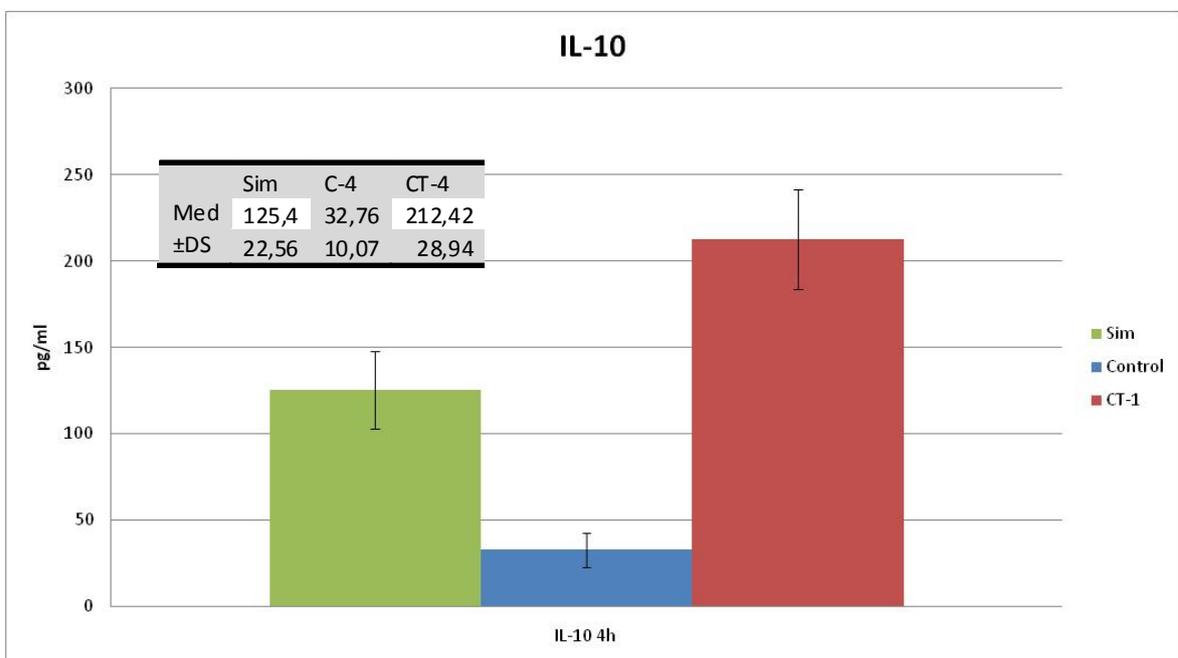


Figura .- IL-10 (pg/ml) a las 4 h postreperusión.

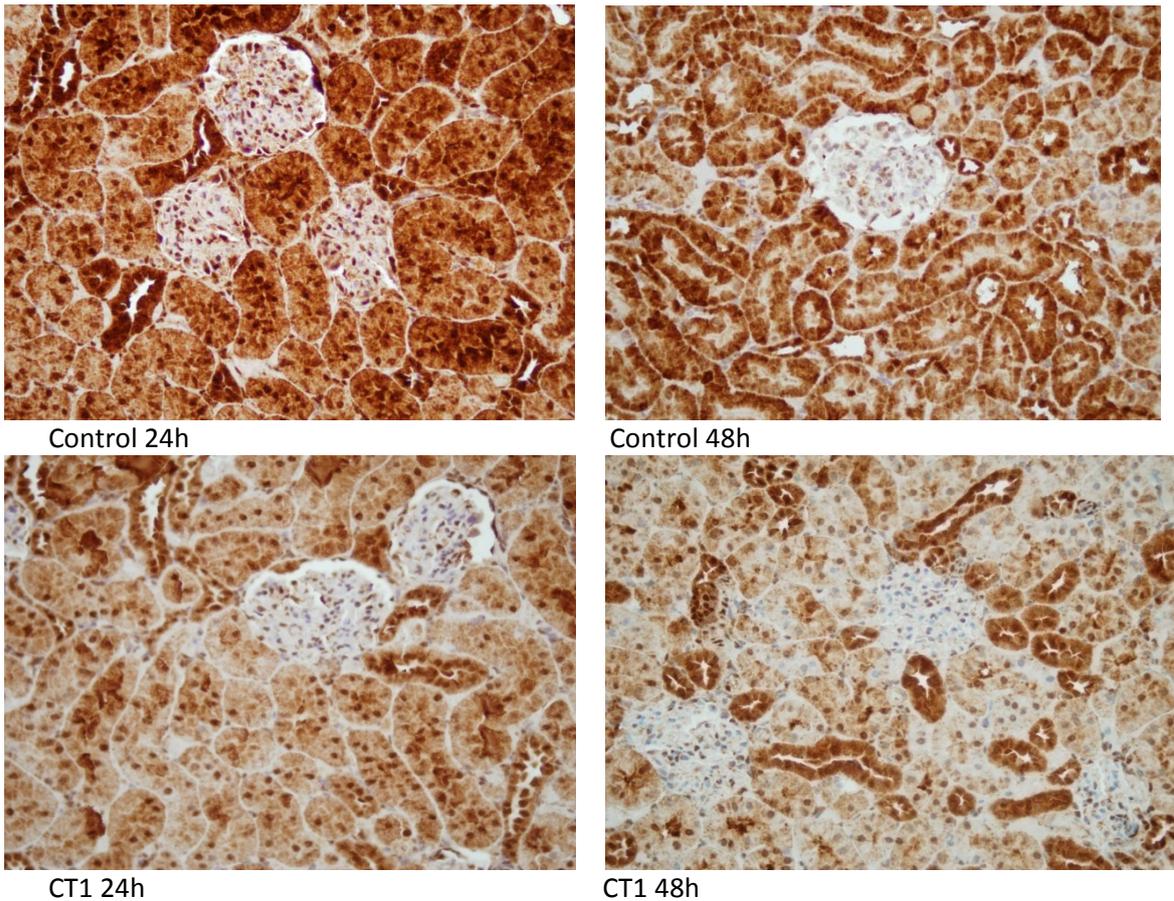
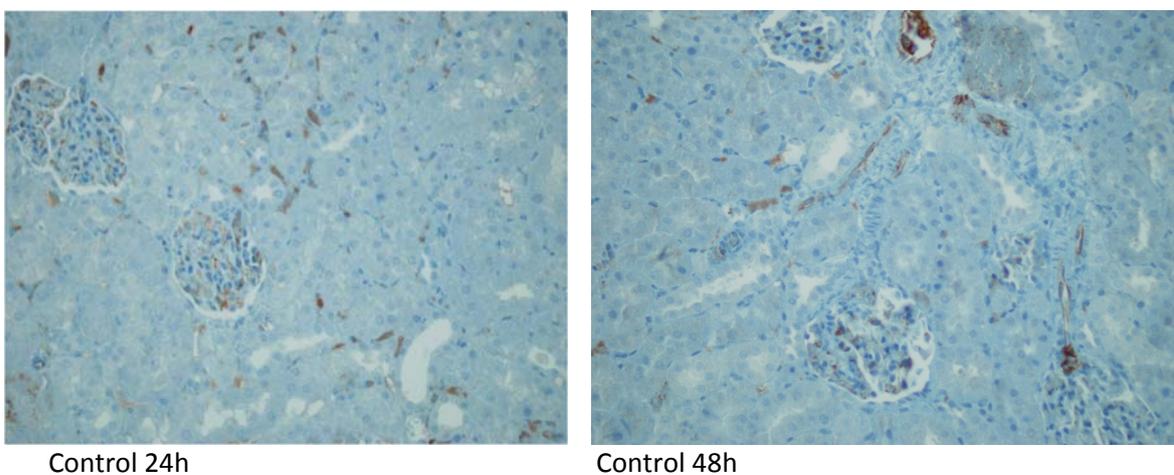


Figura .- Inmunohistoquímica para iNOS

2.7.2.- eNOS/NOS3

Los resultados de la inmunohistoquímica observados a un aumento de 40X, demuestran que tanto a las 24 como a las 48 horas, en los animales con I/R que habían recibido CT-1 la intensidad del marcaje de eNOS era igual que en los I/R control tanto en capilares peritubulares como capilares glomerulares. Sin embargo, en las tratadas con CT-1 se observa una menor congestión medular.



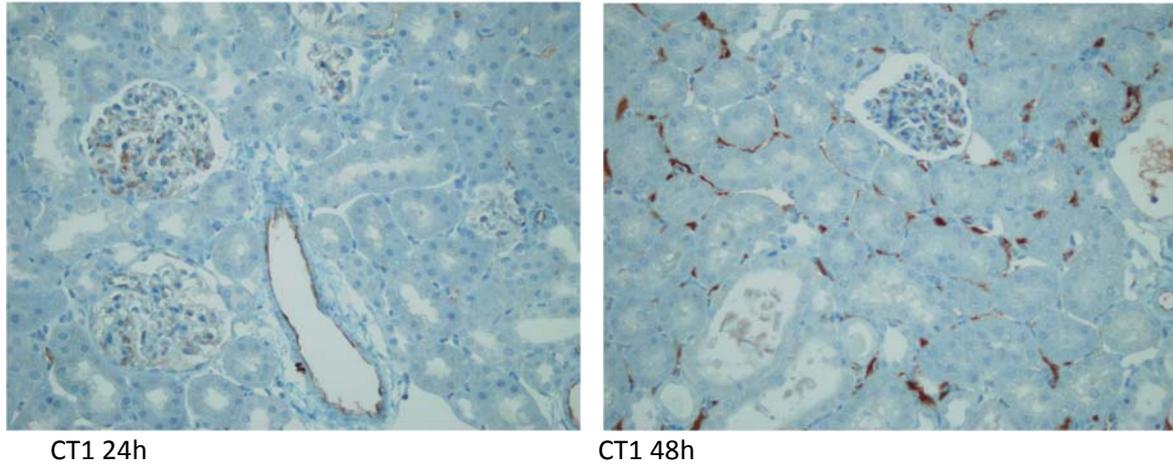


Figura .- Inmunohistoquímica para eNOS

2.8.- Estudio de la interacción leucocito-entotelio:

2.8.1.- P-selectina

La expresión de P-selectina, estudiada a las 4 horas tras la reperfusión estaba significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Control con respecto al Simulado. Los niveles de P-selectina en el grupo CT-1 son significativamente inferiores que el grupo control ($p < 0,001$) pero siguen siendo significativamente superiores ($p < 0,001$) con respecto al grupo Simulado. (Figura)

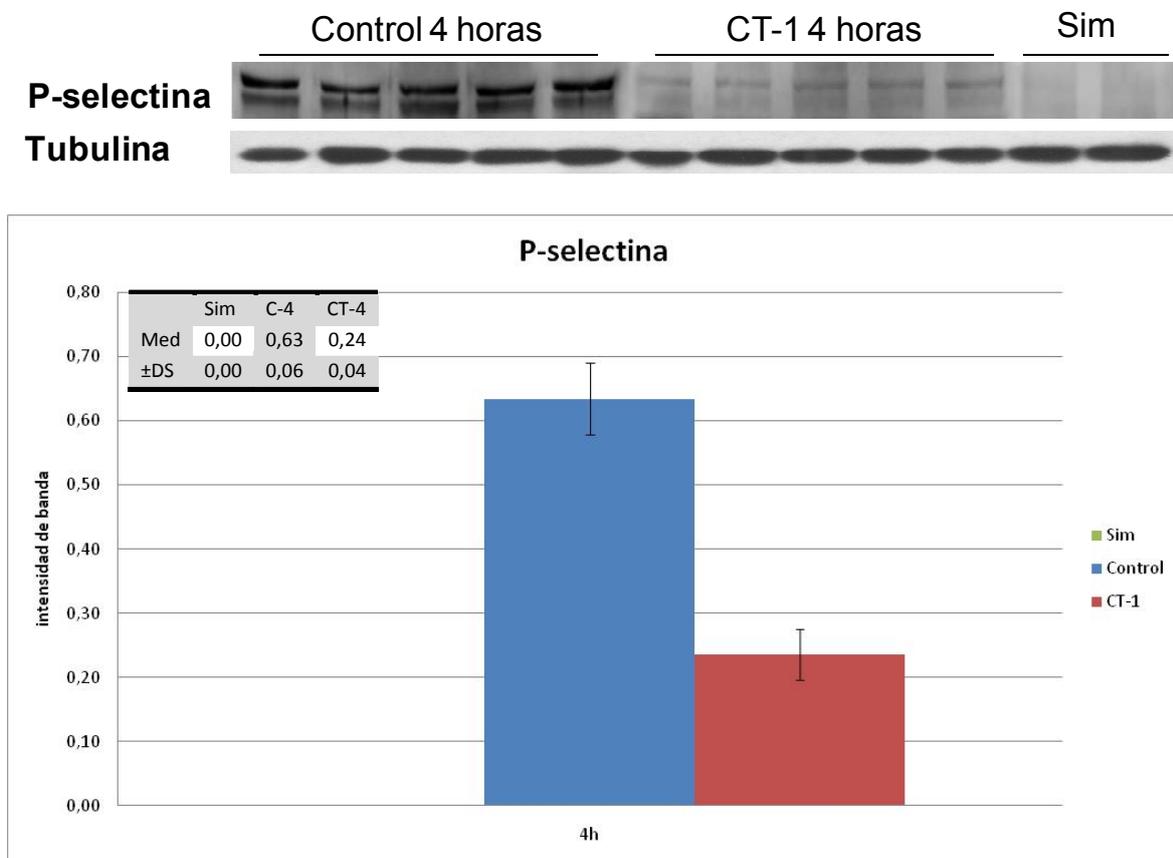


Figura .- Intensidad de la banda P-selectina a las 4h postreperfusion.

2.8.2.- ICAM-1

La expresión de ICAM-1, evaluada a las 24 horas de la I/R, se observa significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Control con respecto al Simulado. Los niveles de ICAM-1 en el grupo CT-1 son significativamente inferiores respecto al grupo control ($p < 0,05$) pero siguen siendo superiores ($p < 0,05$) respecto al grupo Simulado. (Figura).

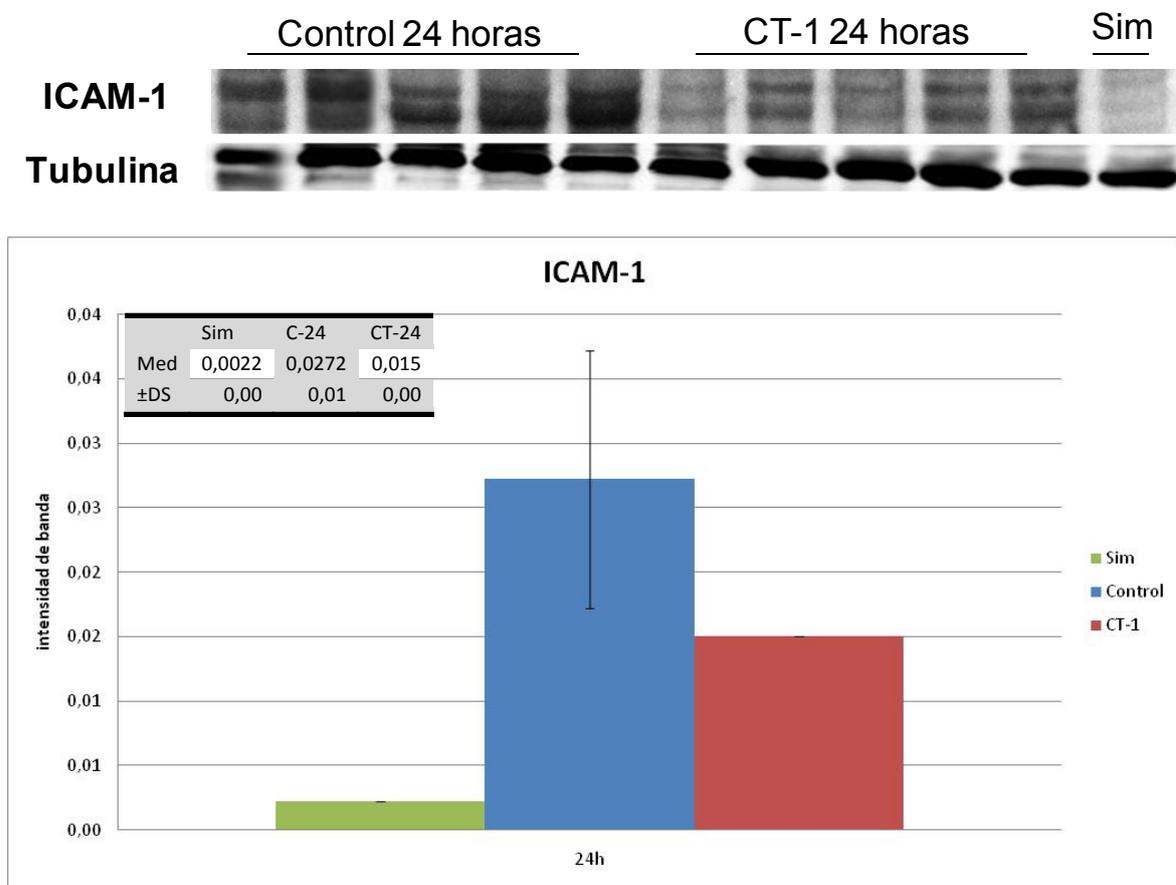


Figura .- Intensidad de la banda ICAM-1 a las 24h postreperfusión.

2.8.3.- VCAM-1

La expresión de VCAM-1, estudiada también a las 24 horas, se encontró significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Control con respecto al Simulado. Los niveles de VCAM-1 en el grupo CT-1 eran significativamente inferiores que los del grupo I/R control ($p < 0,001$) sin presentar diferencias con el grupo Simulado. (Figura).

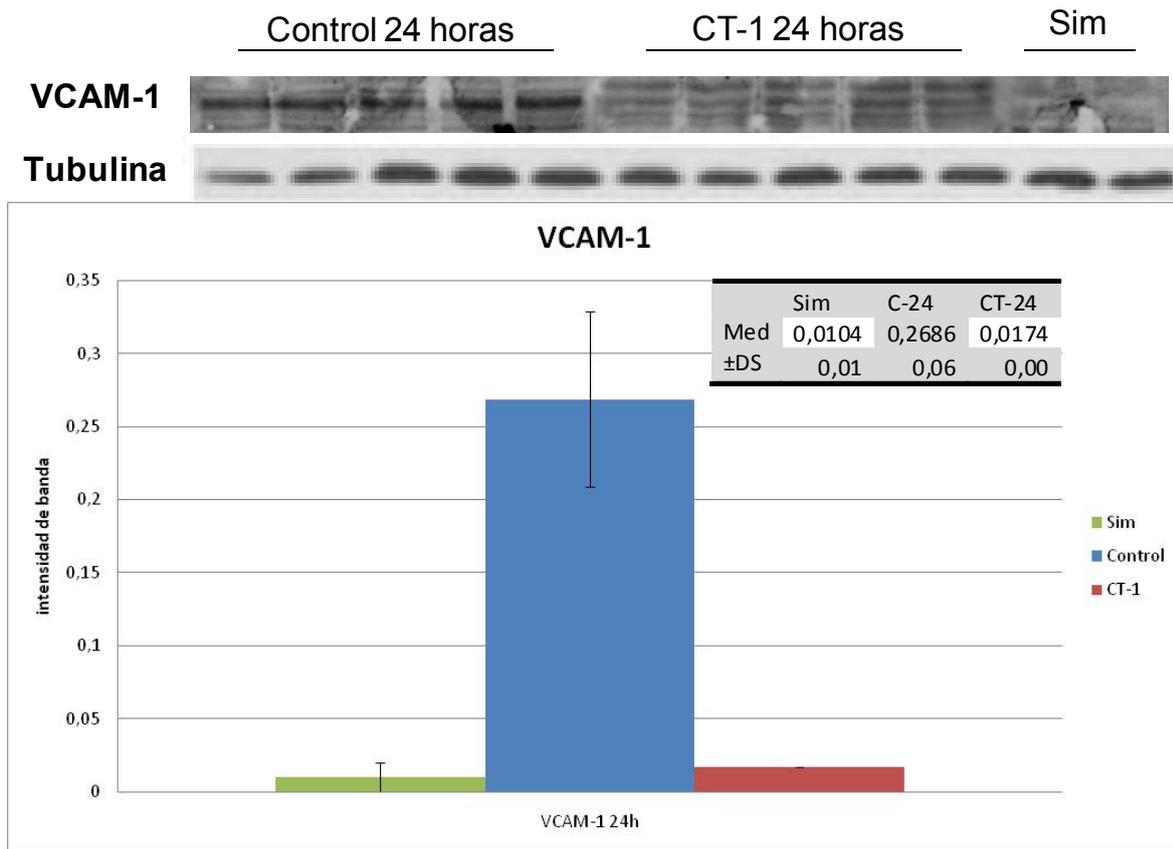
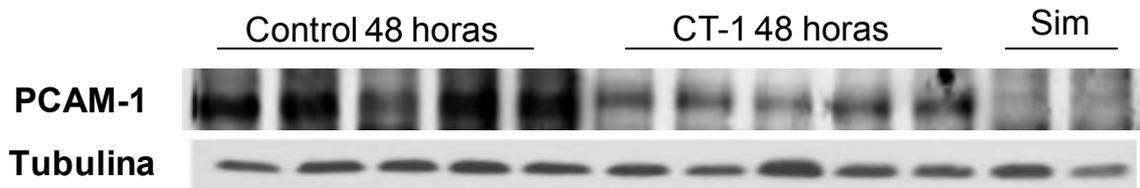


Figura .- Intensidad de la banda VCAM-1 a las 24h postreperusión.

2.8.4.- PECAM-1

La expresión de PECAM-1, estudiada a las 48 horas de la I/R, tenía un perfil similar a la VCAM-1, encontrándose significativamente elevada ($p < 0,001$) en el Grupo Control con respecto al Simulado. Los niveles de PECAM-1 en el grupo CT-1 eran significativamente inferiores que los del grupo control ($p < 0,001$) no presentando diferencias significativas con el grupo Simulado. (Figura)



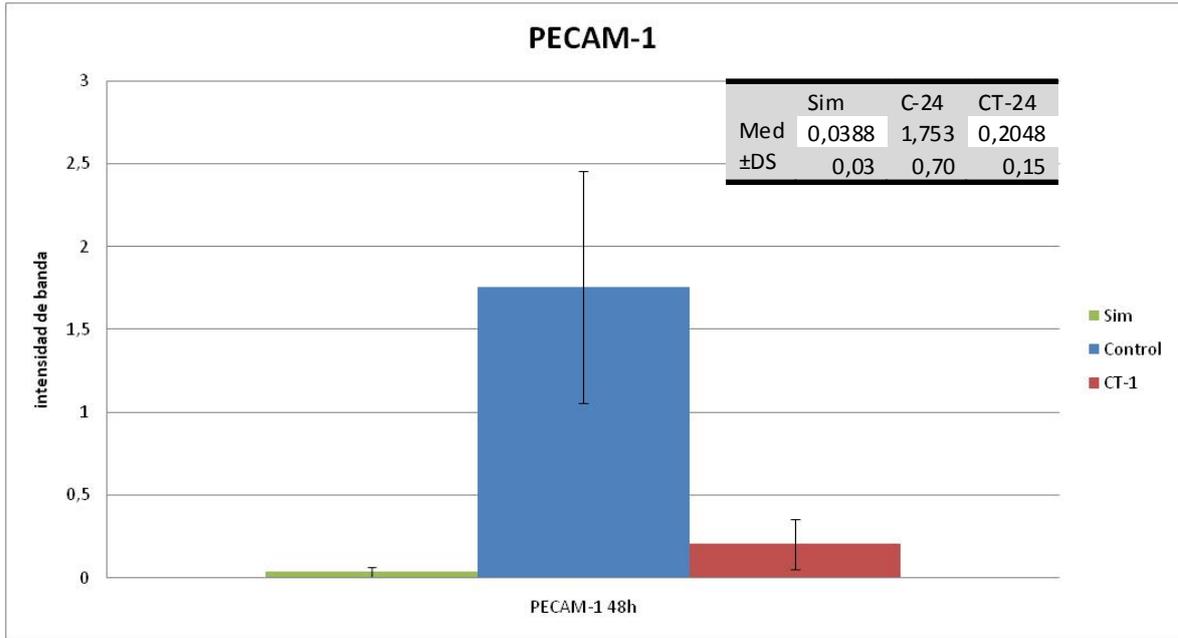


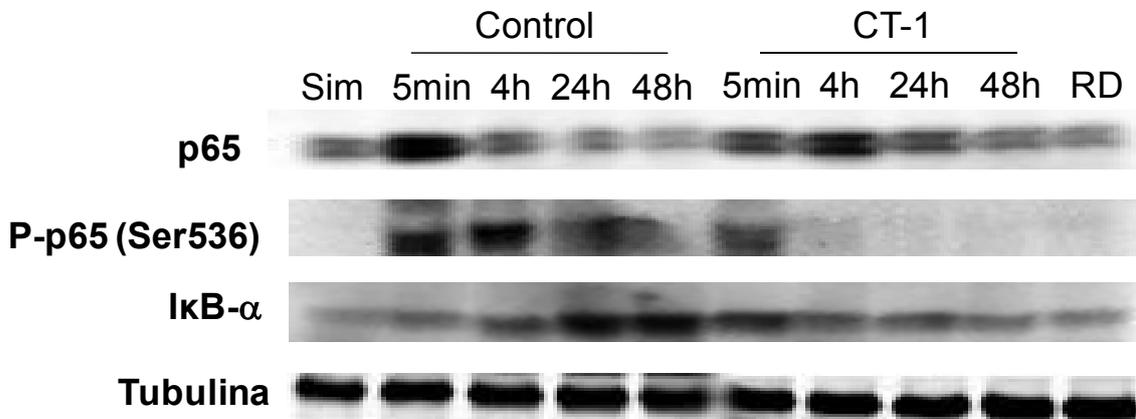
Figura .- Intensidad de la banda PECAM-1 a las 48h postreperusión.

2.9.- Estudio del factor de transcripción nuclear-κB:

La activación del factor de transcripción nuclear-κB se hizo mediante el estudio de la fosforilación de Rel A (p65) en la Ser536 y por los niveles de IκB-α.

2.9.1.- Valoración de p65 (Rel A)

Cuando se estudió la cantidad total de p65 evaluada a los 5 minutos, 4, 24 y 48 horas tras la I/R observamos un aumento de la cantidad de p65 en riñones que sufrieron I/R en comparación con el riñón del grupo simulado y del riñón contralateral que no sufría I/R, diferencias que se observaba desde los 5 minutos tras la I/R. La cantidad de p65 total era significativamente mayor en los animales que recibían CT-1 que en los que no la recibían ($p < 0,05$) a las 4 y 24 horas tras la I/R (Figura)



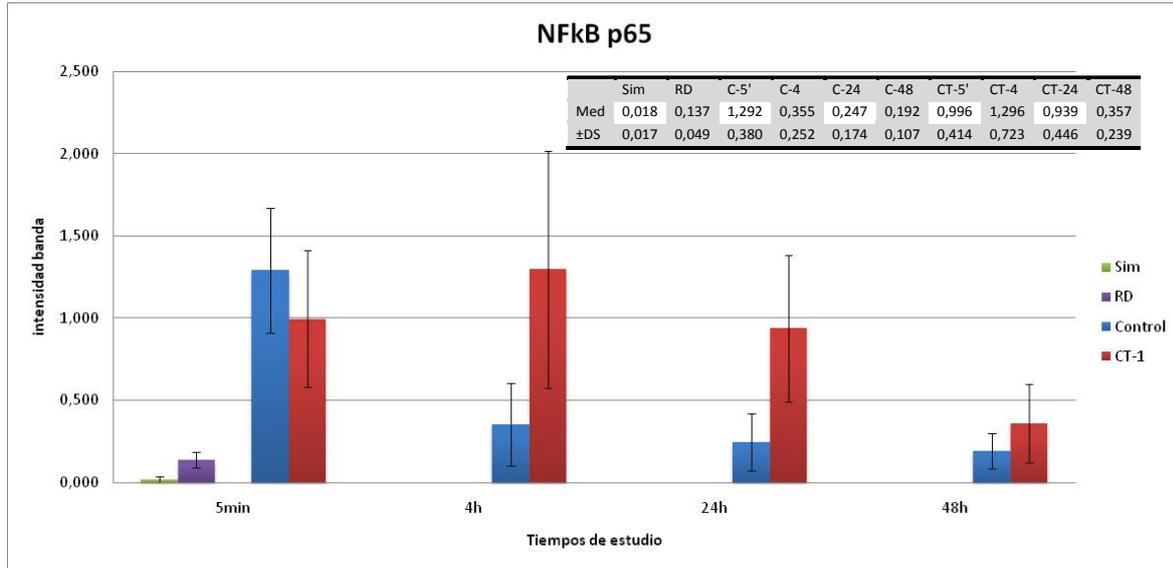


Figura .- Intensidad de la banda NF-κB a los 5min, 4, 24 y 48h postreperusión.

2.9.2.- Valoración de la fosforilación de p 65

La fosforilación de p65 se evaluó a los 5 minutos, 4, 24 y 48 horas. Observamos a los 5 minutos tras la I/R un aumento de la cantidad de p-p65 en riñones que sufrieron I/R en comparación con el riñón del grupo simulado y del riñón contralateral que no sufría I/R ($p < 0,0001$), en los que la cantidad de p-p65 era mínima. A las cuatro y las 24 horas, tras la I/R, en el grupo control se mantenía un nivel alto de p-p65, mientras este era indetectable en el grupo tratado con CT-1 ($p < 0,0001$), desapareciendo los niveles detectables en ambos grupos a las 48 horas (Figura).

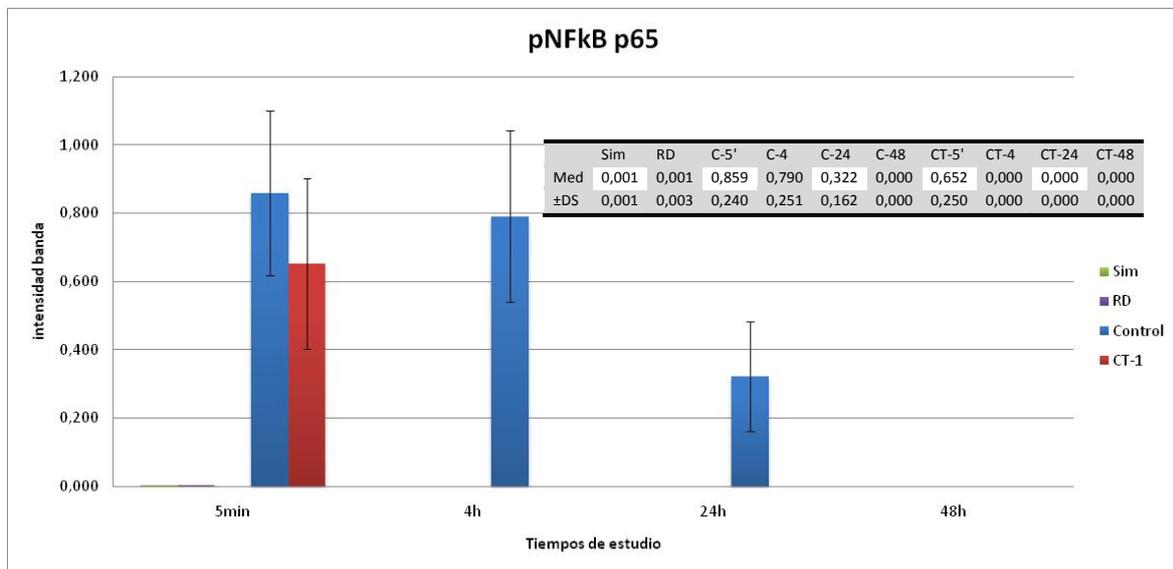


Figura .- Intensidad de la banda p-p65 a los 5min, 4, 24 y 48 h postreperusión.

