

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



Universidad de Salamanca

FACULTAD DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL

“TRASPLANTE RENAL, CONTROL DEL DAÑO POSTREPERFUSIÓN CON
CITOCINA SIMILAR A LA CARDIOTROFINA (NNT-1/BSF-3)”

DOCTORANDO:

Dña. M^a Pilar Moreno Andrés

DIRECTORES:

Prof. Francisco Javier García Criado

Profa. María Begoña García Cenador

Febrero, 2015

Prof. Dr. Don. Francisco Lozano Sánchez. Director del Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada. **“TRASPLANTE RENAL, CONTROL DEL DAÑO POSTREPERFUSIÓN CON CITOCINA SIMILAR A LA CARDIOTROFINA (NNT-1/BSF-3)”** realizada por D. M^a Pilar Moreno Andrés en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, para optar al Grado de Doctor por esta Universidad, cumple 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 24 de febrero de 2015.

Fdo. Prof. Don. Francisco Lozano Sánchez
Director del Departamento de Cirugía

**Prof. Dr. D. Francisco Javier García Criado. Profesor Titular de Cirugía.
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.**

**Profa. Dra. D. Dña. María Begoña García Cenador. Profesora Ayudante
Doctor. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.**

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **“TRASPLANTE RENAL, CONTROL DEL DAÑO POSTREPERFUSIÓN CON CITOCINA SIMILAR A LA CARDIOTROFINA (NNT-1/BSF-3)”** presentada por Dña. M^a Pilar Moreno Andrés, ha sido realizada 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 24 de febrero de 2015.

Prof. F. Javier García Criado
DIRECTOR DE LA TESIS

Profa. M. Begoña García Cenador.
DIRECTORA 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 al Profesor. D. Francisco Javier García Criado y a la Profesora Dña. María Begoña García Cenador, Directores de esta Tesis Doctoral por su absoluta disponibilidad y por todas las facilidades ofrecidas.

Al Departamento de Cirugía y particularmente a su Director, por los medios prestados.

Al equipo de trabajo que ha participado en el desarrollo del proyecto en el que se encuentra englobado este trabajo.

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 ...

Mi familia, a los que considero familia

A mi futuro marido.

ÍNDICE

I. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	13
1.- Trasplante de Órganos	15
1.1.- Importancia actual del trasplante	15
1.2.- Trasplante Renal.....	16
1.3.- Problemática del trasplante renal	24
2.- Lesión por isquemia y reperfusión (I/R)	41
2.1.- Lesión por isquemia.....	42
2.2.- Lesión por reperfusión	56
3.- Necrosis tubular aguda	61
3.1.- Morfología de la NTA.....	62
3.2.- Fisiopatología del daño renal.....	68
3.3.- Fases de la NTA	83
4.- Endotelio.....	86
4.1.- Disfunción endotelial.....	89
5.- Inflamación en la lesión por I/R.....	94
5.1.- Generalidades	94
5.2.- Mediadores Químicos de la Inflamación	97
5.3.- Factores transcripcionales	130
5.4.- Receptores tipo toll (TLRs)	140
5.5.- Células inflamatorias.....	141
5.6.- Activación de la Inflamación	146
6.- NNT-1/BSF-3.....	173
7.- Inflamación y Odontología	178
7.1.- Inflamación en la enfermedad periodontal	178
7.2.- Diagnóstico de la enfermedad periodontal.....	180
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	183
III. MATERIAL Y MÉTODO	187
1.- Materiales	189
1.1.- Instalaciones.....	189
1.2.- Animales de experimentación.....	190
1.3.- Equipos empleados	190

2.- Métodos: Diseño Experimental	193
2.1- Condiciones generales del estudio	193
2.2- Modelos experimentales	197
2.3.- Técnicas empleadas para el estudio de las variables.....	200
2.4.- Estudio estadístico.....	210
IV. RESULTADOS	211
1.- Resultados de la Fase Preservación	213
1.1.- Estudio del estrés oxidativo: Anión Superóxido	213
1.2.- Estudio de las Citocinas.....	214
1.3.- Estudio del Óxido Nítrico	215
1.4.- Estudio de la interacción leucocito endotelio	216
1.5.- Estudio de la activación de NF- κ B: I κ B- α	217
2.- Resultados de la Fase Trasplante Renal.....	218
2.1.- Supervivencia	218
2.2.- Estudio de la función renal.....	218
2.3.- Estudio del estrés oxidativo: Anión Superóxido	220
2.4.- Estudio de las Citocinas.....	220
2.5.- Estudio de la lesión endotelial	222
2.6.- Estudio de la activación de NF- κ B: I κ B- α	224
V. DISCUSIÓN	225
1.- Preservación Fría del Riñón	228
2.- Discusión de la Fase de Trasplante Renal	231
2.1.- Función renal	231
2.2- Estrés oxidativo	231
2.3.- Citocinas	232
2.4.- Moléculas de adhesión celular.....	232
2.5.- Factor transcripcional kB	233
VI. CONCLUSIONES	239
VII. BIBLIOGRAFÍA	243

I.

ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

I. Estado actual del problema

1.- TRASPLANTE DE ÓRGANOS

1.1.- Importancia actual del trasplante

El trasplante es uno de los avances más significativos de la cirugía moderna, 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 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 prueba de diagnóstico para el 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, la cual, ha desempeñado un papel en la mejora de los pacientes y la supervivencia del injerto.

En el 2007 se analizaron los datos de 97 países y 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.¹⁷⁶

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.^{42, 176} 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 incrementa en un 50% (al pasar de 156 a 235) y representa ya el 10% del total de 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.

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 una 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. (Tabla I)

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

Tabla I

Donaciones y trasplantes en España en los años 2007,2008 y 2009 (ONT, 2009)

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 residuales y el agua, asimismo, 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 (ARF)

La ARF es un síndrome clínico común, caracterizado por una pérdida rápida y progresiva de la función renal (horas a semanas).³⁹ La GFR 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) aunque puede ir acompañada de oliguria, (volumen urinario <400 cc/24h), lo más frecuente en que no se produzca oliguria, (alrededor del 60%) y generalmente pasan desapercibidas.²⁴⁵

La etiología es múltiple y la morbi-mortalidad es elevada en la actualidad, aproximadamente el 70% en pacientes en la UCI.¹⁴ Su incidencia en pacientes hospitalizados es aproximadamente 5% y hasta de 30% en admisiones a UCI.¹²⁴

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 ARF son la isquemia renal prolongada y las lesiones nefrotóxicas que producen oliguria. La causa que más incidencia de casos provoca es la isquemia renal, que al disminuir la perfusión renal no llega ni oxígeno ni nutrientes para el metabolismo celular, lo que puede provocar necrosis renal. 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 ARF:

- ARF Prerenal (55% de los casos de ARF)

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 renal ni en la microestructura.

- ARF Postrenal (5% de los casos de ARF)

Es una consecuencia de la obstrucción mecánica o funcional del tracto urinario. Puede o no, estar inicialmente acompañada por pequeños cambios morfológicos.

- ARF Intrarenal o intrínseca (40% de los casos de ARF)

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 nefronas.²²⁰

En ARF prerrenal 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 ARF prerrenal representa la forma más común de lesión renal y conduce a ARF intrínseca si no se corrige rápidamente.⁷⁵

La ARF intrarenal está asociada patológicamente a la NTA, siendo las causas más frecuentes de ésta, la hipoperfusión renal prolongada y los fármacos nefrotóxicos.

1.2.1.1.1.- Fisiopatología de la ARF

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 GFR, se acumulan los productos residuales del organismo y por ello, el paciente experimentará un incremento de los niveles séricos de creatinina y BUN, lo que recibe el nombre de uremia.

Por lo tanto la hipoperfusión renal produce hipovolemia, disminución en el volumen cardíaco, 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. (Fig.1).

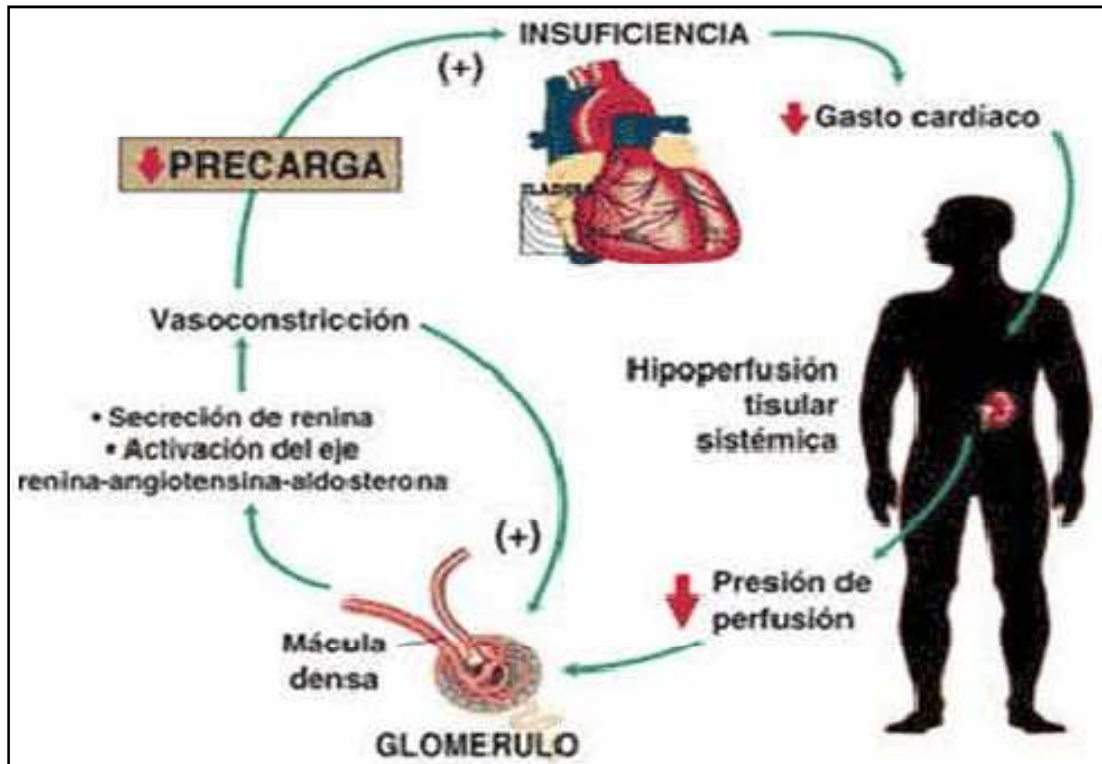


Figura 1

Fisiopatología de la ARF

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

- La autoregulación

Este mecanismo trata de mantener la presión hidrostática glomerular por medio de la dilatación de la arteriola aferente y la constricción de la arteriola eferente consiguiendo incrementar el flujo sanguíneo, la presión en el lecho capilar glomerular y un aumento de la velocidad de filtración glomerular.

La dilatación arteriolar aferente a través de la respuesta miogénica, retroalimentación túbulo glomerular, y a las prostaglandinas y posiblemente del óxido nítrico también.

La constricción arteriolar eferente vía angiotensina II.

- Activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona.^{99.}

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 secreción 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 a nivel de los túbulos distales.

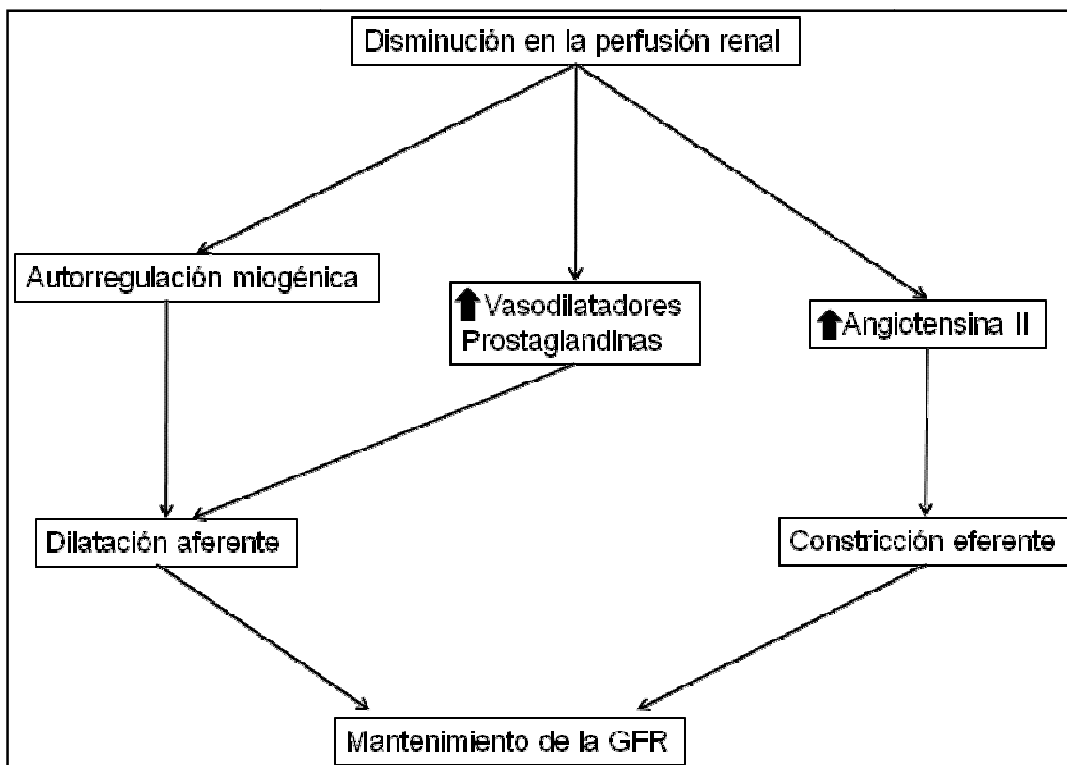


Figura 2

Mecanismos compensatorios que mantienen la GFR 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 resulta en daño tubular.^{60, 133} 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 ACE o antagonistas de los receptores

de angiotensina, puede acelerar la NTA en los individuos con la perfusión renal reducida.

La vasoconstricción renal severa se ha demostrado en ARF clínicas y experimentales y ha sido considerada en el pasado como el factor predominante que lo provoca, lo que explica el nombre de la nefropatía vasomotora,¹⁴² sin embargo, la reducción en el flujo sanguíneo renal total por sí solo no parece ser el responsable de la fuerte reducción de la GFR, ya que el incremento del flujo sanguíneo renal mediante aumento de volumen o de la administración de vasodilatadores no corrige la GFR. La génesis y las posibles consecuencias de la intensa vasoconstricción renal persistente. (FIG.2)

Las manifestaciones de la ARF, pueden no aparecer hasta una semana después de la lesión inicial, sin embargo cuando aparecen lo hacen de manera brusca. La ARF evoluciona a través de cuatro fases, y si el paciente no se recupera aparece una enfermedad renal crónica. La patofisiología de la ARF, 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 GFR. 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 inflamatoria.¹²⁸

1.2.1.2.- Insuficiencia renal crónica (CRF)

La CRF se desarrolla desde meses hasta años y conduce a una destrucción irreversible del tejido renal,²⁷⁶ con la consiguiente enfermedad renal progresiva que conduce a la insuficiencia renal terminal (ESRF).¹⁷⁹

La CRF 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 ARF se debe a la complicación de una gran cantidad de enfermedades del riñón, tales como enfermedades inflamatorias de los riñones (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 CRF es la isotenuriapoliuria, con 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 CRF se incluye en el término uremia.

La Insuficiencia Renal Terminal (ESRF), es la última consecuencia, en la cual generalmente se requiere diálisis hasta que se encuentre un donante para un trasplante renal. (Fig. 3)

La incidencia de la ESRF, se ha incrementado internacionalmente a ritmo constante desde 1989. Los EEUU tienen la tasa de incidencia de ESRF más alta, seguida de Japón, el cual tiene una prevalencia más alta que EEUU. U S Renal Data System, USRDS 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2010. En España, la prevalencia de la insuficiencia renal crónica es relativamente alta, y similar a la de los países de la misma

zona geográfica. 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 renal.¹²⁵ 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 GFR es inferior a 12 ml/min.

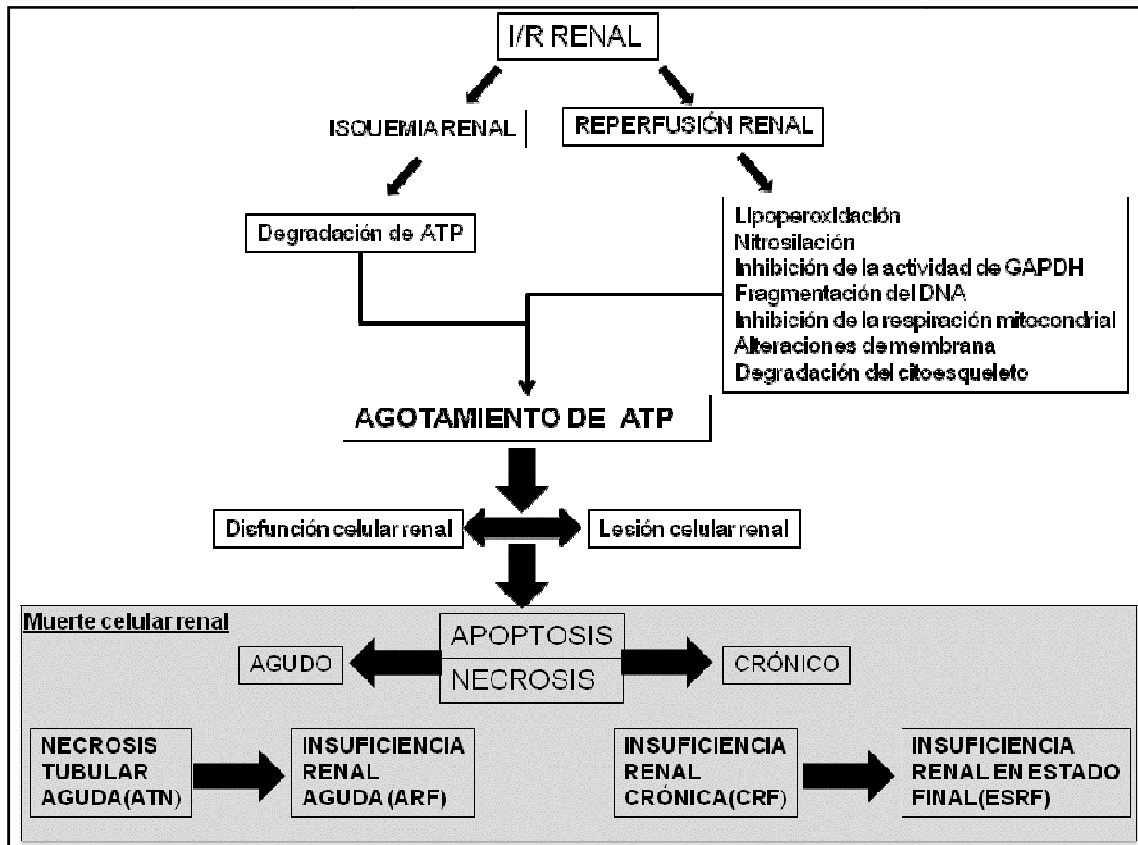


Figura 3

Mecanismos de lesión por I/R renal

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 renal. 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 funcional 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 reperfusión del órgano son eventos que pueden condicionar esos trastornos, mediante la interacción de factores inmunológicos e isquémicos.