2.9.3.- Valoración de IκB-α

En el estudio de la activación de IκB-α, evaluada a los 5 minutos, 4, 24 y 48 horas, observamos diferencias ($p < 0,05$) en todos los tiempos entre grupo CT1 y Control. Observamos a los 5 minutos tras la I/R un aumento de la cantidad de IκB-α en riñones que sufrieron I/R en comparación con el riñón del grupo simulado y del riñón contralateral que no sufría I/R, en los que la cantidad de IκB-α era mínima ($p < 0,05$). A las cuatro 24 horas y 48 horas, tras la I/R, en el grupo control se mantenía un nivel alto y creciente de IκB-α, mientras este era muy bajo en el grupo tratado con CT-1 (Figura)

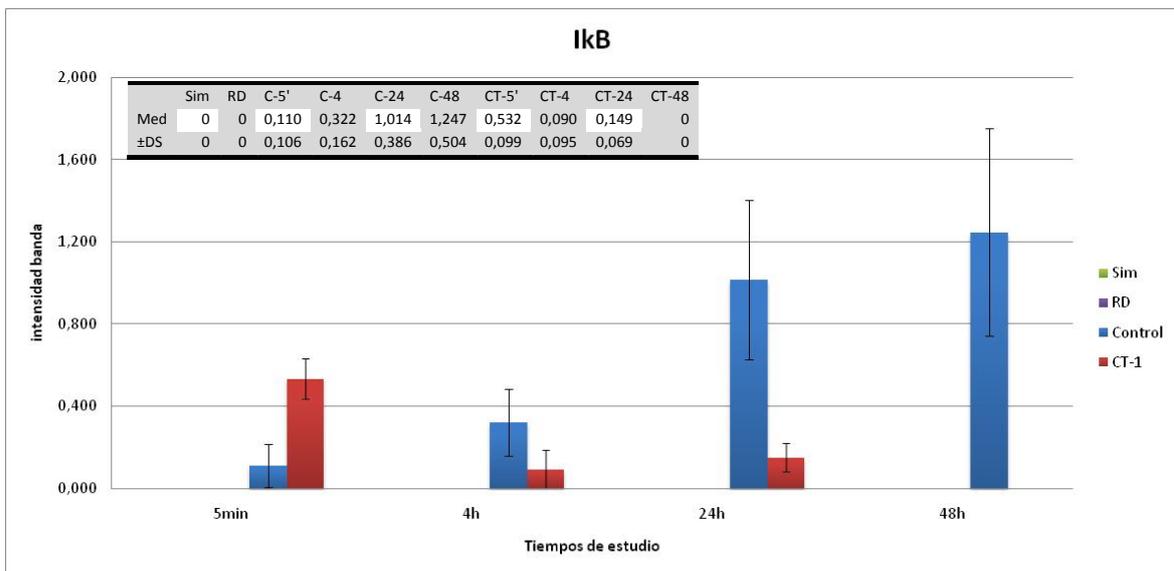
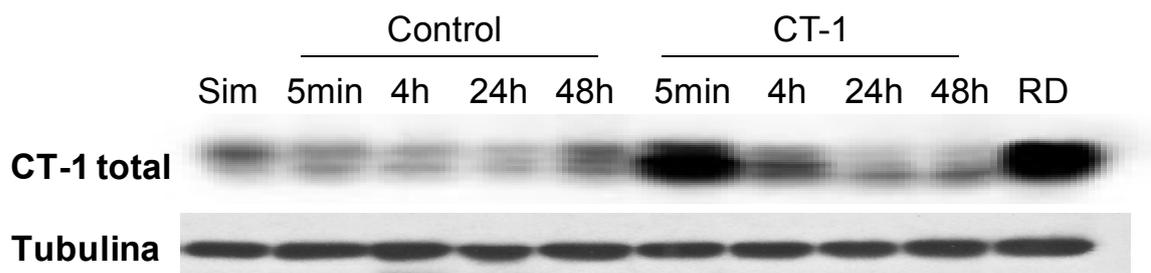


Figura .- Intensidad de la banda IκB-α a los 5min, 4, 24 y 48h postreperusión.

2.10.- Estudio de la expresión de la Cardiotrofina-1 y de su receptor

2.10.1.- Cardiotrofina-1 total

El estudio de la cantidad tisular de CT-1 realizado a los 5 minutos, 4, 24 y 48 horas, demostró que, como era de esperar, en los grupos que habían recibido la CT-1, tanto el riñón isquémico como en el contralateral había cantidades muy grandes de esta citocina en relación con los animales que no habían recibido CT-1 (Grupos Control y Simulado) ($p < 0,001$). Este aumento se mantenía a las cuatro horas. No había diferencias significativas entre el grupo I/R control y el grupo I/R CT-1 ni a las 24 ni a las 48 horas tras la reperusión (Figura)



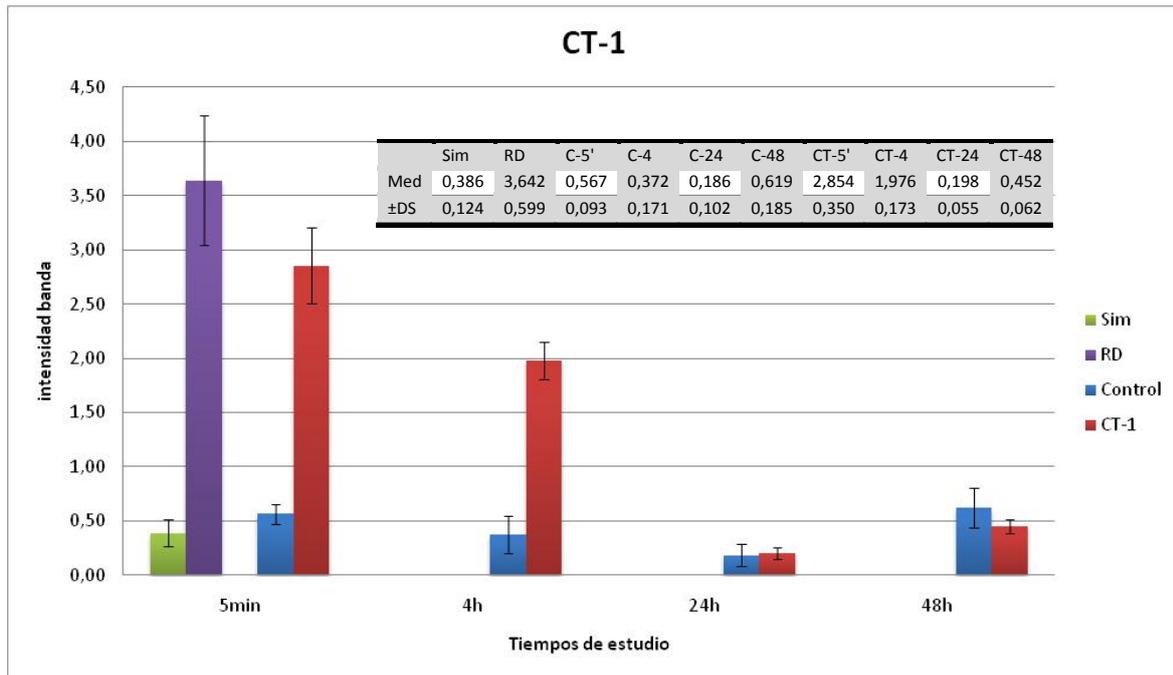


Figura .- Intensidad de la banda CT-1 a las 5min, 4, 24 y 48h postreperfusión.

También estudiamos la expresión del mRNA de CT-1 total mediante RT-PCR semicuantitativa y del mRNA de 18S para comprobar la igualdad de carga en todas las muestras. El tratamiento con CT-1 aumentó la expresión del mRNA de CT-1 a los 5 minutos, 4, 24 y 48 horas, los niveles decayeron a los 14 días. Los niveles del mRNA de CT-1 en el grupo control a los 5 minutos, 4, 24 y 48 horas era menor pero por encima de los niveles basales y ya a los 14 días la expresión era igual en el grupo control que en el tratado con CT-1.

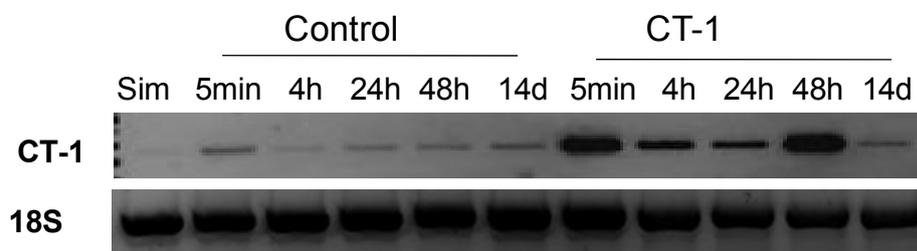


Figura .- Estudio de la expresión por RT-PCR en el tejido renal de CT-1.

2.10.2.- Cardiotrofina-1 marcada con cola de histidina

El estudio de la cantidad tisular de CT-1 marcada con cola de histidina realizado a las 4, 24 y 48 horas, demostró que, como era de esperar, en los grupos que habían recibido la CT-1 marcada con cola de histidina, tanto en el riñón isquémico como en el contralateral había cantidades muy grandes de esta citocina en relación con los animales que no habían recibido CT-1 (Grupo Control y Simulado) ($p < 0,001$). Este aumento se mantenía a las cuatro horas. No había

diferencias significativas entre el grupo I/R control y el grupo I/R CT-1 ni a las 24 ni a las 48 horas tras la reperfusión (Figura).

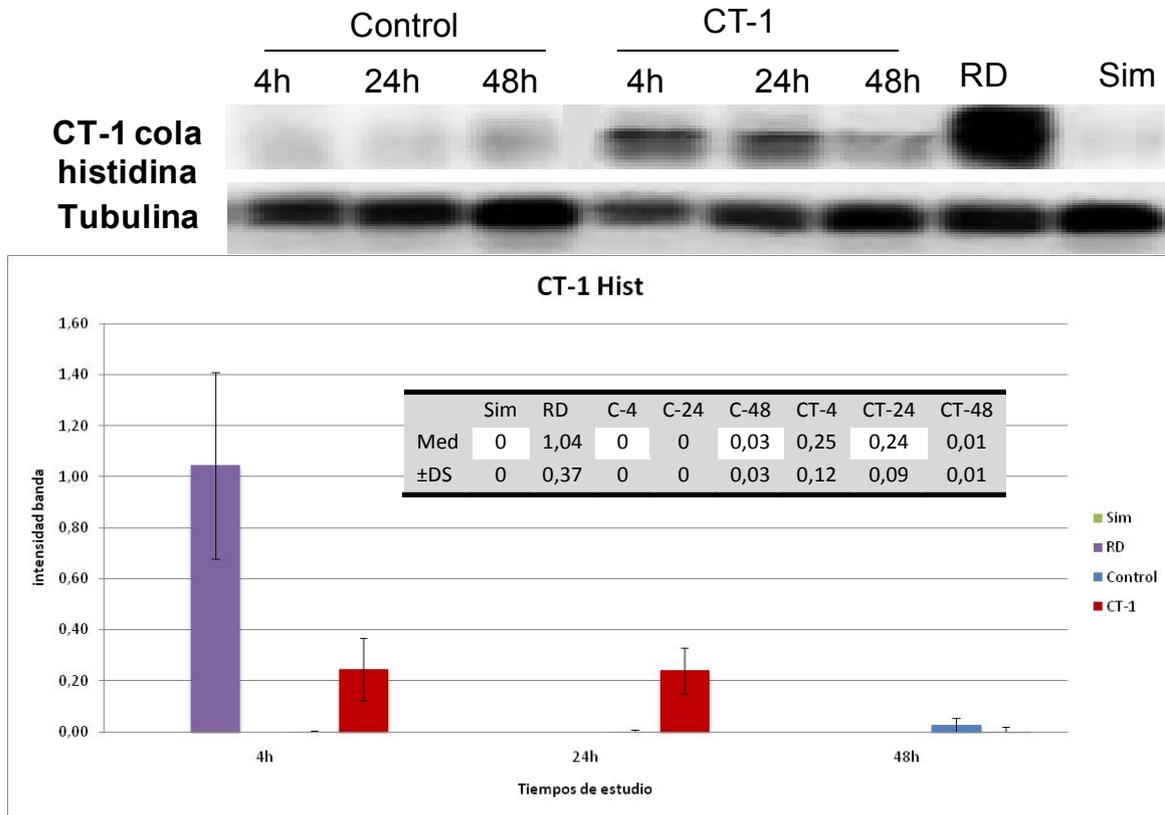
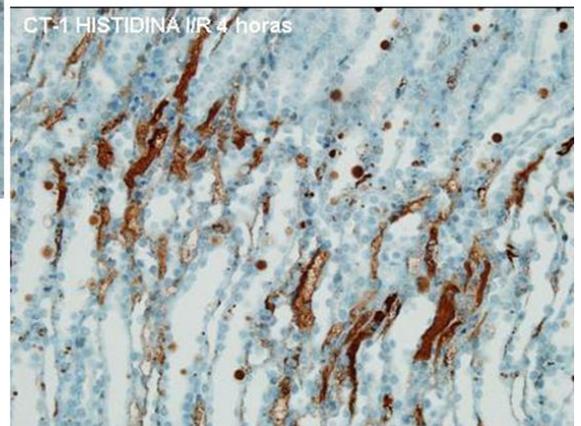
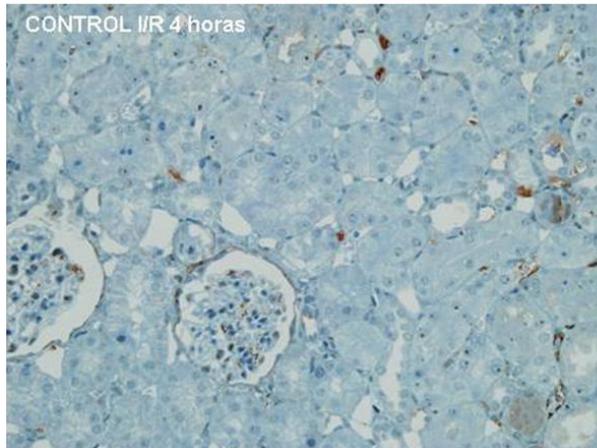
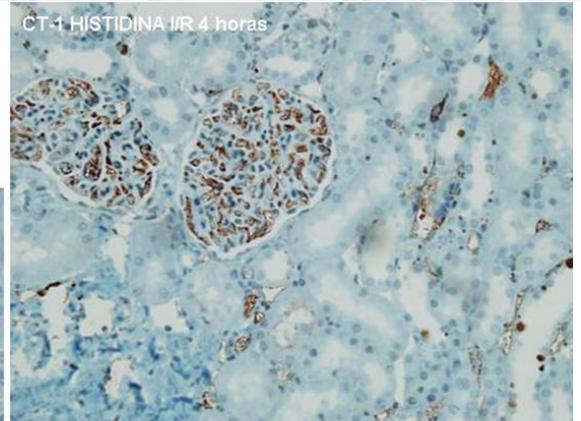
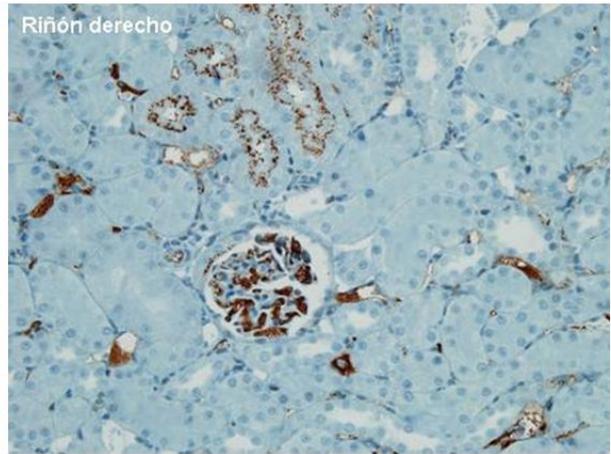
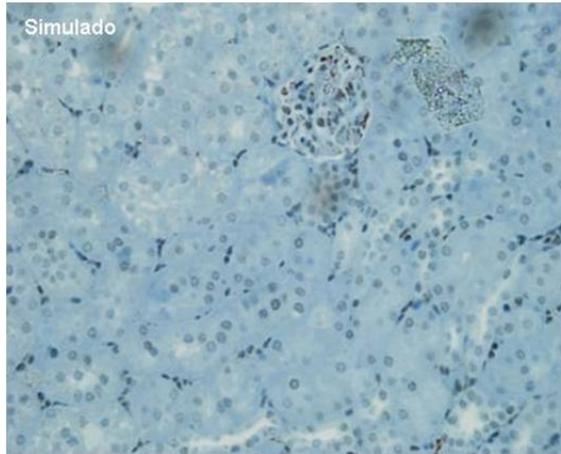
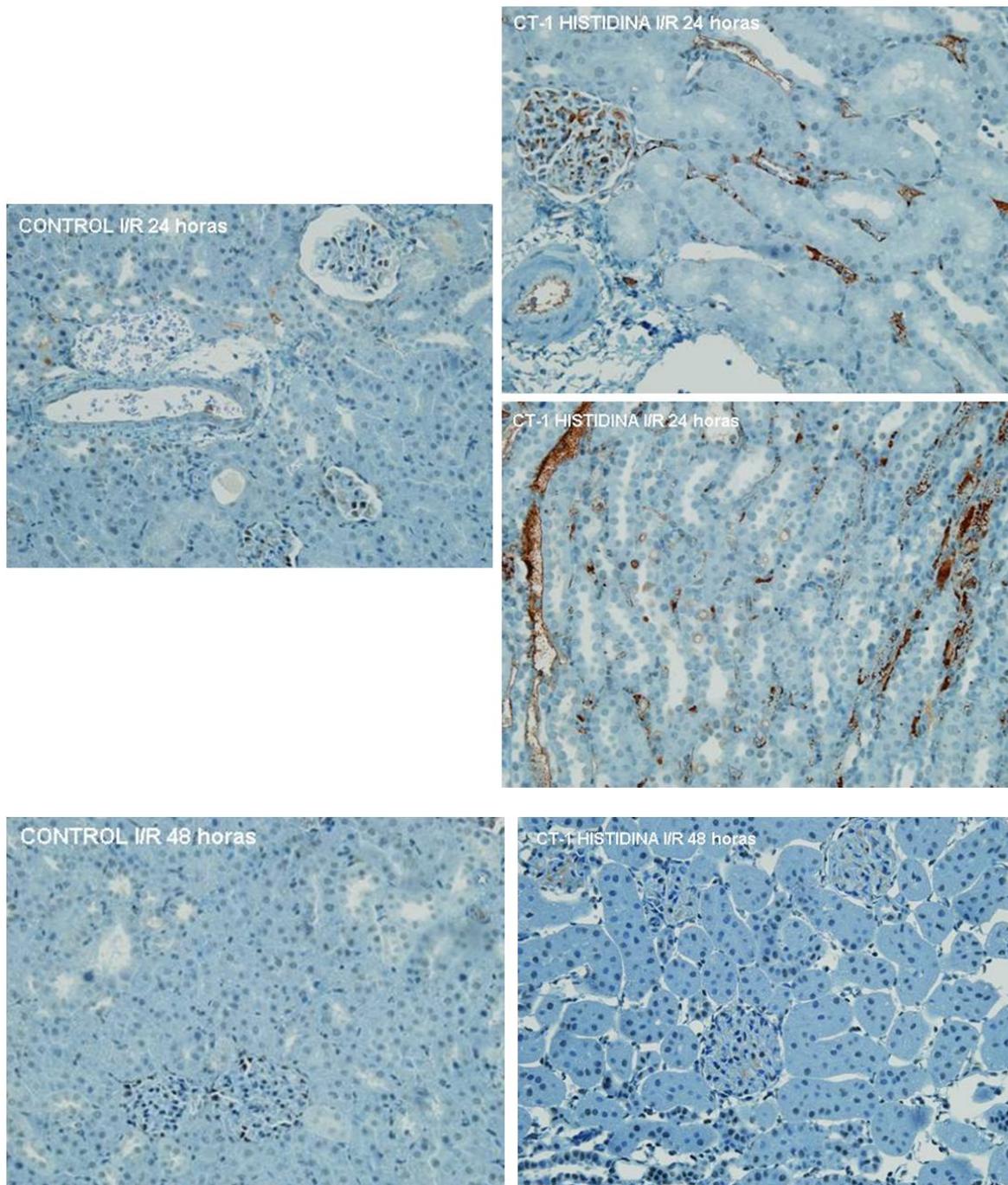


Figura .- Intensidad de la banda CT-1 marcada con cola de histidina a las 4, 24 y 48h postreperfusión.

Los resultados de inmunohistoquímica observados a un aumento de 40X, apoyan los resultados de western blot, ya que tanto a las 4 como a las 24 horas, en los animales con I/R que habían recibido CT-1 marcada con cola de histidina la intensidad del marcaje era mucho mayor que en los I/R control, en los cuales la tinción observada es inespecífica. La tinción en los animales con I/R que habían recibido CT-1 marcada con cola de histidina se observa tanto en capilares tubulares como en capilares glomerulares, también se encuentran muy teñidas las células del túbulo colector. También se observa tinción en el borde en cepillo en el riñón derecho.





2.10.3.- Receptor gp130

Mientras que en el Grupo CT-1 observamos un incremento significativo, con respecto al resto de los Grupos, a las 24 horas ($p < 0,001$) en el Grupo Control este incremento se observa con mayor intensidad a las 48 horas ($p < 0,001$) donde el grupo CT-1 ha disminuido de forma significativa ($p < 0,01$) aunque sigue siendo superior al Grupo Simulado ($p < 0,001$) (Figura).

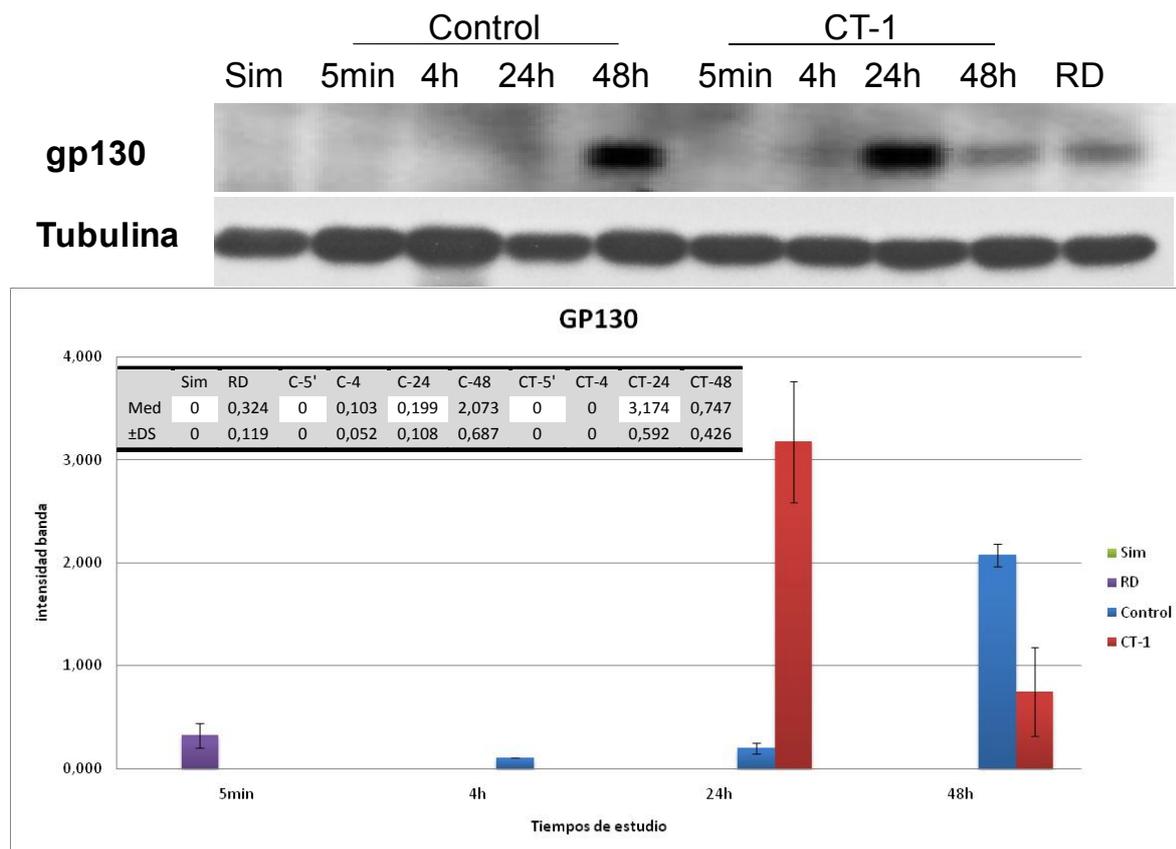


Figura .- Intensidad de la banda gp130 a los 5min, 4, 24 y 48h postreperfusión.

También estudiamos la expresión del mRNA de gp130 mediante RT-PCR semicuantitativa y del mRNA de 18S para comprobar la igualdad de carga en todas las muestras. El tratamiento con CT-1 aumentó la expresión del mRNA de gp130 a los 5 minutos, y a las 4 horas, los niveles decayeron a las 24, 48 horas y 14 días. Los niveles del mRNA de SOCS-3 en el grupo control a los 5 minutos era menor, pero por encima de los niveles basales y a los 14 días la expresión era mayor en el grupo control que en el tratado con CT-1 (Figura).

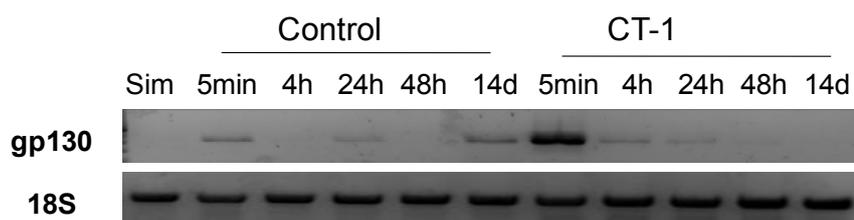


Figura .- Estudio de la expresión por RT-PCR en el tejido renal de gp130.

2.11.- Vías de señalización de la CT-1

2.11.1.- SOCS-3

El estudio de SOCS-3, realizado a las 5 minutos, 4, 24 y 48 horas y 14 días, evidenció un importante incremento, en los primeros momentos, en el Grupo CT-1 respecto al Control ($p < 0,001$) invirtiéndose la relación a los 14 días ($p < 0,05$) (Figura).

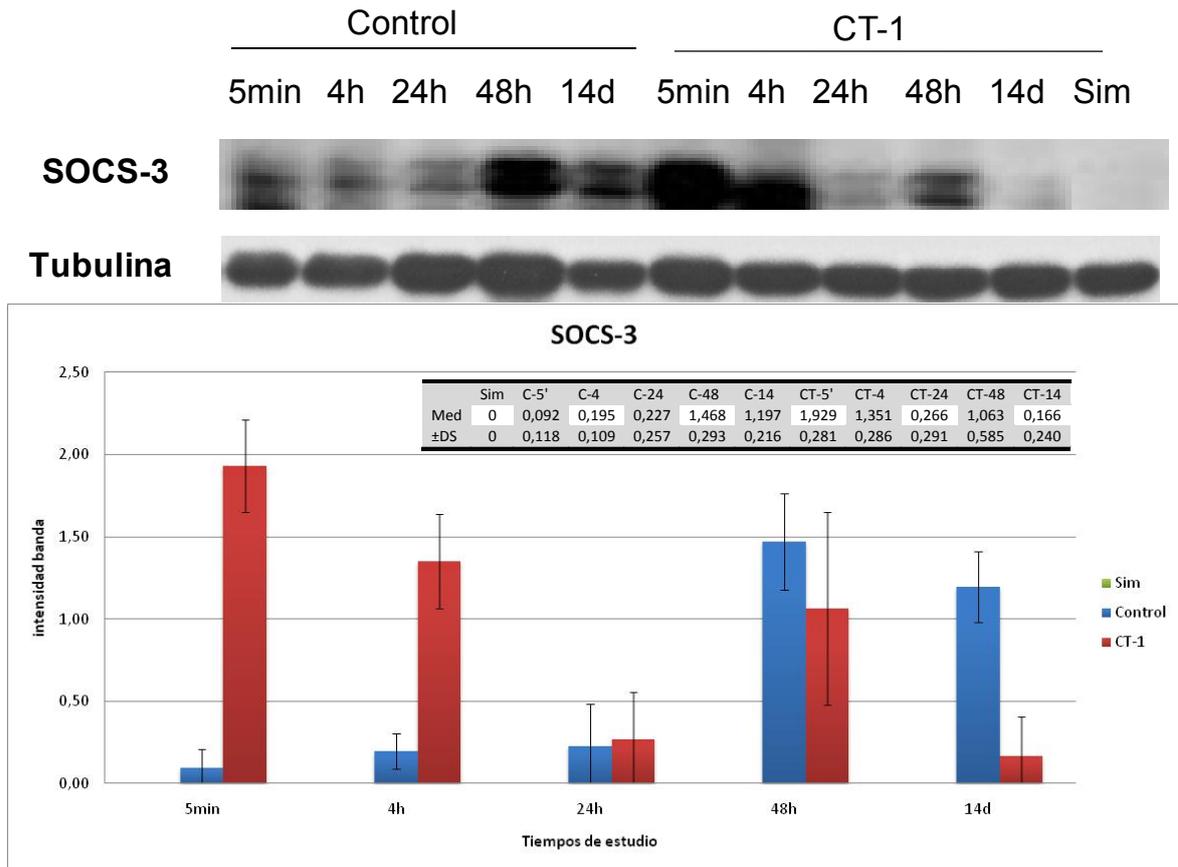


Figura .- Intensidad de la banda SOCS-3 a las 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

También estudiamos la expresión del mRNA de SOCS-3 mediante RT-PCR semicuantitativa y del mRNA de 18S para comprobar la igualdad de carga en todas las muestras. El tratamiento con CT-1 aumentó la expresión del mRNA de SOCS-3 a los 5 minutos, 4, y 24 horas, los niveles decayeron a las 48 horas. Los niveles del mRNA de SOCS-3 en el grupo control era menor pero por encima de los niveles basales (Figura).

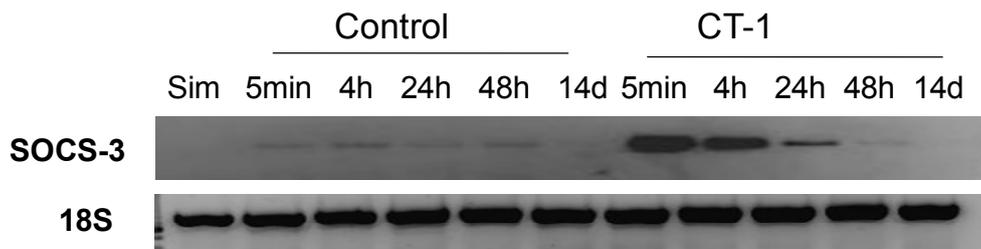


Figura .- Estudio de la expresión por RT-PCR en el tejido renal de SOCS-3.

2.11.2.- STAT3 y p-STAT3

Mientras que no observamos diferencias significativas en el estudio de STAT-3 en ninguno de los grupos, los resultados obtenidos con pSTAT-3 demuestran un elevado incremento a los 5 minutos y 4 horas en el Grupo CT-1 respecto al Control ($p < 0,001$) que se normaliza, no existiendo diferencias significativas, en el resto de los tiempos estudiados (Figuras).