Algunas maniobras técnicas y farmacológicas, 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 homeostasis del medio interno del órgano y sus efectos se manifestarán en el grado en que recupere o no su función tras el trasplante. La lesión del órgano ocurre principalmente como resultado de la respuesta inflamatoria originada por el proceso de I/R, y 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 trasplante en el receptor.⁹⁰
- La tercera fase, es la fase de *reperfusión*, cuando el injerto es reperfundido con la sangre del receptor.

Durante la preservación del riñón se ha demostrado un aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio, que es más elevada cuanto mayor es el tiempo de isquemia fría, lo cual podría estar relacionado con el fallo primario del injerto. La importancia de los mecanismos de adhesión leucocitaria varía dependiendo de que el órgano este sometido a períodos cortos o prolongados de preservación. En el caso de períodos cortos de preservación en la patogenia de la lesión generada, tiene más importancia los RLO, mientras que en el caso de periodos prolongados, son las proteínas de la superficie celular las que desempeñan un papel más importante.

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 la supervivencia del injerto. 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.

Debido a ello, existen pocos estudios experimentales sobre trasplante renal en los que los tiempos de preservación del órgano sean prolongados.⁹⁸

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, 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.

La hipoxia es capaz de poner en marcha un importante número de genes (que permanecen desde hace millones de años de la evolución anaerobia), sin embargo, los procesos de transcripción y traducción están sujetos a la ausencia de oxígeno, necesaria para responder rápidamente a las demandas energéticas. 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. No hay evidencias de que se despliegue la doble cadena de DNA, ni del transporte de nucleótidos.

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, perdiéndose otro porcentaje celular de modo irreversible. 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.^{225.}

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 procaspasa 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 fría.^{30, 171.}

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, 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 isquemia caliente.^{213.}

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-

reperusión, fenómeno que no se produce durante la isquemia fría prolongada.^{87.}

La isquemia caliente también produce un importante daño a los hepatocitos y reduce el número de células de Kupffer viables. Sin embargo, la isquemia fría seguida de la reperusión provoca cambios notables en las células endoteliales sinusoidales con necrosis temprana sin afectar a los hepatocitos.^{105.}

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 pronto incrementándose la filtración y disminuyendo el transporte.^{102.} 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 celular.^{102.}

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.

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.^{210, 211.}

La mayoría de las enzimas en los animales normotérmicos 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 el aumento del edema celular.

Los órganos expuestos a la isquemia normotérmica permanecen viables por 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.

Para conseguir la hipotermia se realiza la infusión vascular 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.^{98.}

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, constituyendo las diferentes soluciones de preservación.

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:^{98,169.}

1.3.1.1.1.- *Minimizar el edema celular asociado a la isquemia y la hipotermia*, mediante la utilización de líquidos hipertónicos (composición similar al compartimento intracelular) y la adición de sustancias impermeables para la célula, de manera que la presión osmótica de los electrolitos y las sustancias impermeabilizadoras alcance una actividad osmolar lo más parecida a la del plasma y el compartimento intracelular (en torno a los 310 mOs/kg).

1.3.1.1.2.- *Prevenir la acidosis intracelular asociada a la isquemia*, ya que ocasiona daño celular al producir un fracaso de las membranas celulares e inducir edema celular.

1.3.1.1.3.- *Disminuir la entrada de Ca⁺⁺ al interior de la célula* durante la reperfusión, ya que activa las fosfolipasas que atacan la membrana celular.

1.3.1.1.4.- *Prevenir la expansión del espacio intersticial* durante la reperfusión mediante sustancias que tengan efecto oncótico.

1.3.1.1.5.- *Prevenir el daño inducido por los RLO* durante la reperfusión, mediante la adición de sustancias scavenger (barrendero) que frenarían el daño inducido por estos radicales.

1.3.1.1.6.- *Aportar precursores de ATP*, ya que la reperfusión orgánica requiere la regeneración rápida de la bomba de Na que necesita ATP.

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, hidroxietilalmidón
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	Aminocolesterol, vitamina E, desferroxamina
Fármaco	Minimiza la entrada de Ca ⁺ a la célula	Mg ⁺ , verapamilo, nifedipino, diltiazem, trifluoperazina

Tabla II

Diferentes funciones de algunos de los componentes de una solución de preservación.

1.3.1.1.1.- 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 la mayoría de la energía en forma de ATP derivada de la fosforilación

oxidativa. La Na^+/K^+ ATPasa permite concentraciones más altas de Na^+ en el exterior de la célula, y así contrarrestar la presión osmótica coloidal (oncótica) derivada de las proteínas intracelulares y otros aniones impermeables. 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 impermeables a la membrana celular, 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, sucrosa, manitol) o lactobionato, rafinosa etc.

1.3.1.1.2.- 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 lisosomiales. 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.

1.3.1.1.3.- 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.

1.3.1.1.4.- 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 osmótica coloidal, y permita un libre intercambio de los constituyentes del líquido sin expandir el espacio intersticial.

1.3.1.1.5.- 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 si se añaden sustancias antioxidantes con actividad “scavenger” frenarían el efecto de los RLO. También se pueden añadir enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa que actúan como mecanismo de defensa activando el catabolismo del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido, respectivamente. El glutathion es reducido por la enzima glutathionperoxidasa 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.

1.3.1.1.6.- Suministro de sustratos energéticos.

Finalmente, referente al metabolismo energético, 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.

Son diversas las soluciones que se utilizan para la preservación de órganos,^{169,232} 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.¹⁵⁰ 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 es válida en la preservación de corazón, hígado y pulmón.

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.¹⁶⁹

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.^{28.}

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.^{28.}

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.^{169.}

1.3.1.2.- 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 impermeables 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 un importante debate, hay dos métodos aplicables en el ámbito clínico: a) la conservación en frío, que sería efectiva para riñones recuperados de donantes óptimos,¹⁰⁷ 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.

En comparaciones 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.²⁷³ Sin embargo la máquina de perfusión es económicamente superior a la conservación en frío.

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.¹⁰⁷

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). 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:⁸⁴.

1.3.2.1.- Rechazo hiperagudo

El rechazo hiperagudo, es irreversible, es necesario realizar nefrectomía. 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.

1.3.2.2.- Rechazo agudo

Es el más característico de las primeras semanas o meses del trasplante. Ocurre en un 20 40% de los trasplantes cadavéricos 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.

1.3.2.3.- Rechazo crónico

Este 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. En respuesta a los patógenos que generan los componentes del complemento, citocinas, quimiocinas etc, algunas de las cuales se discutirán más adelante en relación a la I/R

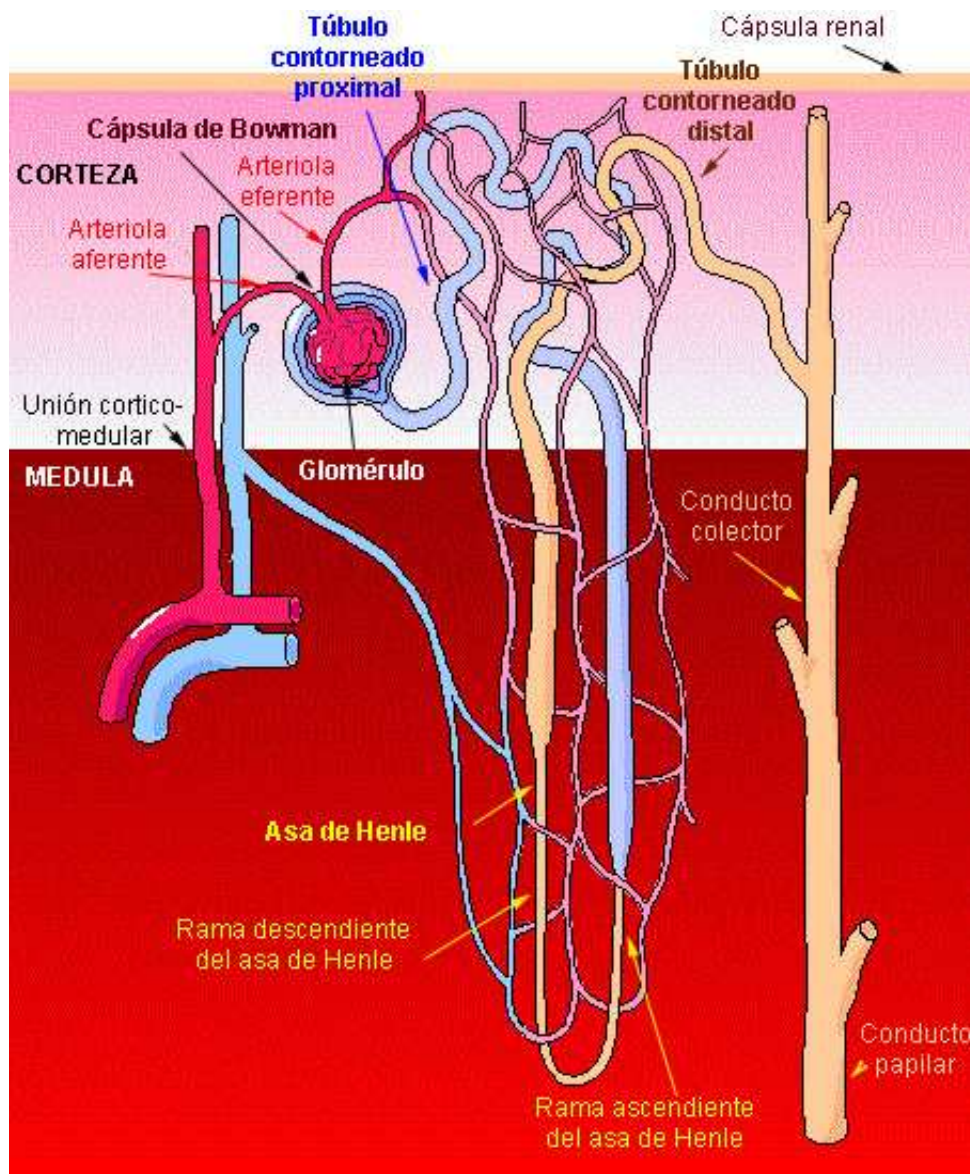


Figura 4

Estructura de la Nefrona

La I/R severa puede causar necrosis y apoptosis de las células epiteliales tubulares polarizadas. La ARF 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, sin embargo, la disfunción renal profunda que se produce en ATN 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.³⁹

El trasplante de riñón está inevitablemente asociado a un período de isquemia, empezando por la obtención de órganos del donante hasta su reperfusión en el receptor. La reperfusión del riñón isquémico, aunque necesario para rescatar el órgano de la necrosis y pérdida permanente de la función, puede causar lesión celular aguda y disfunción renal.^{173,174} Dependiendo de la gravedad de la ARF 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*.^{243,281} 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.²⁸¹

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.²³

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.

Los resultados de supervivencia del injerto a largo plazo¹⁷³ 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.¹⁷²

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.

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 CRF.²⁰⁹

Además, la I/R causa una liberación de citocinas y factores de crecimiento asociados con la nefropatía crónica.¹⁷⁴ que llevan a la rápida activación de la respuesta inflamatoria. 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 ARF que se acompaña de altas tasas de mortalidad.

Otro de los objetivos de la modulación biológica del ARF isquémico 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.

La patofisiología de la disfunción primaria del injerto después del trasplante de riñón en la clínica muestra grandes similitudes con el ARF isquémico en modelos de ratón.

Dada la complejidad de su patofisiología se sigue investigando para atenuar el ARF isquémico. A pesar de los conocimientos en la patofisiología del desarrollo de ARF, 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 el ARF, 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 del ARF isquémico durante las últimas dos décadas, por lo que actualmente las intervenciones terapéuticas aplicables son el trasplante y la diálisis.¹²⁵

Tanto en el ARF como en el CRF está involucrada la isquemia en el desarrollo del daño renal.

2. LESIÓN POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN (I/R)

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 exacta patofisiología difiere con relación a varios aspectos visibles en otros órganos.^{140.}

La lesión por I/R es un fenómeno complejo que contribuye a la morbilidad y la mortalidad en el trasplante clínico de órganos sólidos.^{122.}

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.

La isquemia afecta significativamente a la homeostasis celular (sobrecarga de Na^+ y Ca^{2+} , acidosis intracelular, hinchazón, lesiones del citoesqueleto, hipercalcemia mitocondrial y otros). Si la reperfusión de un órgano en la isquemia es esencial para su viabilidad y su recuperación funcional, la llegada de oxígeno en la sangre provocará una serie de lesiones; esto se conoce como el fenómeno de la I/R. La vasomotricidad y las funciones endoteliales se ven significativamente afectadas por la I/R. La vasodilatación dependiente del endotelio está más afectada por las lesiones de I/R que la vasoconstricción y la vasodilatación independiente del endotelio. Las RLO y el $\text{TNF-}\alpha$ parecen desempeñar un papel importante en el daño por I/R. La

reperfusión también induce una importante respuesta inflamatoria, caracterizada por una producción masiva de RLO, y de la activación de complemento y de los neutrófilos. Una estrecha interacción entre endotelio activado y los neutrófilos dará lugar a una concentración significativa de neutrófilos activados en el intersticio, donde van a liberar RLO y muchos tipos de proteasas, que van a destruir las células y la matriz extracelular. Esta transferencia de neutrófilos desde el lecho intravascular al intersticio, implica a varias familias de proteínas como selectinas, integrinas, y las inmunoglobulinas. El estrés oxidativo, la producción de citocinas y las lesiones mitocondriales secundarias que se producen con la reperfusión induce apoptosis a nivel del parénquima y de las estructuras vasculares. Con respecto al sistema vascular compuesto por; pequeñas arterias, capilares o venas post-capilares, las repercusiones de la I/R son idénticas, pero difieren de las imágenes clínicas. Los estados proinflamatorios inducidos por la reperfusión continúan durante varios días y pueden afectar el pronóstico del paciente^{2, 47, 78, 128}. La hipotermia produce unas lesiones celulares específicas, que son más importantes cuanto más tiempo tarde el órgano en ser transplantado^{225, 226}. Una compleja cascada de procesos va a desencadenarse durante la preservación, como la pérdida de ATP, acumulación de hipoxantina, disfunción de la bomba Na^+/K^+ , edema celular, acúmulo de Ca^{2+} citosólico y un aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio.

2.1.- Lesión por isquemia

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

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 son detectadas muy precozmente, a los pocos minutos de iniciarse la isquemia.

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.¹³⁶

2.1.1.- Biología celular y molecular del daño isquémico

La isquemia inicial y posterior de privación de oxígeno, cualquiera que sea su causa, decrece 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 (FIG.5). En consecuencia, la producción anaeróbica de adenosín trifosfato (ATP), molécula energética celular esencial, es sensiblemente inferior (FIG.6).

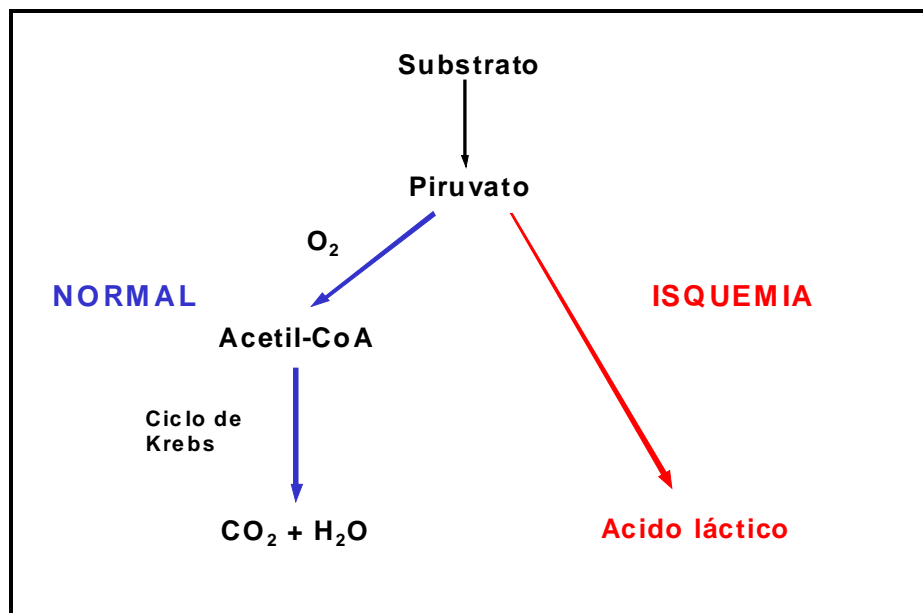


Figura 5

Cambios metabólicos en la lesión isquémica.