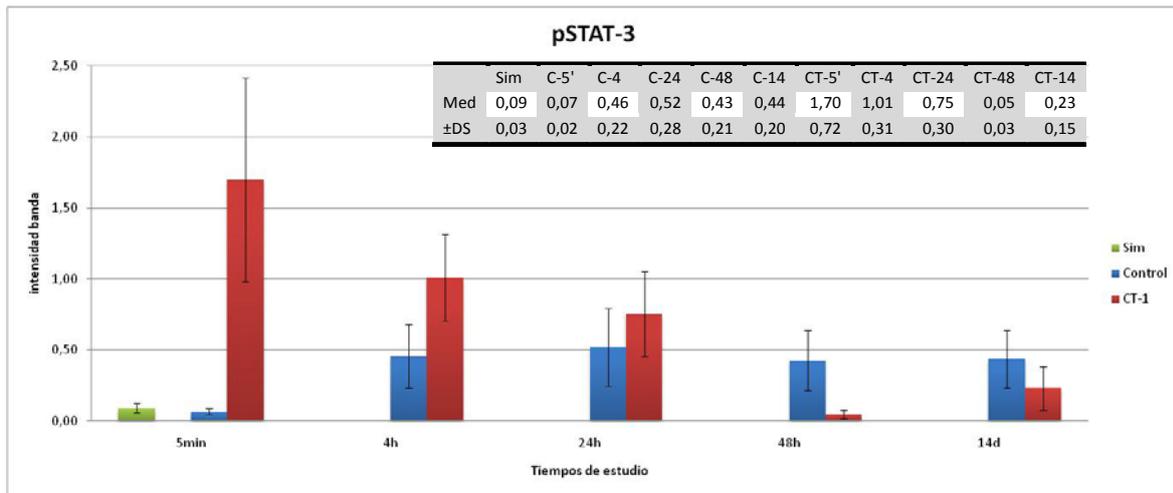
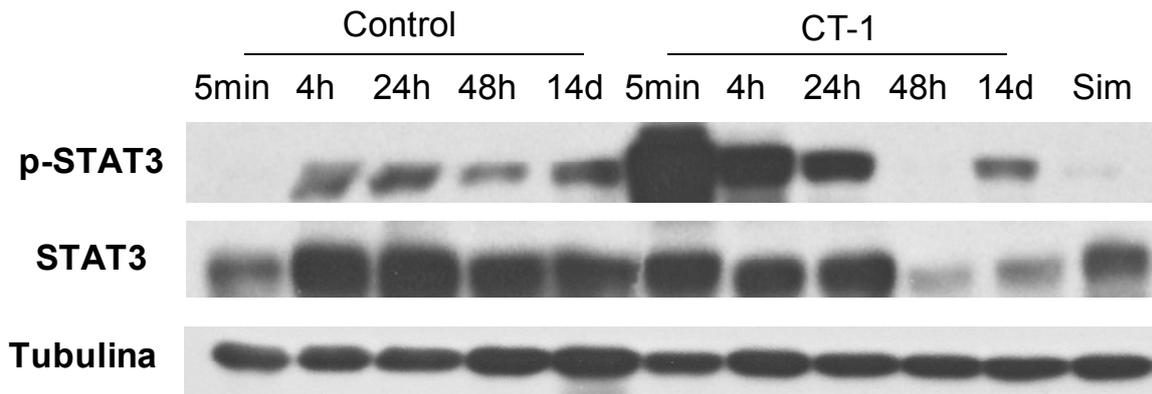


Figura .- Intensidad de la banda p-STAT3 a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

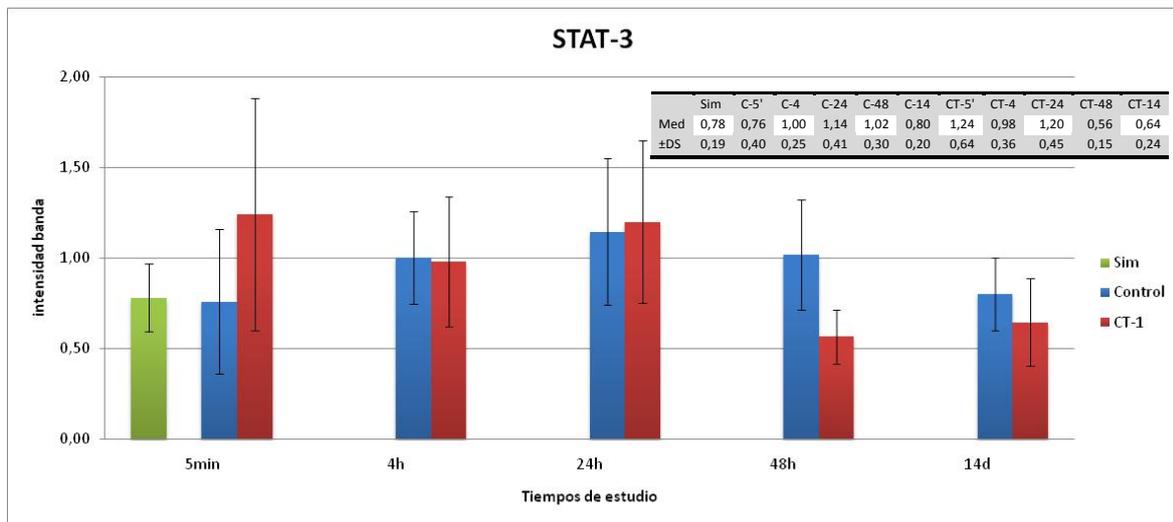


Figura .- Intensidad de la banda STAT3 a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

2.11.3.- Akt y p-Akt

El estudio de Akt y p-Akt realizado a los 5min, 4, 24 y 48 horas y 14 días, no demostró diferencias ni en la activación de Akt ni en el Akt total (Figuras).

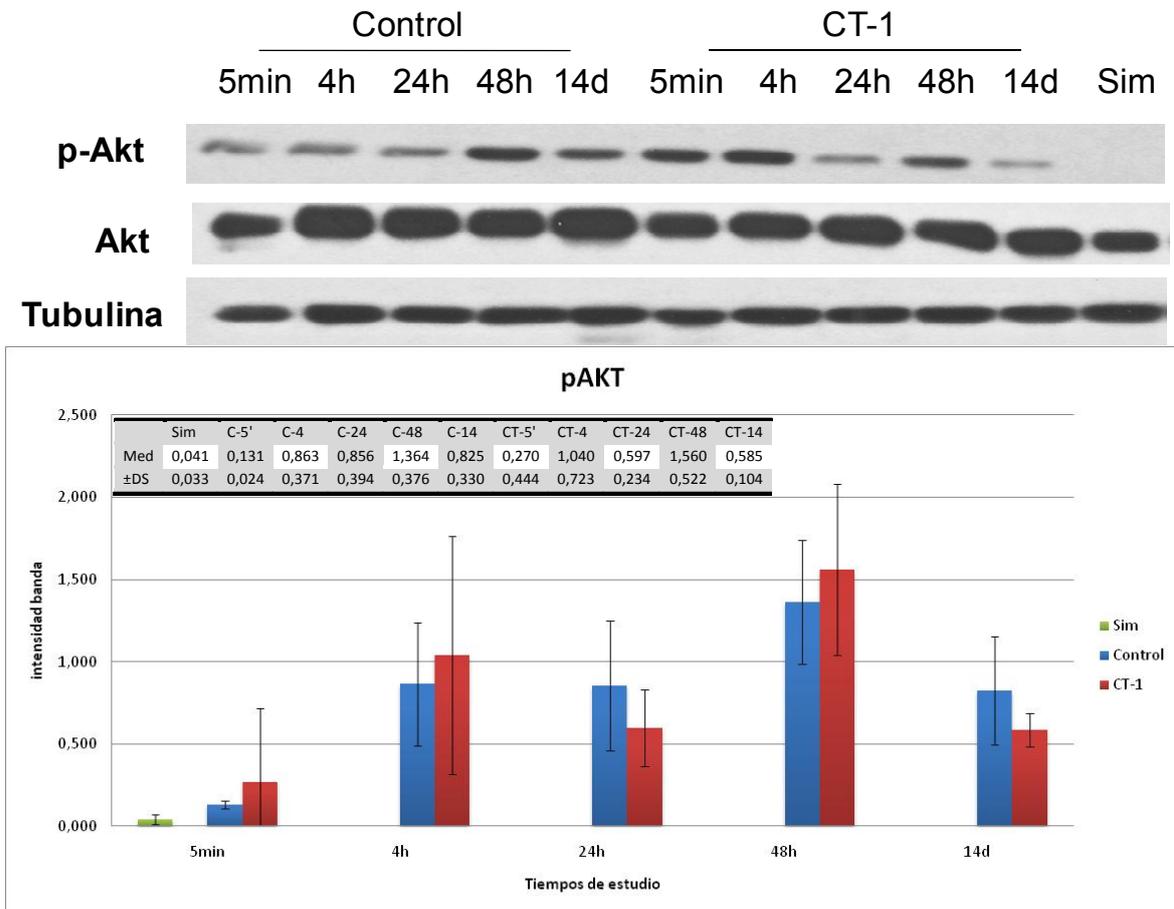


Figura .- Intensidad de la banda p-Akt a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

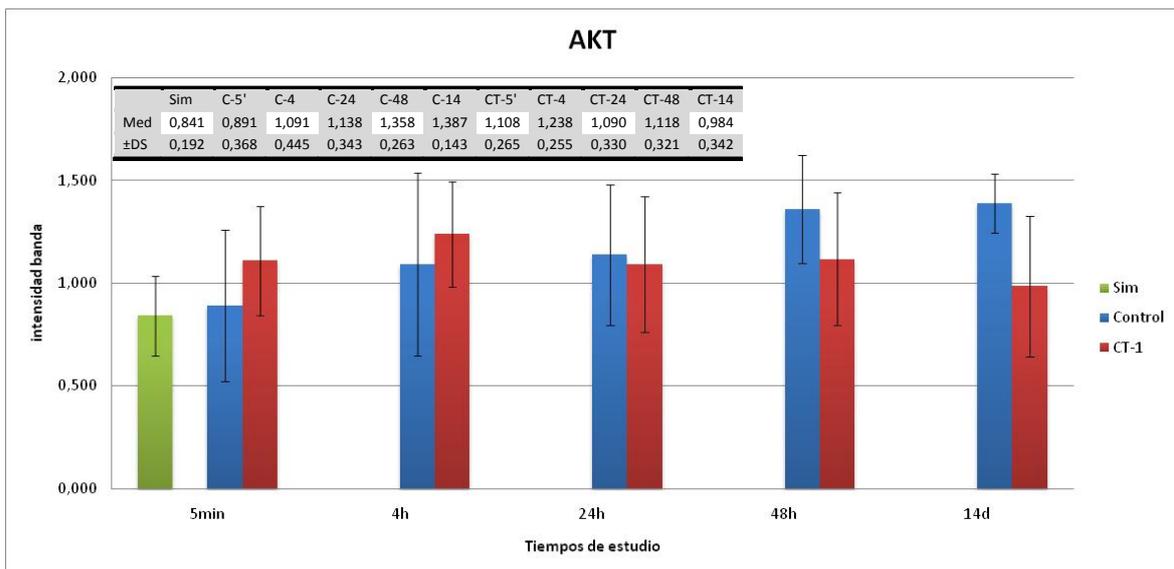


Figura .- Intensidad de la banda Akt a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

2.11.4.- ERK1/2 y p-ERK1/2

El estudio de ERK1/2 y p-ERK1/2 realizado a los 5min, 4, 24 y 48 horas y 14 días, al igual que ocurrió con el de STAT-3, solamente presentó diferencias en el primer momento de la valoración de p-ERK1/2 con un importante incremento en el Grupo CT-1 respecto a los demás ($p < 0,0001$). En el resto de los tiempos estudiados no observamos diferencias entre los Grupos Control y CT-1 aunque siguen presentando valores significativamente superiores al Simulado ($p < 0,001$) (Figuras).

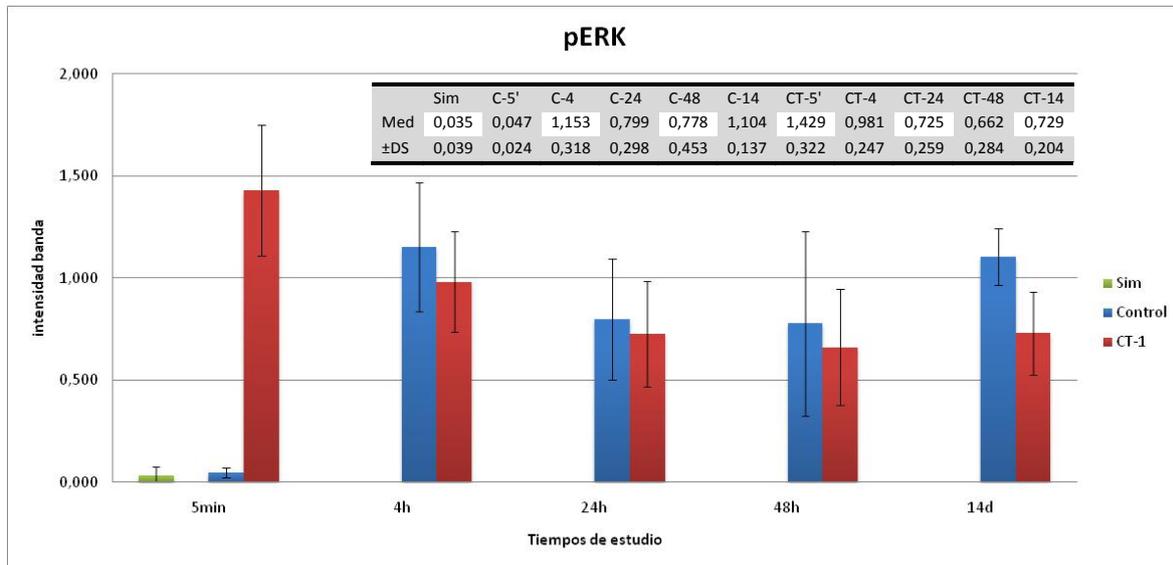
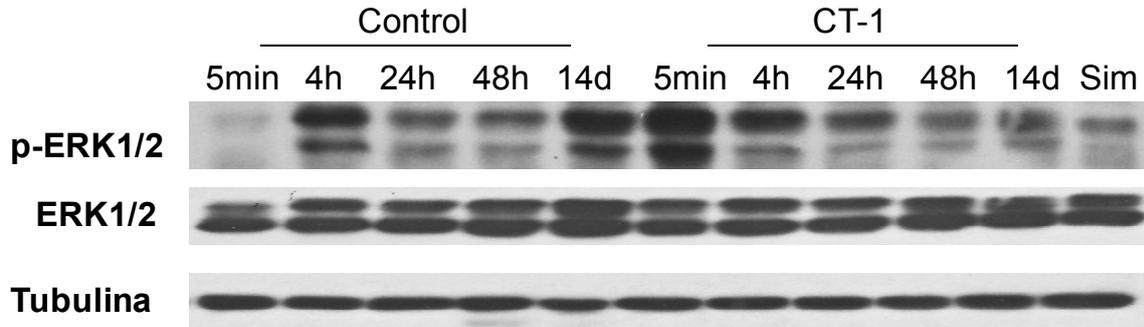


Figura .- Intensidad de la banda pERK1/2 a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

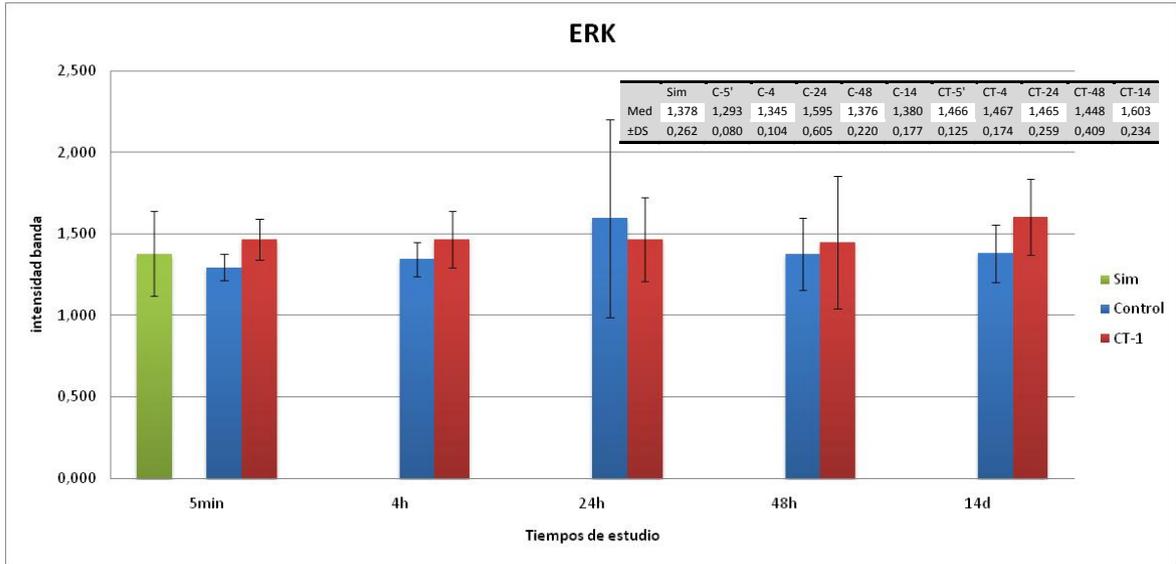


Figura .- Intensidad de la banda ERK1/2 a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

2.12.- Estudio de la apoptosis: Caspasa-3 activada

Utilizamos como marcador proapoptótico la caspasa-3 activada y en cuanto al estudio realizado a los 5min, 4, 24 y 48 horas y 14 días, observamos una diferencia significativas, $p < 0,05$, entre los grupos Control y CT-1 en todos los tiempos. Presentando el grupo Control diferencias con el grupo simulado a los mismos tiempos $p < 0,05$. Hay que describir qué se ve, como yo he hecho en las descripciones anteriores.

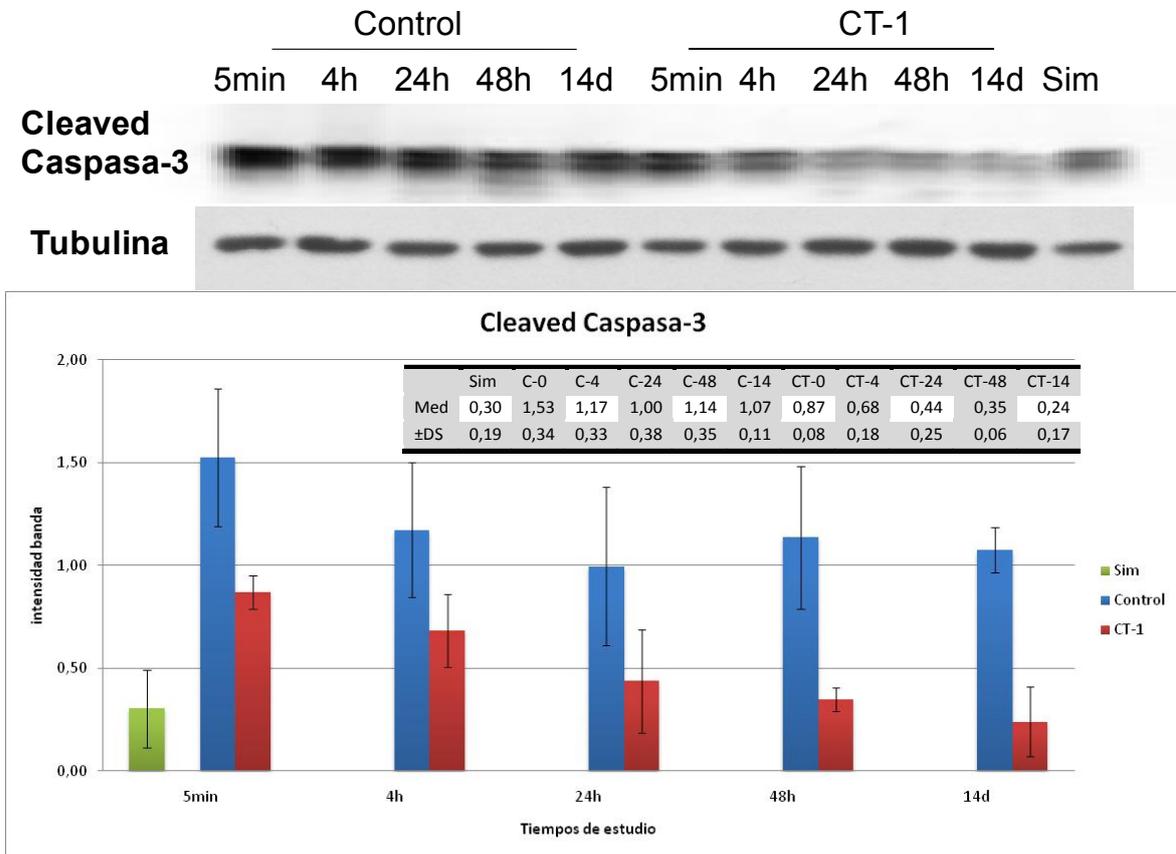
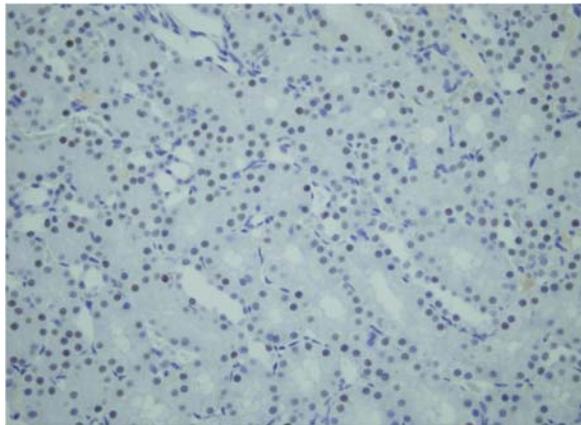
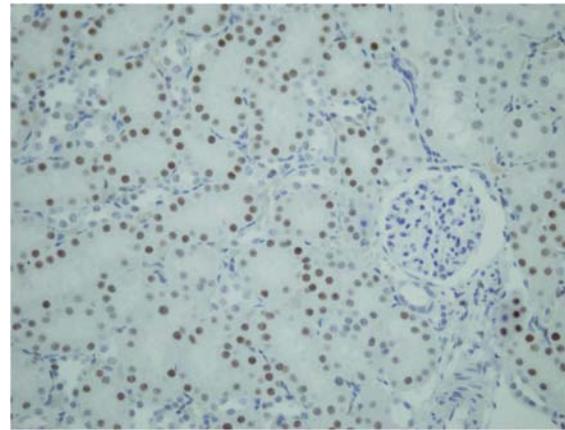


Figura .- Intensidad de la banda caspasa-3 activada a los 5min, 4, 24 y 48h y 14 días postreperfusión.

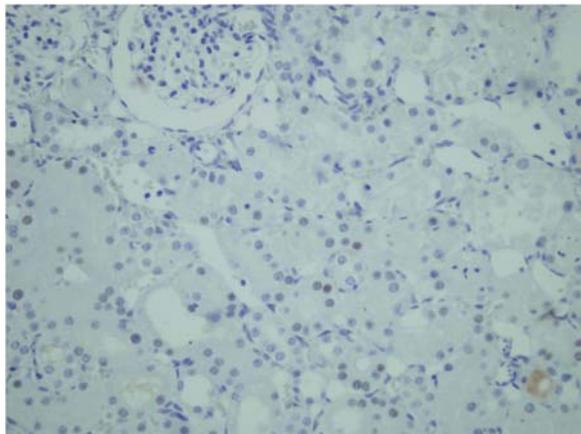
Los resultados de inmunohistoquímica observados a un aumento de 40X, apoyan los resultados de western blot, ya que tanto a las 24 como a las 48 horas, en los animales con I/R que habían recibido CT-1 la intensidad del marcaje de caspasa-3 era menor que en los I/R control en los cuales se observa una mayor tinción en el citoplasma de las células tubulares.



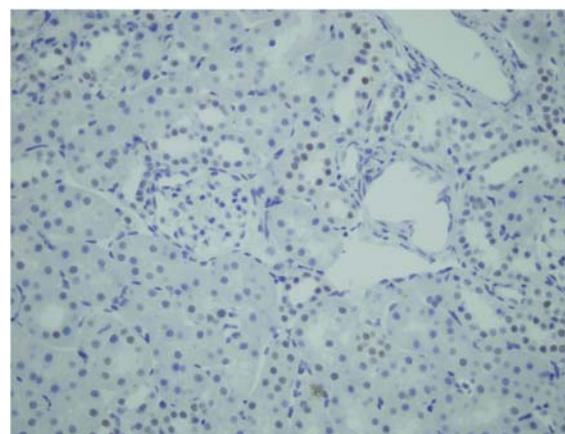
Control 24h



Control 48h



CT1 24h



CT1 48h

3.- Fase Control de Dosis para Preservación y Trasplante:

El estudio del radical libre del oxígeno anión superóxido, de la citocina proinflamatoria TNF- α y de la iNOS para evaluar la mejor dosis a emplear en el modelo de I/R demostró una ausencia de eficacia en la disminución de la producción del ASO, del TNF- α y de la activación de la iNOS en los grupos CT100 y CT200 (pNS) (animales tratados con 100 μ g/Kg y 200 μ g/Kg de CT-1), mientras que en los grupos CT400 y CT800 (animales tratados respectivamente con 400 μ g/Kg y 800 μ g/Kg de CT-1) se comprobó una disminución significativa ($p < 0,001$) en todas las variables estudiadas (Figuras).

La ausencia de diferencias significativas entre los grupos CT400 y CT800 (pNS) y el no disponer de estudios de toxicidad, nos hizo tomar la decisión de emplear la dosis menor, 400 μ g/Kg de CT-1, para la realización del modelo de I/R (Figuras).

3.1.- Anión superóxido

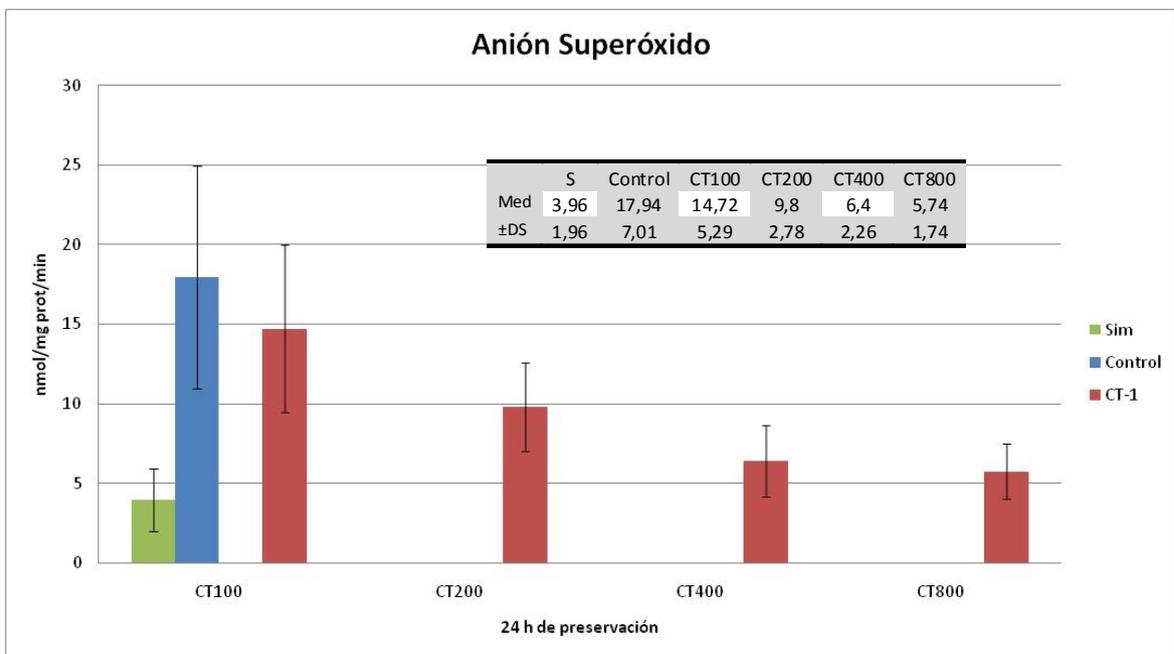


Figura .-Ritmo de producción del Anión Superóxido (nmol/mg prot/min).

3.2.- Factor de Necrosis Tumoral- α

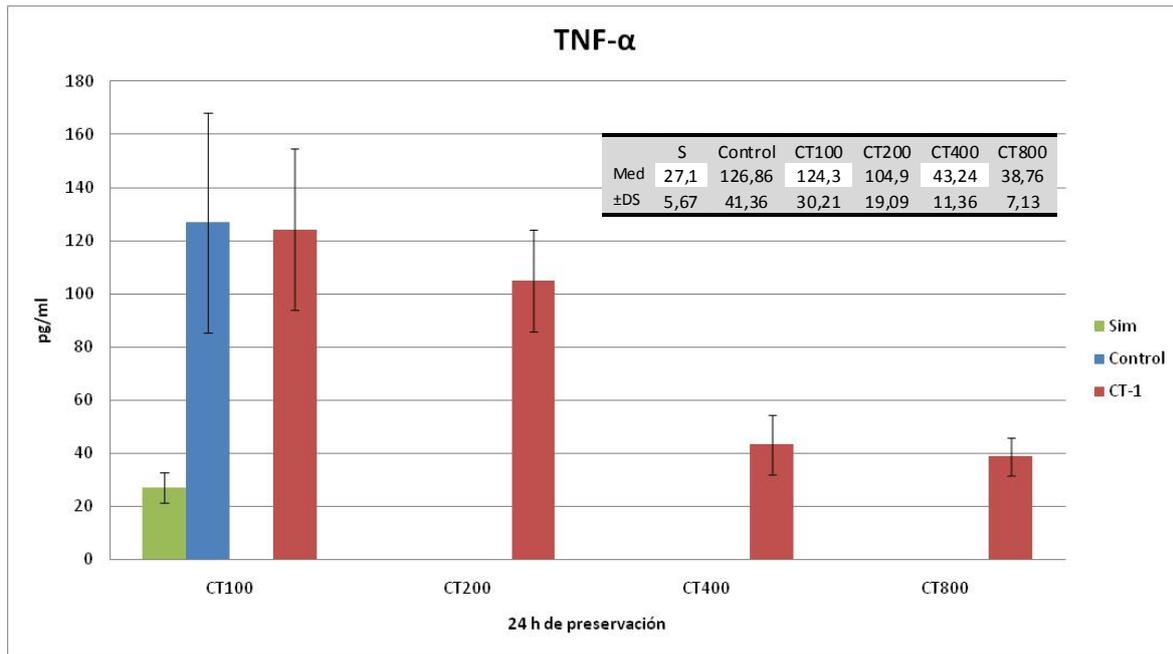


Figura .-TNF- α en solución de preservación (pg/ml).

3.3.- iNOS

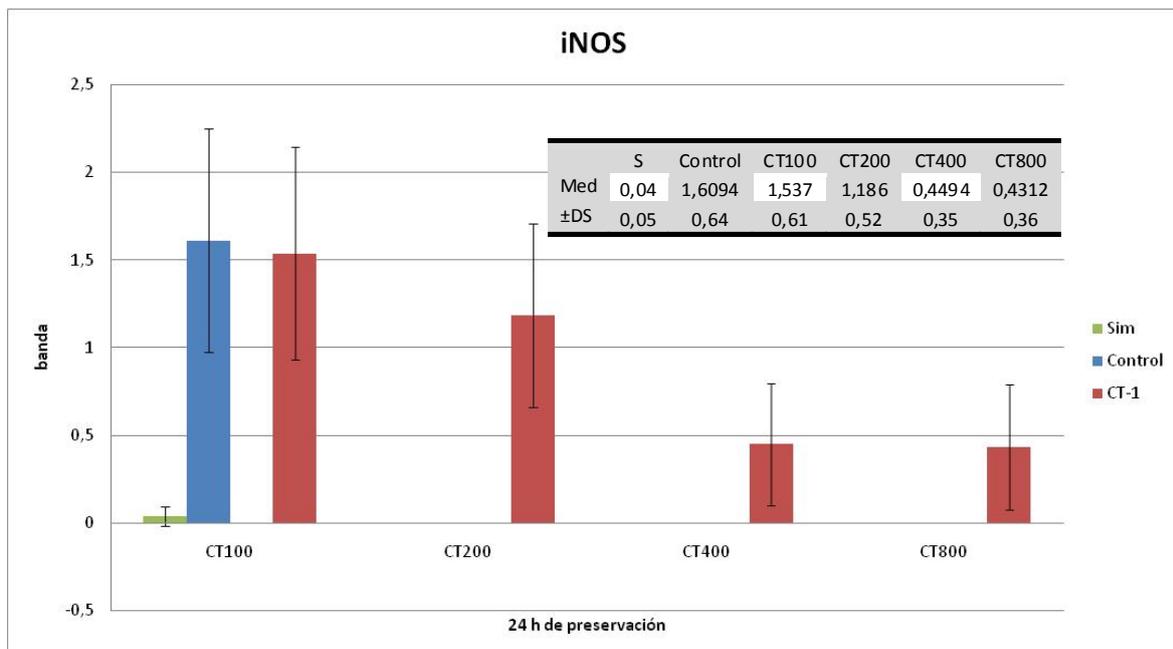
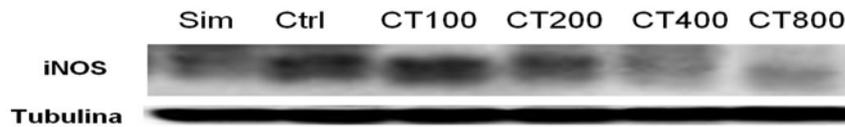


Figura .-iNOS en tejido renal preservado.

4.- Resultados de la fase preservación

4.1.- Estudio del estrés oxidativo: Anión superóxido

Los riñones del grupo I/R control presentan una mayor producción de anión superóxido que los observados en el Grupo Simulado desde las 6 horas de preservación ($p < 0,05$). Los riñones del grupo preservación que recibió CT-1 tienen menos producción de ASO que los del grupo preservación control a las 6 y 24 horas ($p < 0,05$) (Figura)

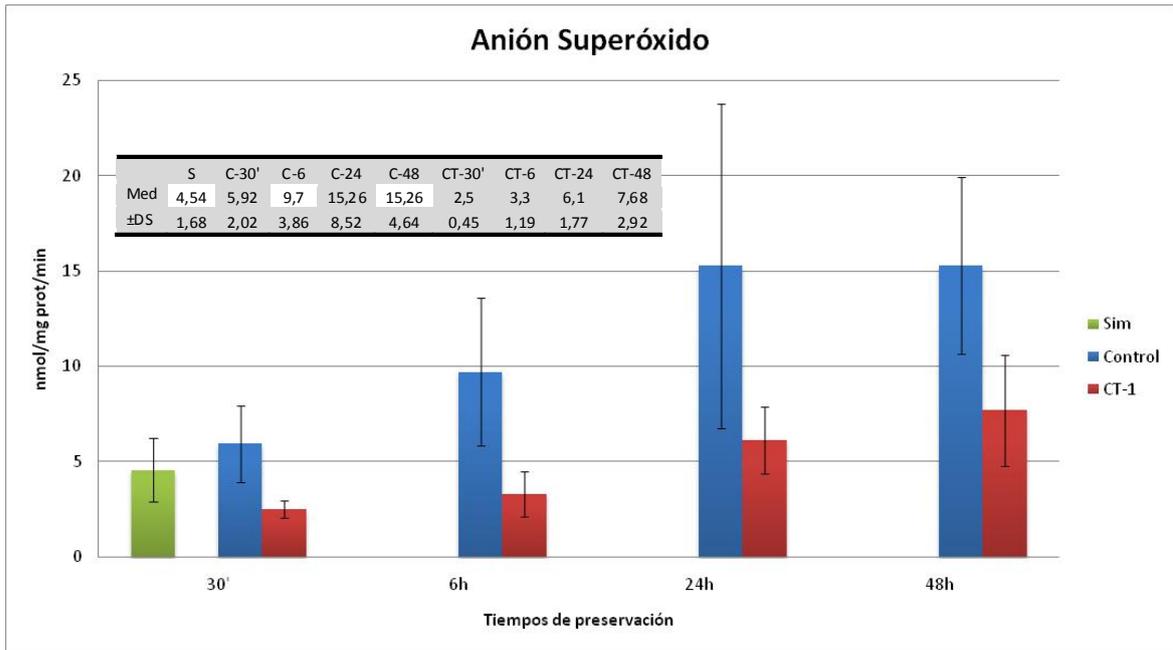
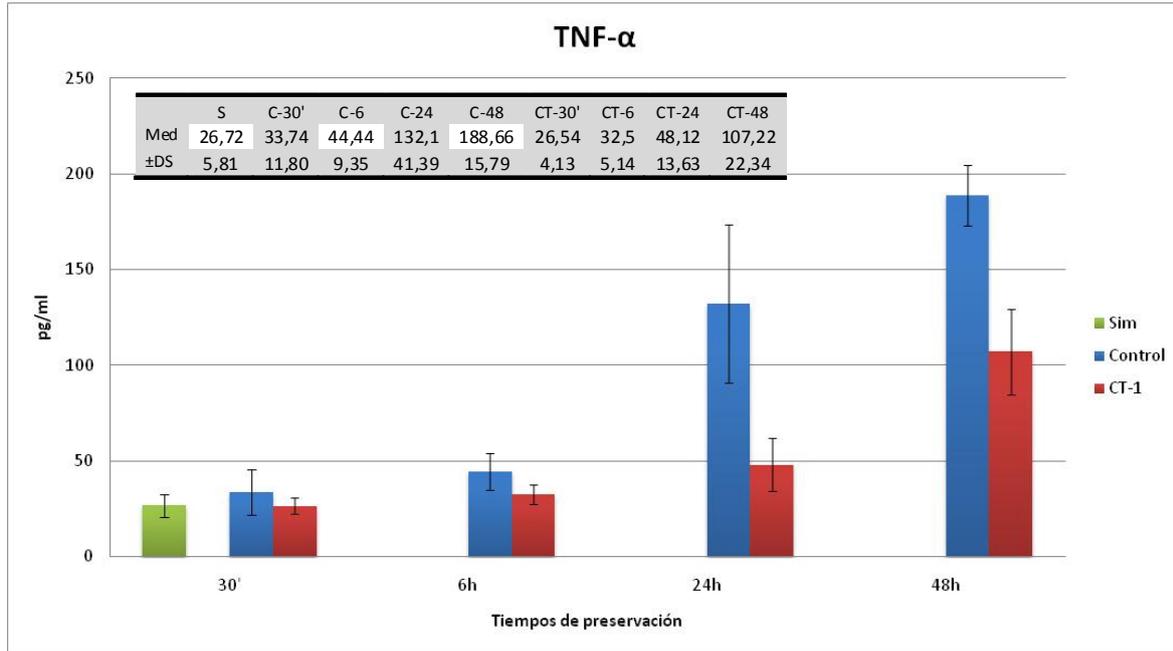


Figura .-Niveles de Anión Superóxido (U/mg prot/min) en la de preservación

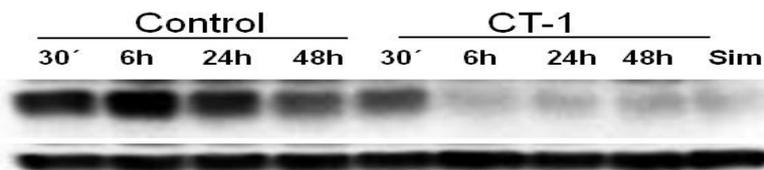
4.2.- Estudio de la citocina: TNF- α

El estudio de la concentración de TNF- en la solución de preservación demostró un incremento de la cantidad de esta citocina en el Grupo Control respecto del CT-1 a las 24 y 48 horas de preservación ($p < 0,05$). A las 48 horas ambos grupos presentaron diferencias significativas con el Simulado ($p < 0,05$) (Figura).



4.3.- Estudio de la iNOS

La activación de la iNOS se observó significativamente superior en el Grupo Control respecto al CT-1 ($p < 0,01$). En ambos grupos se comprobó una disminución de la iNOS en los diferentes tiempos ensayados siendo esta significativa a las 48 horas ($p < 0,05$). El Grupo Control siempre presentó diferencias con el Simulado ($p < 0,05$) mientras que el Grupo CT-1 solamente las tuvo a los 30 minutos ($p < 0,05$) (Figura)



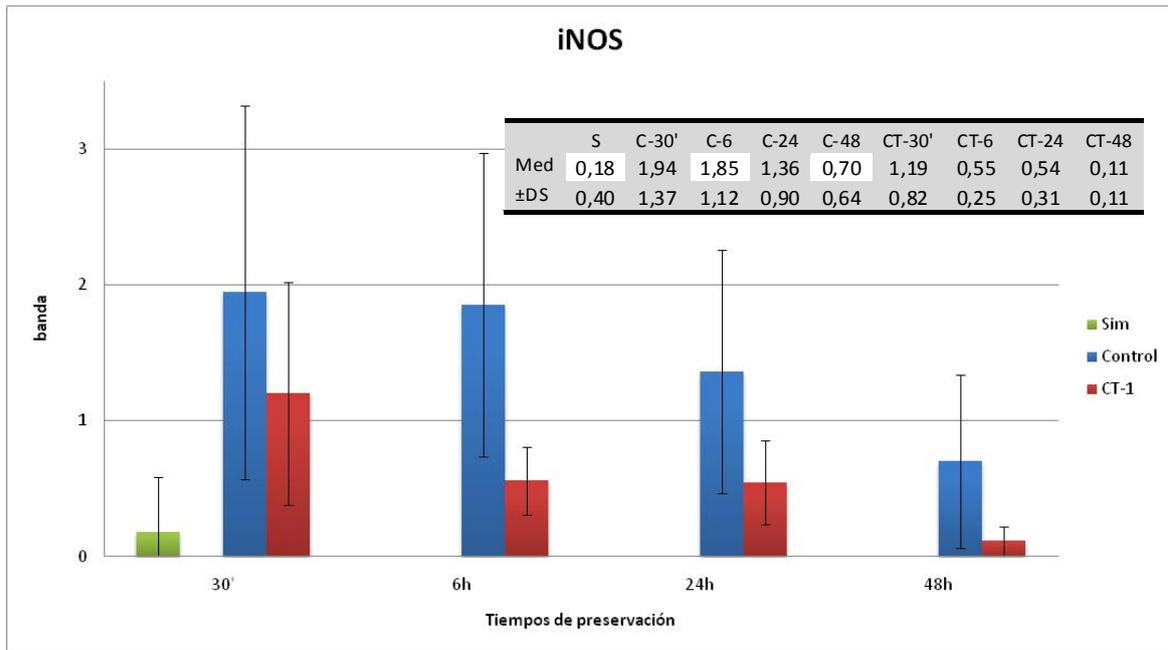
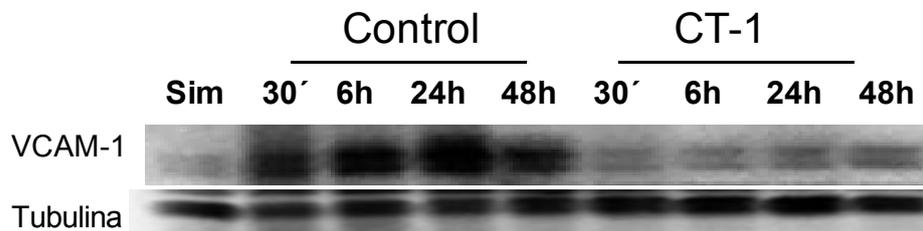


Figura .- Intensidad de la banda iNOS a los 30', 6, 24 y 48 h.

4.4.- Estudio de la interacción leucocito-endotelio: VCAM-1

El estudio de VCAM-1 demostró un aumento significativo, en todos los tiempos, del Grupo Control respecto al Simulado y CT-1 entre los que no hubo diferencias (pNS) (Figura).



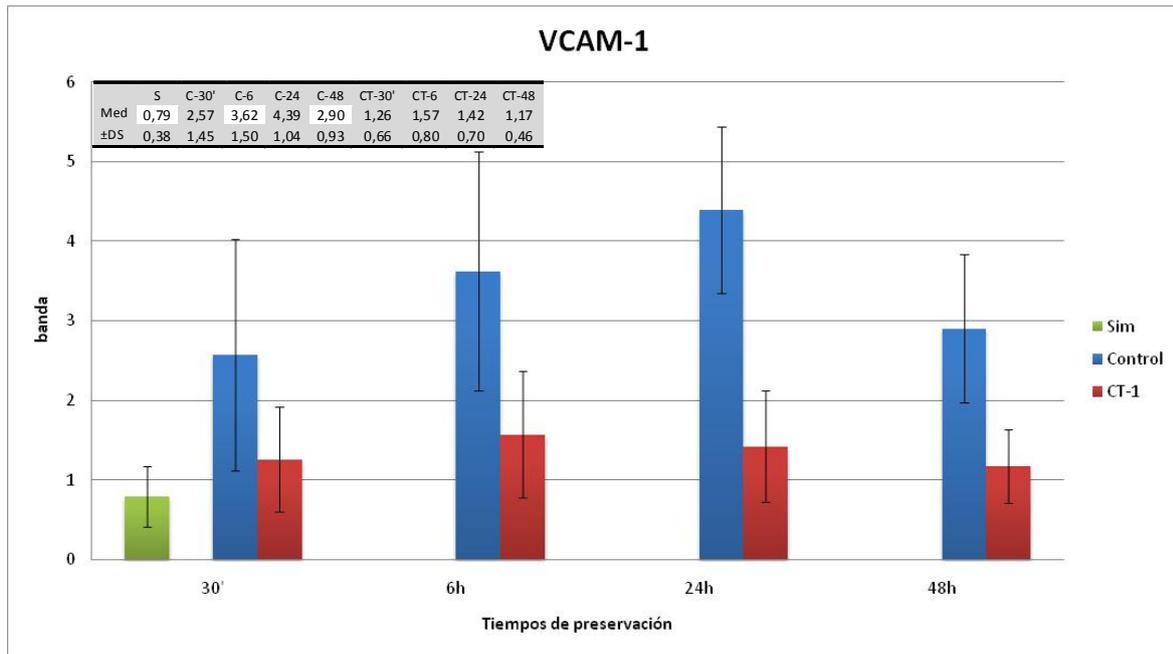
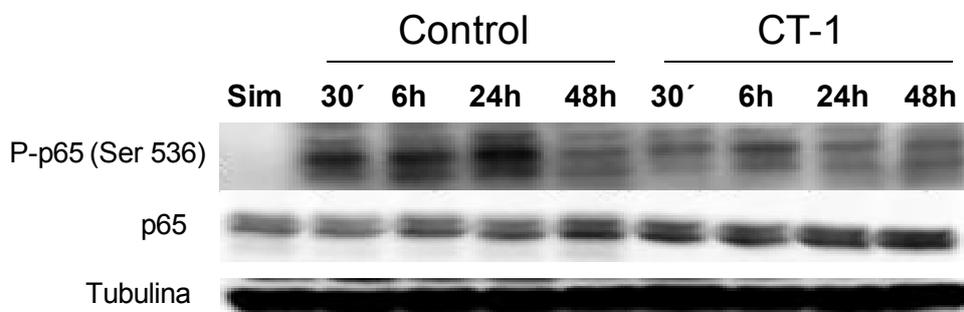


Figura .- Intensidad de la banda VCAM-1 a los 30', 6, 24 y 48 h.

4.5.- Valoración de la transcripción nuclear: NF-κB

Mientras que el estudio de NF-κB p65, no demostró diferencias (pNS) entre ningún Grupo ni tiempo en pNF-κB p65 observamos valores superiores en los Grupos CT-1 y Control respecto al Simulado (p<0,01), no existiendo diferencias entre ellos (Figuras).



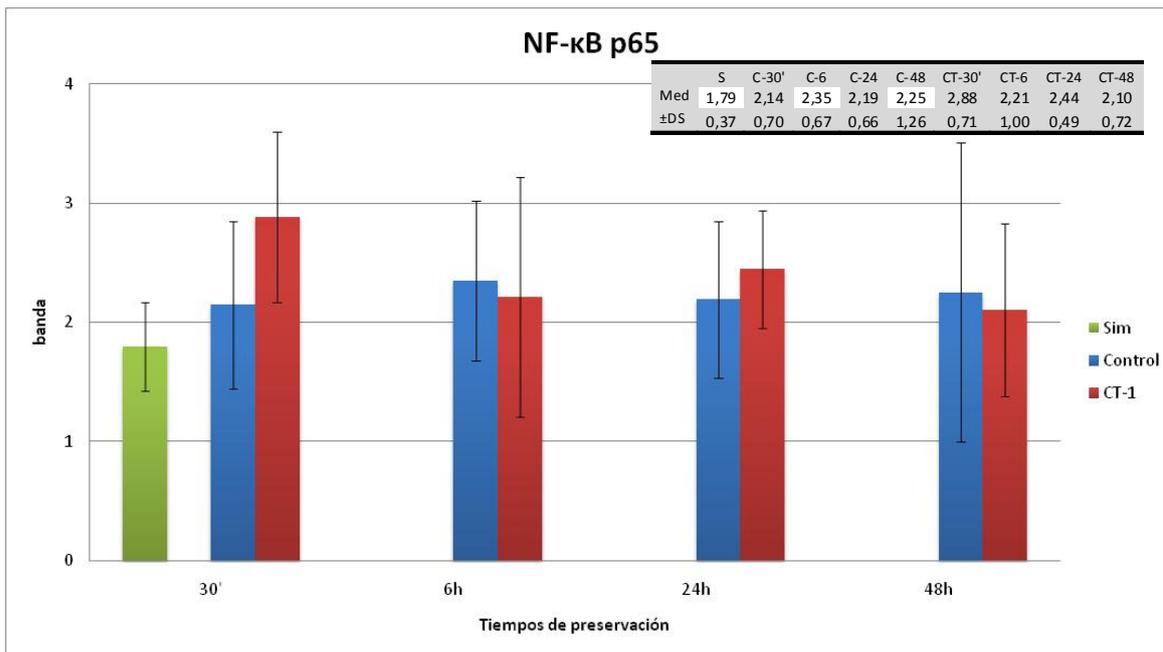


Figura .- Intensidad de la banda NF-κB a los 30', 6, 24 y 48 h.

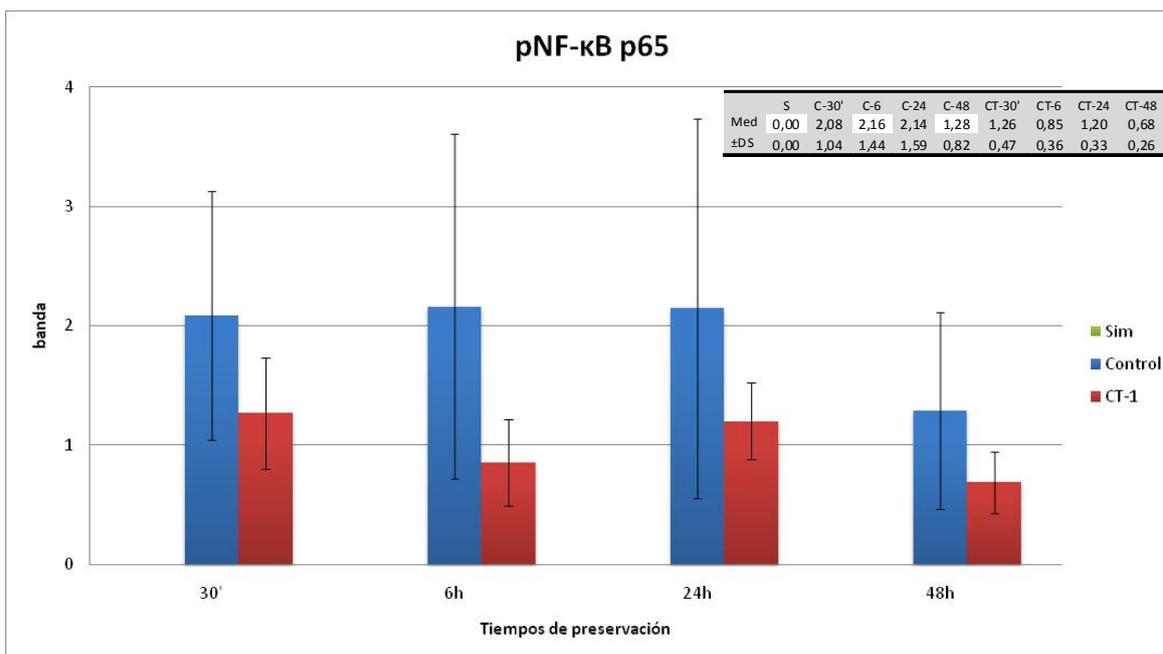


Figura .- Intensidad de la banda pNF-κB a los 30', 6, 24 y 48 h.

5.- Resultados de la fase trasplante renal

5.1.- Supervivencia

El estudio de la supervivencia hasta el día 30 postrasplante demostró la alta mortalidad en el Grupo Control que al quinto día ya era del 60% y llegó al 90% al mes de la cirugía. Este Grupo presentó diferencias significativas con los Grupos Simulado y CT-1 desde el cuarto día postrasplante hasta la finalización del estudio ($p < 0,001$). El día 30 del estudio de supervivencia fue el único que presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el Grupo Simulado y el CT-1 (Figura)

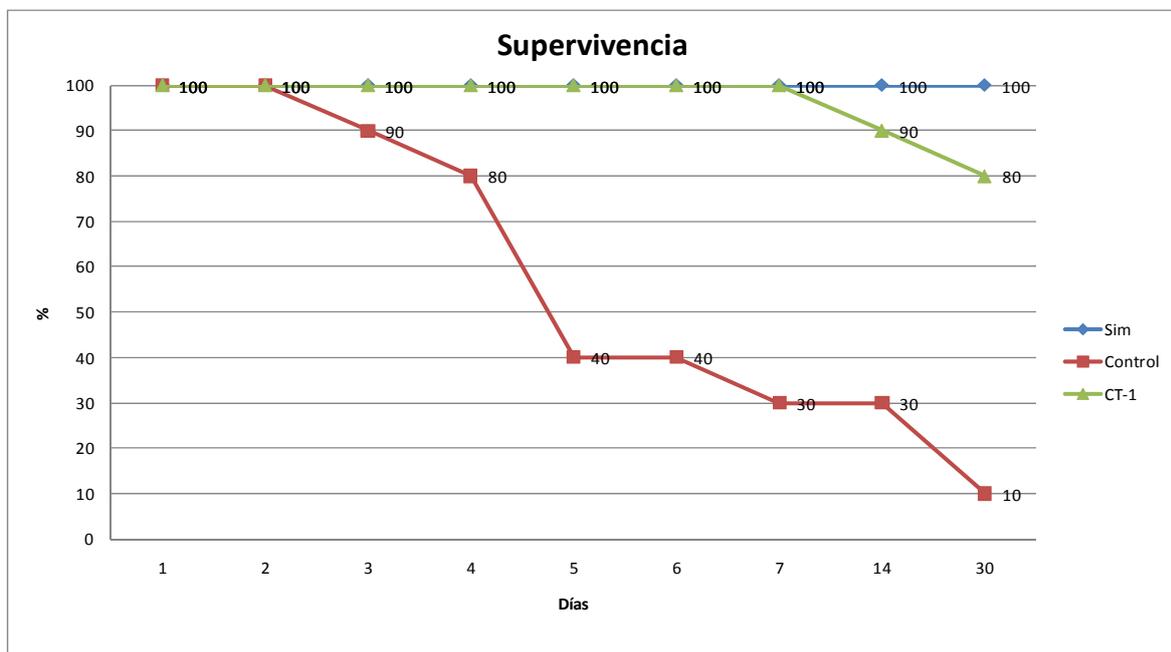


Figura .- Supervivencia tras el trasplante renal; expresado en % de animales vivos.

5.2.- Estudio de la función renal:

5.2.1.- Creatinina plasmática

El estudio de la creatinina sérica y de su aclaramiento, realizado a las 24 horas 3, 7 y 14 días, demostró unos valores de creatinina plasmática significativamente mayores en todos los tiempos estudiados ($p < 0,05$), en el grupo I/R control con respecto al grupo simulado. El grupo I/R tratado con CT-1 tenía unos valores menores de creatinina plasmática que el grupo I/R control ($p < 0,05$) y no presentó diferencias con el Simulado (pNS) (Figura).

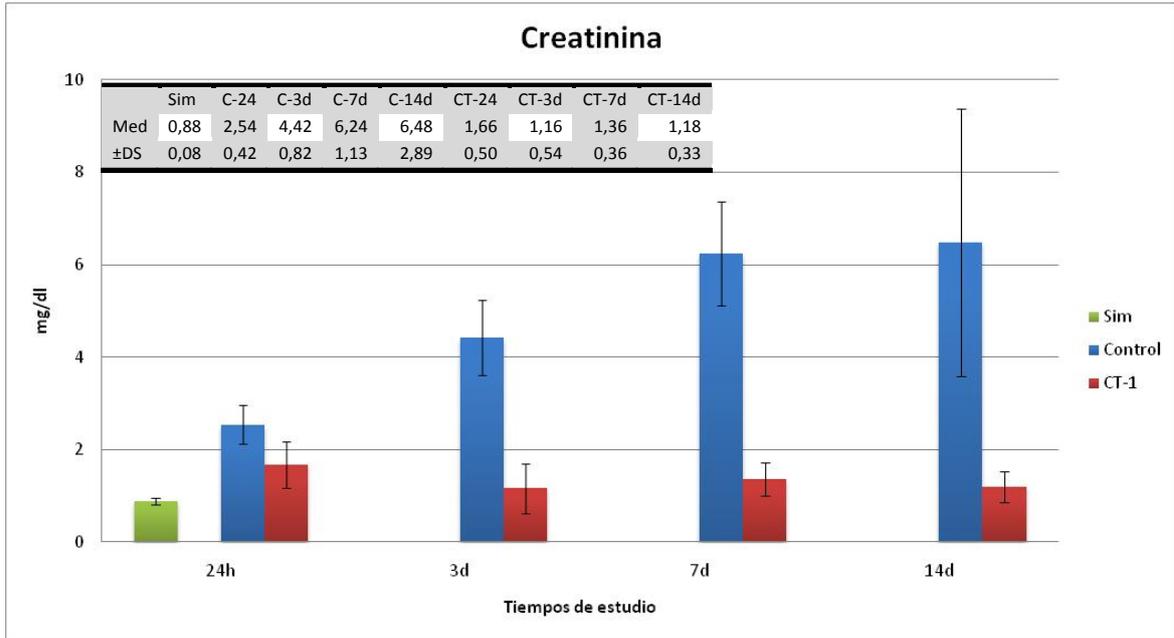


Figura 28.- Concentración de creatinina en plasma (mg/ml) a las 24h, 3, 7, y 14 días post-trasplante.

5.2.2.- Aclaramiento de la creatinina

La disminución del aclaramiento de la creatinina observado en todos los tiempos del Grupo Control es significativa ($p < 0,05$) respecto a los Grupos Simulado y CT-1 entre los que no existen diferencias (pNS) (Figura).

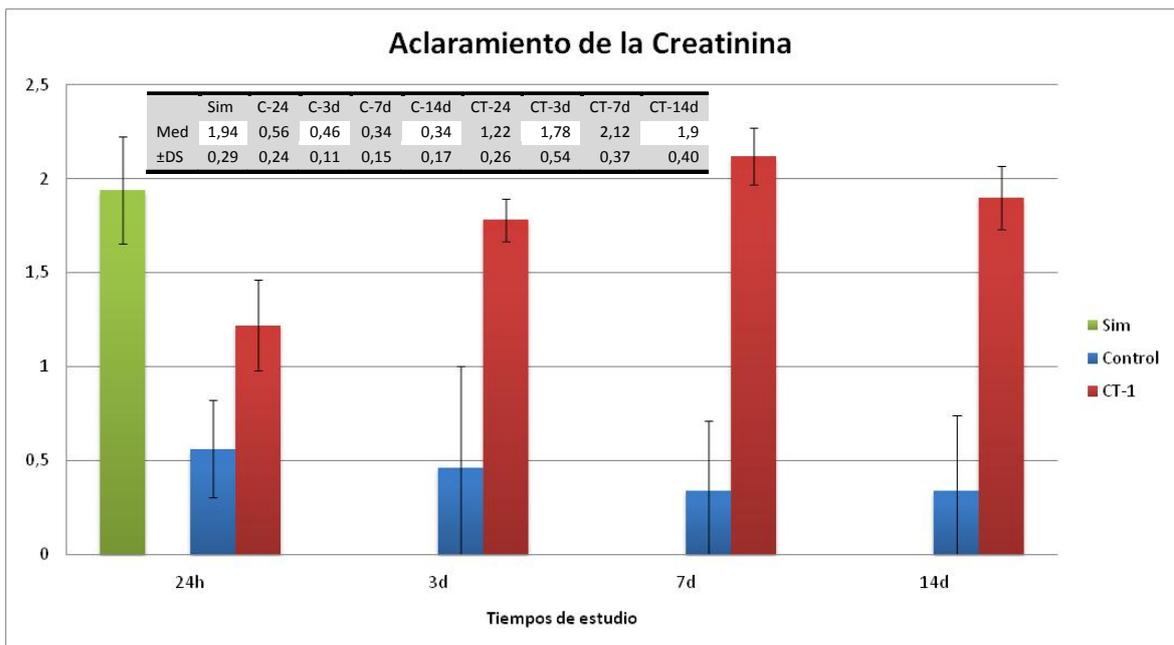


Figura .- Aclaramiento de creatinina en plasma a las a las 24h, 3, 7, y 14 días post-trasplante.

5.3.- Estudio del estrés oxidativo: Anión Superóxido.

Se comprueba un incremento de la producción de ASO en el Grupo Control conforme pasan los días postrasplante, presentando en todos ellos diferencias significativas con los Grupos Simulado y CT-1 entre los que no existen diferencias (pNS) (Figura).

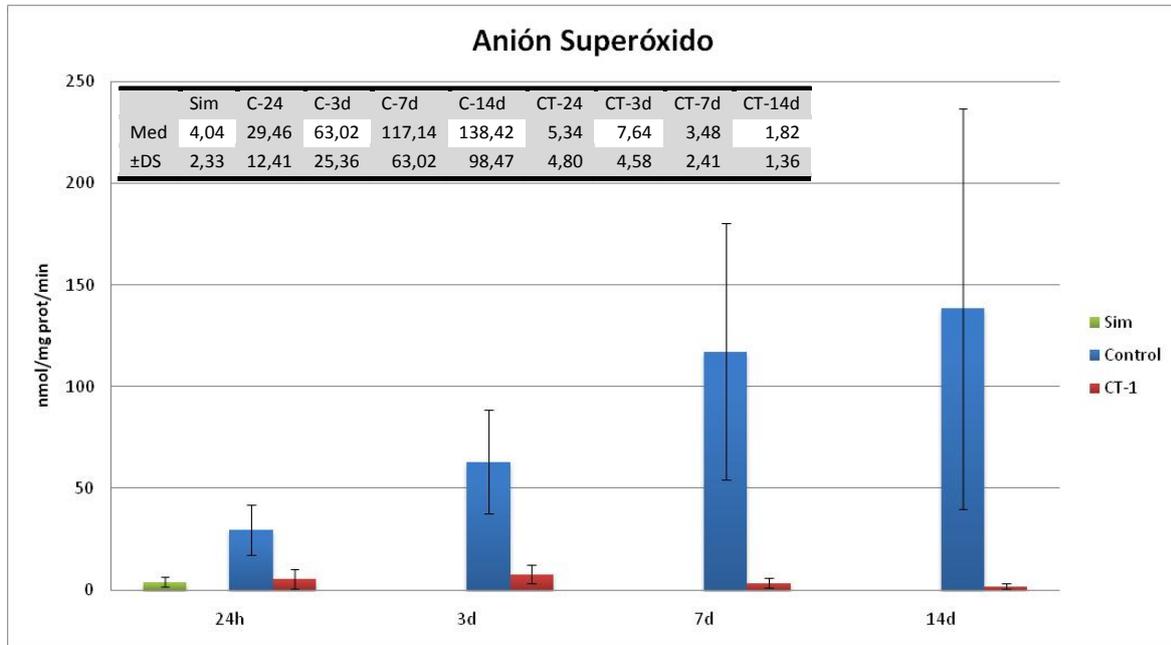


Figura .- Producción de anión superóxido.

5.4.- Estudio de las Citocinas:

5.4.1.- Factor de Necrosis Tumoral- α

El TNF- α se incrementa significativamente ($p < 0,01$) en el grupo trasplante control con respecto al simulado y en todos los tiempos observamos unos valores de TNF superiores en el grupo control que el tratado con CT-1, siendo estas diferencias significativas ($p < 0,05$), no existiendo diferencias entre los Grupos Simulado y CT-1. (pNS) (Figura).

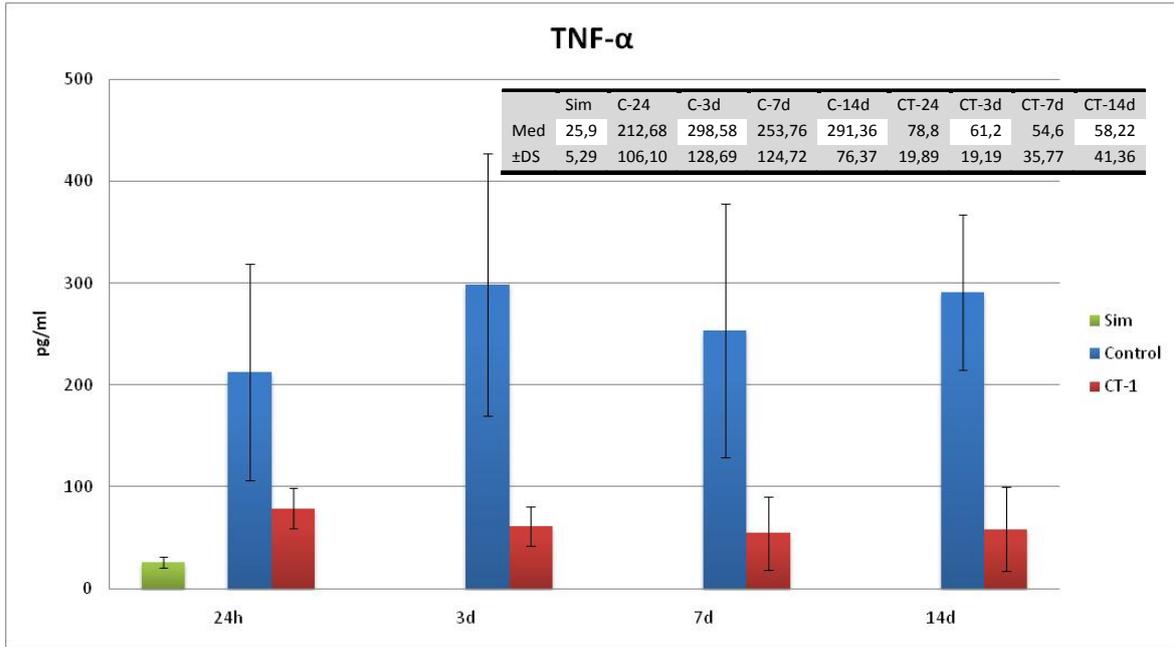


Figura .- Valores de TNF- α (pg/ml).