La síntesis de una molécula de glucosa por fosforilación oxidativa produce 36 moléculas de ATP (36 ATP/glucosa).²¹⁷. Sin embargo, el metabolismo anaeróbico produce una cantidad mínima de fosfatos de alta energía, insuficiente para las demandas energéticas de la célula.^{78,12}

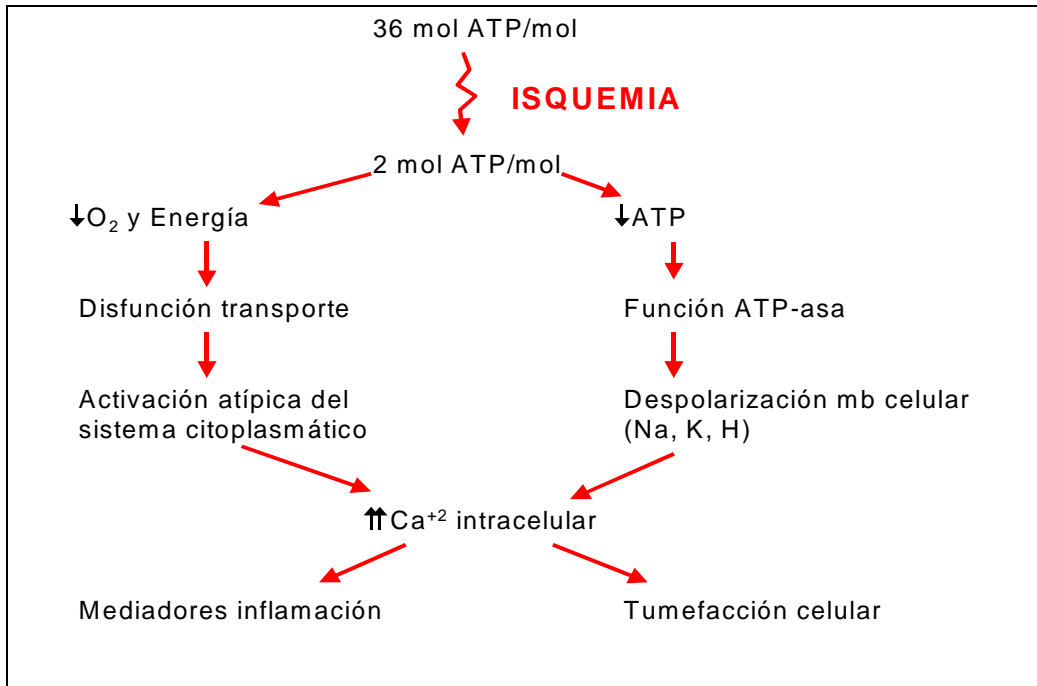


Figura 6

La pérdida energética y la disfunción de los sistemas de transporte de la membrana conducen, a la acumulación de fluido dentro de la célula y a la tumefacción de la misma.

Enumeramos a continuación las principales consecuencias de la pérdida de ATP celular:

1.- Pérdida de la función de las bombas Na⁺/K⁺ ATPasas tanto de las membranas plasmáticas celulares y microsomales lo que provoca:

- Alteraciones en el contenido electrolítico de las células
- Hinchazón celular
- Incremento de la concentración de Ca²⁺ libre en el citosol
- Acidosis intracelular

2.- Activación de determinadas enzimas

- Fosfolipasas
- Proteasas

La isquemia renal da paso a una segunda fase de reperfusión en la que paradójicamente también produce daño celular en base a:

- 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 glucolisis 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 disminuye la actividad de la mieloperoxidasa postreperfusión y la liberación del ácido araquidónico. Todas estas alteraciones conducen a la producción de cambios nucleares y autodigestión proteica (FIG.7).

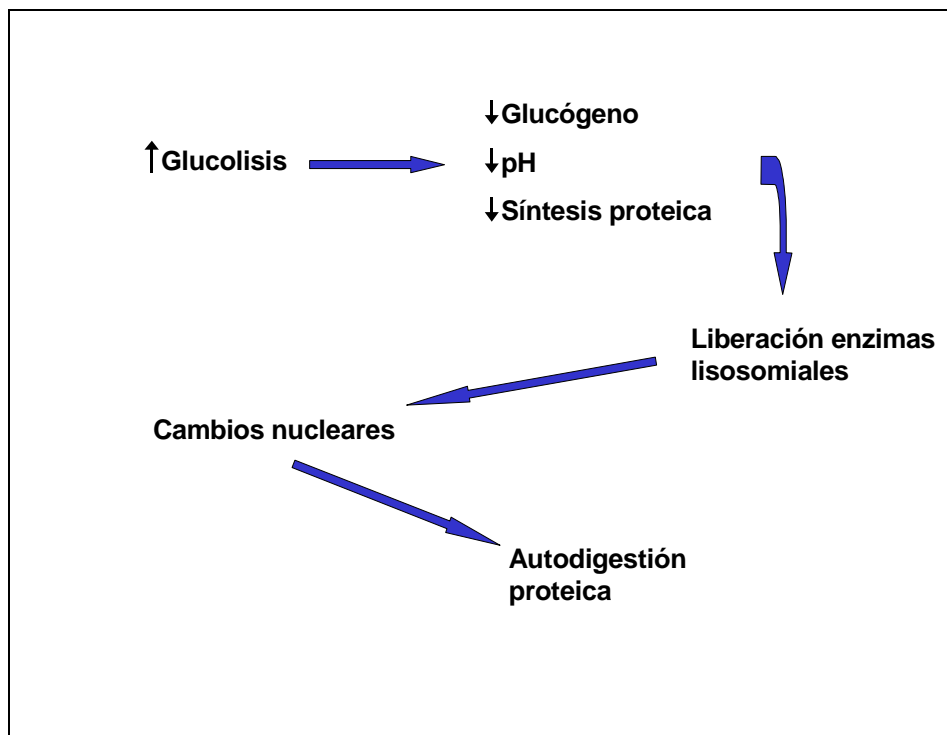


Figura 7

Autodigestión proteica en la lesión isquémica.

Por lo tanto, con la ausencia de oxígeno, se produce un déficit en los sustratos metabólicos, en el tejido isquémico se observa una disminución en los gránulos de glucógeno. Aunque no es el factor más contribuyente, el agotamiento del glucógeno inmediatamente detiene la glucolisis 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. Menos beneficiosa que la glucólisis aerobia y la fosforilación oxidativa, es la glucólisis anaeróbica, abastecida por glucogenólisis, 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^+ y la reducción de la oxidación de la NADPH₂ por las mitocondrias acidifica la célula y también inhibe la glucólisis anaeróbica.^{78.}

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 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 toxicidad de los productos metabólicos aumenta en la misma proporción que la pérdida de la osmolaridad celular. La hiperosmolaridad también atrae agua hacia el interior de la célula a través de la simple difusión 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 fosfatasa de membrana (Na^+/K^+ ATPasa), actúan lentamente durante la isquemia, pero la ausencia de ATP las inhibe, de ese modo dañan 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, etapa de la cual depende la extensión y duración de la isquemia.

El daño isquémico también afecta de manera importante a la bicapa fosfolipídica. Naturalmente en situaciones de isquemia los metabolitos salen fuera de la célula, acumulándose 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 en el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, en las membranas mitocondriales y en los microtúbulos del citoesqueleto, cuyos daños son dependientes del tiempo de isquemia.¹⁷¹.

El retículo endoplásmico lleva a cabo muchas reacciones bioquímicas, las cuales para llevarse a cabo requieren de unas condiciones citoplásmicas basadas en el pH, concentraciones de iones, estados redox y catalíticos. Cuando estas características se pierden no se pueden llevar a cabo la mayoría de estas reacciones. El edema mitocondrial prolonga la ausencia de fosfocreatina, la cual es necesaria para proteger desde la membrana mitocondrial interna hasta el citoplasma. 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, la cual 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.

La necrosis se lleva a cabo cuando las reservas de ATP se pierden. Cuando el ATP es parcialmente conservado, el citocromo C es liberado con activación de las caspasas, y como resultado la muerte celular por apoptosis. Cuando se pierden las crestas mitocondriales y la matriz se vuelve densa, en esta fase el daño es irreversible.

La acidosis es un resultado inmediato de la glucólisis anaeróbica: como la demanda de energía es alta, el número de reacciones deberían seguir

generando suficiente ATP. Sin embargo, la enzima glicerol 3fosfato deshidrogenasa, disminuye en el proceso, y solo puede ser generada por fermentación del piruvato a ácido láctico, lo cual acidifica el citoplasma de manera muy importante. En situación de acidosis, la descomposición de la NAD^+ lleva a cabo la formación de metabolitos inhibidores de la glucólisis. Para prevenir la excesiva acidosis en la vía de la glucólisis hay una enzima clave, la fosfofructocinasa, pero esta es inhibida debido a la disminución del pH. Si no hay flujo sanguíneo para eliminar el lactato la producción de energía se para. Una disminución del pH se observa de forma uniforme en los tejidos isquémicos, aunque podría estar involucrado en protección en la reperfusión, la acidosis durante la oclusión de la arteria coronaria esta bien correlacionado con el daño del tejido medido mediante la liberación de la mioglobina (la mioglobina liberada es filtrada por los riñones y es tóxica para el epitelio tubular renal causando ARF).¹³⁴. De forma importante la acidosis afecta tanto a la recuperación de la contractibilidad del endotelio como a las funciones endoteliales micovasculares en corazones mantenidos en hipotermia no expuestos a isquemia.

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,⁸³. este aumento del Ca^{+2} citosólico se ve además 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.^{4, 46, 69}.

La sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria causa la inhibición temprana del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena transportadora de electrones y bajo la progresión de la isquemia 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.¹⁰⁹

La apertura del poro mPT se ha observado en la reperfusión del músculo cardíaco postisquémico, la apertura prolongada va a suponer que durante la reperfusión el daño sea irreversible.⁸³

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 mTP.⁸

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 que queda abolido. 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 por citolisis. (*Efecto Donnan*: se crea una presión oncótica coloidal intracelular alta).⁴⁷.

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 del núcleo, y están involucradas en la ejecución de la apoptosis y 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.²¹.

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 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-8 y 9 activan la caspasa-3, la cual inicia la vía final de la apoptosis.³³.

Al mismo tiempo, la isquemia conduce a una pérdida de fosfolípidos de membrana, alteraciones en el citoesqueleto y a una acumulación de adenosina (desciende el ATP y aumento el ADP) 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. Como ya hemos comentado la hipercalcemia celular induce la degradación de los fosfolípidos sarcoplásmicos

y proteínas del citoesqueleto, modifica la afinidad de Ca^{+2} y la eficacia de las proteínas contráctiles y además modifica la estructura terciaria de las enzimas tales como la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. Estas dos enzimas catalizan las mismas reacciones, la transformación de la hipoxantina en xantina y xantina en ácido úrico. Pero mientras que el primero utiliza NAD^{+} como un cofactor, la segunda utiliza oxígeno y forma el anión superóxido, un RLO que se producirá masivamente durante la reperfusión.

Los acúmulos de xantina oxidasa y de sus sustratos: hipoxantina y xantina durante el período de isquemia, son los que van a producir la lesión en las células durante la reperfusión, puesto que llegará el oxígeno necesario para la enzima con la consecuente producción de RLO.⁷⁶

Otra fuente de RLO es el complejo III de la cadena transportadora de electrones.³⁸ Los aniones superóxido pueden ser generados por casi todas las oxidases 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. (Fig. 8)

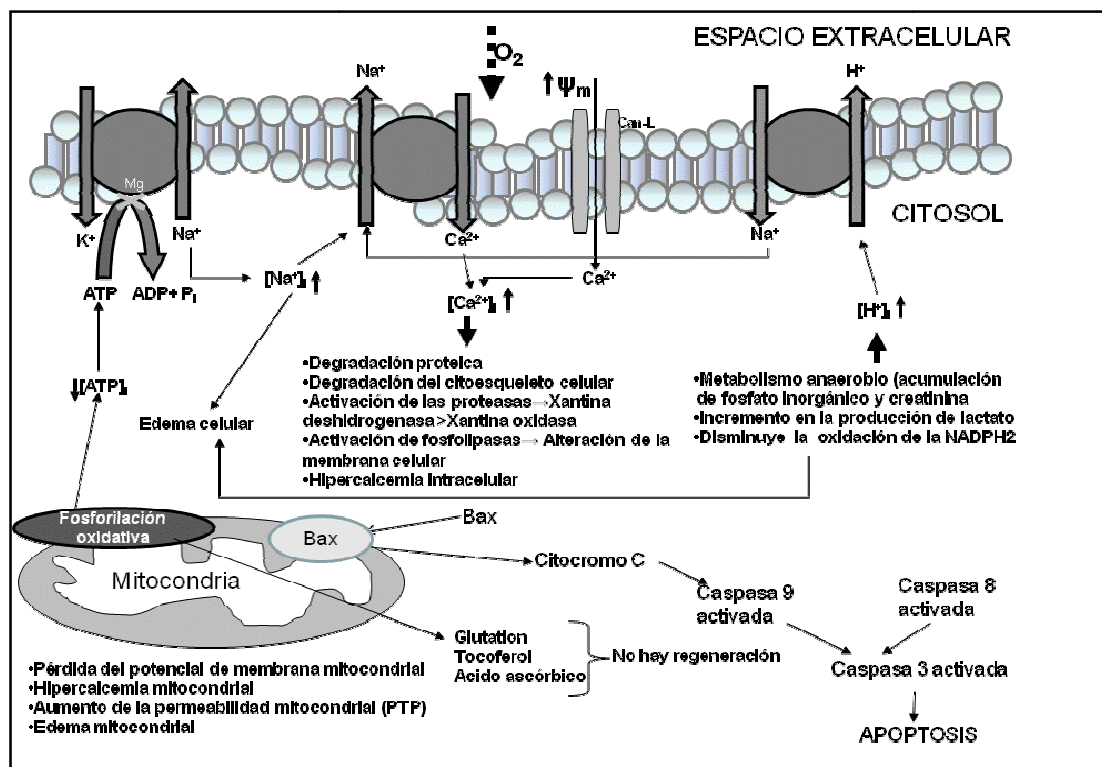


Figura 8
Modificada⁷⁸

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).

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 reperfusión.^{136, 186.}

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",^{68.} caracterizado por la imposibilidad de la reperfusión del órgano debido a la obstrucción progresiva en la microcirculación^{149.} 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

Muchos factores se han propuesto para este fenómeno, entre ellos un desequilibrio entre mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores, congestión endotelial, incremento de la permeabilidad endotelial llevando al edema intersticial que comprime los capilares peritubulares, incrementando la adherencia leucocitaria, y la acumulación extravascular de leucocitos, fenómenos que resultan en una obstrucción de tipo mecánico al flujo.

Posteriormente, durante la reperfusión, puede también exacerbarse este daño isquémico ("reflow paradox").^{181.}

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.

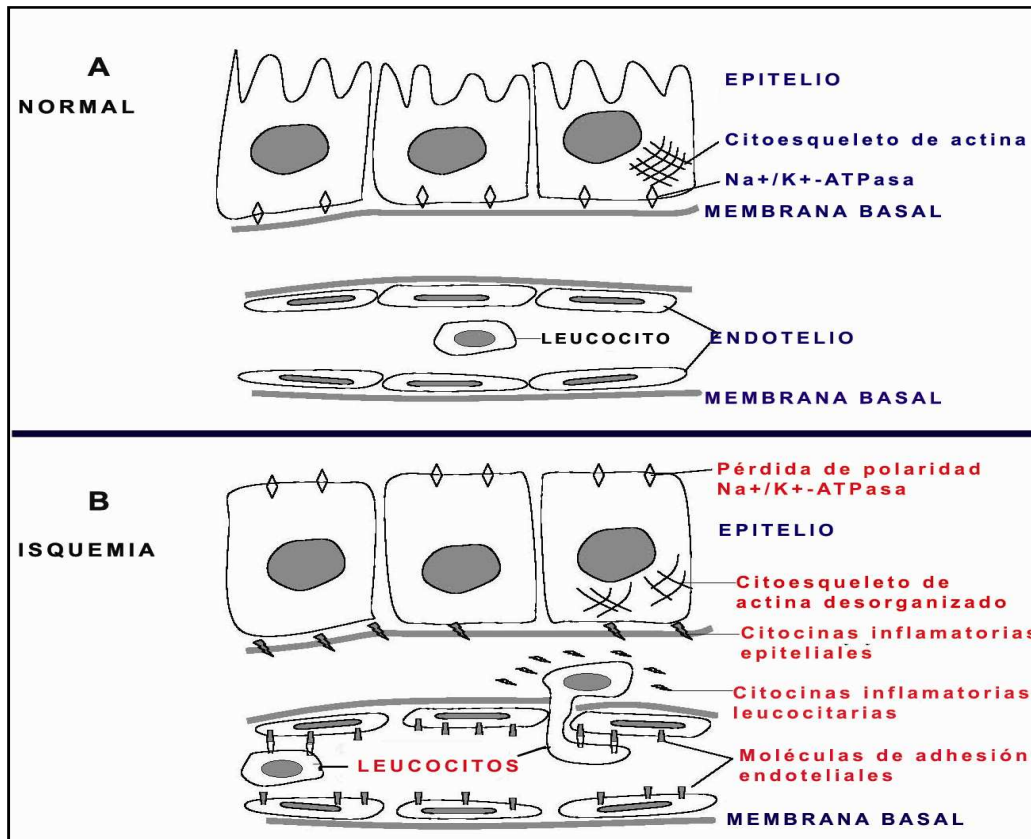


Figura 9

El daño isquémico activa la reacción inflamatoria.