5.4.2.- Interleucina-6

Al tercer día de evolución postrasplante observamos un incremento significativo de la IL-6 en el Grupo CT-1 respecto a los otros dos ($p < 0,05$) no comprobándose diferencias entre otros tiempos y/o Grupos (Figura).

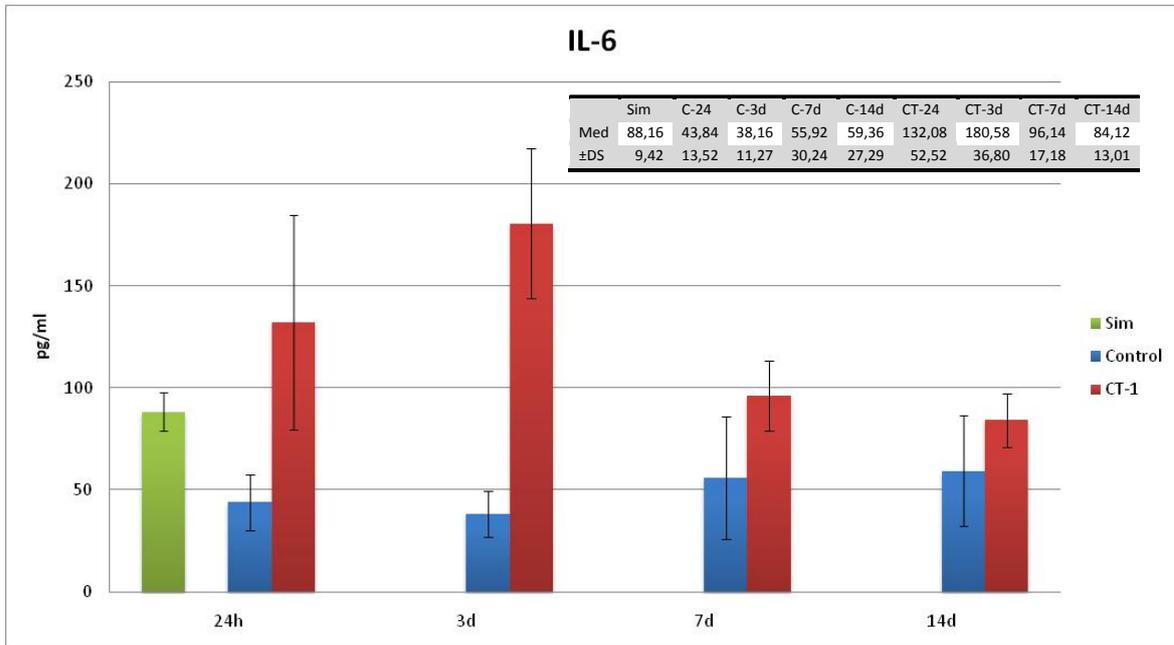


Figura 46.- Valores de IL-6 (pg/ml).

5.5.- Estudio de la lesión endotelial:

5.5.1.- ICAM-1 soluble

El estudio de la sICAM-1 evidenció un incremento significativo ($p < 0,001$) en el Grupo Control respecto al Simulado y CT-1, no existiendo diferencias entre estos (Figura).

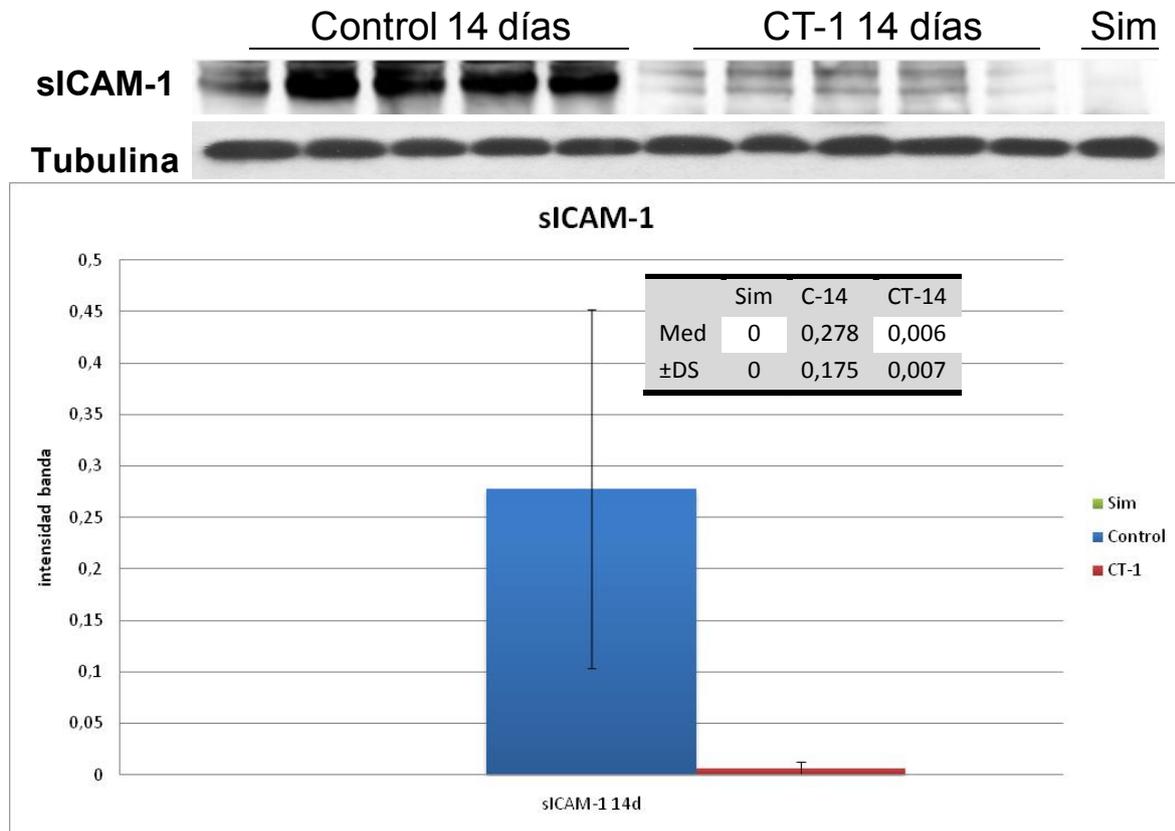
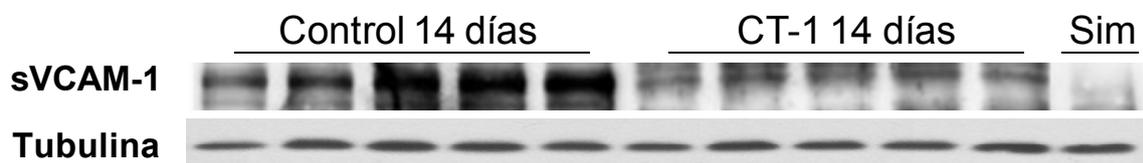


Figura .- Intensidad de la banda sICAM.

5.5.2.- VCAM-1 soluble

Al igual que en el caso anterior, el estudio de la sVCAM-1 evidenció un incremento significativo ($p < 0,001$) en el Grupo Control respecto al Simulado y CT-1, no existiendo diferencias entre estos (Figura).



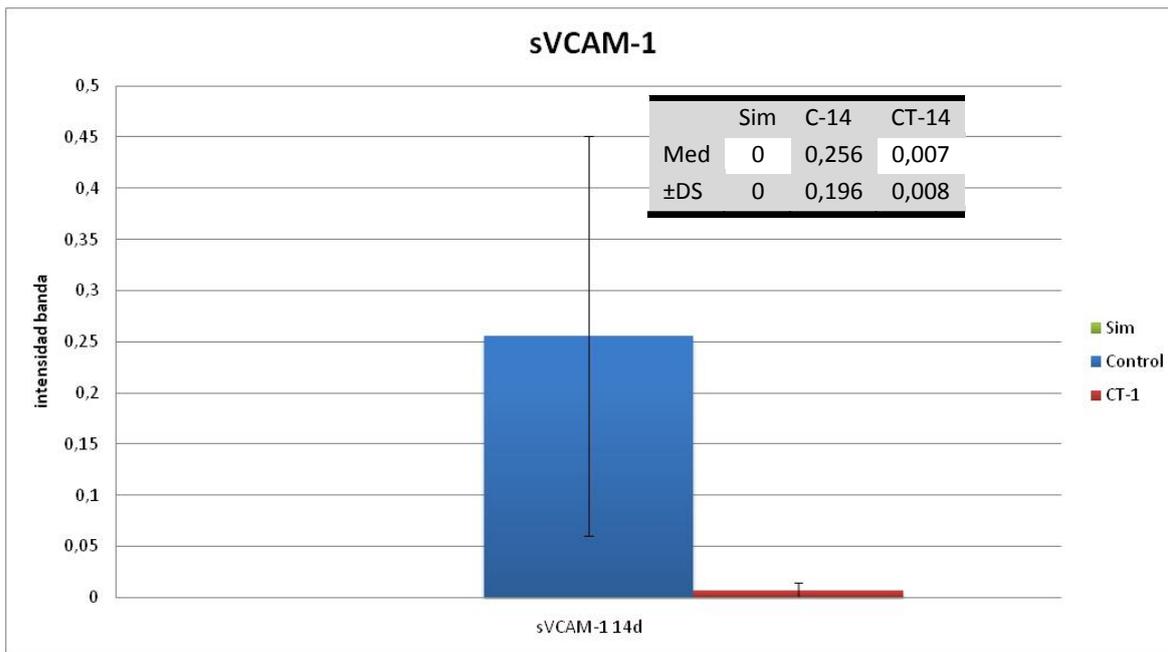
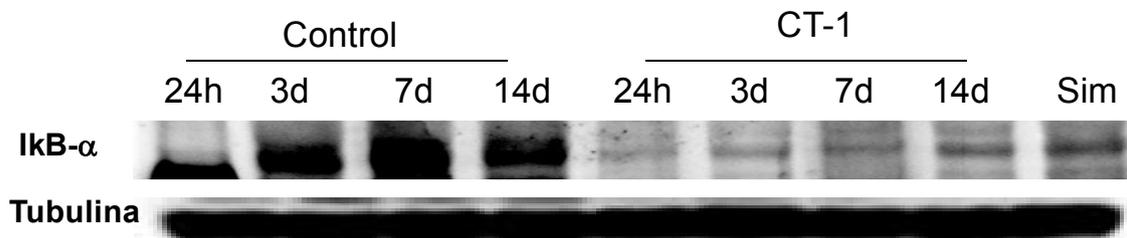


Figura .- Intensidad de la banda sVCAM.

5.5.- Estudio de la activación del factor de transcripción nuclear κ B: $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$

Comprobamos un incremento significativo en el Grupo Control, en todos los tiempos, respecto a los otros Grupos, entre los que no hubo diferencias (Figura).



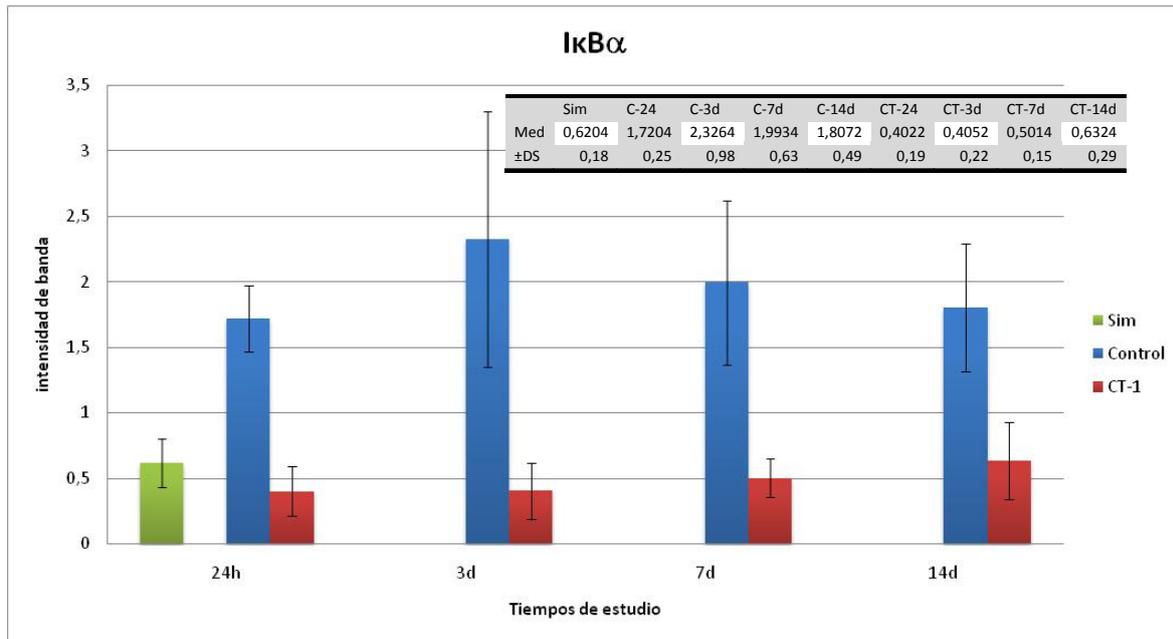


Figura .- Intensidad de la banda IκB-α a las 24 horas, 3, 7 y 14 días post-trasplante.

V.- DISCUSIÓN

V.- DISCUSIÓN

El síndrome de I/R está representado por una amplia variedad de manifestaciones clínicas que son a la vez causa y consecuencia de múltiples alteraciones sistémicas que forman parte de la amplificación de la respuesta inflamatoria e inmunológica de los pacientes quirúrgicos. Su fisiopatología es el resultado de una compleja interacción celular y humoral en la que intervienen el endotelio, neutrófilos, complemento, linfocitos, CAMs, RLOs y mediadores de la inflamación, entre otros, los cuales favorecen el daño ultraestructural del aparato energético celular y la muerte celular. La gravedad de esta respuesta está determinada por la intensidad de la lesión primaria. La magnitud del trauma y la propia cirugía mayor condicionan un primer daño al paciente crítico, el cual rápidamente es seguido por una respuesta inflamatoria, que se constituye como una segunda agresión que determina en una buena parte de los casos el pronóstico crítico y la recuperación de los enfermos. Por este motivo, la modulación de esa respuesta, es un factor esencial que permite modificar las evoluciones adversas. Se ha despertado un gran interés científico en torno a estos problemas y, en especial, en la manera en la que se debe facilitar el restablecimiento de la homeostasis en las horas inmediatamente siguientes a los eventos que demandan por su complejidad una atención integral del cirujano. Se han formulado múltiples alternativas, algunas aún en fase experimental, y es muy importante el desarrollo de nuevas terapias que permitan abordar y objetivar rutinariamente un problema mayor de los pacientes quirúrgicos. Un caso especial de I/R en el que se ha centrado este estudio es el del trasplante renal.

El hallazgo de la acción de la CT-1 mejorando la lesión por I/R, en otros tejidos^{312,315,317,353,359,363,457-459} abre el camino para su utilización en todo proceso quirúrgico que

implique una situación isquémica y su consiguiente reperfusión, y su uso puede suponer una importante mejora en la viabilidad de los trasplante de riñón.

En el modelo experimental que se ha desarrollado en el presente trabajo nos hemos planteado estudiar el síndrome de la respuesta inflamatoria, sus consecuencias y su control con la administración profiláctica de un fármaco de nueva generación en fase experimental, la CT-1, con la doble intención de incrementar el conocimiento de la fisiopatología de estos procesos y profundizar en la comprensión de otros mecanismos de acción del fármaco empleado, que puedan ayudar a su utilización convencional o incluso abrir nuevos campos terapéuticos.

Hemos dividido el presente trabajo en cuatro fases:

- ✚ En la primera fase, mediante un modelo experimental de I/R renal, evaluamos el efecto que ejerce la CT-1 sobre la respuesta inflamatoria.
- ✚ En la segunda fase, mediante un modelo experimental de preservación, evaluamos el efecto que ejerce la CT-1 en el líquido de preservación sobre la inflamación del órgano preservado.
- ✚ En la tercera fase, mediante un modelo experimental de trasplante renal, evaluamos el efecto que ejerce la CT-1 sobre la respuesta inflamatoria del riñón trasplantado.

1.- Discusión de Resultados para la Evaluación de la Dosis

Para evaluar la dosis más adecuada de Cardiotrofina-1 (CT1rat drobiosystems, 06092500-02), se hicieron cuatro grupos con diferentes concentraciones: Simulado, CT200 (200 µg/Kg CT-1), CT400 (400 µg/Kg CT-1), y CT800 (800 µg/Kg CT-1), y medimos la producción del ASO (O_2^-) que es una especie reactiva derivada del oxígeno que se origina debido a una agresión tisular.

La cantidad de ASO producida en el riñón por los grupos CT400 y CT800 es significativamente inferior a la del grupo simulado. Además no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CT400 y CT800, por lo que seleccionamos CT400 como la dosis adecuada para nuestro estudio.

La disminución de la producción de ASO inducida por la CT-1, junto con la revisión bibliográfica sobre la CT-1 y la experiencia previa en diferentes modelos experimentales de respuesta inflamatoria [Iniguez M. y cols., 2006] nos hicieron decidir la dosis y el momento de administración respectivamente

2.- Isquemia Renal Caliente + Reperfusión (I/R)

La fisiopatología del daño originado por la I/R renal no se conoce íntegramente pero sí se han investigado detalladamente muchos fenómenos claves en el daño que sigue a la isquemia tisular y posterior fallo renal, como son la vasoconstricción, el estrés oxidativo, la activación de células endoteliales, la infiltración renal de células inflamatorias, la inflamación renal, la despolarización y necrosis del epitelio tubular y el edema intersticial.

Aunque se ha estudiado detalladamente el papel y el efecto de la CT-1 en la I/R cardíaca y hepática, no tenemos conocimiento de que se haya estudiado en la I/R renal. En esta fase de nuestro estudio experimental, hemos demostrado que la administración profiláctica intravenosa de CT-1 previene el daño producido por la I/R en el riñón, lo que se demuestra por una mejoría de las lesiones estructurales y funcionales del riñón que recibe CT-1 con respecto a los animales que no lo reciben. Estos datos están de acuerdo con estudios publicados en modelos experimentales de I/R en otros órganos en los que la CT-1, presenta efectos protectores frente al daño por I/R.^{312,315,317,353,359,363,457-459} A continuación pasamos a discutir detalladamente estos resultados.

2.1.- Supervivencia

El grupo de animales tratado con CT-1 tiene una supervivencia a los 14 días post-reperfusión mucho mayor (80%) que la del grupo control (50%), lo que coincide con los efectos descritos por otros autores que demuestran el importante papel que tiene la administración de CT-1 en el mantenimiento de la función de otros órganos después de la I/R^{312,315,317,353,359,363,457-459}.

En un modelo en ratas en las que se estimuló la expresión de CT-1 mediante la administración de un adenovirus conteniendo el cDNA de CT-1, se observó que esta maniobra aumentó la supervivencia después de la hepatectomía masiva, una intervención que causa la mortalidad del 91% de los animales control, mientras que el 54% de los animales que recibían

terapia génica con CT-1 sobrevivían a largo plazo.⁴¹³ En otro estudio sobre fallo hepático fulminante en ratas la administración de CT-1 aumentó la supervivencia hasta en un 80%^{322,348,353,406,414,415}.

2.2.- Función renal e histología renal

En cuanto a la función renal, nuestros resultados demuestran que la administración profiláctica intravenosa de CT-1, previene la disminución del filtrado glomerular inducido por la I/R, medido por unos menores niveles de creatinina en plasma y un mayor valor del aclaramiento de creatinina en el grupo tratado con CT-1 comparado con el grupo I/R control. Estos datos están de acuerdo con los hallazgos histológicos que demuestran que la administración de CT-1 reduce la necrosis tubular inducida por la I/R y sugieren un papel protector de la CT-1 sobre la función del órgano.

Otro mecanismo, que podría influir de manera esencial en la mejoría de la función renal podría ser que el aporte de CT-1 mantendría en el riñón la síntesis de sustancias con acción vasodilatadora, esencialmente prostaglandinas, como se ha demostrado en el hígado.⁴¹⁴

2.3.- Estrés oxidativo

En cuanto a la producción de RLO observamos que los niveles de ASO aumentan en el tejido de riñón del grupo control tras la I/R, sin embargo en las ratas tratadas con CT-1 no se observó este aumento^{339,348,406}. Se ha demostrado que la activación de la vía de señalización gp130/STAT3, vía fundamental de acción de la CT-1, induce la expresión de la enzima antioxidante superóxido dismutasa que transforma el ASO en peróxido de hidrógeno, menos agresivo³²², y esto junto con el efecto antiinflamatorio que luego se discutirá, podría explicar estos resultados.

2.4.- Inflamación

Para verificar la activación de NF- κ B se analizaron los cambios en los niveles de p65 fosforilado y el I κ B- α total, porque la fosforilación de la subunidad p65 y la degradación de I κ B- α están asociados con la activación de la vía NF- κ B.²¹⁰ Nuestros datos demuestran que p65 fosforilado aumenta inmediatamente, a los 5 minutos tras la reperfusión, mientras que I κ B- α total disminuye en los dos grupos, por lo que se estaría degradando por el proteosoma. Mientras p65 fosforilado va disminuyendo con el tiempo, I κ B- α total va aumentando con el tiempo en el grupo control, mientras este era muy bajo en el grupo tratado con CT-1, por lo que pensamos que el NF- κ B nuclear conduce a la expresión de I κ B- α ,^{460,461} generando un circuito de retroalimentación negativa.²¹⁰ Por esta razón, en ausencia de I κ B- α la terminación de la activación de NF- κ B en respuesta a un estímulo como TNF- α está significativamente retardada.^{210,213} La fosforilación de p65 y la liberación de I κ B- α desde el complejo p65-p52-I κ B sugieren la activación de NF- κ B.

NF- κ B es un factor de transcripción que controla la expresión de múltiples genes involucrados en la inflamación, entre ellos genes que codifican citocinas proinflamatorias como (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , etc), quimiocinas como (IL-8, MIP-1 α , MCP-1, RANTES, etc), moléculas de adhesión como (ICAM, VCAM, E-selectina), enzimas inducibles (COX-2 e iNOS), factores de crecimiento y algunas proteínas de fase aguda y receptores inmunológicos, todos ellos implicados en el control de la mayoría de los procesos inflamatorios^{216,462,463}.

Nuestros datos demuestran que en los animales que reciben CT-1, NF- κ B está menos activada en riñón tras la isquemia. El efecto de CT-1 sobre la activación de NF- κ B es variable según los diferentes trabajos de la literatura. En un modelo de infección por LPS se ha observado que la administración intravenosa de la CT-1, provoca en el corazón una disminución de la expresión de iNOS y de la activación de NF- κ B²⁹⁹. Se ha descrito que CT-1 activa NF- κ B en células endoteliales^{328,440}, monocitos^{439,443,464}. Por otro lado se ha descrito que los efectos citoprotectores de CT-1 en cardiomiocitos en cultivo ocurren a través de la activación de NF- κ B³²⁶. Por lo tanto, parece que, dependiendo de las circunstancias, CT-1 induce o inhibe la activación de NF- κ B.

Asimismo hemos demostrado que la I/R renal induce un aumento de los niveles plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , e IL-1 β . En un estudio *in vivo* de I/R renal se ha demostrado que la expresión renal de quimiocinas estaba significativamente aumentada después de la I/R, y se

acompañaba de una importante acumulación de macrófagos en el intersticio renal.⁴⁶⁵ Esta acumulación de los macrófagos en el riñón post-isquémico es debido a la sobreexpresión de quimiocinas en las células tubulares.^{219,234} La disminución selectiva de macrófagos disminuye el daño agudo del riñón isquémico.²³⁴

Nuestros datos demuestran que en las ratas con I/R que recibieron CT-1 los niveles plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , e IL-1 β son menores que en las ratas que no reciben CT-1. Benigni et al han demostrado que la CT-1 inhibe la producción de TNF- α tanto en suero, como en corazón, por lo tanto podría ser un inhibidor endógeno de la producción de TNF- α .⁴⁰⁶ De este modo, CT-1 previene del daño pulmonar agudo producido por endotoxinas a través de la inhibición de la producción de TNF- α o de otras citocinas proinflamatorias.⁴¹¹ La CT-1 administrada exógenamente va a inducir sobreactivación de gp130 con un incremento en la fosforilación de STAT-3 y STAT-1 en el riñón que posteriormente va a incrementar la expresión de SOCS-3 y SOCS-1 lo que inhibe las citocinas proinflamatorias.^{300,466} La inyección intravenosa de CT-1 a ratas Wistar inducen en el corazón un aumento rápido de la expresión de mRNA de SOCS-1.²⁹⁹ Además se ha demostrado que SOCS-1 tiene un efecto dominante sobre el receptor del INF- γ (IFN- γ R), inhibiendo los efectos proinflamatorios de este.^{467,468}

Nuestros resultados también demuestran que, como habíamos visto en estudios anteriores, la I/R renal hace disminuir los niveles circulantes de IL-6 e IL-10, citocinas con efecto predominantemente antiinflamatorio.^{75,96} En las ratas a las que se administra CT-1, los niveles circulantes de IL-6 e IL-10 son similares o incluso mayores que los del grupo simulado. Este efecto podría participar en el efecto protector renal de la CT-1, ya que se ha demostrado que IL-10 previene la activación de NF- κ B inducida por TNF- α , debido a la activación de la vía de supervivencia celular ERK1/2. Por lo tanto si la CT-1 aumenta la síntesis de IL-10, éste, aumenta la activación de ERK1/2 y por lo tanto la inhibición de NF- κ B, como también hemos observado en nuestros datos.

Como ya sabemos IL-10 requiere de la activación de STAT-3 para ejercer sus efectos antiinflamatorios, IL-10 induce rápidamente SOCS-3 de forma dependiente de STAT-3 e IL-10 utiliza SOCS-3 de manera temprana para limitar la producción de TNF- α e iNOS.⁴⁶⁹ Por lo tanto IL-10 utiliza diferentes mecanismos de acción a través de la proteína SOCS-3 sobre diferentes vías, activadas por el mismo estímulo. Además, la IL-10 también induce la síntesis de BCL-3, la cual se une al NF- κ B como molécula inhibitoria, por lo que IL-10 utilizaría también esta vía para inhibir la activación de NF- κ B.⁴⁷⁰

La CT-1 induce la síntesis de IL-6 *in vitro* ^{440,443} y se ha demostrado que este efecto es a través de NF- κ B, ya que en la región promotora del gen IL-6, se encuentra un sitio de unión para NF- κ B. ⁴⁷¹ El mecanismo exacto de cómo la activación de JAK2/STAT3 participa en la expresión de IL-6 inducida por CT-1 no está claro. Una activación directa del gen IL-6 parece poco probable, porque no hay ningún sitio de unión para STAT3 en el gen promotor de IL-6. ^{443,472}

IL-6 puede provocar *in vivo* tanto efectos antiinflamatorios como proinflamatorios dependiendo de las circunstancias. ⁴⁷² Se ha demostrado que cuando SOCS-3 está ausente, la activación de STAT-3 mediada por IL-6 vía gp130 induce respuestas antiinflamatorias idénticas a las de IL10R. ²⁹⁷

Existen observaciones contradictorias con las anteriores, en las que se sugiere que la producción de IL-6 por parte de la CT-1 podría ser utilizado como un mecanismo regulatorio beneficioso. En un modelo de daño agudo por I/R en corazón de rata ⁴⁷³ los efectos citoprotectores antiapoptóticos de la IL-6 más el receptor soluble de la IL-6 eran más fuertes que sus efectos proinflamatorios, lo que sugiere que la IL-6 producida por la CT-1 podría tener efectos antiapoptóticos.

De estos datos se puede deducir una mayor capacidad de controlar la respuesta inflamatoria tras la I/R renal en los grupos tratados con CT-1 y que el efecto protector de CT-1 es debido, entre otros mecanismos, a sus efectos en el incremento de las citocinas IL-6 e IL-10 y al decremento de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , fenómenos vinculados a un efecto antiinflamatorio. ³⁰⁰

Nuestros resultados también corroboran que la I/R renal aumenta la expresión de iNOS, mientras que la administración de CT-1 disminuye dicho aumento de la expresión. Otros autores han descrito que la administración de CT-1 disminuye los mediadores de la respuesta inflamatoria y entre ellos la iNOS, ³²⁷ lo que apoya también nuestras observaciones. Sin embargo, se ha demostrado que la CT-1 tiene efectos hemodinámicos aparentemente contradictorios con esta observación. Cuando se administra la CT-1 intravenosa en ratas causa hipotensión sistémica de manera dosis dependiente, demostrándose que la hipotensión es causada por vasodilatación y este efecto es debido a la activación de la iNOS. ^{408,474} En nuestros resultados observamos un aumento significativo de la iNOS a los 5 minutos en el grupo tratado con respecto al grupo control, y a las 4, 24 y 48 horas disminuye en el grupo tratado respecto al control, debido posiblemente a la disminución de las citocinas proinflamatorias y de la activación de p65.

La regulación de la actividad de la iNOS es principalmente transcripcional; la unión de STAT y NF- κ B a las secuencias del promotor que presenta la iNOS son necesarias para la activación

de la iNOS.⁴⁷⁵ La activación de p65, juega un importante papel en la expresión de iNOS.^{475,476} En nuestro trabajo la CT-1 disminuye la activación de p65 y también la expresión de iNOS. También en los estudios de sepsis *in vivo*, hay activación de NF-κB, y aumento de la expresión de iNOS, y ambos fenómenos se inhiben totalmente en las ratas tratadas con CT-1³⁰⁰ Por lo tanto, es posible que el efecto de CT-1 sobre la iNOS esté mediado por la menor activación de NF-κB.

Mientras que se conoce mucho sobre los mecanismos de inducción de iNOS, se han encontrado pocos represores transcripcionales. Se ha investigado sobre el papel de la proteína STAT-3 en la inducción de iNOS por LPS, IL-1β e INF-γ en células mesangiales. Estos estímulos inducen rápidamente la fosforilación de STAT-3 y la unión de STAT-3 a la secuencia específica de DNA. Se ha demostrado también que el NF-κB forma un complejo con STAT-3. La interacción directa de STAT-3 y NF-κB p65 se observó *in vivo* e *in vitro*. La sobreexpresión de STAT-3 inhibe de manera espectacular la inducción de iNOS mediada por IL-1β o por INF-γ + LPS. También se ha demostrado que la sobreexpresión de STAT-3 inhibe la actividad de un gen promotor dependiente de NF-κB, desprovisto de elementos de unión para STAT sin influir a la actividad del DNA de unión para NF-κB. Por lo tanto STAT-3, vía interacción directa con NF-κB p65, actúa como un inhibidor de la actividad de NF-κB para suprimir la inducción indirecta del promotor de iNOS por citocinas en células mesangiales.⁴⁷⁶

Se ha observado tanto *in vitro* como en un estudio *in vivo* sobre I/R renal que la expresión de algunas quimiocinas es mediada por la activación de la ruta JAK/STAT.⁴⁶⁵

2.5.- Infiltración neutrofílica y CAMS

También hemos demostrado en nuestro estudio que en los riñones de ratas sometidas a I/R y que reciben CT-1 hay una menor acumulación neutrofílica medida por la actividad de mieloperoxidasa. Asimismo hemos observado una menor cantidad de las moléculas de adhesión (CAMS) P-selectina, ICAM-1, VCAM-1 y PCAM en los riñones de las ratas tratadas con CT-1 que en los de las ratas sin tratar.

Se ha descrito ya que la administración de CT-1 disminuye la acumulación de neutrófilos inducida por endotoxina en el pulmón⁴¹¹. Los mecanismos implicados en este efecto no están del todo claros: podría ser a través de la inhibición por CT-1 de la producción de TNF-α⁴⁰⁶, o a través

de la inhibición de otras citocinas proinflamatorias. Hay que tener en cuenta que las citocinas como el TNF- α inducen un incremento de la expresión de las CAMs y por lo tanto de la interacción leucocito endotelio^{411,468,477}. Por lo tanto si hay una menor expresión de las CAMs habrá menor infiltración neutrofílica asociada a un menor daño en la función renal. En un estudio *in vivo*, la administración de CT-1 disminuye la acumulación de neutrófilos en el pulmón⁴¹¹.