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. (FIG.9)

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:

- a) disfunción endotelial y vasoconstricción renal sostenida;
- b) alteraciones en el citoesqueleto de las células tubulares, del volumen celular y de la dirección del transporte transmembrana;
- c) 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;
- d) la organización de material de detritus en el interior y exterior de las células.^{186.}

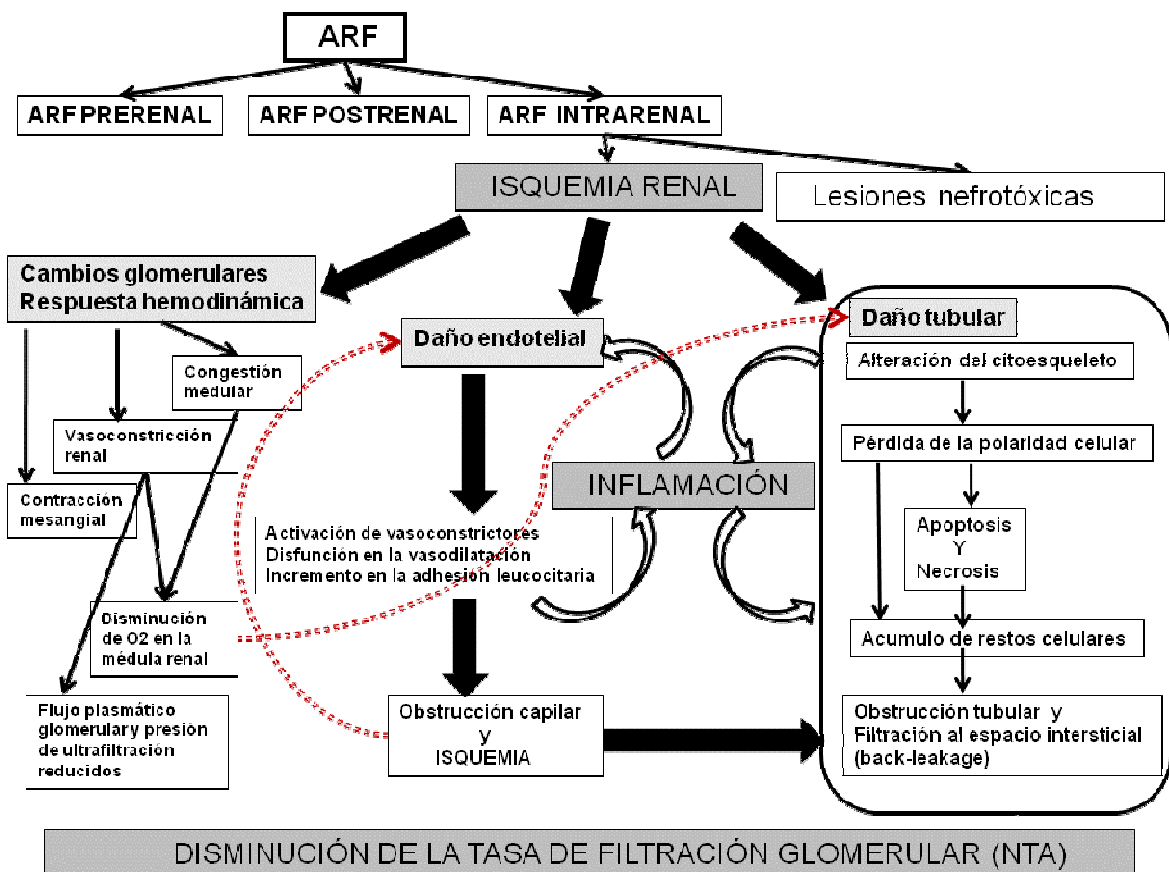


Figura 10

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
- Perdida 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 fosfatasa, 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).^{47.}

La expresión de CAMs (FIG.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.^{47.}

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. 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 reperfusión con oxígeno, van a ocasionar alteraciones más graves que las inducidas por la propia isquemia. (FIG.10)¹³⁶.

Un mediador crucial de la lesión por I/R son los RLO en particular, el peróxido de hidrógeno.¹⁶⁸.

Los RLO se forman en los tejidos post-isquémicos por reducción química del oxígeno aportado en la reperfusión,²⁹⁰ y pueden inducir al TNF- α a través de la activación de la vía p38 MAPK.¹⁸⁰.

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.⁸⁸ (Fig.11)

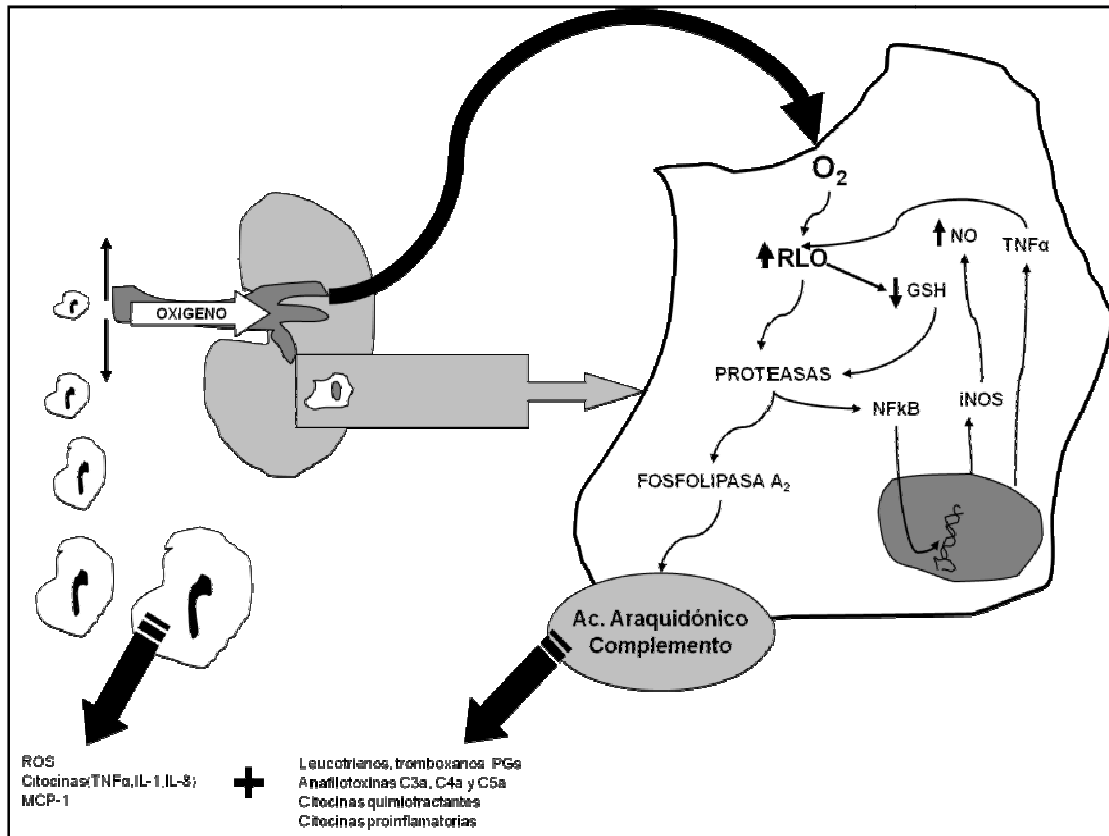


Figura 11

Producción de RLO tras la reperfusión; implicación en la producción de sustancias quimiotractoras

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 (FIG.12). Todo esto contribuirá al trastorno en la función celular y a su posterior necrosis, fenómeno esencial que acompaña a la reperfusión de los tejidos isquémicos.¹⁵⁴

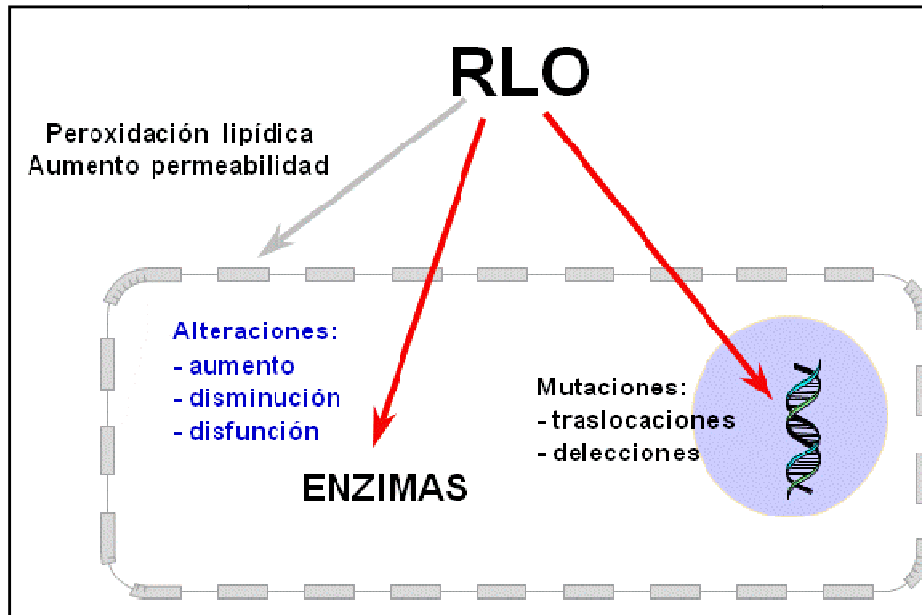


Figura 12

Mecanismo de lesión celular de los RLO

En concreto, los RLO inducirán en su acción sobre el DNA, la activación de proteínas transcripcionales que incrementarán la producción de óxido nítrico y citocinas (TNF- α) las cuales a su vez, aumentarán la producción de más RLO perpetuando e incrementando así el daño. (Fig. 13)

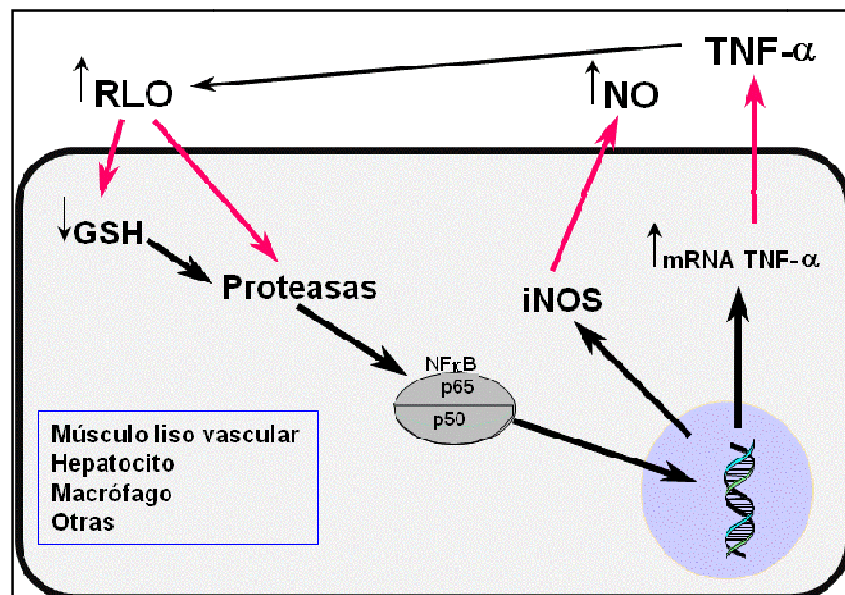


Figura 13

Mecanismo de retroalimentación en la producción de RLO.

La activación y acumulación de los neutrófilos en el tejido postisquémico es causa de lesión, siendo ésta proporcional al grado de acumulación. La

lesión se ejerce sobre la microvasculatura¹⁴⁹ y consiste en incrementos de la permeabilidad vascular a las proteínas plasmáticas; dicho incremento constituye un marcador sensible del daño inducido por la isquemia y reperfusión en los tejidos, y en la que los neutrófilos parecen ser mediadores primarios.^{111, 196.}

Se ha comprobado cómo la actividad de la mieloperoxidasa en el tejido reperfudido, marcador de presencia neutrofílica, se intensifica más de 4 veces respecto de la fase de isquemia en modelos experimentales de I/R sobre distintos tejidos, incluido el riñón.^{63.} 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 microvascular.^{78.} 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 sérico.^{9, 10.} 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 leucocitaria.

De hecho, la inactivación del complemento disminuye la lesión por reperfusión en los tejidos.^{256.} (Fig. 14)

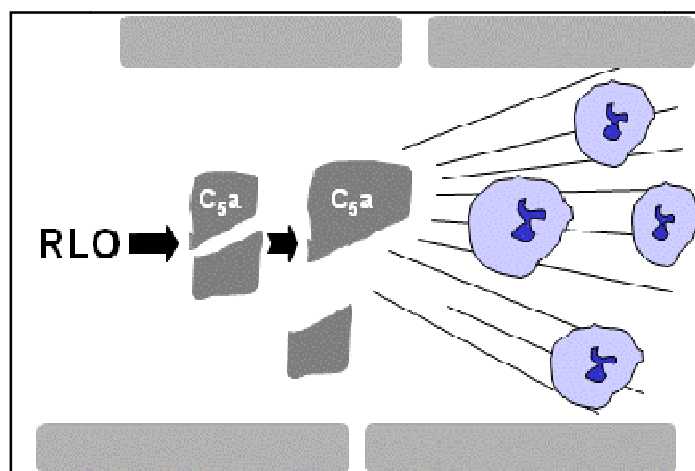


Figura 14

Interacción RLO y sistema complemento. Quimiotaxis leucocitaria por el complemento.

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 iniciado.²⁶ (Fig. 15)

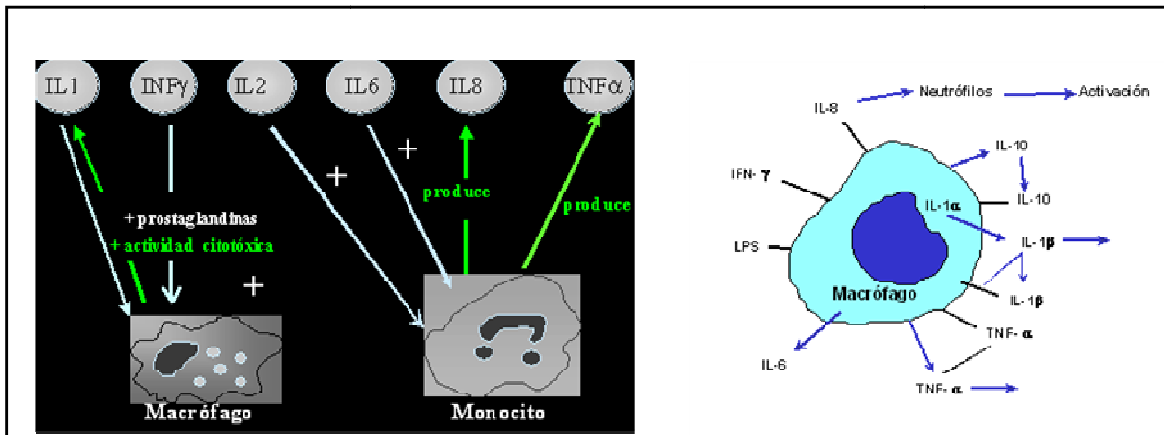


Figura 15

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 ARF con incremento de la morbi-mortalidad y está correlacionado con la incidencia de rechazo agudo en varias series clínicas.

En resumen, la principal manifestación del daño inicial por I/R será el retraso en la función del injerto, hecho que ocurre en casi el 30% de los trasplantes renales. El daño por I/R, parece desencadenar una sobrerregulación de los antígenos del MHC que así incrementan la inmunogenicidad del injerto, promoviendo una respuesta inflamatoria no específica, la cual interactuará y amplificará, la cascada/secuencia de las citocinas y CAMs característica del daño inmune. Evidencias experimentales y clínicas han identificado también al daño por I/R como un factor de riesgo, independiente de antígeno, para el CRF.

3.- NECROSIS TUBULAR AGUDA

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 ARF intrínseca están asociados con NTA, derivado de una isquemia prolongada o lesión tóxica. Se utilizan con frecuencia sinónimos de NTA, como ARF isquémica o ARF nefrotóxica.

La NTA es la causa más frecuente de ARF intrínseca, representando el 70% de los casos. Al igual que con otras causas de ARF, 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 ARF, y se define como una rápida (horas o días) disminución de la GFR, que conduce a la retención de los productos de desecho como la urea y la creatinina. Las diversas etiologías de ARF, 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 ARF prerrenal y la NTA isquémica son parte de un mismo espectro de hipoperfusión renal, que en casos extremos puede llegar a la necrosis cortical.^{220.}

Siendo la ARF 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 ARF prerrenal, pero cuando el daño es particularmente extenso, puede desarrollarse una necrosis cortical renal bilateral y la ARF no ser reversible.

Por lo tanto, las causas de NTA son prácticamente las mismas que en la ARF 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 muchas drogas se encuentra incrementado en presencia de isquemia renal, sepsis y otras situaciones que provocan daño renal. Las toxinas exógenas más importantes incluyen la mioglobina, hemoglobina, ácido úrico, Ca^{2+} , y proteínas anómalas del mieloma.

En algunos pacientes la administración de agentes de contraste para estudios radiológicos induce un cuadro de ARF, típicamente oligúrico, aunque muchos de ellos no llegan a recurrir 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.

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. (Fig. 16)

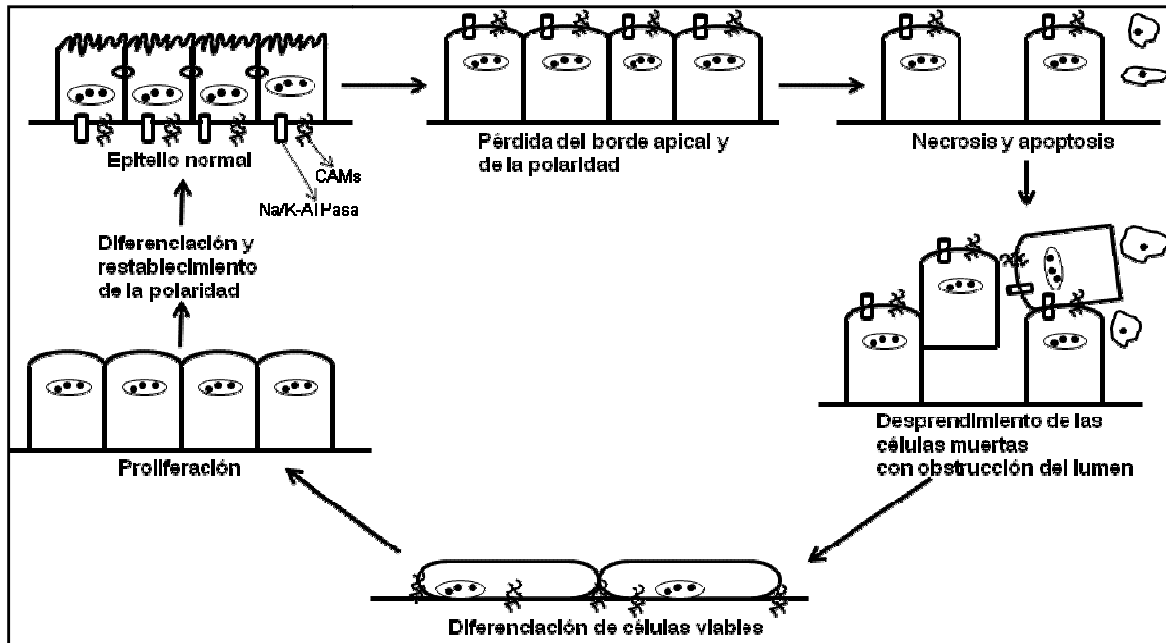


Figura 16

Alteraciones en la morfología de las células del túbulo en la NTA.

Si el daño es grave, las células afectadas se pierden por apoptosis, y las células con lesiones más graves sufren necrosis, sin embargo, incluso las células poco dañadas sufren alteraciones significativas en el citoesqueleto de actina, relacionadas con varias de las consecuencias funcionales de la NTA.

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 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.^{52.}

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 distributiva 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.⁷¹.

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, que se trasladan desde la membrana basolateral a la apical.

Estos cambios de polaridad celular explican las alteraciones de reabsorción de Na^+ , agua y otros solutos que ocurren en la NTA, funciones que se recuperan después de la isquemia, de la recuperación del nivel celular de ATP y del citoesqueleto de actina, lo que conlleva una recuperación definitiva de la polaridad celular.²⁷⁷.

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 integrinas¹,¹

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).¹³⁹.
- 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. Estos cambios son reversibles si se aumentan los niveles de ATP antes de que la célula muera. Esta alteración isquémica contribuye de forma notable a la disminución del filtrado glomerular típico de la NTA.

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 α 1 β expresada en las zonas apicales de las células dañadas o por sus receptores presentes en la matriz proteica. Esta

interacción requiere la presencia de la 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.¹⁸⁵

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 ARF y la NTA experimental como en humanos.¹¹⁹

Después de breves períodos de isquemia renal, las células apoptóticas se hacen evidentes dentro de las primeras 24 horas de reperfusión. Una segunda oleada de células apoptóticas se ha observado durante la fase de recuperación de la ARF, cuando probablemente representa un mecanismo para la eliminación de las excesivas o no deseadas células proliferativas, facilitando así la remodelación de los túbulos lesionados. 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 pérdida del borde en cepillo, necrosis tubular, edema celular, dilatación tubular e inflamación intersticial comparado con riñones con función renal, 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 inmediatamente²³⁰. Similar a las anomalías histológicas leves, sin embargo, las reducciones relativamente pequeñas en el flujo sanguíneo renal impiden alcanzar la tasa de filtración glomerular severamente deprimida en pacientes con principios de disfunción del injerto. De acuerdo con modelos matemáticos, la reducción de la GFR, es causada principalmente por una disminución en la fuerza motriz hacia afuera durante la ultrafiltración glomerular.

En pacientes con principios de disfunción del injerto, la diferencia de presión hidráulica glomerular transcápilar (fuerza motriz hacia afuera) supera la presión oncótica glomerular (fuerza motriz hacia adentro) por sólo 2 mmHg, en comparación con los 12 mmHg en pacientes con una función adecuada de los injertos.²⁴³

La disminución en la presión de ultrafiltración neta podría ser causada por la 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, considerando que se mantiene constante en injertos con disfunción sostenida. Sin embargo, el número de células tubulares que han sufrido necrosis o desechos en el lumen tubular en biopsias renales, es bajo (1-4%). Además, el número de células epiteliales anuladas en los riñones trasplantados con función renal retardada, es muy variable y no es significativamente diferente de los pacientes 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,^{46, 47.} lo que sugiere la importancia de otras alteraciones funcionales,^{220.} 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 del tejido mensajial 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 pared.^{275.}

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, ha sido considerada durante mucho tiempo una característica intrínseca del ARF, lo llevo a denominarla "nefropatía vasomotora".^{142.} Además, el riñón postisquémico

también muestra alteraciones regionales en los patrones de flujo sanguíneo. También, hay una marcada congestión e hipoperfusión de la médula externa que persisten a pesar de que el flujo sanguíneo cortical mejora durante reperfusión después del daño isquémico.^{26, 63, 186.}

Diversos estudios sugieren que las anomalías persistentes en el flujo sanguíneo intrarrenal que afectan a la región medular externa pueden contribuir a la reducción de la GFR.^{26, 63, 186.}

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 el oxígeno en esta región es bajo, con una presión parcial de oxígeno 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. El transporte activo de Na⁺ que se produce en este nivel depende de la fosforilación oxidativa para producir energía. 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.^{47.}

Incluso después del retorno total del flujo sanguíneo renal tanto la hipoxia como la vasoconstricción persisten en la región medular externa, teniendo como resultado una lesión tubular mayor.

Las técnicas de imagen sofisticadas han documentado esos cambios en el flujo sanguíneo renal regional en animales con ARF y luego en humanos. Mecanismos que subyacen a estas alteraciones hemodinámicas han comenzado a emerger, y se refieren principalmente a las lesiones de las células endoteliales.⁷⁷ Esto se traduce en un desequilibrio local de sustancias vasoactivas, con una mayor liberación de vasoconstrictores como la endotelina y con una significativa disminución en la cantidad de vasodilatadores, como del óxido nítrico (NO).

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.^{76.}

- Se ha demostrado, en pacientes con ARF de diversas etiologías, elevados niveles de endotelina-1, un potente vasoconstrictor renal, y que los antagonistas de los receptores de endotelina mejoran la ARF experimental.¹¹⁰ pero se carece de datos en seres humanos
- En cuanto al papel de la angiotensina II, otro potente vasoconstrictor renal, ha sido propuesto porque se ha demostrado en pacientes con ARF, sin embargo, la inhibición de la angiotensina II no disminuye la extensión de la lesión renal en la ARF experimental e incluso podría acelerar la ARF en pacientes con volumen sanguíneo reducido pero efectivo. Esto hace que el papel de la angiotensina II en NTA en humanos sea dudoso.⁴⁶
- La adenosina ha sido propuesta como un vasoconstrictor renal 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 GFR inducida por agentes de contraste, pero estos fármacos no son eficaces una vez establecida la NTA.²⁶¹
- 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 ARF 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 NTA.^{46,154}

Del mismo modo, tanto monóxido de carbono como compuestos liberadores de monóxido de carbono son protectores en modelos animales de ARF isquémica,²⁶³ 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 GFR en la ARF establecida a pesar del aumento flujo sanguíneo renal total.^{142,143.}

Sin embargo se sabe, que las alteraciones microvasculares desempeñan un papel importante, como se comentará a continuación.

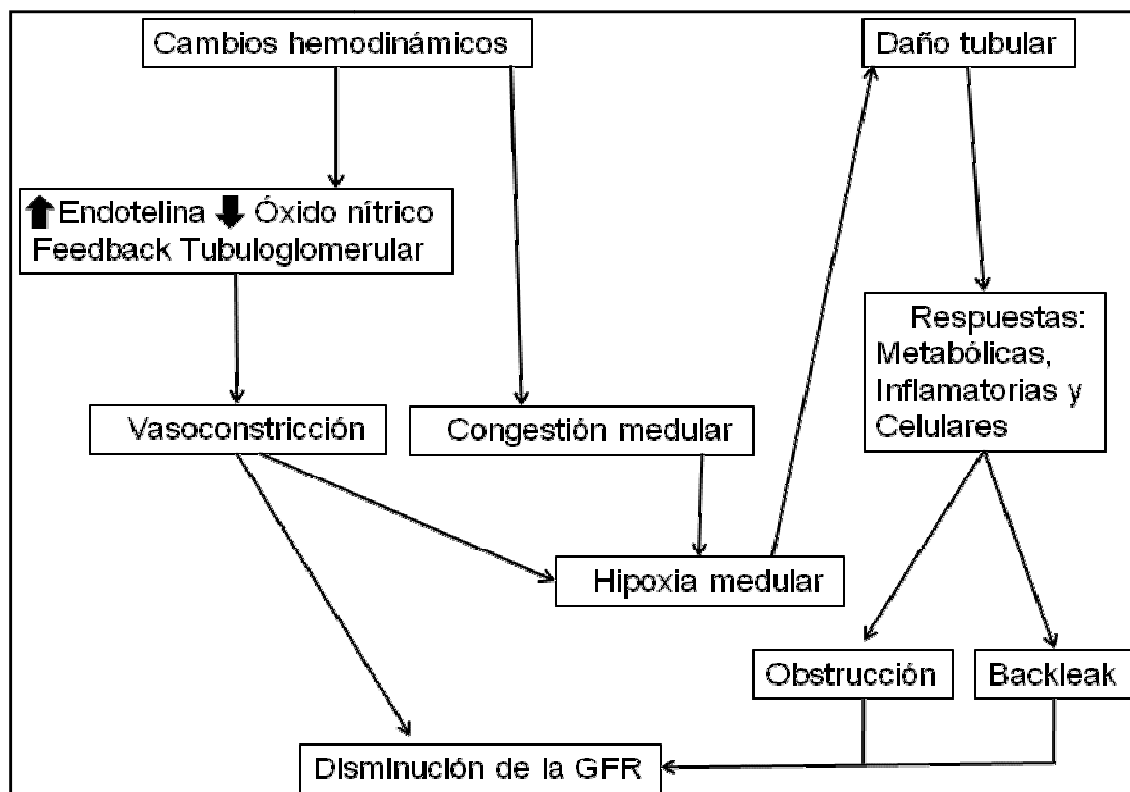


Figura 17

Patogénesis de la NTA (cambios macrovasculares)

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 GFR. Se origina a partir de detritus celulares y otros, procedentes de las células tubulares dañadas y de precipitación de proteínas (en lugar de necrosis), dejando zonas de la membrana basal desnudas.² Otro factor que conduce a la reducción de la GFR 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 una variedad de sustancias, incluyendo creatinina y urea. La activación del sistema de retroalimentación túbulo glomerular también puede contribuir a la reducción de la GFR.^{163,}

El incremento, cada vez mayor del NaCl en los segmentos de la nefrona distal, específicamente la mácula densa, debido a las anomalías celulares en el túbulo proximal isquémico parece ser que induce la constricción arteriolar aferente a través de la activación del A1AR y por tanto disminuye la GFR. Sin embargo, estudios en animales han demostrado que en los knockout de A1AR se produce un paradójico empeoramiento de la lesión renal isquémica, y que la activación exógena de A1AR es protectora.¹⁵¹ Por lo tanto, 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. Los efectos beneficiosos de la activación del A1AR exógeno en ATN en humanos están por determinar.^{151.}

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.

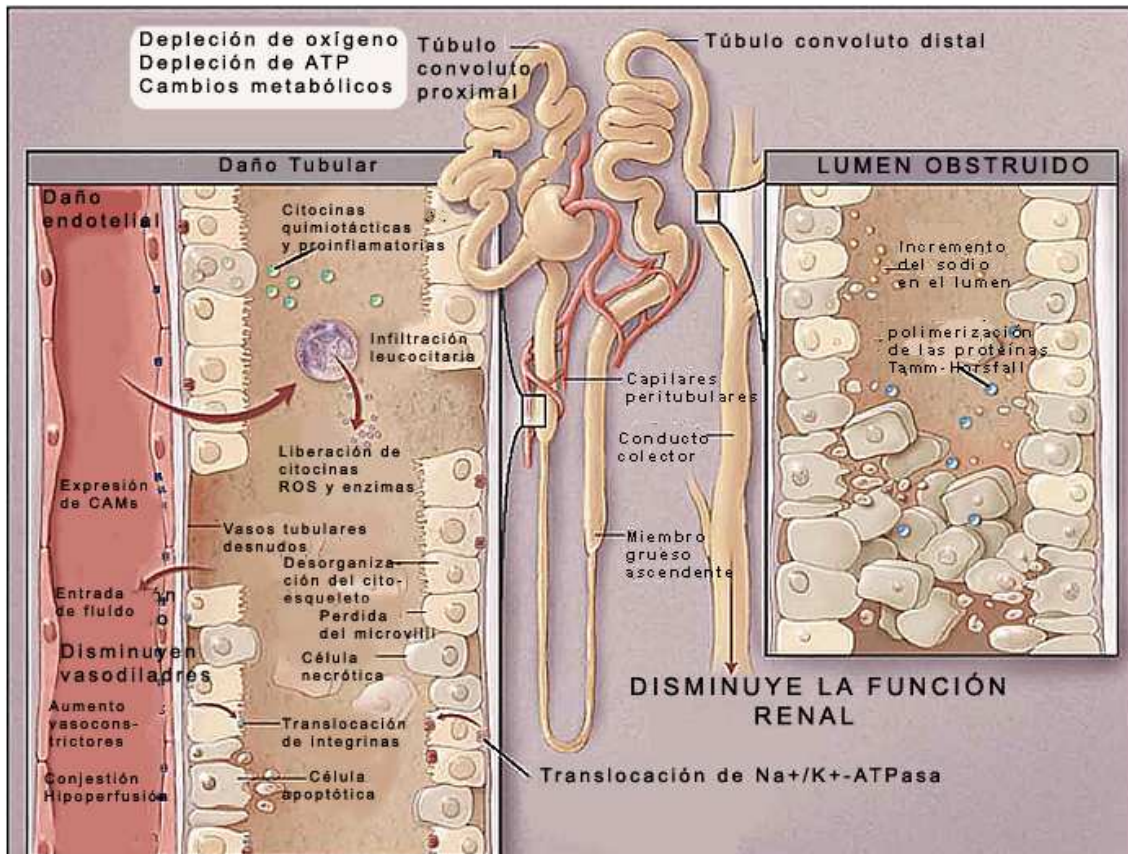


Figura 18

Patofisiología de los mecanismos de NTA. Modificada². 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 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.⁴⁶

Enumeramos a continuación, las consecuencias principales de la ausencia de ATP y su interrelación. (Fig. 19)

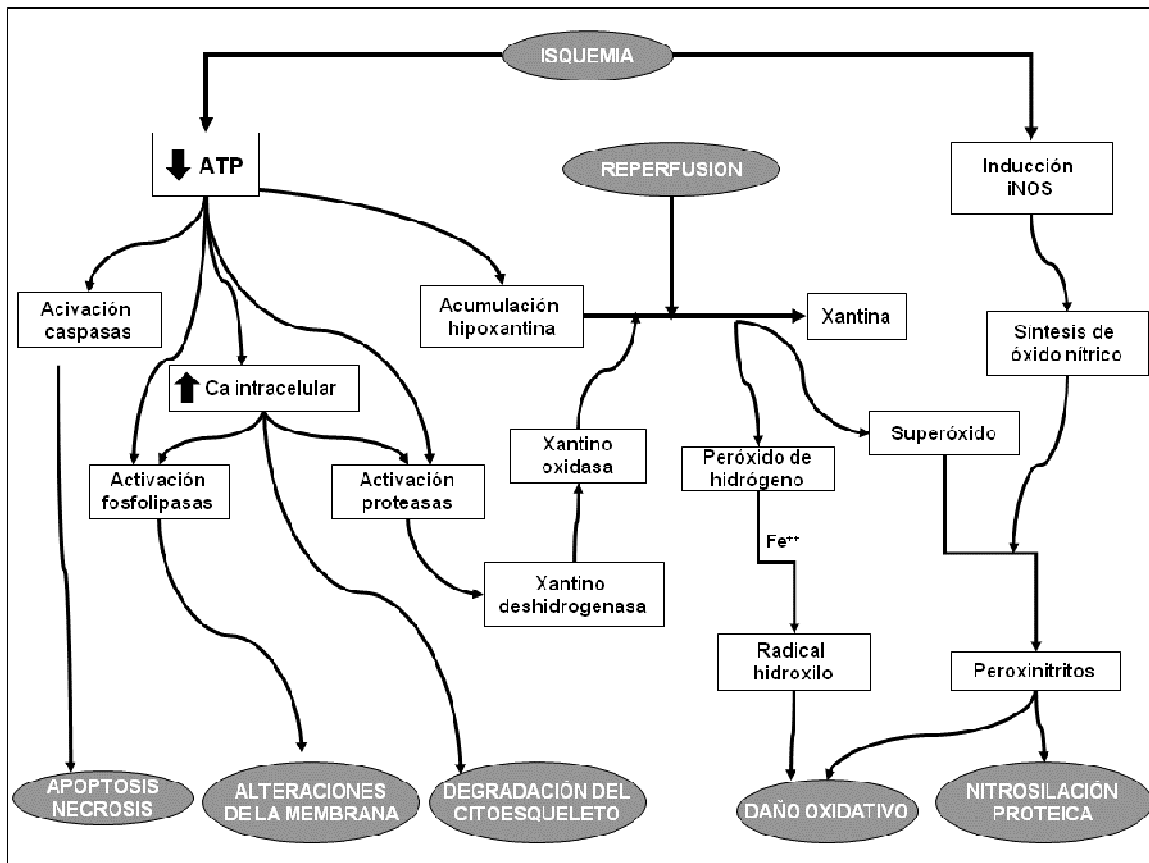


Figura 19

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 externa.^{78.}

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

*El Ca^{++} citosólico libre aumentado es recaptado por las mitocondrias, lo que provoca su hinchazón y la activación de la fosfolipasa mitocondrial, que alterará la fosforilación oxidativa.*⁴⁶. Esto tiene como resultado en daño mitocondrial, la activación de las proteasas y fosfolipasas, la generación de RLO y la alteración del citoesqueleto. Los inhibidores de los mPT, como veremos en el apartado de lesión por isquemia, se ha demostrado que mejoran la lesión isquémica renal en diversos estudios con animales, aunque los mecanismos que confieren a la protección no están claros, 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 ARF 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 sean eficaces en la NTA establecida.⁸

Como resultado del agotamiento del ATP y el aumento del Ca^{+2} intracelular, se ha demostrado la activación de la fosfolipasa y esta va a inducir daño en los túbulos proximales de modelos animales. La activación de la fosfolipasa puede resultar en la ruptura de los fosfolípidos de la membrana, la alteración de las membranas celulares y la consiguiente muerte celular. Los inhibidores de la fosfolipasa A2 han demostrado protección contra las lesiones celulares de los túbulos en modelos experimentales.