Varios estudios *in vitro* revelan que la expresión de las CAMs está asociada con la activación de la vía de señalización JAK/STAT^{312,313,328,464,465}. Se ha demostrado que IFN- γ induce expresión de ICAM-1 a través de la activación de JAK/STAT *in vitro*^{467,478}. Aunque son escasos los estudios *in vivo* que relacionen JAK/STAT con la expresión de las CAMs⁴⁶⁵, se ha demostrado que la CT-1 induce expresión de la ICAM-1 en cultivos de células endoteliales^{328,441}. La expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por CT-1 requiere la activación de NF- κ B^{328,441,479}. Sin embargo en nuestros resultados podemos ver que la expresión renal de las CAMs es significativamente menor en las ratas tratadas con CT-1 que en el grupo control. Esta disminución sería debido a la disminución de citocinas y de la activación de NF- κ B ya descritas, ya que la expresión de las CAMs por la I/R está mediada a través de la activación de NF- κ B por estimulación de las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , e INF- γ .⁴⁷⁹ También se ha visto que la expresión de ICAM-1 y de VCAM-1 estimuladas por el TNF- α son dependientes de NF- κ B ya que si se inhibe totalmente NF κ B se inhibe también la expresión tanto de ICAM-1 como VCAM-1⁴⁸⁰. Por lo tanto podemos sugerir que la administración de CT-1, al disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias y la activación de NF- κ B, disminuiría la expresión de las CAMs.

2.6.- Apoptosis

Nuestros resultados demuestran un aumento de la apoptosis tras la I/R, demostrada por un aumento de la expresión de caspasa-3 activada. Este resultado concuerda con la observación generalizada de que la apoptosis es una de las causas de daño renal durante la I/R⁶⁵. La importancia de la caspasa-3 en dicha apoptosis se demuestra por el hecho de que la administración de un RNA de interferencia contra caspasa-3 en el líquido de preservación renal disminuyó la expresión de caspasa-3 activada y la apoptosis renal tras la reperfusión, y produjo una mejor función renal⁴⁸¹.

Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la caspasa-3 activada en el grupo tratado con CT-1, con respecto al grupo control en todos los tiempos, habiendo sido documentados ya los efectos antiapoptóticos de la CT-1 en diferentes modelos de daño^{482,483}. Por ejemplo, la CT-1 protege de la apoptosis provocada por doxorrubicina en miocitos cardiacos *in vitro*.^{307,316} También se ha demostrado protección contra la apoptosis inducida en células del pulmón.⁴⁰⁹ *In vivo*, la CT-1 protege de la apoptosis en el infarto de miocardio, inhibe significativamente P53, Fas y Bax, y se incrementa la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2.^{361,362} La CT-1 también reduce la muerte celular neuronal tanto *in vivo* como *in vitro*.⁴²³ Asimismo se ha demostrado que la CT-1 actúa como una defensa natural del hígado contra la apoptosis, pudiendo tener un potencial terapéutico importante, ya que la CT-1 protege del fallo hepático fulminante inducido por D-gal, mediante sus efectos como molécula antiapoptótica y favorecedora de la reparación celular.⁴¹⁵ También se ha demostrado que CT-1 induce un aumento en la síntesis de las proteínas de choque térmico hsp70 y hsp90.³⁷¹ Este incremento está relacionado con la protección de muerte celular por estrés isquémico en el pulmón.⁴⁸⁴

Se ha demostrado que la protección frente a la apoptosis inducida por CT-1 en miocitos cardiacos sometidos a un estrés por I/R puede estar mediada por la activación de la translocación al núcleo de NF- κ B y la activación transcripcional de la expresión de genes dependientes de NF- κ B con efectos citoprotectores.³²⁶ Hay que tener en cuenta que la activación de NF- κ B puede tener efectos pro-apoptóticos o anti-apoptóticos. De ahí la importancia de comprender los mecanismos de señalización a través de los cuales CT-1 actúa sobre NF- κ B. NF- κ B es activado a través de diferentes cascadas de señalización tales como Akt y ERK que fosforilan I κ B, NF- κ B es liberado de la subunidad inhibidora (I κ B), y traslocado al núcleo,⁴⁸⁵ donde promueve la actividad transcripcional de determinados genes involucrados en inflamación, crecimiento celular y protección antiapoptótica, además de otros genes proapoptóticos.^{486,487} Otro de los mecanismos del efecto anti-apoptótico de CT-1 podría ser la inhibición de la producción de TNF- α . El TNF- α causa un incremento significativo de la apoptosis debido a un incremento en la activación de la caspasa-3, la proteasa clave en la ejecución de la apoptosis.⁴⁸⁸ Además SOCS-1, que hemos visto que se activa por CT-1, suprime la apoptosis inducida por TNF- α posiblemente por la disminución en la caspasa-3 activada y la inhibición de la caspasa-8 activada, por lo que ese podría ser otro mecanismo de acción de CT-1 inhibiendo apoptosis. Este efecto se llevaría a cabo mediante la inhibición de JAK1 por SOCS-1.⁴⁸⁹

Otra de las vías claramente implicadas en la inhibición de la señal apoptótica es la vía de la PI3K/AKT. Como hemos visto antes, nuestros resultados demuestran una activación de la ruta PI3K/AKT tras el tratamiento con CT-1 a los 5 minutos y a las 4 horas, aunque las diferencias no son significativas en pAKT, con respecto al grupo control. La activación de PI3K induce la activación por fosforilación de AKT en la serina 475 y treonina 308. La activación de AKT provoca a su vez la fosforilación de BAD en las serinas 112 y 136. BAD es un miembro de la familia de Bcl-2 y es un regulador importante de la señal de supervivencia. BAD inactivo dimeriza con las proteínas Bcl-x o Bcl-2 neutralizando su actividad antiapoptótica. La fosforilación de BAD conlleva la liberación de Bcl-2 o Bcl-x que suprimirán la vía de apoptosis. Por tanto, la fosforilación de BAD supone la supresión de la vía de apoptosis³⁰⁷.

En resumen, la CT-1 es capaz de inducir la vía de señalización de JAK/STAT así como la vía de supervivencia PI3K/AKT. Por tanto, la cascada de señales inducida por la CT-1 explica que la CT-1 actúe como una citocina con efectos antiapoptóticos a través de la vía PI3K/AKT y posiblemente como inductora de la proliferación y diferenciación en hepatocitos a través de la vía JAK/STAT-3.

2.7.- Expresión de cardiotrofina-1 y de su receptor

Nuestros resultados muestran que el riñón no hay un aumento substancial de las cantidades de CT-1 tras la I/R. Estos resultados no son diferentes de los que se han observado en el hígado, en el que se ha visto que la isquemia no induce un aumento de la expresión de CT-1 en tejido, sin embargo sí se observan diferencias en el suero por lo tanto si habría más CT-1 circulante y la CT-1 podría actuar de forma paracrina durante el preconditionamiento isquémico³¹⁵. Con respecto a la cantidad de CT-1 exógena administrada, nuestros resultados demuestran que se capta en grandes cantidades por los riñones, sobre todo por el contralateral no isquémico, y que desaparece, de forma que a las 48 horas no se observa CT-1 exógena en el riñón isquémico.

2.8.- Señalización. JAK/STAT-SOCS

La I/R induce un aumento progresivo de la activación de STAT-3, mientras que, como era de esperar, la administración de CT-1 induce una activación todavía mayor de STAT-3. La activación de STAT-3 se produce por fosforilación de un residuo de tirosina en la posición 705 y un residuo de serina en la posición 727. La activación de STAT-3 por la fosforilación de la tirosina 705 la llevan a cabo varias cinasas, incluyendo JAK, EGFR, Src y ERK mientras que la fosforilación de la serina 727 tiene lugar por otras serinas cinasas como MAPK, protein cinasa C (PKC) y otras. La fosforilación de STAT-3 en el citoplasma lleva a su dimerización, translocación al núcleo, y unión al DNA y como resultado la expresión de genes involucrados en proliferación, supervivencia, y diferenciación celular.²⁹⁸ Los efectos reguladores de STAT-3 pueden ser opuestos dependiendo de la citocina que lleve a cabo su activación como probablemente del tipo celular y de las vías de señalización que se lleven a cabo en paralelo^{313,490}.

La activación de la ruta JAK/STAT está implicada en la regulación de los mecanismos de respuesta inflamatoria³¹³. Dependiendo del ligando y de los diferentes STATs que estén involucrados, los efectos biológicos pueden ser proinflamatorios o antiinflamatorios. Las citocinas de la familia de IL-6 ejercen su acción vía homodímeros STAT-3 o heterodímeros STAT1/3. Esos complejos se unen a las secuencias GAS e inducen la transcripción de genes que regulan proliferación y supervivencia de células. La STAT-3 también traducen las acciones antiinflamatorias de IL-10. Los receptores generan distintos pools del mismo STAT activado, con distintas actividades solapadas. Si la activación de STAT-3 por parte de IL-6 es mantenida en vez de ser transitoria, IL-6 puede activar genes antiinflamatorios como IL-10.^{491,492} En nuestro estudio a las 4 horas tanto IL-6 como pSTAT está incrementada por lo que su acción está siendo prolongada, no transitoria, lo que sugiere que sus efectos son básicamente antiinflamatorios. Además, el INF- γ inhibe la activación de STAT-3 inducido por IL-6 acompañado por un incremento en la inducción de SOCS-3, y como consecuencia la disminución de la expresión de genes antiinflamatorios, por lo que el INF- γ induce cambios en la señalización de IL-6 hacia un fenotipo proinflamatorio.⁴⁹² Por lo tanto, nuestros datos de menores niveles de INF- γ en el grupo tratado con CT-1 con respecto al no tratado, explicaría la disminución de expresión de genes proinflamatorios y permitiría a la IL-6 ejercer su efecto protector.

El papel de STAT-1 y STAT-3 en apoptosis y proliferación celular no está nada claro, ya que algunos estudios los asocian con apoptosis y otros con protección contra la apoptosis. Por otra

parte, aunque STAT-3 favorece la proliferación celular, STAT-1 parece tener efectos antiproliferativos.^{493,494}

Se conoce relativamente poco acerca de como la vía de señalización JAK/STAT actúa sobre el daño inducido por la I/R en un órgano sólido. En un modelo de daño renal por I/R en rata, la interrupción de JAK2 mediante un inhibidor, (AG490) inhibió las vías de señalización STAT-1/STAT-3, mejoró la función renal, disminuyó las lesiones histológicas y redujo la apoptosis de las células del epitelio tubular.⁴⁶⁵

La I/R induce un aumento progresivo de los niveles de SOCS-3, mientras que la administración de CT-1 induce un aumento muy rápido de SOCS-3, cuyos niveles aumentan rápidamente tras la administración de CT-1, volviendo a niveles basales a las 24 horas. En un modelo de infección por LPS se ha observado que la administración intravenosa de la CT-1, provoca en el corazón, un gran aumento de SOCS-1 junto con una disminución de SOCS-3 que se acompaña de inhibición de pSTAT-1, pSTAT-3, iNOS y p65^{299,300}. Como hemos dicho en la introducción, el aumento de SOCS-3 tras CT-1 está basado en la activación de la ruta JAK/STAT, mientras que a su vez, SOCS-3 inhibe la activación de STAT-3³⁰⁰, ya que SOCS-3, es responsable de la regulación de las citocinas cuya señalización es a través del receptor gp130, y además se ha demostrado que SOCS-3 afecta tanto a la calidad como a la cantidad de la señalización a través del receptor gp130.^{495,496} Nuestros datos de un menor daño renal y unos mayores niveles de SOCS-3 en los riñones de los animales tratados con CT-1 están de acuerdo con otro estudio en el que se demuestra que SOCS-1 y SOCS-3 inducen protección del daño renal agudo por isquemia.⁴⁹⁶

Tanto SOCS3 y SOCS-1 están relacionados con la inflamación. SOCS-1 actúa como regulador de la señalización del INF- γ y modula la respuesta del TNF- α . Además, la sobreexpresión de SOCS-1 disminuye la activación de p65 y la expresión de iNOS.⁴⁸⁹ Por ello, los altos niveles de SOCS-3 observados tras la administración de CT-1, podría explicar la menor activación de p65 y la menor expresión de iNOS observados en los riñones de estos animales.

Tanto IL-6 como IL-10 inducen la expresión de los reguladores negativos feedback SOCS. Las SOCS interactúan directamente con las JAKs o con los receptores de las citocinas inhibiendo su actividad catalítica. Las SOCS además suprimen la señalización JAK/STAT inducida por varias citocinas. Por lo tanto, podemos sugerir que la activación de SOCS tras la I/R tiene como papel fisiológico contrarrestar parcialmente la activación de la ruta JAK/STAT que se produce tras la I/R.

2.9.- Señalización ERK-AKT

Nuestros resultados demuestran un aumento de la activación de ERK en el riñón tras la I/R. Cuando se administra CT-1, se observa un aumento en la activación de ERK a los 5 minutos de la reperusión, sin diferencias significativas con el grupo que no recibe CT-1 en el resto de los tiempos. CT-1 activa la ruta MEK1/2-ERK1/2 en corazón³¹³ y se ha demostrado el papel de la vía ERK1/2 en los efectos protectores de la CT-1 en la I/R cardiaca tanto si se añade antes o después de la isquemia, ya que en ambos casos esos efectos protectores se bloquean si se inhibe esa vía^{313,359}.

Una de las vías claramente implicadas en la inhibición de la señal apoptótica es la vía PI3K/Akt. La activación de PI3K induce la activación por fosforilación de Akt. En resumen, la CT-1 es capaz de inducir la vía de señalización de JAK/STAT así como la vía de supervivencia PI3K/Akt. Por tanto, la cascada de señales inducida por la CT-1 explica que la CT-1 actúe como una citocina con efectos antiapoptóticos a través de la vía PI3K/Akt³⁰⁷ y posiblemente como inductora de la proliferación, diferenciación y protección frente al daño por I/R a través de la vía JAK/STAT/SOCS.

Por lo tanto y en conclusión general podemos sugerir que la protección que ejerce la CT-1 sobre la I/R renal está basada en una menor producción de RLOs, una menor activación endotelial y una menor respuesta inflamatoria, probablemente mediada por una activación de las vías STAT-3/SOCS-3.

3.- Preservación Fría del Riñón

La preservación en frío es un proceso imprescindible en el mantenimiento de los órganos que van a ser trasplantados y ha facilitado mucho que puedan utilizarse órganos de personas fallecidas y ser trasplantados a pacientes que están a mucha distancia. Sin embargo, aun en frío, se produce un daño en el órgano tanto durante la preservación como en la fase de reperfusión tras el trasplante. Este daño durante la preservación renal condiciona, en el mejor de los casos, la aparición de NTA. Si la NTA es irreversible hablaremos de un fallo primario del injerto, consecuencia del desarrollo de una necrosis cortical. El desarrollo de NTA reduce en al menos un 10% el porcentaje de riñones funcionantes al año del trasplante. El desarrollo de NTA está mediado tanto por factores en el donante como por el grado de lesión isquémica que se incrementa con el tiempo de almacenamiento. Además, cuando se produce un retraso en el inicio de la función renal tras el trasplante debido al daño durante la preservación o a otros factores, se produce un aumento muy importante en el número de fallos del injerto y en otros parámetros de la función del órgano trasplantado^{497,498}.

Aunque la preservación fría produce un daño tisular menor que la isquemia caliente, también produce un cierto nivel de daño. En un estudio en el que se preservaron los riñones de rata durante 24 o 48 horas a 0-4 °C, se observó que con 24 horas de preservación las células epiteliales mostraban muy pocos cambios, mientras que a las 48 horas de preservación, las células del túbulo proximal tenían grandes daños, y muchas de ellas, necrosis manifiesta.⁴⁹⁹ Otros estudios apoyan que la mayor duración del injerto produce mayor daño renal.⁵⁰⁰ Estos datos concuerdan con los nuestros que demuestran un elevado nivel de daño en las riñones preservados en frío durante 48 horas. Por otro lado, las lesiones renales causadas por la isquemia fría asociada a la preservación además de ser menores son completamente diferentes a los que se observan tras la isquemia caliente.⁵⁰¹ Sin embargo es sorprendente la falta de información en la literatura sobre los efectos que la preservación renal en frío produce en los riñones.

En esta fase del estudio analizamos si la adición de CT-1 al líquido de preservación podría proteger al riñón de los posibles daños que ocurrieran durante la isquemia fría. Por lo tanto,

decidimos realizar el almacenaje del órgano a 4°C de temperatura durante distintos tiempos (30 minutos, 6, 24 y 48 horas).

La preservación en frío induce un aumento de la de la producción de anión superóxido (ASO) y de la expresión de iNOS. La producción aumentada de ASO está de acuerdo con estudios previos que han demostrado que la isquemia fría induce aumento de la producción de ASO e inactivación de la enzima antioxidante mitocondrial clave para su eliminación, la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) que transforma el ASO en peróxido de hidrógeno,^{502,503} lo que permite explicar el aumento del nivel de ASO. Estos autores han observado también un aumento de la producción de nitrotirosina, que resulta de la nitrosilación por peroxinitritos de los residuos tirosina de las proteínas. El peroxinitrito se produce por reacción entre ASO y óxido nítrico, por lo que estos datos están de acuerdo con nuestros datos de un aumento de expresión de la iNOS y la producción de ASO tras la preservación fría.

Nuestros datos demuestran que la adición de CT-1 al líquido de preservación renal disminuye la producción de ASO y la expresión de iNOS en comparación con los riñones a los que no se añade CT-1 al líquido de preservación. Se ha observado que la inhibición de la actividad oxidante de ASO protege al riñón del daño producido por la isquemia fría, por ejemplo, la adición al líquido de preservación de mitoquinona, un antioxidante mitocondrial, disminuye tanto la producción de ASO como la producción de nitrotirosina y la muerte celular renal.⁵⁰³ Asimismo la sobreexpresión de MnSOD o la inhibición de la iNOS en tubulos renales proximales de rata protegen a los mismos de los daños inducidos por isquemia fría.⁵⁰⁴ Por ello, podemos concluir que los efectos observados de la CT-1 sobre la producción de ASO y la expresión de iNOS explican la protección tisular aportada por esta citocina. Se ha sugerido que las sustancias que previenen el daño mitocondrial en riñones sometidos a isquemia podrían emplearse para mejorar la función renal y la supervivencia del injerto tras el trasplante renal.⁵⁰²

También observamos un aumento de la producción de TNF- α , y de la activación de NF- κ B durante la isquemia fría. Se ha demostrado que la duración de la isquemia fría correlaciona con la producción de diversas citocinas en hígado.⁵⁰⁵ Aunque en la literatura no hemos encontrado ningún dato de los efectos de la isquemia fría sin reperusión sobre la producción de citocinas o la activación de NF- κ B, esta activación y el aumento de producción de TNF- α puede estar relacionado con el aumento del estrés oxidativo. Se ha demostrado que los radicales libres provenientes de las mitocondrias activan la producción de citocinas.⁵⁰⁶ Se sabe, por otro lado, que ASO activa NF- κ B y NF- κ B induce TNF- α . CT-1 modula de forma muy importante el aumento

de la citocina proinflamatoria TNF- α , evita de forma, casi total, el aumento de iNOS, y es muy efectiva previniendo la activación de p65.

Todos estos datos sugieren un claro efecto protector de la CT-1 frente a la respuesta inflamatoria del riñón a la isquemia fría, lo que la convierte en un excelente candidato para su utilización en la preservación de riñones para trasplante. El tratamiento con CT-1 podría permitir aumentar el tiempo efectivo de preservación del órgano.

4.- Discusión de la Fase de Trasplante Renal

A fin de obtener un claro efecto lesivo del periodo de isquemia fría, decidimos preservar el riñón a trasplantar durante 24 horas a 4°C de temperatura. La agresividad de esta maniobra se demostró por los resultados hallados en el grupo trasplante control: 1) altos niveles de creatinina sérica probablemente debidos un retraso en la función del injerto y a la aparición progresiva de NTA en los riñones trasplantados. 2) incremento de la citocina proinflamatorias TNF- α , como consecuencia del fenómeno de inflamación tras la isquemia/reperfusión. 3) alta producción de anión superóxido, seguramente debida a la infiltración neutrofílica. 4) altos niveles ICAM-1 soluble y de VCAM-1 soluble que demuestran una gran activación endotelial.

En este modelo muy agresivo, nuestros resultados demuestran un claro efecto de la CT-1 mejorando la supervivencia de los animales trasplantados. Este aumento de la supervivencia puede deberse a varios factores:

4.1.- Función renal

Encontramos unos valores de creatinina sérica, en el grupo tratado con CT-1, significativamente menores y unos valores de aclaramiento de creatinina significativamente mayores que en el grupo control en todos los tiempos estudiados, lo que nos lleva a deducir un efecto protector de la administración de CT-1 sobre la función del riñón trasplantado, impidiendo un retraso en el inicio de la función y una NTA más tardía. Las causas que pueden conducir a este significativo mantenimiento de la función son muchas y pueden ser dependientes de la regulación de la respuesta inflamatoria por parte de la CT-1.

4.2.- Estrés oxidativo

Comprobamos una disminución en la producción de ASO en el tejido renal postrasplante de los animales tratados con CT-1. Entre las posibles causas de esta disminución en la producción de RLO se pueden incorporar las comentadas en el caso de la I/R renal, esto es, la inhibición de enzimas productoras de RLO, la disminución de la activación e infiltración neutrofílica (que es una importante fuente de producción de RLO) y la menor producción de TNF- α .

4.3.- Citocinas

El incremento de la citocina proinflamatoria TNF- α en el plasma de los animales trasplantados es significativamente menor en el grupo tratado con CT-1. Los mecanismos implicados en el descenso de los niveles de la citocina por el tratamiento con CT-1 han sido tratados ampliamente en la discusión de la fase de I/R y pudieran estar basados en la disminución de la activación neutrofílica, una menor activación del factor transcripcional NF- κ B, una menor expresión de las CAMs y la disminución del ambiente oxidativo intracelular.

Al mismo tiempo observamos que los animales tratados con CT-1, presentaban cifras superiores de IL-6 con respecto al grupo control. De estos datos se puede deducir una mayor capacidad de controlar la respuesta inflamatoria tras el trasplante renal en los grupos tratados con CT-1 y que el efecto protector de CT-1 es debido, entre otros mecanismos, a sus efectos en el incremento de la citocina IL-6 y al decremento de TNF- α , fenómenos vinculados a un efecto antiinflamatorio.

4.4.- Moléculas de adhesión celular

Hemos hallado unos niveles plasmáticos de las CAM solubles estudiadas (sVCAM-1 y sICAM-1) significativamente menores en los animales trasplantados tratados con CT-1, que en los

animales trasplantados no tratados, que probablemente representan una menor expresión endotelial de estas CAMs, y que puede ser debida a diferentes factores. En principio, la regulación de la propia respuesta inflamatoria con la disminución en la producción de citocinas proinflamatorias, es ya de por sí suficiente para justificar este descenso, pero no podemos olvidar la posible modulación de la activación de factores de transcripción como NF- κ B. La disminución de la expresión de las moléculas de adhesión celular estudiadas (ICAM-1 y VCAM-1) determinará una menor interacción leucocito-endotelio y consecuentemente una menor infiltración neutrofílica, fenómeno directamente relacionado con el daño postreperfusión.

La menor activación e infiltración neutrofílica conducirá a una menor producción de RLOs causantes de lesión tisular. Éstos, a su vez, son mediadores inflamatorios capaces de activar factores transcripcionales como el NF- κ B, causante de la producción de diferentes citocinas proinflamatorias (como el TNF- α , la IL-1 y el INF- γ) responsables del incremento de la expresión de CAMs y además, en el caso del TNF- α , del incremento en la producción de RLO. Todo ello redundará en una menor lesión tisular, con un mantenimiento de la función del órgano y, consecuentemente, un efecto protector en el síndrome de la respuesta inflamatoria por I/R, que pudiera ser la clave del efecto beneficioso del tratamiento con CT-1 en el trasplante renal.

En suma, los resultados expuestos demuestran que el fallo renal y la respuesta inflamatoria a la I/R tras el trasplante es más severa en aquellos animales no tratados con CT-1. La administración de CT-1 tiene efectos protectores sobre la función renal e inhibe la respuesta inflamatoria inducida por la I/R renal en el trasplante renal. Estos efectos parecen estar mediados por una reducción en la producción de los RLO, el decremento en las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e INF- γ , el incremento de las citocinas antiinflamatorias IL-6 e IL-10, la reducción de la expresión renal de las CAMs y una menor infiltración neutrofílica y macrofágica.

Estos datos sugieren la posibilidad de utilizar la CT-1 en la solución de preservación y en la perfusión del injerto obtenido para trasplante renal con el objetivo de preservar la función del injerto y hacer disminuir la incidencia de fallo del injerto postrasplante.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

1. La CT-1 protege del daño renal inducido por I/R y de la inflamación asociada a este proceso.
2. La adición de CT-1 al líquido de preservación disminuye las alteraciones inducidas en el riñón por la preservación en frío.
3. Cuando se trasplantan riñones preservados durante 24 horas en líquido de la Universidad de Wisconsin conteniendo CT-1, la respuesta inflamatoria de estos animales es menor que en aquellos en los que se trasplantan riñones preservados sin CT-1.
4. Cuando se trasplantan riñones preservados durante 24 horas en líquido de la Universidad de Wisconsin conteniendo CT-1, la supervivencia y la función renal de estos animales son mayores que en aquellos en los que se trasplantan riñones preservados sin CT-1.
5. El conjunto de estos resultados sugiere que CT-1 puede ser utilizada para disminuir el daño renal inducido por I/R y para mejorar la función de los riñones preservados cuando se trasplantan.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- 1 Daga Ruiz, D., Fernandez Aguirre, C., Segura Gonzalez, F. & Carballo Ruiz, M. [Indications and long-term outcomes for solid organ transplant. Quality of life in solid organ transplant recipients]. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* **32**, 296-303 (2008).
- 2 Matesanz, R., Mahillo, B., Alvarez, M. & Carmona, M. Global observatory and database on donation and transplantation: world overview on transplantation activities. *Transplantation proceedings* **41**, 2297-2301 (2009).
- 3 Domínguez-Gil González, B. *et al.* Situación actual del trasplante renal de donante vivo en España y otros países. *Nefrología* **30**, 3-13 (2010).
- 4 Chronopoulos, A., Rosner, M. H., Cruz, D. N. & Ronco, C. Acute kidney injury in the elderly: a review. *Contributions to nephrology* **165**, 315-321 (2010).
- 5 Cruz, D. N., Bagshaw, S. M., Ronco, C. & Ricci, Z. Acute kidney injury: classification and staging. *Contributions to nephrology* **164**, 24-32 (2010).
- 6 Srisawat, N., Hoste, E. E. & Kellum, J. A. Modern classification of acute kidney injury. *Blood purification* **29**, 300-307 (2010).
- 7 Barrantes, F. *et al.* Acute kidney injury predicts outcomes of non-critically ill patients. *Mayo Clinic proceedings* **84**, 410-416 (2009).
- 8 Kheterpal, S. *et al.* Development and validation of an acute kidney injury risk index for patients undergoing general surgery: results from a national data set. *Anesthesiology* **110**, 505-515 (2009).
- 9 Rosen, S. & Stillman, I. E. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol* **19**, 871-875 (2008).
- 10 Goldberg, R. & Dennen, P. Long-term outcomes of acute kidney injury. *Advances in chronic kidney disease* **15**, 297-307 (2008).
- 11 Hiremath, S., Fergusson, D., Doucette, S., Mulay, A. V. & Knoll, G. A. Renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: a systematic review of the evidence. *Am J Transplant* **7**, 2350-2360 (2007).
- 12 Kolonko, A., Chudek, J. & Wiecek, A. Prediction of the severity and outcome of acute tubular necrosis based on continuity of Doppler spectrum in the early period after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 1631-1635 (2009).

- 13 Lameire, N., Van Biesen, W. & Vanholder, R. Acute renal failure. *Lancet* **365**, 417-430 (2005).
- 14 Kinsey, G. R., Li, L. & Okusa, M. D. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron* **109**, e102-107 (2008).
- 15 Wolfe, M., Almond, A., Robertson, S., Donaldson, K. & Isles, C. Chronic kidney disease presenting acutely: presentation, clinical features and outcome of patients with irreversible chronic kidney disease who require dialysis immediately. *Postgraduate medical journal* **86**, 405-408 (2010).
- 16 Meguid El Nahas, A. & Bello, A. K. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* **365**, 331-340 (2005).
- 17 Passman, R. & Herzog, C. A. End-stage renal disease: Sudden cardiac death: stratifying risk in dialysis patients. *Nature Reviews Nephrology* (2010).
- 18 Burrows, N. R., Li, Y. & Geiss, L. S. Incidence of treatment for end-stage renal disease among individuals with diabetes in the US continues to decline. *Diabetes care* **33**, 73 (2010).
- 19 Kierdorf, H. P. Renal replacement therapy in acute renal failure. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **135**, 2341-2346 (2010).
- 20 de Francisco, A. Sostenibilidad y equidad del tratamiento sustitutivo de la función renal en España. *Nefrología* **31**, 241-246 (2011).
- 21 Trivedi, H. Cost implications of caring for chronic kidney disease: are interventions cost-effective? *Advances in chronic kidney disease* **17**, 265-270 (2010).
- 22 Huet, T. *et al.* A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA+ low-K+ content reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. *Transplantation* **76**, 18-27 (2003).
- 23 Bryan, C. F. *et al.* Cold ischemia time: an independent predictor of increased HLA class I antibody production after rejection of a primary cadaveric renal allograft. *Transplantation* **71**, 875-879 (2001).
- 24 Herrero-Fresneda, I. *et al.* Cold ischemia in the absence of alloreactivity induces chronic transplant nephropathy through a process mediated by the platelet-activating factor. *Transplantation* **70**, 1624-1631 (2000).
- 25 Scott, W. E., 3rd *et al.* Real-time noninvasive assessment of pancreatic ATP levels during cold preservation. *Transplantation proceedings* **40**, 403-406 (2008).
- 26 Camara, A. K. *et al.* ROS scavenging before 27 degrees C ischemia protects hearts and reduces mitochondrial ROS, Ca²⁺ overload, and changes in redox state. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C2021-2031 (2007).
- 27 Salahudeen, A. K. Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F181-187 (2004).
- 28 Salahudeen, A. K. Cold ischemic injury of transplanted organs: some new strategies against an old problem. *Am J Transplant* **4**, 1 (2004).
- 29 Pompilio, G. *et al.* Effects of warm ischemia on valve endothelium. *The Annals of thoracic surgery* **63**, 656-662 (1997).
- 30 Hansen, T. N., Haworth, R. A. & Southard, J. H. Warm and cold ischemia result in different mechanisms of injury to the coronary vasculature during reperfusion of rat hearts. *Transplantation proceedings* **32**, 15-18 (2000).
- 31 Huet, P. M. *et al.* Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md)* **39**, 1110-1119 (2004).
- 32 Hosgood, S. A., Bagul, A., Yang, B. & Nicholson, M. L. The relative effects of warm and cold ischemic injury in an experimental model of nonheartbeating donor kidneys. *Transplantation* **85**, 88-92 (2008).

- 33 Belzer, F. O. & Southard, J. H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* **45**, 673-676 (1988).
- 34 Polderman, K. H. & Herold, I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Critical care medicine* **37**, 1101-1120 (2009).
- 35 Polderman, K. H. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine* **37**, S186-202 (2009).
- 36 Southard, J. H. & Belzer, F. O. Organ preservation. *Annual review of medicine* **46**, 235-247 (1995).
- 37 Collins, G. M., Bravo-Shugarman, M. & Terasaki, P. I. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet* **2**, 1219-1222 (1969).
- 38 Maathuis, M. H., Leuvenink, H. G. & Ploeg, R. J. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* **83**, 1289-1298 (2007).
- 39 Cobo, J. L. & Del Rio Gallegos, F. [Organ preservation]. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* **33**, 282-292 (2009).
- 40 Schreinemachers, M. C., Doorschodt, B. M., Florquin, S. & Tolba, R. H. Comparison of preservation solutions for washout of kidney grafts: an experimental study. *Transplantation proceedings* **41**, 4072-4079 (2009).
- 41 Lee, C. Y. & Mangino, M. J. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis* **5**, 105-112 (2009).
- 42 Collins, G. M. *et al.* Kidney preservation for transportation. IV. Eight-thousand-mile international air transport. *The Australian and New Zealand journal of surgery* **40**, 195-197 (1970).
- 43 Bretschneider, H. J. [Survival Time and Recuperative Time of the Heart in Normothermia and Hypothermia.]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Kreislaufforschung* **30**, 11-34 (1964).
- 44 Irish, W. D. & Katz, E. Cold machine perfusion or static cold storage of kidneys: why the debate continues. *Am J Transplant* **10**, 1955-1956 (2010).
- 45 Watson, C. J. *et al.* Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *Am J Transplant* **10**, 1991-1999 (2010).
- 46 Jamieson, N. V. Kidney preservation times, donor types, and long-term outcomes. *Transplantation* **83**, 255-256 (2007).
- 47 Keown, P. A., McMaster, W. R. & McManus, B. M. Tools to identify organ rejection and immune quiescence for biological understanding and personalized medical care. *Biomarkers in medicine* **4**, 115-121 (2010).
- 48 Halloran, P. F. T cell-mediated rejection of kidney transplants: a personal viewpoint. *Am J Transplant* **10**, 1126-1134 (2010).
- 49 Marcen, R. *et al.* Long-term graft function changes in kidney transplant recipients. *NDT plus* **3**, ii2-ii8 (2010).
- 50 Snoeijs, M. G., van Heurn, L. W. & Buurman, W. A. Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation* **15**, 190-199 (2010).
- 51 Yarlagadda, S. G., Coca, S. G., Formica, R. N., Jr., Poggio, E. D. & Parikh, C. R. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 1039-1047 (2009).
- 52 Billen, E. V., Christiaans, M. H., Lee, J. & van den Berg-Loonen, E. M. Donor-directed HLA antibodies before and after transplantectomy detected by the luminex single antigen assay. *Transplantation* **87**, 563-569 (2009).
- 53 Moers, C. *et al.* Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *The New England journal of medicine* **360**, 7-19 (2009).