3.2.3.3.- Acidosis intracelular

La acidosis intracelular resultante del daño isquémico, es en un principio beneficioso, ya que protege a la célula del daño isquémico, ya que reduce el

metabolismo del AMP, además reduce la afinidad del Ca^{++} por la calmodulina, lo que enlentece la formación de la xantinaoxidasa y finalmente 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 célula, produciéndose los RLO.

3.2.3.4.- Generación de los RLO

Los RLO, como el radical hidroxilo, peroxinitritos, y ácido hipocloroso, se generan desde vías diferentes, durante la reperfusión de los riñones isquémicos. El radical hidroxilo puede formarse a partir del superóxido y del peróxido de hidrógeno, que, en circunstancias normales, son continuamente producidos por las células del túbulo. La conversión final de peróxido de hidrógeno al radical hidroxilo requiere de Fe^{++} . (Fig.9) Los antioxidantes naturales, tales como la superóxido dismutasa, catalizan la conversión de superóxido en peróxido de hidrógeno, que, a su vez, se convierte en agua por la catalasa o la glutatión peroxidasa, lo cual confiere citoprotección. La isquemia prolongada tiene como resultado el catabolismo de ATP celular a hipoxantina, y la activación simultánea de la xantina oxidasa Ca^{2+} -dependiente.

Durante la reperfusión, la xantina oxidasa utiliza el oxígeno molecular como un receptor de electrones, mientras transforma la hipoxantina a xantina, lo que genera excesivo anión superóxido. Otras fuentes de RLO son las mitocondrias dañadas durante la I/R, los neutrófilos que se activan tras la I/R, y la producción de peroxinitritos de la interacción del superóxido con el óxido nítrico (sintetizado las células tubulares proximales inducidos por la lesión isquémica y tóxica).

La lesión mediada por RLO también se encuentra asociada a condiciones de excesiva disponibilidad de Fe^{++} libre, tales como hemoglobinuria, mioglobinuria, la gentamicina y la nefrotoxicidad de cisplatino. Una vez generados, los RLO pueden dañar las células de muchas maneras, incluyendo la oxidación directa de proteínas de la membrana, la peroxidación de los lípidos de membrana, y el daño del ADN. Sin embargo, el papel de los RLO en ATN sigue en controversia. Aunque varios estudios en animales evidencian la generación de RLO en la lesión renal por I/R y un efecto protector de los antioxidantes administrados exógenamente.

Parece ser, que los RLO también pueden actuar como señalizadores en la transcripción molecular para regular la transcripción génica y activar factores de transcripción como NF-kB y AP-1, con consecuencias patológicas pero también protectoras.⁷

La activación de los neutrófilos reclutados durante la reperfusión de los riñones isquémicos están implicados en lesiones posteriores de las células renales. Como ya comentaremos en el daño por reperfusión, los neutrófilos activados se adhieren libremente al endotelio vascular a través de las interacciones mediadas vía P-selectina, quedando inmobilizados a través de las interacciones entre las moléculas de adhesión leucocitaria CD11/18 y el receptor endotelial ICAM-1, e inducen lesiones directas tanto al endotelio como a las células tubulares, mediante la liberación de RLO. En modelos experimentales, la eliminación de los neutrófilos o inhibición de la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales (a través de la administración del ligando soluble de la glicoproteína P-selectina o neutralizando a cualquiera ICAM-1 o CD11/18, reduce significativamente la severidad de la lesión por I/R.¹⁴⁹

3.2.4.- Alteraciones en la microvasculatura

Hasta ahora, las investigaciones se han centrado principalmente en la lesión tubular como la principal causa de isquemia relacionada con la ARF, pero cada vez más pruebas implican a las alteraciones en la microcirculación intrarenal¹⁰⁰ y al mantenimiento del O₂.

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.^{57, 149}

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.

A pesar de que la NTA ha sido considerada la principal causa de ARF,^{103, 142} 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 el ARF isquémico.^{154.}

- Fenómeno de “no reflujo”

La reperfusión después de la lesión isquémica, tiene como resultado la recuperación incompleta del flujo sanguíneo renal, esta reducción persistente del flujo sanguíneo total y regional fue descrito hace varias décadas como el fenómeno de “no-reflujo”.^{247.}

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.^{68, 149.}

Muchos factores han sido propuestos para explicar este fenómeno, como 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.

La reducción persistente en la oxigenación del tejido renal se ha medido directamente en modelos animales de lesión por reperfusión y sepsis.^{112, 113.}

La mayoría de los vasos rectos descendentes que suministran sangre a la médula surgen de las arteriolas eferentes de los glomérulos yustacorticomedulares. 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 de O₂ renal y del flujo sanguíneo medular, respectivamente.

En condiciones fisiológicas normales, aproximadamente el 80% del consumo de O₂ renal es utilizado por la bomba de Na⁺-K⁺-ATPasa del túbulo proximal, lugar de reabsorción de aproximadamente dos terceras partes del ClNa que entra en el fluido tubular por filtración glomerular. Por lo tanto, factores que intervienen en la GFR influyen en la oxigenación medular de forma

muy importante modificando la cantidad de soluto liberado a los túbulo. En resumen, la oxigenación renal adecuada depende del equilibrio entre el suministro de oxígeno microcirculatorio y el consumo de oxígeno renal llevado a cabo por la actividad de reabsorción de electrolitos.

En estudios de trasplante renal en animales y humanos, utilizando técnicas de análisis de imagen, muestran la fisiopatología de la lesión de I/R mostrando signos morfológicos de daño vascular y ausencia de flujo tanto en capilares peri tubulares como glomerulares.^{230.}

La ruptura de las uniones de las células endoteliales, las alteraciones del glicocalix endotelial y del citoesqueleto de actina endotelial aparece en el ARF,^{249.} esto conduce a un incremento de la permeabilidad microcirculatoria y al edema intersticial.^{249.} 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 O₂ a las células y promueve el daño del órgano.^{113.} (Fig. 20)

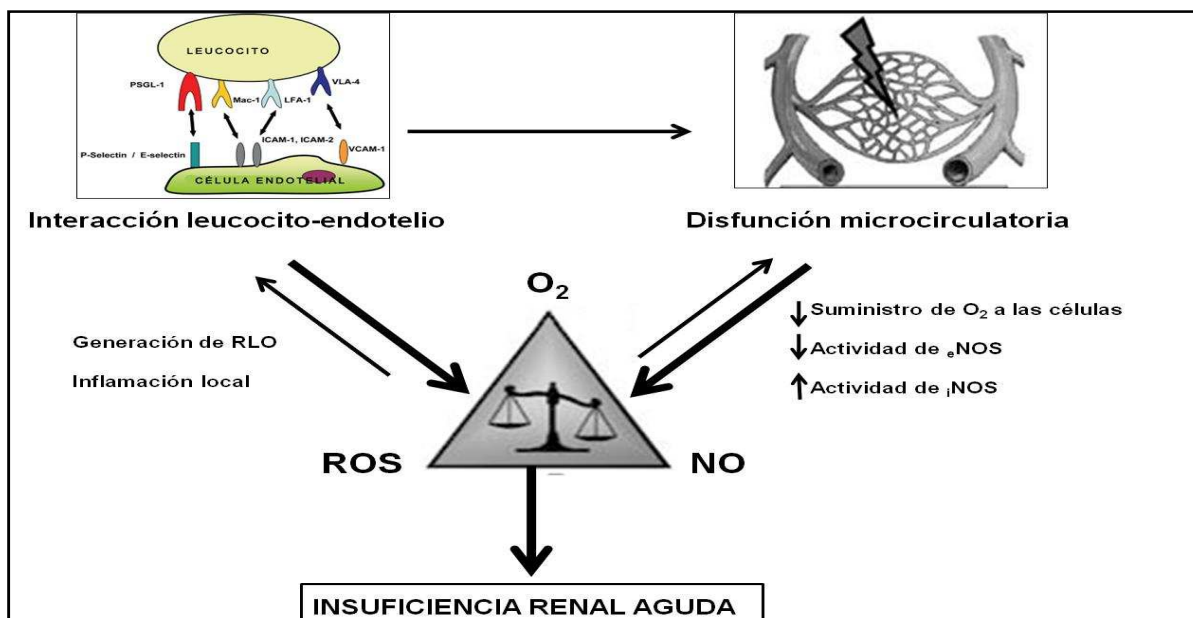


Figura 20

Relación entre la microcirculación y la inflamación en el desarrollo del ARF

El endotelio juega un papel clave en la regulación del flujo, permeabilidad, tráfico celular, señalización y funciones inmunológicas.^{249.} En

este contexto, la disfunción endotelial se define como vasorelajación alterada en respuesta a los vasodilatadores dependientes del endotelio, tales como la ACh. Esta disfunción endotelial se ha demostrado que participa en la vasoconstricción postisquémica tras la reperfusión.^{186.}

La adhesión de plaquetas al endotelio, con la consiguiente adhesión leucocitaria, y la adhesión de plaquetas a neutrófilos, todo este agregado llevan a un estrechamiento de los capilares peritubulares.^{219.}

Aunque el mecanismo de esta disfunción no está claro, parece ser que es el NO el que juega el papel principal.^{80.}

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 el cual actúa como regulador de la microcirculación intrarenal y en la regulación del consumo de O₂ renal puede ser gravemente perturbado en ARF.^{80.} El NO derivado de la eNOS, es esencial para mantener el suministro de O₂ renal después de la I/R. 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.^{153.}

Sin embargo, inhibidores no selectivos bloquean la actividad de eNOS y se observó como se exagera el daño isquémico en el órgano.

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.^{36.} 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 derivado de la eNOS y de la formación de RLO como peroxinitritos. [Legrand M. y cols., 2009] Sin embargo, es más importante la interacción entre el sistema de NO y el estrés oxidativo en promover el ARF. El anión superóxido se une rápidamente con el NO y tiene como resultado una disminución en la disponibilidad del NO y un aumento en la producción de peroxinitritos dañinos para la célula.^{7.}

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/R.¹⁹³

Diversas estrategias de antioxidantes, como el uso del tempol, han demostrado proporcionar acciones beneficiosas en ARF.³⁶

Los RLO ejercen daño directamente sobre el endotelio a través de las estructuras extracelulares como las membranas celulares y glicocalix.²²² Los RLO también pueden perjudicar mediante la vasoreactividad dependiente del endotelio. Además, los RLO median la acción vasoconstrictora de otros agonistas como endotelina-1 y modulan la acción óxido nítrico dependiente.

Por último, la activación del sistema de complemento en los capilares peritubulares ha sido descrita en ratones. Estudios en animales indican que la I/R renal induce cambios en las células endoteliales que favorecen la activación del complemento en los capilares de peritubulares. Una vez activado el sistema del complemento puede generar las señales inflamatorias.

La activación de la inflamación es muy importante tanto en el inicio como en la extensión del daño en ARF. Es evidente que la disfunción microcirculatoria interacciona con la respuesta inflamatoria a través de las lesiones hipóxicas resultante de la disminución de flujo microcirculatorio.³¹

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 tejido.¹⁰⁸

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 inflamatorios.¹¹⁸

La ICAM-1 parece ser particularmente importante en la adhesión firme y en la migración transendotelial de leucocitos.

La fractalquina, es una quimiocina expresada 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 macrófagos.^{200.}

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 y interactúa con CD28 expresada en células T activadas y monocitos a nivel del vaso recto ascendente de la circulación medular.

La respectiva contribución 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 del ARF isquémico, 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 infiltración de células T descrito en el inicio del curso del ARF.

Más detalles pueden encontrarse en las revisiones dedicados a este tema.^{257.}

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 hemodinámica, coagulación, inflamación y permeabilidad vascular.^{249.} 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.

Por lo tanto, el daño hipóxico puede provocar inflamación local, las interacciones leucocito-endotelio tienen efectos paracrinos potenciales con perturbaciones del sistema de óxido nítrico, que a su vez puede afectar la microcirculación renal.

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 fisopatológicas.

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 celulas 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 isquémica comparada con otras regiones del riñón, incluso en condiciones basales.

3.3.2.- Fase de mantenimiento

Durante la fase de mantenimiento, las lesiones del túbulo renal están establecidas, la GFR 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 no oligúrica. La ARF 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 entre los que se incluyen la vasoconstricción renal persistente y la isquemia medular desencadenada por una alteración en la liberación de mediadores vasoactivos por las células endoteliales dañadas (por ejemplo descenso de óxido nítrico y aumento de endotelina), congestión de los vasos sanguíneos medulares y lesión por reperfusión, provocada por mediadores liberados desde los leucocitos o desde otras células del parenquima renal.^{26, 63, 186.}

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 muertas por apoptosis, eliminación de cilindros intratubulares mediante el restablecimiento del flujo de líquido tubular, y la regeneración de la pérdida de 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 ARF 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 ARF de diversas etiologías.^{2.} Otros estudios en humanos con factores de crecimiento están en marcha.^{46.}

Las proteínas HSP son un grupo de proteínas muy conservadas que se expresan de manera constitutiva en las células normales con un incremento importante en las células dañadas por el calor, la hipoxia, o toxinas. Al menos dos familias de HSP, denominadas HSP-70 y HSP-25, se ha demostrado que se sobreexpresan en las células del túbulo renal después de una lesión por I/R en animales. HSP-70 puede jugar un papel en la restitución de la polaridad celular, y HSP-25 pueda ayudar en la reparación de los filamentos de actina en las células dañadas. El papel de las HSPs en NTA humanos está todavía por dilucidar.

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).

**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- κ B TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

Tabla III

Principios activos del endotelio vascular

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, en cambio, alcanzan 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 antagonicos, como el óxido nítrico y la endotelina para la regulación de la contracción de las células musculares lisas, o la de activadores de la

fibrinolisis como el t-PA o el u-PA y de su inhibidor el PAI-1, que controlan la fibrinolisis.^{110, 263.}

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 fibrinolisis, disminuye la permeabilidad capilar e inhibe la adhesión y migración de neutrófilos y macrófagos generadores de inflamación. (FIG.21)

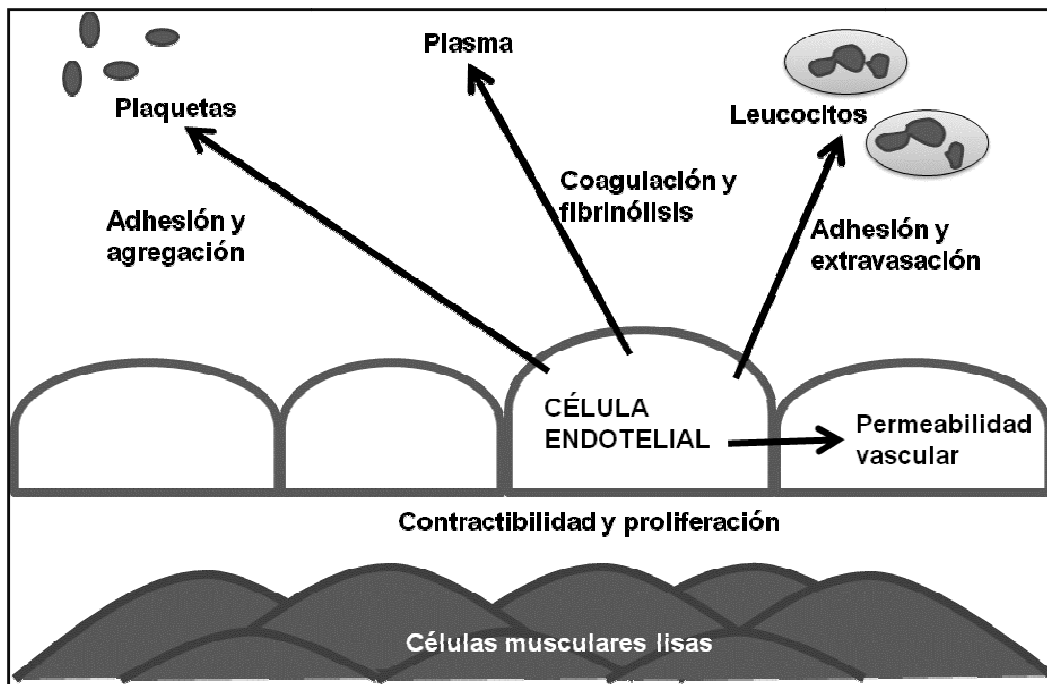


Figura 21

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.^{152.} Las células del endotelio vascular renal inician la respuesta inflamatoria en el riñón dañado debido a su contacto directo con los agentes lesivos.^{186.} Morfológicamente en el endotelio, la desorganización del citoesqueleto de actina y los complejos de unión son similares a los previamente descritos en las células epiteliales tubulares.^{152, 249.}

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.¹⁷⁰ Una menor disponibilidad de NO, una alteración en la producción de prostanoïdes (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.