- 54 Marcen, R. *et al.* Achieving chronic kidney disease treatment targets in renal transplant recipients: results from a cross-sectional study in Spain. *Transplantation* **87**, 1340-1346 (2009).
- 55 Marcen, R. *et al.* Evolution of rejection rates and kidney graft survival: a historical analysis. *Transplantation proceedings* **41**, 2357-2359 (2009).
- 56 Gandolfo, M. T. & Rabb, H. Very early alloantigen-independent trafficking of lymphocytes during ischemic acute kidney injury. *Kidney international* **71**, 1193-1195 (2007).
- 57 Poggio, E. D., Batty, D. S. & Flechner, S. M. Evaluation of renal function in transplantation. *Transplantation* **84**, 131-136 (2007).
- 58 Marcen, R. *et al.* Chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* **37**, 3718-3720 (2005).
- 59 Kokkinos, C. *et al.* Outcome of kidney transplantation from nonheart-beating versus heart-beating cadaveric donors. *Transplantation* **83**, 1193-1199 (2007).
- 60 Kennedy, S. E. & Erlich, J. H. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology (Carlton, Vic)* **13**, 390-396 (2008).
- 61 Garcia, S. C., Pomblum, V., Gams, E., Langenbach, M. R. & Schipke, J. D. Independency of myocardial stunning of endothelial stunning? *Basic research in cardiology* **102**, 359-367 (2007).
- 62 Laipanov Kh, I., Sergienko, V. I. & Petrosyan, E. A. Morphological changes in the liver during experimental modeling of acute ischemia and reperfusion of the limb. *Bulletin of experimental biology and medicine* **144**, 96-99 (2007).
- 63 Mura, M. *et al.* Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock (Augusta, Ga)* **28**, 227-238 (2007).
- 64 Leong, C. L., Anderson, W. P., O'Connor, P. M. & Evans, R. G. Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1726-1733 (2007).
- 65 Kosieradzki, M. & Rowinski, W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings* **40**, 3279-3288 (2008).
- 66 Rich, P. R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society transactions* **31**, 1095-1105 (2003).
- 67 Gourdin, M. J., Bree, B. & De Kock, M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *European journal of anaesthesiology* **26**, 537-547 (2009).
- 68 Fujioka, D. *et al.* Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation* **117**, 2977-2985 (2008).
- 69 Zager, R. A., Johnson, A. C., Naito, M. & Bomszyk, K. Maleate nephrotoxicity: mechanisms of injury and correlates with ischemic/hypoxic tubular cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F187-197 (2008).
- 70 Mangino, M. J., Tian, T., Ametani, M., Lindell, S. & Southard, J. H. Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury. *Transplantation* **85**, 427-436 (2008).
- 71 Cohen, M. V., Yang, X. M. & Downey, J. M. Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic research in cardiology* **103**, 464-471 (2008).
- 72 Halestrap, A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society transactions* **34**, 232-237 (2006).
- 73 Akcay, A., Nguyen, Q. & Edelstein, C. L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators of inflammation* **2009**, 137072 (2009).
- 74 Devarajan, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1503-1520 (2006).

- 75 Garcia-Criado, F. J. *et al.* Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation* **66**, 982-990 (1998).
- 76 Javadov, S. & Karmazyn, M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* **20**, 1-22 (2007).
- 77 Argaud, L. *et al.* Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**, 367-374 (2005).
- 78 Baskin-Bey, E. S. *et al.* Clinical Trial of the Pan-Caspase Inhibitor, IDN-6556, in Human Liver Preservation Injury. *Am J Transplant* **7**, 218-225 (2007).
- 79 Castaneda, M. P. *et al.* Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* **76**, 50-54 (2003).
- 80 Goligorsky, M. S. Whispers and shouts in the pathogenesis of acute renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 261-266 (2005).
- 81 Chen, Q., Camara, A. K., Stowe, D. F., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C137-147 (2007).
- 82 Molitoris, B. A. & Sutton, T. A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney international* **66**, 496-499 (2004).
- 83 Galiuto, L. & Crea, F. No-reflow: a heterogeneous clinical phenomenon with multiple therapeutic strategies. *Current pharmaceutical design* **12**, 3807-3815 (2006).
- 84 Le Dorze, M., Legrand, M., Payen, D. & Ince, C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Current opinion in critical care* **15**, 503-508 (2009).
- 85 Menger, M. D., Pelikan, S., Steiner, D. & Messmer, K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *The American journal of physiology* **263**, H1901-1906 (1992).
- 86 Bonventre, J. V. & Zuk, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney international* **66**, 480-485 (2004).
- 87 Abuelo, J. G. Normotensive ischemic acute renal failure. *The New England journal of medicine* **357**, 797-805 (2007).
- 88 Ma, A., Qi, S. & Chen, H. Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* **6**, 20-43 (2008).
- 89 Zweier, J. L. & Talukder, M. A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research* **70**, 181-190 (2006).
- 90 Hao, C. M. & Breyer, M. D. Roles of lipid mediators in kidney injury. *Seminars in nephrology* **27**, 338-351 (2007).
- 91 Hao, C. M. & Breyer, M. D. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney international* **71**, 1105-1115 (2007).
- 92 Legrand, M., Mik, E. G., Johannes, T., Payen, D. & Ince, C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* **14**, 502-516 (2008).
- 93 Cunningham, P. N. *et al.* Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J Immunol* **168**, 5817-5823 (2002).
- 94 Jo, S. K., Sung, S. A., Cho, W. Y., Go, K. J. & Kim, H. K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 1231-1239 (2006).
- 95 Friedewald, J. J. & Rabb, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney international* **66**, 486-491 (2004).

- 96 Garcia-Criado, F. J. *et al.* Protective effect of new nitrosothiols on the early inflammatory response to kidney ischemia/reperfusion and transplantation in rats. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 441-450 (2009).
- 97 Arumugam, T. V. *et al.* Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **374**, 33-45 (2006).
- 98 Farrar, C. A., Zhou, W., Lin, T. & Sacks, S. H. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure. *Faseb J* **20**, 217-226 (2006).
- 99 Thurman, J. M. *et al.* Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *The Journal of clinical investigation* **116**, 357-368 (2006).
- 100 Du, D. *et al.* The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Developmental cell* **18**, 52-63 (2010).
- 101 Genesca, M., Sola, A. & Hotter, G. Actin cytoskeleton derangement induces apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Apoptosis* **11**, 563-571 (2006).
- 102 Rodriguez-Pena, A., Garcia-Criado, F. J., Eleno, N., Arevalo, M. & Lopez-Novoa, J. M. Intrarenal administration of molsidomine, a molecule releasing nitric oxide, reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transplant* **4**, 1605-1613 (2004).
- 103 Woroniecki, R., Ferdinand, J. R., Morrow, J. S. & Devarajan, P. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F358-364 (2003).
- 104 Kwon, O. *et al.* Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *The Journal of clinical investigation* **101**, 2054-2064 (1998).
- 105 Molina, A. *et al.* Renal ischemia/reperfusion injury: functional tissue preservation by anti-activated β 1 integrin therapy. *J Am Soc Nephrol* **16**, 374-382 (2005).
- 106 Kaushal, G. P., Basnakian, A. G. & Shah, S. V. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney international* **66**, 500-506 (2004).
- 107 Schmitz, V., Schaser, K. D., Olschewski, P., Neuhaus, P. & Puhl, G. In vivo visualization of early microcirculatory changes following ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung* **40**, 19-25 (2008).
- 108 Wen, X., Murugan, R., Peng, Z. & Kellum, J. A. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective. *Contributions to nephrology* **165**, 39-45 (2010).
- 109 Jerkic, M. *et al.* Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 83-94 (2004).
- 110 Singh, P., Deng, A., Weir, M. R. & Blantz, R. C. The balance of angiotensin II and nitric oxide in kidney diseases. *Current opinion in nephrology and hypertension* **17**, 51-56 (2008).
- 111 Martinez-Salgado, C., Garcia-Cenador, B., Fuentes-Calvo, I., Macias Nunez, J. F. & Lopez-Novoa, J. M. Effect of adenosine in extracellular matrix synthesis in human and rat mesangial cells. *Molecular and cellular biochemistry* **305**, 163-169 (2007).
- 112 Vallon, V. & Osswald, H. Adenosine receptors and the kidney. *Handbook of experimental pharmacology*, 443-470 (2009).
- 113 Vera, T., Henegar, J. R., Drummond, H. A., Rimoldi, J. M. & Stec, D. E. Protective effect of carbon monoxide-releasing compounds in ischemia-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **16**, 950-958 (2005).
- 114 Lameire, N., Van Biesen, W. & Vanholder, R. Impact of peritoneal dialysis on patient and graft outcome after kidney transplantation. *Contributions to nephrology*, 226-241 (2003).
- 115 Lameire, N. H., De Vriese, A. S. & Vanholder, R. Prevention and nondialytic treatment of acute renal failure. *Current opinion in critical care* **9**, 481-490 (2003).

- 116 Lopez-Novoa, J. M., Quiros, Y., Vicente, L., Morales, A. I. & Lopez-Hernandez, F. J. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney international* (2010).
- 117 Devarajan, P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Current opinion in pediatrics* **17**, 193-199 (2005).
- 118 Kon, Z. N. *et al.* Warm ischemia provokes inflammation and regional hypercoagulability within the heart during off-pump coronary artery bypass: a possible target for serine protease inhibition. *Eur J Cardiothorac Surg* **33**, 215-221 (2008).
- 119 Abramov, A. Y., Scorziello, A. & Duchen, M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* **27**, 1129-1138 (2007).
- 120 Takahashi, T. *et al.* Neutrophil-activating activity and platelet-activating factor synthesis in cytokine-stimulated endothelial cells: reduced activity in growth-arrested cells. *Microvascular research* **73**, 29-34 (2007).
- 121 Araujo, M. & Welch, W. J. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Current opinion in nephrology and hypertension* **15**, 72-77 (2006).
- 122 Polat, K. Y. *et al.* The protective effect of aprotinin and alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation proceedings* **40**, 63-68 (2008).
- 123 Sanchez-Conde, P. *et al.* The comparative abilities of propofol and sevoflurane to modulate inflammation and oxidative stress in the kidney after aortic cross-clamping. *Anesthesia and analgesia* **106**, 371-378, table of contents (2008).
- 124 Tain, Y. L. *et al.* Lack of long-term protective effect of antioxidant/anti-inflammatory therapy in transplant-induced ischemia/reperfusion injury. *American journal of nephrology* **26**, 213-217 (2006).
- 125 Forstermann, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* **459**, 923-939 (2010).
- 126 Chatterjee, P. K. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **376**, 1-43 (2007).
- 127 Horbelt, M. *et al.* Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F688-695 (2007).
- 128 Pan, Y. *et al.* Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology* **27**, 912-925 (2007).
- 129 Hoste, E. A. *et al.* Epidemiology of acute kidney injury. *Contributions to nephrology* **165**, 1-8 (2010).
- 130 Olof, P., Hellberg, A., Kallskog, O. & Wolgast, M. Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla. *Kidney international* **40**, 625-631 (1991).
- 131 Summers, W. K. & Jamison, R. L. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **25**, 635-643 (1971).
- 132 Johannes, T., Mik, E. G. & Ince, C. Nonresuscitated endotoxemia induces microcirculatory hypoxic areas in the renal cortex in the rat. *Shock (Augusta, Ga)* **31**, 97-103 (2009).
- 133 Sutton, T. A. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvascular research* **77**, 4-7 (2009).
- 134 Johannes, T., Ince, C., Klingel, K., Unertl, K. E. & Mik, E. G. Iloprost preserves renal oxygenation and restores kidney function in endotoxemia-related acute renal failure in the rat. *Critical care medicine* **37**, 1423-1432 (2009).
- 135 Roelofs, J. J. *et al.* Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* **17**, 131-140 (2006).

- 136 Guan, Z., Gobe, G., Willgoss, D. & Endre, Z. H. Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F619-628 (2006).
- 137 Legrand, M. *et al.* L-NIL prevents renal microvascular hypoxia and increase of renal oxygen consumption after ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F1109-1117 (2009).
- 138 Myers, S. I., Wang, L., Liu, F. & Bartula, L. L. Oxygen-radical regulation of renal blood flow following suprarenal aortic clamping. *J Vasc Surg* **43**, 577-586 (2006).
- 139 Rubio-Gayosso, I., Platts, S. H. & Duling, B. R. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology* **290**, H2247-2256 (2006).
- 140 Jang, H. R. & Rabb, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **130**, 41-50 (2009).
- 141 Kato, N. *et al.* The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1565-1576 (2009).
- 142 Oh, D. J. *et al.* Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**, F264-271 (2008).
- 143 Thurman, J. M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **123**, 7-13 (2007).
- 144 Celie, J. W. *et al.* Subendothelial heparan sulfate proteoglycans become major L-selectin and monocyte chemoattractant protein-1 ligands upon renal ischemia/reperfusion. *The American journal of pathology* **170**, 1865-1878 (2007).
- 145 Choudhury, D. Acute kidney injury: current perspectives. *Postgraduate medicine* **122**, 29-40 (2010).
- 146 Leemreis, J. R., Versteilen, A. M., Sipkema, P., Groeneveld, A. B. & Musters, R. J. Digital image analysis of cytoskeletal F-actin disintegration in renal microvascular endothelium following ischemia/reperfusion. *Cytometry A* **69**, 973-978 (2006).
- 147 Malyszko, J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **411**, 1412-1420 (2010).
- 148 Wagner, D. D. & Frenette, P. S. The vessel wall and its interactions. *Blood* **111**, 5271-5281 (2008).
- 149 Schram, M. T. & Stehouwer, C. D. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **37 Suppl 1**, 49-55 (2005).
- 150 Basile, D. P., Fredrich, K., Weihrauch, D., Hattan, N. & Chilian, W. M. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F893-902 (2004).
- 151 Kielar, M. L. *et al.* Maladaptive role of IL-6 in ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3315-3325 (2005).
- 152 Simmons, E. M. *et al.* Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney international* **65**, 1357-1365 (2004).
- 153 Hu, H. *et al.* Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant* **4**, 432-437 (2004).
- 154 Molls, R. R. *et al.* Keratinocyte-derived chemokine is an early biomarker of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F1187-1193 (2006).
- 155 Ichimura, T. *et al.* Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *The Journal of clinical investigation* **118**, 1657-1668 (2008).
- 156 Prakash, J. *et al.* Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion-induced injury. *J Am Soc Nephrol* **19**, 2086-2097 (2008).

- 157 Wang, Y. *et al.* IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1544-1555 (2009).
- 158 Furuichi, K., Wada, T., Kaneko, S. & Murphy, P. M. Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury. *Front Biosci* **13**, 4021-4028 (2008).
- 159 Barklin, A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* **53**, 425-435 (2009).
- 160 Catania, A., Lonati, C., Sordi, A. & Gatti, S. Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. *Brain, behavior, and immunity* **23**, 877-884 (2009).
- 161 van der Hoeven, J. A. *et al.* Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney international* **64**, 1874-1882 (2003).
- 162 Loor, G. & Schumacker, P. T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell death and differentiation* **15**, 686-690 (2008).
- 163 Lutz, J., Thurmel, K. & Heemann, U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation. *Journal of inflammation (London, England)* **7**, 27 (2010).
- 164 Jutel, M., Akdis, M. & Akdis, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* **39**, 1786-1800 (2009).
- 165 De Berardis, D. *et al.* The effect of newer serotonin-noradrenalin antidepressants on cytokine production: a review of the current literature. *International journal of immunopathology and pharmacology* **23**, 417-422 (2010).
- 166 Diepenhorst, G. M., van Gulik, T. M. & Hack, C. E. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Annals of surgery* **249**, 889-899 (2009).
- 167 Jang, H. R., Ko, G. J., Wasowska, B. A. & Rabb, H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **87**, 859-864, doi:10.1007/s00109-009-0491-y (2009).
- 168 Zheng, X. *et al.* Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. *The American journal of pathology* **173**, 973-980 (2008).
- 169 Ferrarresso, M. *et al.* Posttransplant ischemia-reperfusion injury in transplanted heart is prevented by a minibody to the fifth component of complement. *Transplantation* **86**, 1445-1451 (2008).
- 170 Thurman, J. M. *et al.* C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. *J Immunol* **178**, 1819-1828 (2007).
- 171 Amara, U. *et al.* Interaction between the coagulation and complement system. *Advances in experimental medicine and biology* **632**, 71-79 (2008).
- 172 Patel, N. S. *et al.* The role of cyclooxygenase-2 in the rodent kidney following ischaemia/reperfusion injury in vivo. *European journal of pharmacology* **562**, 148-154 (2007).
- 173 Peng, S. L., Gu, X., Dai, C. L., Huang, Y. & Zhao, Y. [Effects of Shenfu injection on prostacyclin, thromboxane A2 and activities of ATPases in rats exposed to hepatic ischemia-reperfusion injury]. *Zhong xi yi jie he xue bao = Journal of Chinese integrative medicine* **5**, 427-431 (2007).
- 174 Stables, M. J. & Gilroy, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in lipid research* (2010).
- 175 Yost, C. C., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie* **92**, 692-697 (2010).
- 176 Lopez-Novoa, J. M. Potential role of platelet activating factor in acute renal failure. *Kidney international* **55**, 1672-1682 (1999).

- 177 O'Sullivan, L. A., Liongue, C., Lewis, R. S., Stephenson, S. E. & Ward, A. C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Molecular immunology* **44**, 2497-2506 (2007).
- 178 Ramesh, G. & Reeves, W. B. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl*, S56-61 (2004).
- 179 Netea, M. G. *et al.* IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS pathogens* **6**, e1000661 (2010).
- 180 Wanderer, A. A. Ischemic-reperfusion syndromes: biochemical and immunologic rationale for IL-1 targeted therapy. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **128**, 127-132 (2008).
- 181 Rusai, K. *et al.* Administration of interleukin-1 receptor antagonist ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int* **21**, 572-580 (2008).
- 182 He, Z. *et al.* Macrophages are not the source of injurious interleukin-18 in ischemic acute kidney injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F535-542 (2009).
- 183 Nechemia-Arbely, Y. *et al.* IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1106-1115 (2008).
- 184 Klein, C. L. *et al.* Interleukin-6 mediates lung injury following ischemic acute kidney injury or bilateral nephrectomy. *Kidney international* **74**, 901-909 (2008).
- 185 Murray, P. J. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current opinion in pharmacology* **6**, 379-386 (2006).
- 186 Dong, X. *et al.* Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney international* **71**, 619-628 (2007).
- 187 Akbulut, G., Dilek, O. N., Kahraman, A., Koken, T. & Serteser, M. The correlation between renal tissue oxidative stress parameters and TNF-alpha levels in an experimental model of ischemia-reperfusion injury in mice. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **11**, 11-16 (2005).
- 188 Kher, A. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research* **67**, 594-603 (2005).
- 189 Meldrum, K. K. *et al.* Liposomal delivery of heat shock protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor-kappaB activation, tumor necrosis factor-alpha production, and subsequent ischemia-induced apoptosis. *Circulation research* **92**, 293-299 (2003).
- 190 Furuichi, K. *et al.* Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* **181**, 8670-8676 (2008).
- 191 He, Z. *et al.* Interleukin-18 binding protein transgenic mice are protected against ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1414-1421 (2008).
- 192 Turan, R., Yagmurdur, H., Kavutcu, M. & Dikmen, B. Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *European journal of anaesthesiology* **24**, 185-189 (2007).
- 193 Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V. & Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annual review of pharmacology and toxicology* **41**, 203-236 (2001).
- 194 Lowenstein, C. J. Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* **75**, 240-246 (2007).
- 195 Selemidis, S., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Kemp-Harper, B. K. & Drummond, G. R. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular research* **75**, 349-358 (2007).
- 196 Kang-Decker, N. *et al.* Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *Journal of cell science* **120**, 492-501 (2007).
- 197 Dezfulian, C., Raat, N., Shiva, S. & Gladwin, M. T. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovascular research* **75**, 327-338 (2007).

- 198 Goor, Y. *et al.* Fucoidin, an inhibitor of leukocyte adhesion, exacerbates acute ischemic renal failure and stimulates nitric oxide synthesis. *Scandinavian journal of urology and nephrology* **40**, 57-62 (2006).
- 199 Kurata, H. *et al.* Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *European journal of pharmacology* **517**, 232-239 (2005).
- 200 Vo, P. A., Lad, B., Tomlinson, J. A., Francis, S. & Ahluwalia, A. autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *The Journal of biological chemistry* **280**, 7236-7243 (2005).
- 201 Brune, B. & Zhou, J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovascular research* **75**, 275-282 (2007).
- 202 Zhang, W. & Edwards, A. A model of nitric oxide tubulovascular cross talk in a renal outer medullary cross section. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F711-722 (2007).
- 203 Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. & Moilanen, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets* **4**, 471-479 (2005).
- 204 Goligorsky, M. S., Brodsky, S. V. & Noiri, E. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology. *Seminars in nephrology* **24**, 316-323 (2004).
- 205 Kaya, K. *et al.* The effect of sodium nitroprusside infusion on renal function during reperfusion period in patients undergoing coronary artery bypass grafting: a prospective randomized clinical trial. *Eur J Cardiothorac Surg* **31**, 290-297 (2007).
- 206 Taylor, C. T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *The Journal of physiology* **586**, 4055-4059 (2008).
- 207 Taylor, C. T. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *The Biochemical journal* **409**, 19-26 (2008).
- 208 Karhausen, J., Haase, V. H. & Colgan, S. P. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **4**, 256-258 (2005).
- 209 Cummins, E. P. & Taylor, C. T. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* **450**, 363-371 (2005).
- 210 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362 (2008).
- 211 Latanich, C. A. & Toledo-Pereyra, L. H. Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *J Invest Surg* **22**, 301-315 (2009).
- 212 Vallabhapurapu, S. & Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* **27**, 693-733 (2009).
- 213 Gerondakis, S. *et al.* Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* **25**, 6781-6799 (2006).
- 214 Van Waes, C., Yu, M., Nottingham, L. & Karin, M. Inhibitor-kappaB kinase in tumor promotion and suppression during progression of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 4956-4959 (2007).
- 215 Wan, F. & Lenardo, M. J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell research* **20**, 24-33 (2010).
- 216 Rius, J. *et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**, 807-811 (2008).
- 217 O'Dea, E. L., Kearns, J. D. & Hoffmann, A. UV as an amplifier rather than inducer of NF-kappaB activity. *Molecular cell* **30**, 632-641 (2008).
- 218 Cao, C. C. *et al.* In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney international* **65**, 834-845 (2004).

- 219 Sung, F. L., Zhu, T. Y., Au-Yeung, K. K., Siow, Y. L. & O, K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney international* **62**, 1160-1170 (2002).
- 220 Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R. & Willoughby, D. A. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nature medicine* **7**, 1291-1297 (2001).
- 221 Chen, L. W. *et al.* The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature medicine* **9**, 575-581 (2003).
- 222 Arumugam, T. V. *et al.* Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock (Augusta, Ga)* **32**, 4-16 (2009).
- 223 El-Achkar, T. M. *et al.* Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F534-544 (2008).
- 224 Pulskens, W. P. *et al.* Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS one* **3**, e3596 (2008).
- 225 Rusai, K. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **25**, 853-860 (2010).
- 226 Bolisetty, S. & Agarwal, A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more. *Kidney international* **75**, 674-676 (2009).
- 227 Faubel, S. *et al.* Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **322**, 8-15 (2007).
- 228 Rouschop, K. M. & Leemans, J. C. Ischemia-reperfusion treatment: opportunities point to modulation of the inflammatory response. *Kidney international* **73**, 1333-1335 (2008).
- 229 Shimoda, N., Fukazawa, N., Nonomura, K. & Fairchild, R. L. Cathepsin g is required for sustained inflammation and tissue injury after reperfusion of ischemic kidneys. *The American journal of pathology* **170**, 930-940 (2007).
- 230 Liu, M. *et al.* Effect of T cells on vascular permeability in early ischemic acute kidney injury in mice. *Microvascular research* **77**, 340-347 (2009).
- 231 Kinsey, G. R. *et al.* Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1744-1753 (2009).
- 232 Zhang, Z. X. *et al.* NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* **181**, 7489-7498 (2008).
- 233 Lee, H. T. *et al.* Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F713-722 (2007).
- 234 Day, Y. J., Huang, L., Ye, H., Linden, J. & Okusa, M. D. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F722-731 (2005).
- 235 Kurts, C. Dendritic cells: not just another cell type in the kidney, but a complex immune sentinel network. *Kidney international* **70**, 412-414 (2006).
- 236 Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**, 2252-2258 (2005).
- 237 Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews* **7**, 678-689 (2007).
- 238 Ascon, D. B. *et al.* Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* **177**, 3380-3387 (2006).
- 239 Alon, R. & Ley, K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Current opinion in cell biology* **20**, 525-532 (2008).
- 240 Evans, E. A. & Calderwood, D. A. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science (New York, N.Y)* **316**, 1148-1153 (2007).

- 241 von Andrian, U. H. & Mackay, C. R. T-cell function and migration. Two sides of the same
242 coin. *The New England journal of medicine* **343**, 1020-1034 (2000).
- 243 Langer, H. F. & Chavakis, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *Journal of*
244 *cellular and molecular medicine* **13**, 1211-1220 (2009).
- 245 Miner, J. J. *et al.* Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte
rolling and signaling under flow. *Blood* **112**, 2035-2045 (2008).
- 246 Barreiro, O., Vicente-Manzanares, M., Urzainqui, A., Yanez-Mo, M. & Sanchez-Madrid, F.
Interactive protrusive structures during leukocyte adhesion and transendothelial
migration. *Front Biosci* **9**, 1849-1863 (2004).
- 247 Nishida, N. *et al.* Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to
extended conformations. *Immunity* **25**, 583-594 (2006).
- 248 Barreiro, O., de la Fuente, H., Mittelbrunn, M. & Sanchez-Madrid, F. Functional insights on
the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte
migration and immune interactions. *Immunological reviews* **218**, 147-164 (2007).
- 249 Lamagna, C. *et al.* Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin:
function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Molecular biology of the cell* **16**,
250 4992-5003 (2005).
- 251 Orlova, V. V. & Chavakis, T. Regulation of vascular endothelial permeability by junctional
adhesion molecules (JAM). *Thrombosis and haemostasis* **98**, 327-332 (2007).
- 252 Muller, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the
inflammatory response. *Trends in immunology* **24**, 327-334 (2003).
- 253 Bixel, G. *et al.* Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood*
104, 3205-3213 (2004).
- 254 von Hundelshausen, P., Koenen, R. R. & Weber, C. Platelet-mediated enhancement of
leukocyte adhesion. *Microcirculation* **16**, 84-96 (2009).
- 255 Killock, D. J. *et al.* In Vitro and in Vivo Characterization of Molecular Interactions between
Calmodulin, Ezrin/Radixin/Moesin, and L-selectin. *The Journal of biological chemistry* **284**,
256 8833-8845 (2009).
- 257 Zarbock, A., Singbartl, K. & Kellum, J. A. Evidence-based renal replacement therapy for
acute kidney injury. *Minerva anesthesiologica* **75**, 135-139 (2009).
- 258 Colditz, I. G., Schneider, M. A., Pruenster, M. & Rot, A. Chemokines at large: in-vivo
mechanisms of their transport, presentation and clearance. *Thrombosis and haemostasis*
97, 688-693 (2007).
- 259 Laudanna, C. & Alon, R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated
arrest of rolling leukocytes. *Thrombosis and haemostasis* **95**, 5-11 (2006).
- 260 Shamri, R. *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-
1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature immunology* **6**,
497-506 (2005).
- 261 Schenkel, A. R., Mamdouh, Z. & Muller, W. A. Locomotion of monocytes on endothelium
is a critical step during extravasation. *Nature immunology* **5**, 393-400 (2004).
- 262 Phillipson, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly
distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental*
medicine **203**, 2569-2575 (2006).
- 263 Basit, A. *et al.* ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment
into the alveolar space. *American journal of physiology* **291**, L200-207 (2006).
- 264 Barreiro, O. *et al.* Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a
novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *The Journal of cell biology*
157, 1233-1245 (2002).

- 261 Barreiro, O. *et al.* Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of cell biology* **183**, 527-542 (2008).
- 262 Yang, L. *et al.* Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. *J Immunol* **177**, 6440-6449 (2006).
- 263 Yang, L., Kowalski, J. R., Zhan, X., Thomas, S. M. & Luscinskas, F. W. Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro. *Circulation research* **98**, 394-402 (2006).
- 264 Carman, C. V. & Springer, T. A. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Current opinion in cell biology* **20**, 533-540 (2008).
- 265 Weber, C., Fraemohs, L. & Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature reviews* **7**, 467-477 (2007).
- 266 Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G. & Nottebaum, A. F. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in cell biology* **19**, 8-15 (2009).
- 267 Vestweber, D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunological reviews* **218**, 178-196 (2007).
- 268 Langer, H. F. *et al.* Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1463-1470 (2007).
- 269 Sachs, U. J. *et al.* The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *The Journal of biological chemistry* **282**, 23603-23612 (2007).
- 270 Shaw, S. K. *et al.* Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *The Journal of experimental medicine* **200**, 1571-1580 (2004).
- 271 Phillipson, M., Kaur, J., Colarusso, P., Ballantyne, C. M. & Kubes, P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PloS one* **3**, e1649 (2008).
- 272 Pennica, D. *et al.* Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1142-1146 (1995).
- 273 Ernst, M. & Jenkins, B. J. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* **20**, 23-32 (2004).
- 274 Ishikawa, M. *et al.* cDNA cloning of rat cardiotrophin-1 (CT-1): augmented expression of CT-1 gene in ventricle of genetically hypertensive rats. *Biochemical and biophysical research communications* **219**, 377-381 (1996).
- 275 Pennica, D. *et al.* Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *The Journal of biological chemistry* **270**, 10915-10922 (1995).
- 276 Pennica, D., Wood, W. I. & Chien, K. R. Cardiotrophin-1: a multifunctional cytokine that signals via LIF receptor-gp 130 dependent pathways. *Cytokine & growth factor reviews* **7**, 81-91 (1996).
- 277 Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* **374**, 1-20 (2003).
- 278 Pennica, D. *et al.* Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine* **8**, 183-189 (1996).

- 279 Funamoto, M. *et al.* Isolation and characterization of the murine cardiotrophin-1 gene: expression and norepinephrine-induced transcriptional activation. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 1275-1284 (2000).
- 280 Skiniotis, G., Lupardus, P. J., Martick, M., Walz, T. & Garcia, K. C. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Molecular cell* **31**, 737-748 (2008).
- 281 Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* **334 (Pt 2)**, 297-314 (1998).
- 282 Fischer, P. & Hilfiker-Kleiner, D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *British journal of pharmacology* **153 Suppl 1**, S414-427 (2008).
- 283 Pennica, D. *et al.* Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron* **17**, 63-74 (1996).
- 284 Robledo, O. *et al.* Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *The Journal of biological chemistry* **272**, 4855-4863 (1997).
- 285 Grotzinger, J. Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochimica et biophysica acta* **1592**, 215-223 (2002).
- 286 Plun-Favreau, H. *et al.* Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor. *The Journal of biological chemistry* **278**, 27169-27179 (2003).
- 287 Wollert, K. C. *et al.* Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* **271**, 9535-9545 (1996).
- 288 Yamaoka, K. *et al.* The Janus kinases (Jaks). *Genome biology* **5**, 253 (2004).
- 289 Feener, E. P., Rosario, F., Dunn, S. L., Stancheva, Z. & Myers, M. G., Jr. Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Molecular and cellular biology* **24**, 4968-4978 (2004).
- 290 Bhattacharya, S. & Schindler, C. Regulation of Stat3 nuclear export. *The Journal of clinical investigation* **111**, 553-559 (2003).
- 291 Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. & Schindler, C. W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24 (2002).
- 292 Hendry, L. & John, S. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**, 4613-4620 (2004).
- 293 Fujitani, Y. *et al.* An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* **14**, 751-761 (1997).
- 294 Bhattacharya, S., Ray, R. M. & Johnson, L. R. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *The Biochemical journal* **392**, 335-344 (2005).
- 295 McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C. & Reich, N. C. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *The EMBO journal* **21**, 1754-1763 (2002).
- 296 Zimmers, T. A., Pierce, R. H., McKillop, I. H. & Koniaris, L. G. Resolving the role of IL-6 in liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)* **38**, 1590-1591; author reply 1591 (2003).
- 297 Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews* **7**, 454-465 (2007).
- 298 Aggarwal, B. B. *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1171**, 59-76 (2009).