Por lo tanto las células endoteliales, durante la lesión y la inflamación, respectivamente interactúa con las células sanguíneas circulantes, es decir, media adherencia de las plaquetas y leucocitos a la pared del vaso y sufre la muerte celular programada.

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.²³¹

Los daños estructurales tanto en las células del músculo liso vascular como en las células endoteliales se produce rápidamente después de un daño

isquémico.¹³⁹ La reorganización de la F-actina en las células endoteliales se produce después de la I/R renal.¹⁵²

Las modificaciones del citoesqueleto, *observadas* en células endoteliales *in vitro* sometidos a la ausencia de ATP⁷¹ o la exposición a los oxidantes (tales como H₂O₂) puede ser responsable del aumento de la permeabilidad endotelial y edema intersticial.

Por otra parte, la microscopía de fluorescencia estudios han demostrado que el flujo microvascular puede verse afectada en los capilares peritubulares debido a la ruptura de las células endoteliales o agregación, causando la obstrucción intravascular renal después de I/R.^{19, 186, 249.}

Se observó *en* un modelo de rata, un cambio en las uniones endoteliales célula-célula caracterizado por una rápida pérdida de las uniones adherentes (VE caderina) después de I/R. Otro posible mecanismo²⁴⁹ implicado en el aumento de la permeabilidad endotelial podría ser que; debido a la interrupción de las uniones adherentes puede aumentar la permeabilidad paracelular y la salida del lecho vascular a los tejidos circundantes.

Las células endoteliales hinchadas también podrían participar en el deterioro de la perfusión por compresión de los capilares y la disminución de la luz vascular. además del edema intersticial.¹³⁹ De hecho, la hinchazón de las células endoteliales es una observación histológica clásica seguida de la I/R.

La I/R puede inducir despolarización de la membrana de las células endoteliales mediante la inactivación de los canales de K⁺ sensibles al flujo y puede inducir hiperpolarización o despolarización rectificando la inhibición del flujo de K⁺ hacia el interior o exterior respectivamente.

Además, la lesión endotelial regional puede activar las células endoteliales de otros órganos, como los pulmones, dando lugar a la lesión pulmonar aguda, que contribuye aún más al daño renal a través de la hipoxia sistémica. También, la lesión de las células endoteliales puede inducir una respuesta procoagulativa y contribuir así a la obstrucción vascular y déficits en la perfusión renal.

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 presiones de O_2 , 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.^{62.}

La administración sistémica o intrarenal de células endoteliales completamente diferenciadas en riñones de rata postisquémicos demuestran 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.^{19.} Estos 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.^{77.}

Después de la I/R renal se producen complejas interacciones entre lesión tubular, lesiones microvasculares, e inflamación.

Por lo tanto, 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,^{186.} 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 (FIG.22) las estrategias que modulen la respuesta inflamatoria pueden proporcionar efectos beneficiosos significativos en ARF isquémico.

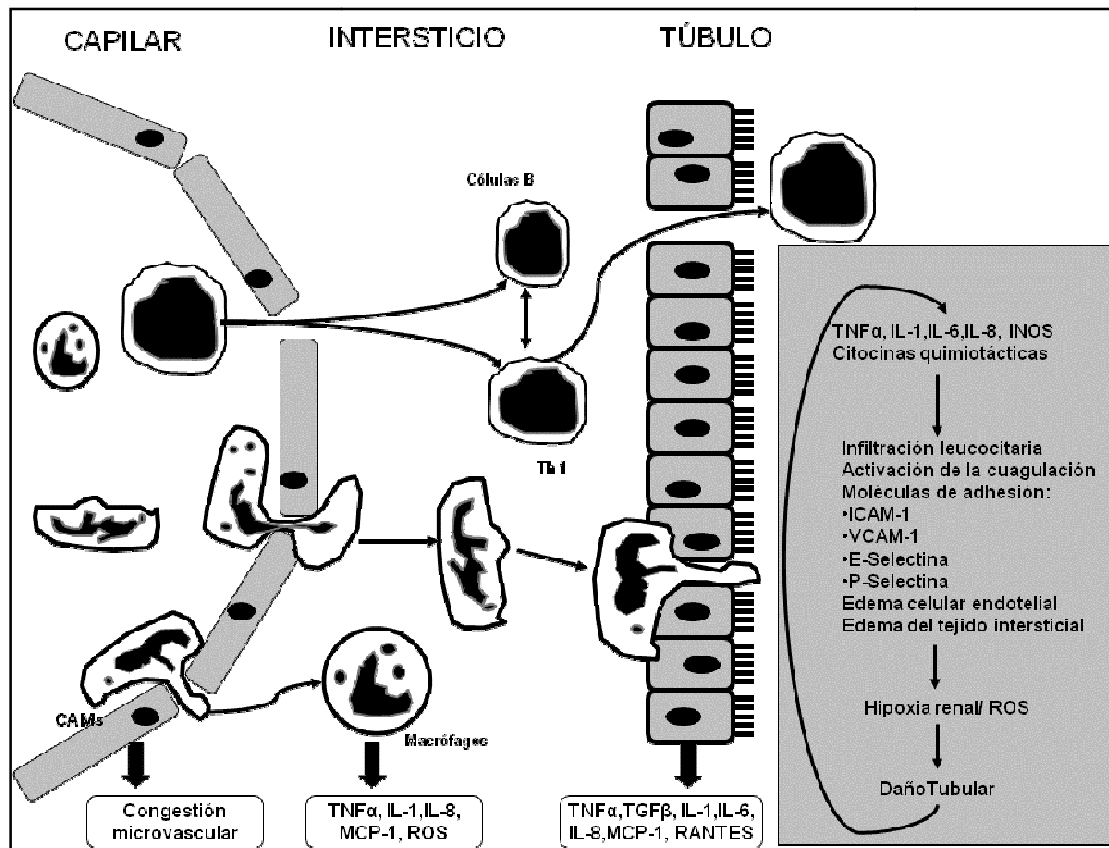


Figura 22

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.^{26, 63, 216, 241.} 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 ARF,^{241.} y los niveles del receptor de quimiocinas CXCR3 en orina puede predecir ARF después de trasplante de riñón,^{104.} lo que demuestra la importancia clínica de estos mecanismos.

Por un lado, el daño de las células del túbulo promueven la liberación de una serie de mediadores inflamatorios como el TNF- α , IL-6, IL-1 β , las citocinas quimiotácticas (RANTES, MCP-1, e IL-8),²⁶ de los cuales hablaremos a continuación.

Por otra parte, la producción de las quimiocinas promueven 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 (micro)vascular. Estos mecanismos incluyen la disfunción endotelial funcional, 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 (ver Figura interacción entre daño vascular y daño tubular). 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.

La respuesta inflamatoria en el daño post-trasplante es uno de los mecanismos más importantes en el fracaso funcional del órgano trasplantado. Por ello nos proponemos, en el presente trabajo, estudiar la importancia de dicha respuesta inflamatoria y de su posible regulación para obtener una mayor viabilidad celular y una mejor respuesta funcional del órgano trasplantado.¹³⁶

Además de los efectos citotóxicos directos de la hipoxia, la I/R renal induce una reacción inflamatoria en el parénquima renal.²⁶ 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,⁴ y quimiocinas derivadas de queratinocitos (KC, un análogo de ratón de la IL-8) es un marcador biológico precoz de la ARF isquémica.¹⁸⁷ 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.

En el epitelio tubular renal como ya hemos explicado se produce daño y muerte celular durante la isquemia, y varios estudios han sugerido que las células del epitelio tubular renal juegan un papel proinflamatorio.^{214, 272}

También se ha comprobado en diferentes estudios sobre isquemia pura e I/R renal, cómo la activación de los neutrófilos junto con las citocinas liberadas en el tejido isquémico provoca alteraciones sobre el aporte de flujo al riñón. Por su parte, el riñón, sobre todo en la fase de isquemia, puede

responder generando potentes vasoconstrictores como el tromboxano A₂, junto a un descenso de la liberación de vasodilatadores como prostaglandina E-2 o prostaglandina I-2 y el óxido nítrico (NO).^{11, 26, 110, 216.}

Adicionalmente, se produce una serie de respuestas metabólicas intracelulares de adaptación, entre ellas un aumento en la concentración de Ca⁺² intracelular con la generación de los complejos de pirofosfato de calcio y la formación de ácido úrico. Los complejos de fosfato de Ca⁺² y ácido úrico que van a provocar (fragmentación del ADN, ruptura de la membrana celular, proteínas de choque térmico, etc) se pueden unir a los complejos de proteína intracelular llamada inflamasoma. El inflamasoma es una estructura de multiproteínas citosólicas que permite la activación de las caspasas proinflamatorias, las cuales transforman el precursor pro-IL-1 β a la forma activa, lo que conduce a una poderosa respuesta inflamatoria. Por otra parte, también los receptores TLR son estimulados a través de señales de daño para a su vez estimular la secreción de otras citocinas proinflamatorias/quimiocinas a través de la activación del factor NF- κ B. 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.

Aparte de la formación de complejos de fosfato de calcio, el aumento de la concentración de Ca⁺² intracelular también aumenta la activación de fosfolipasas y proteasas. Este último grupo incluye calpaínas (enzimas responsables de la proteólisis neutra Ca⁺²-dependiente) y las caspasas, que ejecutan la muerte celular programada (apoptosis).

Un efecto importante de la hipoxia sobre el tejido es el desarrollo de la acidosis metabólica. Ocurre como resultado de la isquemia, cuando la glucólisis anaeróbica es la única forma de generar energía. Sin embargo, esta puede

inducir una respuesta inflamatoria cuando la perfusión de los tejidos respectivos se restablece²¹². 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 trasplante⁶⁷. 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.³⁴ 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 eliminada.

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

La fibrosis o acumulación de matriz extracelular es el resultado final no específico de la lesión por I/R. Sin embargo, la degradación de la matriz extracelular desempeña también un papel en la mediación de la ARF después de I/R. Por otra parte, los componentes del sistema inmune innato como los TLR o el sistema del complemento también participan en el desarrollo de la lesión de I/R.

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 ARF isquémica se caracteriza por una respuesta inflamatoria fuerte.²⁵⁷ Las terapias que se dirigen a tipos específicos de células inflamatorias o proteínas efectoras, tales como las proteínas del complemento, quimiocinas, o CAMs puede mejorar la ARF isquémica en modelos animales.¹⁶⁷

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 lesión.⁴ 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 inflamación⁴ 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 pulmones.^{114.}

El papel de la histamina y su directa relación con las células cebadas y 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). La histamina es un mediador importante en la fase inicial de la inflamación y en las reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE.

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 inflamatoria.^{45.}

5.2.2.- Mediadores químicos del plasma

Por la presencia de proteasas, una serie de proteínas presentes en el plasma, se van a romper creando un conjunto de mediadores que intervienen en la reacción inflamatoria.

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.

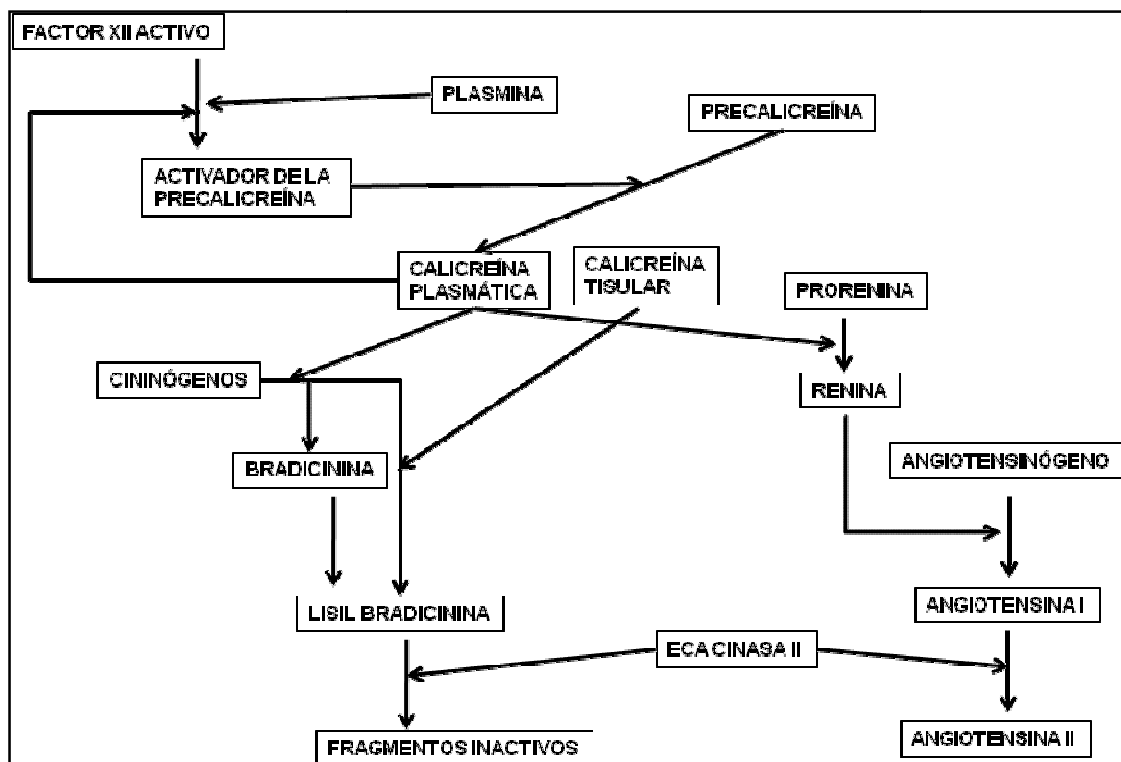


Figura 23

5.2.2.2.- Sistema del complemento

Se conocen más de veinte proteínas séricas 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.

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.^{50, 108.}

Este conjunto de proteínas séricas se sintetiza fundamentalmente en el hígado, también por 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, capaces 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 inflamatoria.^{9.}

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; 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 . 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.

La activación del sistema del complemento puede iniciarse y desarrollarse por dos vías diferentes, la clásica o MLB y la alternativa, estas proteínas del sistema del complemento cuando se activan se convierten en enzimas proteolíticas 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 con capacidad para atacar, el 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 ROS e inhibe la vasodilatación dependiente del endotelio.

Además de ésta, la activación del complemento es responsable de otras acciones biológicas claves en el proceso defensivo frente a la invasión, especialmente bacteriana:

- Oponización: recubrimiento de las “partículas” extrañas por sustancias (opsoninas), haciéndolas más susceptibles a la fagocitosis (el C3a es la opsonina más importante del sistema del complemento y, en menor grado, C4b y C5b).
- Estimulación de la respuesta inflamatoria: mediante liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas por mastocitos y basófilos, (acción de dichos componentes [C3a, C4a, C5a]), escindidos de los principales y que actúan como anafilotoxinas, y de los fenómenos de quimiotaxis de las células fagocíticas (fragmentos C5a y C3a).

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 resulta en 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 MAC pero, además, el 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 estimula 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 neutrófilos.¹⁰

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 complemento 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 C3 a lo largo de la membrana basal tubular y el aumento en la circulación de C3a.²⁵⁶

Se ha propuesto la inhibición del sistema del complemento para reducir el daño por I/R en modelos experimentales.²⁸⁹ En un modelo experimental de daño por I/R en trasplante la inhibición del componente C5, reduce dicho daño.⁵⁹

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.²⁵⁶

El 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.²⁵⁶

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 KC.²⁵⁷

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 bradiginina 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.⁶

5.2.3.- 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.⁸⁸ 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 desencadena mediante una serie de estímulos físicos, mecánicos o químicos (C5a). Una vez liberado, puede seguir dos vías metabólicas.

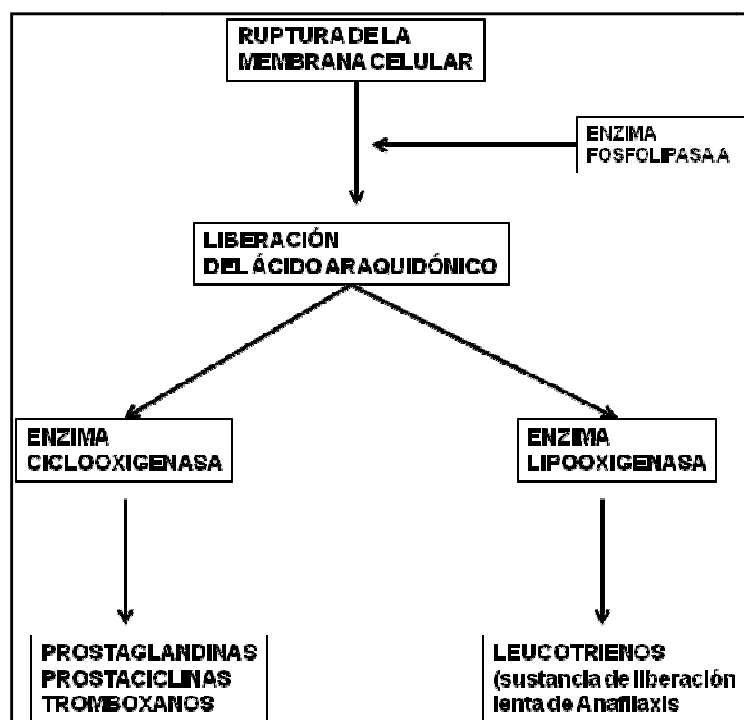


Figura 24

5.2.3.1.- 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.