- 299 Tanimoto, K. *et al.* SOCS1/JAB likely mediates the protective effect of cardiotrophin-1 against lipopolysaccharide-induced left ventricular dysfunction in vivo. *Circ J* **69**, 1412-1417 (2005).
- 300 Hamanaka, I. *et al.* Induction of JAB/SOCS-1/SSI-1 and CIS3/SOCS-3/SSI-3 is involved in gp130 resistance in cardiovascular system in rat treated with cardiotrophin-1 in vivo. *Circulation research* **88**, 727-732 (2001).
- 301 Ungureanu, D. *et al.* PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* **102**, 3311-3313 (2003).
- 302 Chen, W., Daines, M. O. & Khurana Hershey, G. K. Turning off signal transducer and activator of transcription (STAT): the negative regulation of STAT signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology* **114**, 476-489; quiz 490 (2004).
- 303 Tian, Z. J. *et al.* Different contributions of STAT3, ERK1/2, and PI3-K signaling to cardiomyocyte hypertrophy by cardiotrophin-1. *Acta pharmacologica Sinica* **25**, 1157-1164 (2004).
- 304 Nakajima, T. *et al.* Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2207-2211 (1993).
- 305 Hodge, D. R., Hurt, E. M. & Farrar, W. L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2502-2512 (2005).
- 306 Fang, J. Y. & Richardson, B. C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The lancet oncology* **6**, 322-327 (2005).
- 307 Kuwahara, K. *et al.* Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 1385-1394 (2000).
- 308 Scheid, M. P., Marignani, P. A. & Woodgett, J. R. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Molecular and cellular biology* **22**, 6247-6260 (2002).
- 309 Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A. & Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983-8998 (2003).
- 310 Grande, M. T. *et al.* Deletion of H-Ras decreases renal fibrosis and myofibroblast activation following ureteral obstruction in mice. *Kidney international* **77**, 509-518 (2010).
- 311 Martinez-Salgado, C., Rodriguez-Pena, A. B. & Lopez-Novoa, J. M. Involvement of small Ras GTPases and their effectors in chronic renal disease. *Cell Mol Life Sci* **65**, 477-492 (2008).
- 312 Brar, B. K. *et al.* Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation. *Cardiovascular research* **51**, 265-274 (2001).
- 313 Brar, B. K., Stephanou, A., Pennica, D. & Latchman, D. S. CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways. *Cytokine* **16**, 93-96 (2001).
- 314 Fischer, P. & Hilfiker-Kleiner, D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic research in cardiology* **102**, 279-297 (2007).
- 315 Iniguez, M. *et al.* Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2809-2815 (2006).
- 316 Sheng, Z. *et al.* Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry* **272**, 5783-5791 (1997).

- 317 Song, J. *et al.* Adenoviral cardiotrophin-1 transfer improves survival and early graft
function after ischemia and reperfusion in rat small-for-size liver transplantation model.
Transpl Int **21**, 372-383 (2008).
- 318 Kunisada, K. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart
transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-
induced cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
States of America* **97**, 315-319 (2000).
- 319 Hilfiker-Kleiner, D. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 is required for
myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection
from ischemic injury. *Circulation research* **95**, 187-195 (2004).
- 320 Hilfiker-Kleiner, D. *et al.* A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates
postpartum cardiomyopathy. *Cell* **128**, 589-600 (2007).
- 321 Negoro, S. *et al.* Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat
acute myocardial infarction. *Cardiovascular research* **47**, 797-805 (2000).
- 322 Negoro, S. *et al.* Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects
cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the
upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* **104**, 979-981 (2001).
- 323 Negoro, S. *et al.* Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-
induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-
xL/caspase-3 interaction. *Circulation* **103**, 555-561 (2001).
- 324 Lopez, N., Diez, J. & Fortuno, M. A. Characterization of the protective effects of
cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. *Cytokine* **30**,
282-292 (2005).
- 325 Baines, C. P. & Molkenin, J. D. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte
apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**, 47-62 (2005).
- 326 Craig, R., Wagner, M., McCardle, T., Craig, A. G. & Glembotski, C. C. The cytoprotective
effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require
activation of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry* **276**, 37621-37629 (2001).
- 327 Yang, Z. F. *et al.* Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after
hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation. *Liver Int* **28**, 622-
631 (2008).
- 328 Fritzenwanger, M., Foerster, M., Meusel, K., Jung, C. & Figulla, H. R. Cardiotrophin-1
induces intercellular adhesion molecule-1 expression by nuclear factor kappaB activation
in human umbilical vein endothelial cells. *Chinese medical journal* **121**, 2592-2598 (2008).
- 329 Middleton, G. *et al.* Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the
survival of developing neurons. *The Journal of cell biology* **148**, 325-332 (2000).
- 330 Forger, N. G. *et al.* Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic
factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* **23**, 8854-8858 (2003).
- 331 Jin, H. *et al.* In vivo effects of cardiotrophin-1. *Cytokine* **8**, 920-926 (1996).
- 332 Marques, J. M. *et al.* Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the
liver against apoptosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **45**, 639-648 (2007).
- 333 Oppenheim, R. W. *et al.* Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the
survival of subpopulations of developing motoneurons. *J Neurosci* **21**, 1283-1291 (2001).
- 334 Zheng, X., Zhou, D., Seow, C. Y. & Bai, T. R. Cardiotrophin-1 alters airway smooth muscle
structure and mechanical properties in airway explants. *American journal of physiology*
287, L1165-1171 (2004).
- 335 Zvonic, S., Hogan, J. C., Arbour-Reily, P., Mynatt, R. L. & Stephens, J. M. Effects of
cardiotrophin on adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47572-47579 (2004).
- 336 Asai, S. *et al.* The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans. *Biochemical
and biophysical research communications* **279**, 320-323 (2000).

- 337 Sheng, Z., Pennica, D., Wood, W. I. & Chien, K. R. Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival. *Development (Cambridge, England)* **122**, 419-428 (1996).
- 338 Latchman, D. S. Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *International journal of experimental pathology* **80**, 189-196 (1999).
- 339 Freed, D. H. *et al.* Cardiotrophin-1: expression in experimental myocardial infarction and potential role in post-MI wound healing. *Molecular and cellular biochemistry* **254**, 247-256 (2003).
- 340 Wartenberg, M. *et al.* Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *Faseb J* **15**, 995-1005 (2001).
- 341 Wolin, M. S., Ahmad, M. & Gupte, S. A. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *American journal of physiology* **289**, L159-173 (2005).
- 342 Ji, A. R. *et al.* Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage. *Experimental & molecular medicine* **42**, 175-186 (2010).
- 343 Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44-84 (2007).
- 344 Berg, K. *et al.* Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction. *Free radical research* **39**, 629-636 (2005).
- 345 Hishinuma, S., Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K. & Yamauchi-Takahara, K. Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **264**, 436-440 (1999).
- 346 Sauer, H. *et al.* Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Experimental cell research* **294**, 313-324 (2004).
- 347 Ateghang, B., Wartenberg, M., Gassmann, M. & Sauer, H. Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *Journal of cell science* **119**, 1043-1052 (2006).
- 348 Haddad, J. J. & Harb, H. L. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *International immunopharmacology* **5**, 461-483 (2005).
- 349 Chen, X. Y. *et al.* [Effects of cardiotrophin-1 on differentiation of cardiomyocyte-like cells induced from rat bone marrow mesenchymal stem cells]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University* **40**, 85-88 (2009).
- 350 Xinyun, C. *et al.* Effects of cardiotrophin-1 on differentiation and maturation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced with 5-azacytidine in vitro. *International journal of cardiology* **143**, 171-177 (2010).
- 351 Ishikawa, M. *et al.* A heart-specific increase in cardiotrophin-1 gene expression precedes the establishment of ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *Journal of hypertension* **17**, 807-816 (1999).
- 352 Railson, J. *et al.* Cardiotrophin-1 reduces stress-induced heat shock protein production in cardiac myocytes. *Cytokine* **12**, 1741-1744 (2000).
- 353 Freed, D. H., Borowiec, A. M., Angelovska, T. & Dixon, I. M. Induction of protein synthesis in cardiac fibroblasts by cardiotrophin-1: integration of multiple signaling pathways. *Cardiovascular research* **60**, 365-375 (2003).
- 354 Tsuruda, T. *et al.* Cardiotrophin-1 stimulation of cardiac fibroblast growth: roles for glycoprotein 130/leukemia inhibitory factor receptor and the endothelin type A receptor. *Circulation research* **90**, 128-134 (2002).

- 355 Freed, D. H. *et al.* Role of Myosin Light Chain Kinase in Cardiotrophin-1 Induced Cardiac Myofibroblast Cell Migration. *American journal of physiology*, doi:ajpheart.01041.2010 [pii] 10.1152/ajpheart.01041.2010 (2011).
- 356 Freed, D. H., Cunnington, R. H., Dangerfield, A. L., Sutton, J. S. & Dixon, I. M. Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart. *Cardiovascular research* **65**, 782-792 (2005).
- 357 Kaneko, K. *et al.* Expression of interleukin-6 in the ventricles and coronary arteries of patients with myocardial infarction. *Research communications in molecular pathology and pharmacology* **97**, 3-12 (1997).
- 358 Jougasaki, M. Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation. *Adv Clin Chem* **52**, 41-76 (2010).
- 359 Liao, Z. *et al.* Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. *Cardiovascular research* **53**, 902-910 (2002).
- 360 Aoyama, T. *et al.* Augmented expression of cardiotrophin-1 and its receptor component, gp130, in both left and right ventricles after myocardial infarction in the rat. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 1821-1830 (2000).
- 361 Ruixing, Y., Dezhai, Y. & Jiaquan, L. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial infarction. *J Med Invest* **51**, 29-37 (2004).
- 362 Ruixing, Y., Jinzhen, W., Dezhai, Y. & Jiaquan, L. Cardioprotective role of cardiotrophin-1 gene transfer in a murine model of myocardial infarction. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **25**, 286-294 (2007).
- 363 Ghosh, S., Ng, L. L., Talwar, S., Squire, I. B. & Galinanes, M. Cardiotrophin-1 protects the human myocardium from ischemic injury. Comparison with the first and second window of protection by ischemic preconditioning. *Cardiovascular research* **48**, 440-447 (2000).
- 364 Hirota, H. *et al.* Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* **97**, 189-198 (1999).
- 365 He-nan, Z. *et al.* Relation of Cardiotrophin-1 (CT-1) and cardiac transcription factor GATA4 expression in rat's cardiac myocytes hypertrophy and apoptosis. *Pathology, research and practice* **205**, 615-625 (2009).
- 366 Yellon, D. M. & Baxter, G. F. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends in cardiovascular medicine* **9**, 245-249 (1999).
- 367 Latchman, D. S. Cardiotrophin-1: a novel cytokine and its effects in the heart and other tissues. *Pharmacology & therapeutics* **85**, 29-37 (2000).
- 368 Railson, J. E. *et al.* Cardiotrophin-1 and urocortin cause protection by the same pathway and hypertrophy via distinct pathways in cardiac myocytes. *Cytokine* **17**, 243-253 (2002).
- 369 Liu, J. C., He, M., Wan, L. & Cheng, X. S. Heat shock protein 70 gene transfection protects rat myocardium cell against anoxia-reoxygenation injury. *Chinese medical journal* **120**, 578-583 (2007).
- 370 Liu, J. C., Wan, L., He, M. & Cheng, X. S. [Protection of myocardiocytes against anoxia-reoxygenation injury by heat shock protein 70 gene transfection: experiment with rats]. *Zhonghua yi xue za zhi* **87**, 3436-3439 (2007).
- 371 Stephanou, A. *et al.* Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli. *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**, 849-855 (1998).
- 372 Lopez, N., Diez, J. & Fortuno, M. A. Differential hypertrophic effects of cardiotrophin-1 on adult cardiomyocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* **41**, 902-913 (2006).

- 373 Decker, T. & Kovarik, P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637 (2000).
- 374 Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**, 2548-2556 (2000).
- 375 Li, Y. J. *et al.* Crosstalk between ERK1/2 and STAT3 in the modulation of cardiomyocyte hypertrophy induced by cardiotrophin-1. *Chinese medical journal* **117**, 1135-1142 (2004).
- 376 Takahashi, N. *et al.* Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**, 185-192 (2005).
- 377 Jamshidi, Y., Zourlidou, A., Carroll, C. J., Sinclair, J. & Latchman, D. S. Signal-transduction pathways involved in the hypertrophic effect of hsp56 in neonatal cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **36**, 381-392 (2004).
- 378 Oka, T. *et al.* Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation research* **98**, 837-845 (2006).
- 379 Kitta, K. *et al.* Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 4705-4712 (2003).
- 380 Funamoto, M. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 10561-10566 (2000).
- 381 Jougasaki, M. *et al.* Augmented cardiac cardiotrophin-1 in experimental congestive heart failure. *Circulation* **101**, 14-17 (2000).
- 382 Kuwahara, K. *et al.* Involvement of cardiotrophin-1 in cardiac myocyte-nonmyocyte interactions during hypertrophy of rat cardiac myocytes in vitro. *Circulation* **100**, 1116-1124 (1999).
- 383 Stejskal, D. & Ruzicka, V. Cardiotrophin-1. Review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **152**, 9-19 (2008).
- 384 Takimoto, Y. *et al.* Increased expression of cardiotrophin-1 during ventricular remodeling in hypertensive rats. *American journal of physiology* **282**, H896-901 (2002).
- 385 Liu, J. *et al.* Pioglitazone inhibits hypertrophy induced by high glucose and insulin in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Die Pharmazie* **62**, 925-929 (2007).
- 386 Chandrasekar, B., Melby, P. C., Pennica, D. & Freeman, G. L. Overexpression of cardiotrophin-1 and gp130 during experimental acute Chagas cardiomyopathy. *Immunology letters* **61**, 89-95 (1998).
- 387 Diez, J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* **9**, 546-550 (2007).
- 388 Lopez, B., Castellano, J. M., Gonzalez, A., Barba, J. & Diez, J. Association of increased plasma cardiotrophin-1 with inappropriate left ventricular mass in essential hypertension. *Hypertension* **50**, 977-983 (2007).
- 389 Pemberton, C. J. Hypertension, cardiotrophin-1 and gp130: three points to heart failure? *Journal of hypertension* **25**, 2008-2010 (2007).
- 390 Pemberton, C. J., Raudsepp, S. D., Yandle, T. G., Cameron, V. A. & Richards, A. M. Plasma cardiotrophin-1 is elevated in human hypertension and stimulated by ventricular stretch. *Cardiovascular research* **68**, 109-117 (2005).
- 391 Souzeau, E., Llamas, B., Belanger, S., Picard, S. & Deschepper, C. F. A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension* **47**, 128-133 (2006).
- 392 Kurdi, M., Randon, J., Cerutti, C. & Bricca, G. Increased expression of IL-6 and LIF in the hypertrophied left ventricle of TGR(mRen2)27 and SHR rats. *Molecular and cellular biochemistry* **269**, 95-101 (2005).

- 393 Lopez, B. *et al.* Is plasma cardiotrophin-1 a marker of hypertensive heart disease? *Journal of hypertension* **23**, 625-632 (2005).
- 394 Tsutamoto, T. *et al.* Relationship between plasma level of cardiotrophin-1 and left ventricular mass index in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* **38**, 1485-1490 (2001).
- 395 Gonzalez, A. *et al.* Usefulness of plasma cardiotrophin-1 in assessment of left ventricular hypertrophy regression in hypertensive patients. *Journal of hypertension* **23**, 2297-2304 (2005).
- 396 Limongelli, G. *et al.* Cardiotrophin-1 and TNF-alpha circulating levels at rest and during cardiopulmonary exercise test in athletes and healthy individuals. *Cytokine* **50**, 245-247 (2010).
- 397 Calabro, P. *et al.* Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. *Journal of molecular and cellular cardiology* **46**, 142-148 (2009).
- 398 Talwar, S., Squire, I. B., Davies, J. E. & Ng, L. L. The effect of valvular regurgitation on plasma Cardiotrophin-1 in patients with normal left ventricular systolic function. *Eur J Heart Fail* **2**, 387-391 (2000).
- 399 Toh, R. *et al.* Transplantation of cardiotrophin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Journal of the American College of Cardiology* **43**, 2337-2347 (2004).
- 400 Zolk, O., Engmann, S., Munzel, F. & Krajcik, R. Chronic cardiotrophin-1 stimulation impairs contractile function in reconstituted heart tissue. *American journal of physiology* **288**, E1214-1221 (2005).
- 401 Talwar, S. *et al.* Plasma N-terminal pro BNP and cardiotrophin-1 are elevated in aortic stenosis. *Eur J Heart Fail* **3**, 15-19 (2001).
- 402 Zolk, O., Ng, L. L., O'Brien, R. J., Weyand, M. & Eschenhagen, T. Augmented expression of cardiotrophin-1 in failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance. *Circulation* **106**, 1442-1446 (2002).
- 403 Jougasaki, M. *et al.* Ventricular cardiotrophin-1 activation precedes BNP in experimental heart failure. *Peptides* **24**, 889-892 (2003).
- 404 Tsutamoto, T. *et al.* Plasma level of cardiotrophin-1 as a prognostic predictor in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* **9**, 1032-1037 (2007).
- 405 Monserrat, L. *et al.* Cardiotrophin-1 plasma levels are associated with the severity of hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* **32**, 177-183, doi:ehq400 [pii] 10.1093/eurheartj/ehq400 (2011).
- 406 Benigni, F., Sacco, S., Pennica, D. & Ghezzi, P. Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells. *The American journal of pathology* **149**, 1847-1850 (1996).
- 407 Jin, H. *et al.* Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine* **10**, 19-25 (1998).
- 408 Hamanaka, I. *et al.* Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *American journal of physiology* **279**, H388-396 (2000).
- 409 Zhou, D. *et al.* Expression and effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in human airway smooth muscle cells. *British journal of pharmacology* **140**, 1237-1244 (2003).
- 410 Nomura, N. *et al.* Cardiotrophin-1 is a prophylactic against the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *The Annals of thoracic surgery* **76**, 237-243 (2003).
- 411 Pulido, E. J. *et al.* Cardiotrophin-1 attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *The Journal of surgical research* **84**, 240-246 (1999).

- 412 Robledo, O. *et al.* Hepatocyte-derived cell lines express a functional receptor for cardiotrophin-1. *European cytokine network* **8**, 245-252 (1997).
- 413 Bustos, M. *et al.* Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* **125**, 192-201 (2003).
- 414 Beraza, N. *et al.* Interplay among cardiotrophin-1, prostaglandins, and vascular endothelial growth factor in rat liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)* **41**, 460-469 (2005).
- 415 Ho, D. W. *et al.* Therapeutic potential of cardiotrophin 1 in fulminant hepatic failure: dual roles in antiapoptosis and cell repair. *Arch Surg* **141**, 1077-1084; discussion 1084 (2006).
- 416 Cheng, Y. *et al.* Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *The Journal of clinical investigation* **101**, 1992-1999 (1998).
- 417 Han, B. H. *et al.* Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *The Journal of biological chemistry* **277**, 30128-30136 (2002).
- 418 Renolleau, S., Aggoun-Zouaoui, D., Ben-Ari, Y. & Charriaut-Marlangue, C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **29**, 1454-1460; discussion 1461 (1998).
- 419 Wen, T. C., Rogido, M., Gressens, P. & Sola, A. A reproducible experimental model of focal cerebral ischemia in the neonatal rat. *Brain Res Brain Res Protoc* **13**, 76-83 (2004).
- 420 Renolleau, S. *et al.* Specific caspase inhibitor Q-VD-OPh prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. *Journal of neurochemistry* **100**, 1062-1071 (2007).
- 421 Dzierko, M. *et al.* A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Annals of neurology* **64**, 664-673 (2008).
- 422 Feng, Y., Fratkin, J. D. & LeBlanc, M. H. Inhibiting caspase-8 after injury reduces hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rat. *European journal of pharmacology* **481**, 169-173 (2003).
- 423 Peng, H., Sola, A., Moore, J. & Wen, T. Caspase inhibition by cardiotrophin-1 prevents neuronal death in vivo and in vitro. *Journal of neuroscience research* **88**, 1041-1051 (2010).
- 424 Gard, A. L., Gavin, E., Solodushko, V. & Pennica, D. Cardiotrophin-1 in choroid plexus and the cerebrospinal fluid circulatory system. *Neuroscience* **127**, 43-52 (2004).
- 425 Nishikawa, J., Sakuma, K., Sorimachi, Y., Yoshimoto, K. & Yasuhara, M. Increase of Cardiotrophin-1 immunoreactivity in regenerating and overloaded but not denervated muscles of rats. *Neuropathology* **25**, 54-65 (2005).
- 426 Bordet, T. *et al.* Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Human molecular genetics* **10**, 1925-1933 (2001).
- 427 Fasnacht, N. & Muller, W. Conditional gp130 deficient mouse mutants. *Seminars in cell & developmental biology* **19**, 379-384 (2008).
- 428 Sakamoto, T. *et al.* Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF beta 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. *Journal of neuroscience research* **72**, 54-64 (2003).
- 429 Bordet, T. *et al.* Adenoviral cardiotrophin-1 gene transfer protects pmn mice from progressive motor neuronopathy. *The Journal of clinical investigation* **104**, 1077-1085 (1999).

- 430 Dolcet, X. *et al.* Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Molecular and cellular neurosciences* **18**, 619-631 (2001).
- 431 Lesbordes, J. C. *et al.* Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* **12**, 1233-1239 (2003).
- 432 Grumbles, R. M., Sesodia, S., Wood, P. M. & Thomas, C. K. Neurotrophic factors improve motoneuron survival and function of muscle reinnervated by embryonic neurons. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **68**, 736-746 (2009).
- 433 Mitsumoto, H. *et al.* Effects of cardiotrophin-1 (CT-1) in a mouse motor neuron disease. *Muscle & nerve* **24**, 769-777 (2001).
- 434 Song, Y. *et al.* Photoreceptor protection by cardiotrophin-1 in transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter. *Investigative ophthalmology & visual science* **44**, 4069-4075 (2003).
- 435 Walker, E. C. *et al.* Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* **23**, 2025-2032 (2008).
- 436 Natal, C. *et al.* Cardiotrophin-1 is expressed in adipose tissue and upregulated in the metabolic syndrome. *American journal of physiology* **294**, E52-60 (2008).
- 437 He, F. & Stephens, J. M. Induction of SOCS-3 is insufficient to confer IRS-1 protein degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **344**, 95-98 (2006).
- 438 Jougasaki, M., Larsen, A. M., Cataliotti, A., Christiansen, D. C. & Burnett, J. C., Jr. Cardiotrophin-1 stimulates endothelin-1 via gp130 in vascular endothelial cells. *Peptides* **23**, 1441-1447 (2002).
- 439 Fritzenwanger, M., Kuethe, F., Haase, D., Jandt, E. & Figulla, H. R. Cardiotrophin-1 induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* **33**, 46-51 (2006).
- 440 Fritzenwanger, M. *et al.* Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* **36**, 101-106 (2006).
- 441 Ichiki, T. *et al.* Cardiotrophin-1 stimulates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic endothelial cells. *American journal of physiology* **294**, H750-763 (2008).
- 442 Downie, P. F., Talwar, S., Squire, I. B., Davies, J. E. & Ng, L. L. Prolonged stability of endogenous cardiotrophin-1 in whole blood. *Metabolism: clinical and experimental* **50**, 237-240 (2001).
- 443 Fritzenwanger, M. *et al.* Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human monocytes. *Cytokine* **38**, 137-144 (2007).
- 444 Sano, M. *et al.* Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* **275**, 29717-29723 (2000).
- 445 Fukuzawa, J. *et al.* Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3 : an autocrine loop for hypertrophy. *Hypertension* **35**, 1191-1196 (2000).
- 446 Janjua, S., Lawrence, K. M., Ng, L. L. & Latchman, D. S. The cardioprotective agent urocortin induces expression of CT-1. *Cardiovascular toxicology* **3**, 255-262 (2003).
- 447 Jiang, Z. S. *et al.* High- but not low-molecular weight FGF-2 causes cardiac hypertrophy in vivo; possible involvement of cardiotrophin-1. *Journal of molecular and cellular cardiology* **42**, 222-233 (2007).
- 448 Forman, H. & Boveris, A. Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. *Free radicals in biology* **5**, 65-90 (1982).

- 449 Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D. & Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology* **78**, 206-209 (1982).
- 450 Mullane, K. M., Kraemer, R. & Smith, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *Journal of pharmacological methods* **14**, 157-167 (1985).
- 451 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275 (1951).
- 452 Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354 (1979).
- 453 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 454 Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y)* **239**, 487-491 (1988).
- 455 Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159 (1987).
- 456 Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**, 532-534, 536-537 (1993).
- 457 Gritman, K., Van Winkle, D. M., Lorentz, C. U., Pennica, D. & Habecker, B. A. The lack of cardiotrophin-1 alters expression of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA but does not impair cardiac injury response. *Cytokine* **36**, 9-16 (2006).
- 458 Habecker, B. A., Gritman, K. R., Willison, B. D. & Van Winkle, D. M. Myocardial infarction stimulates galanin expression in cardiac sympathetic neurons. *Neuropeptides* **39**, 89-95 (2005).
- 459 Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research* **61**, 448-460 (2004).
- 460 Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866 (1999).
- 461 Zabel, U. & Baeuerle, P. A. Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* **61**, 255-265 (1990).
- 462 Liao, X. X. *et al.* [Role of nuclear factor-KappaB in endothelial injury in acute myocardial infarction]. *Zhongguo wei zhong bing ji jiu yi xue = Chinese critical care medicine = Zhongguo weizhongbing jijiuyixue* **20**, 413-415 (2008).
- 463 Moss, N. C. *et al.* Inhibitory kappa B kinase-beta is a target for specific nuclear factor kappa B-mediated delayed cardioprotection. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **136**, 1274-1279 (2008).
- 464 Fritzenwanger, M. *et al.* Cardiotrophin-1 induces tumor necrosis factor alpha synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Mediators of inflammation* **2009**, 489802 (2009).
- 465 Yang, N. *et al.* Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 91-100 (2008).
- 466 Yasukawa, H. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *The Journal of clinical investigation* **108**, 1459-1467 (2001).
- 467 Kinjyo, I. *et al.* SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* **17**, 583-591 (2002).

- 468 Nakagawa, R. *et al.* SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* **17**, 677-687 (2002).
- 469 Dhingra, S., Sharma, A. K., Arora, R. C., Slezak, J. & Singal, P. K. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovascular research* **82**, 59-66 (2009).
- 470 El Kasmi, K. C. *et al.* General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol* **177**, 7880-7888 (2006).
- 471 Keller, E. T., Wanagat, J. & Ershler, W. B. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci* **1**, d340-357 (1996).
- 472 Kamimura, D., Ishihara, K. & Hirano, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **149**, 1-38 (2003).
- 473 Matsushita, K. *et al.* Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **85**, 1210-1223 (2005).
- 474 Yao, L. *et al.* Acute effect of human cardiotrophin-1 on hemodynamic parameters in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats. *Hypertens Res* **24**, 717-721 (2001).
- 475 Liu, S. F., Ye, X. & Malik, A. B. In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* **159**, 3976-3983 (1997).
- 476 Yu, Z., Zhang, W. & Kone, B. C. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *The Biochemical journal* **367**, 97-105 (2002).
- 477 Gao, J., Morrison, D. C., Parmely, T. J., Russell, S. W. & Murphy, W. J. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *The Journal of biological chemistry* **272**, 1226-1230 (1997).
- 478 Haller, H. *et al.* Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney international* **50**, 473-480 (1996).
- 479 Chang, Y. J., Holtzman, M. J. & Chen, C. C. Differential role of Janus family kinases (JAKs) in interferon-gamma-induced lung epithelial ICAM-1 expression: involving protein interactions between JAKs, phospholipase Cgamma, c-Src, and STAT1. *Molecular pharmacology* **65**, 589-598 (2004).
- 480 Zhou, Z., Connell, M. C. & MacEwan, D. J. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cellular signalling* **19**, 1238-1248 (2007).
- 481 Yang, B., Hosgood, S. A. & Nicholson, M. L. Naked small interfering RNA of caspase-3 in preservation solution and autologous blood perfusate protects isolated ischemic porcine kidneys. *Transplantation* **91**, 501-507 (2011).
- 482 Rind, H. B. & von Bartheld, C. S. Target-derived cardiotrophin-1 and insulin-like growth factor-I promote neurite growth and survival of developing oculomotor neurons. *Molecular and cellular neurosciences* **19**, 58-71 (2002).
- 483 Toth, G. *et al.* Gene transfer of glial cell-derived neurotrophic factor and cardiotrophin-1 protects PC12 cells from injury: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of neuroscience research* **69**, 622-632 (2002).
- 484 Wong, H. R. & Wispe, J. R. The stress response and the lung. *The American journal of physiology* **273**, L1-9 (1997).

- 485 Madrid, L. V. *et al.* Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Molecular and cellular biology* **20**, 1626-1638 (2000).
- 486 Barnes, P. J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* **336**, 1066-1071 (1997).
- 487 Ghosh, S. & Hayden, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews* **8**, 837-848 (2008).
- 488 Woo, M. *et al.* Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & development* **12**, 806-819 (1998).
- 489 Terrell, A. M. *et al.* Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock (Augusta, Ga)* **26**, 226-234 (2006).
- 490 Pfitzner, E., Kliem, S., Baus, D. & Litterst, C. M. The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Current pharmaceutical design* **10**, 2839-2850 (2004).
- 491 Murray, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**, 2623-2629 (2007).
- 492 Bluysen, H. A. *et al.* IFN gamma-dependent SOCS3 expression inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation and differentially affects IL-6 mediated transcriptional responses in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C354-362 (2010).
- 493 Stephanou, A. & Latchman, D. S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **23**, 177-182 (2005).
- 494 Freitas, M. C. *et al.* Blockade of Janus kinase-2 signaling ameliorates mouse liver damage due to ischemia and reperfusion. *Liver Transpl* **16**, 600-610 (2010).
- 495 O'Shea, J. J. & Murray, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* **28**, 477-487 (2008).
- 496 Leonard, M. O. *et al.* 15-Epi-16-(para-fluorophenoxy)-lipoxin A(4)-methyl ester, a synthetic analogue of 15-epi-lipoxin A(4), is protective in experimental ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1657-1662 (2002).
- 497 Requiao-Moura, L. R. *et al.* Effects of ischemia and reperfusion injury on long-term graft function. *Transplantation proceedings* **43**, 70-73 (2011).
- 498 Moreira, P., Sa, H., Figueiredo, A. & Mota, A. Delayed renal graft function: risk factors and impact on the outcome of transplantation. *Transplantation proceedings* **43**, 100-105 (2011).
- 499 He, W., Liu, K. & Ding, H. The relationship between transforming growth factor beta1 expression and cold ischemia injury of rat donor kidney. *Experimental and molecular pathology* **88**, 206-209 (2010).
- 500 Hosgood, S. A., Bagul, A. & Nicholson, M. L. Minimising cold ischaemic injury in an experimental model of kidney transplantation. *European journal of clinical investigation* **41**, 233-240 (2011).
- 501 Yin, M. *et al.* Different patterns of renal cell killing after warm and cold ischemia. *Renal failure* **24**, 147-163 (2002).
- 502 Saba, H., Munusamy, S. & Macmillan-Crow, L. A. Cold preservation mediated renal injury: involvement of mitochondrial oxidative stress. *Renal failure* **30**, 125-133 (2008).
- 503 Mitchell, T. *et al.* The mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone protects against cold storage injury of renal tubular cells and rat kidneys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **336**, 682-692 (2011).
- 504 Mitchell, T., Saba, H., Laakman, J., Parajuli, N. & MacMillan-Crow, L. A. Role of mitochondrial-derived oxidants in renal tubular cell cold-storage injury. *Free radical biology & medicine* **49**, 1273-1282 (2010).
- 505 Duran, J. A. *et al.* Variation in the levels of inflammatory cytokines depending on ischemic time: effects on respiratory variables. *Transplantation proceedings* **41**, 980-982 (2009).

- 506 Naik, E. & Dixit, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *The Journal of experimental medicine* **208**, 417-420 (2011).