Las prostaciclinas producidas por las células endoteliales, son derivados del ácido araquidónico, y son transformadas a diferentes metabolitos siguiendo la vía de la ciclooxigenasa. La COX sigue los mismos caminos que la NOS. Los AINES pueden inhibir este enzima bloqueando la síntesis de prostaglandinas. 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

inflamatorios.²⁰⁴ 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 tienen un efecto citoprotector en el daño por I/R no sólo en el riñón, sino también en el hígado²⁰⁵ y en páncreas.

También, la administración de análogos de la prostaciclina atenuan el daño por I/R mejorando el flujo renal y la filtración glomerular, facilitando la recuperación de las células tubulares dañadas a nivel renal,¹¹⁸ mejorando la microcirculación hepática y atenuando la depleción energética y la lipoperoxidación.

La síntesis de prostaciclina podría contribuir a la protección renal contra el daño renal agudo provocado por endotoxemia.¹¹²

La endotelina, el óxido nítrico, la prostaciclina y el tromboxano actúan conjuntamente interaccionando entre sí y modulando el daño por I/R.

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_c.

El NO formado a partir de L-arginina también relaja el músculo liso e inhibe la adhesión y agregación plaquetaria pero incrementando los niveles de GMP_c. 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.

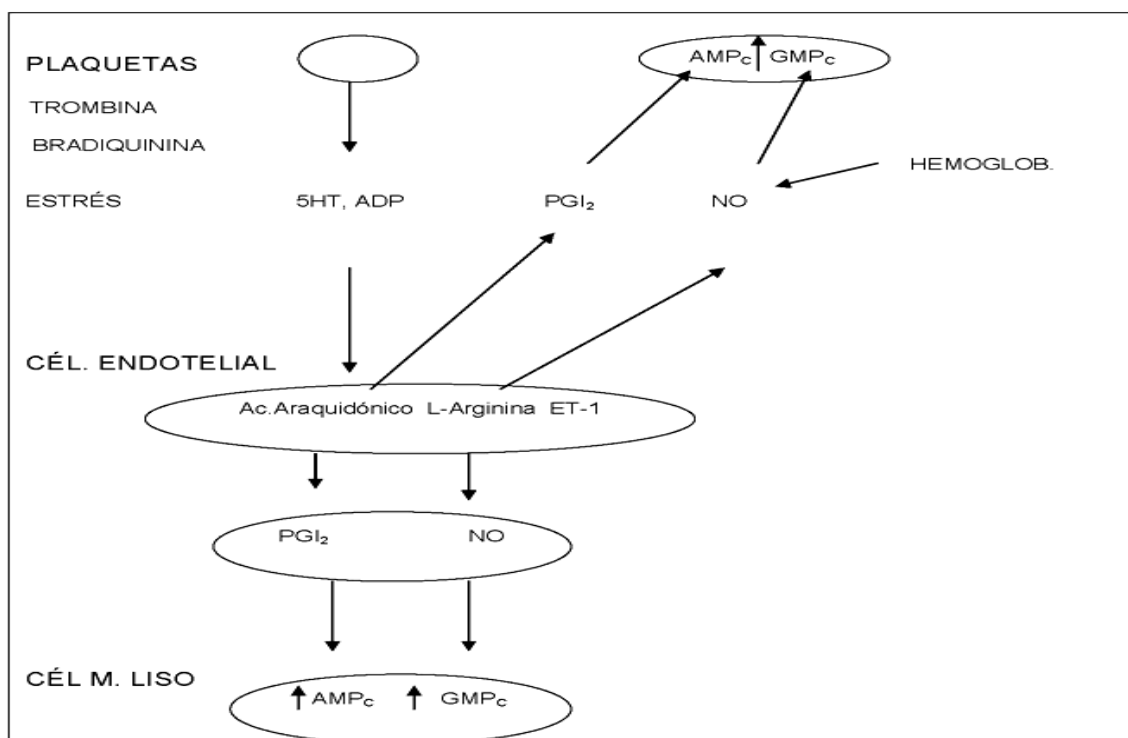


Figura 25

5.2.3.2.- Vía de la lipooxigenasa

La vía de la lipooxigenasa origina los leucotrienos. El ácido araquidónico, bajo la acción de la lipooxigenasa, se transforma en una serie de productos denominados leucotrienos por haber sido aislados inicialmente en los leucocitos y por su estructura química característica. 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 lisosómicas.^{246.}

5.2.4.- 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 endotelio.^{285.}

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 ARF, el PAF parece ser el responsable tanto de las alteraciones hemodinámicas renales como de otras alteraciones asociadas con el ARF. Se ha demostrado como el tratamiento con varios antagonistas de PAF protege significativamente de la ARF isquémica. Los riñones reperfundidos con neutrófilos producen más PAF que los reperfundidos sin neutrófilos, y estos riñones van a ser reperfundidos con un antagonista del PAF observando un incremento en la función renal dosis dependiente 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 PAF.

Como ya hemos comentado el endotelio juega un importante papel en la reducción de la GFR, después de la ARF isquémica, mediada en parte por el PAF. 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 ARF isquémica.

En cuanto a los RLO, en el ARF isquémico 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 lo que, 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 GFR, 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 ARF isquémico.¹⁶³

5.2.5.- Citocinas

Son un grupo de polipéptidos producidos por varios tipos de células, especialmente por monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales.

En el sentido estricto de la palabra, una citocina es una molécula producida por una célula y que tiene un efecto en otra, de manera general han sido consideradas como los factores de crecimiento y hormonas del sistema inmunitario y del hematopoyético.

En sentido práctico 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.^{241.}

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 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 el ARF.^{202.}

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 ARF. En la actualidad se han descrito más de 20; detallaremos a continuación las más importantes relacionadas con el proceso inflamatorio en la reperfusión.^{216.}

5.2.5.1.- 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 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 PGE₂, 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 ciclooxygenasa.
- 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 isquemia.

La acción de IL-1 es fisiológicamente inhibida por el antagonista del receptor de IL-1 (IL1-RA). En un modelo de isquemia reperusión renal en rata, los animales tratados con IL1-RA el daño era significativamente disminuido, así como la infiltración neutrofílica y el número de células apoptóticas comparado con el grupo control.

5.2.5.2.- Interleucina-18 (IL-18)

La IL-18 era estudiada como un importante mediador en la protección contra el daño renal agudo por isquemia en ratones deficientes en caspasa-1. IL-18 es una citocina proinflamatoria producida por los túbulos proximales, linfocitos,⁵⁸ neutrófilos, y macrófagos⁹⁴ 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 ARF por isquemia.⁹⁵

En cuanto al ARF isquémico mediado por IL-18 tiene mecanismos independientes en neutrófilos y macrófagos.⁹⁵ El daño renal agudo inducido

por cisplatino está asociado con un incremento en las citocinas IL-1 β , IL-1 α , IL-6, e IL-18 e infiltración de neutrófilos en el riñón. Sin embargo, la inhibición de IL-1 β , IL-6, IL-18 y neutrófilos, no era suficiente para prevenir el ARF inducido por el cisplatino.⁵⁸ Los ratones deficientes en caspasa-1 estaban protegidos tanto del daño provocado por el cisplatino como por endotoxemia, aunque los mecanismos están por determinar.⁵⁸

5.2.5.3.- 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 el ARF isquémico¹⁹⁷ como en el daño pulmonar en ratones con ARF.¹³⁰ La IL-6 puede estimular sus células diana mediante la forma soluble del receptor de IL-6 en un proceso llamado trans-señalización.¹⁹⁷ Los mecanismos por los cuales se llevan a cabo los efectos de IL-6 en el ARF isquémico podrían ser por trans-señalización y por activación de STAT-3 en células tubulares renales.

5.2.5.4.- 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.¹⁹².

5.2.5.5.- 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:⁵¹.

- 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 monopoiesis (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 PGE₂, 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.³
- Estimulador de la síntesis del PAF.

El TNF- α es una potente citocina proinflamatoria y un importante mediador del daño en el tejido inflamado. En el ARF inducido por cisplatino provoca un aumento en la síntesis del TNF- α , y que la inhibición de la liberación como de la acción de TNF- α , protege al riñón de la nefrotoxicidad.²¹⁶

Se ha demostrado¹²³ que TNF- α está involucrado en la apoptosis después de la I/R 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 .¹⁸⁰

5.2.5.6.- 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.^{26, 63.}

5.2.6.- 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 reperfusión. 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.

5.2.7.- 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, NFkB y vías de señalización relacionadas con receptores tipo Toll (TLR).^{66, 67.} 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.^{66, 67.} 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 puede ser inducida marcadamente por citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 y el IFN- γ o con 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 sobre los linfocitos natural killer (NK), monocitos, y algunos linfocitos T CD8+. La fractalquina en el proceso de extravasación de leucocitos cumple una función dual 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 quimiotractante para células NK y monocitos pero no para neutrófilos. Su expresión está incrementada en pacientes con inflamación tubulointersticial renal con una fuerte expresión localizada en sitios vasculares cerca de la inflamación macrofágica, y es muy importante para dirigir la infiltración celular mononuclear inducida por daño vascular.

En la ARF 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 daño.²⁰⁰

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. Se ha demostrado anteriormente que CXCL1 está incrementado en riñón en la ARF isquémica.²⁵⁵ Hay estudios que sugieren que CXCL1 es un mediador de la ARF 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.

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.

El CXCL1 se sintetiza en monocitos/macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, y células endoteliales.

En ARF isquémico CXCL1 fué detectado en macrófagos y células epiteliales tubulares. Se ha demostrado que la reducción de los macrófagos protege contra la ARF isquémica en ratón^{44, 111}. y el mecanismo protector podría ser debido a la inhibición de la producción de CXCL1 por los macrófagos en la ARF isquémica, ya que se ha demostrado que los macrófagos son la fuente principal de CXCL1 en el riñón tras la ARF isquémica.⁹⁵.

5.2.8.- Radicales libres del oxígeno (RLO)

Un radical libre es una molécula o átomo que contiene en su última capa uno o más electrones desapareados (un número impar de electrones en su capa externa, lo que los hace extraordinariamente reactivos). El oxígeno molecular puede aceptar en total cuatro electrones para formar agua, sin embargo, se puede reducir en pasos univalentes para generar varios tipos de radicales libres.²⁹⁰.

- La reducción univalente produce el anión superóxido O_2^- . Poco reactivo, su toxicidad suele atribuirse a su función como precursor de especies más reactivas del oxígeno.
- El peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , producido como resultado de la reducción bivalente o dismutación del O_2^- .
- El radical hidroxilo, OH^- , que se forma por interacción del O_2^- y el H_2O_2 , estado de reducción de tres electrones. Es altamente reactivo y un agente oxidante muy potente.
- El radical peroxilo (ROO^-), formado a partir de hidroperóxidos orgánicos como los lípidos, el denominado hidroperóxido orgánico (ROOH) y el Oxígeno singlete, forma excitada del oxígeno molecular sin electrones libres en su capa externa.

Bajo condiciones basales, el metabolismo aerobio en los sistemas biológicos produce pequeñas cantidades de radicales libres que son destruidos por antioxidantes endógenos, pero si estos prooxidantes están en exceso, ocurre el estrés oxidativo. El resultado de la acción de los RLO es perjudicial para una serie completa de biomoléculas que se encuentran en los tejidos, entre ellas ácidos nucleicos, lípidos de membrana, enzimas y receptores. Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la membrana son muy accesibles al ataque del OH⁻ en un proceso que da por resultado peroxidación de los lípidos. Ésta puede alterar la fluidez de la membrana celular y provocar la lisis.

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, durante la hipooxigenación celular, se produce un aumento de hipoxantina que, por la acción de las xantinaoxidasa, forma aniones superóxido. También en la fase isquémica, se acumula ácido araquidónico que propicia la síntesis de endoperóxidos y la liberación de radicales libres. Los RLO producidos, entre otros, por neutrófilos y macrófagos, pueden ser liberados tras la exposición a los agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o ante la fagocitosis, etc. 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 organismo posee diferentes mecanismos, tanto de naturaleza enzimática como no enzimática, que lo protegen de la acción de los radicales libres. Los antioxidantes primarios, que previenen la formación de nuevos radicales libres son la Superoxido dismutasa (SOD mitocondrial y citosólica), Glutation peroxidasa, la catalasa (lisosomial) y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina).²⁵⁰ Los antioxidantes secundarios que son captadores no enzimáticos de radicales libres 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 radicales libres (las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa)²⁹⁰.

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 agresión.

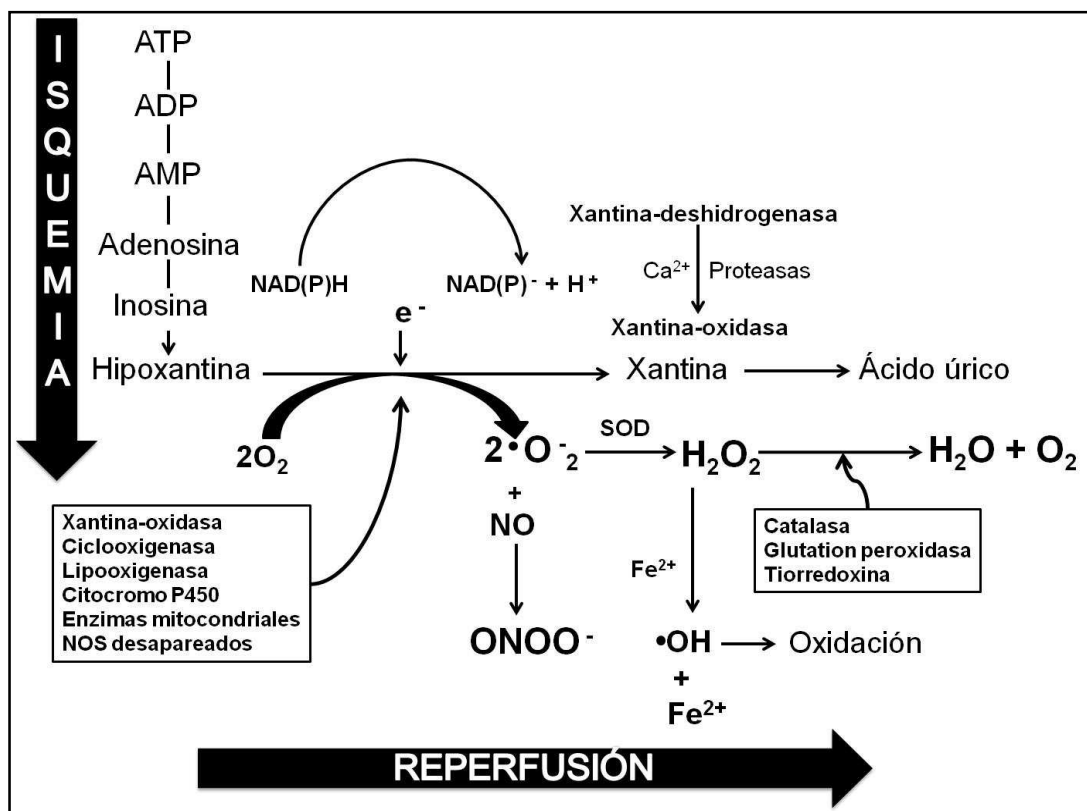


Figura 26

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

La NADPH oxidasa, la xantino oxidasa, el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la activación de la cascada del ácido araquidónico son las principales fuentes de los RLO, COX-2, iNOS, eNOS, etc.

En el tejido reperfundido, solo las dos primeras parecen estar particularmente implicadas. El anión superóxido formado por la NADPH oxidasa o la xantino oxidasa es rápidamente transformada a H_2O_2 por la superóxidodismutasa, la cual en presencia del hierro (Fe^{2+}) o del cobre (Cu^+) se transforma en un radical hidroxilo.

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 catalizan la formación del ácido hipocloroso en presencia de haluros.

El anión superóxido reacciona con el óxido nítrico para formar peroxinitritos.

El PAF, $TNF-\alpha$, IL-6, IL-1 β , factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), la fracción C5a del complemento y las RLO estimulan la producción endotelial de las RLO.^{251.}

Las RLO activan NF κ B y a los neutrófilos, estimulando la producción de citocinas ($TNF-\alpha$, IL-6, PAF y otras), la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión a la superficie del endotelio.

La reperfusión de un órgano isquémico genera un estrés oxidativo. La NADPH₂ oxidasa de los neutrófilos, xantino oxidasa y la disfunción de la fosforilación oxidativa mitocondrial son los principales productores de RLO durante la reperfusión. La acción directa contra los RLO sería un blanco terapéutico en la disminución del daño por reperfusión. La administración de antioxidantes endógenos está siendo ampliamente estudiado en la prevención del daño por I/R. En estudios in vivo^{210, 227.} 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 allopurinol,

disminuye el impacto de los RLO. Sin embargo, estudios en humanos muestran resultados más mitigados, lo cual limita su uso terapéutico.²⁵⁹

5.2.9.- Óxido nítrico (NO)

El NO es un gas incoloro poco soluble en agua. Su molécula contiene un electrón no apareado en su capa exterior, debido a ello, es un radical con elevada reactividad y tendencia a la unión con hemoproteínas reducidas. Es inestable, con una vida media de 3 a 6 segundos, y se oxida, en presencia de oxígeno y agua, a nitrito y nitrato. El NO se produce a partir de L-arginina y NADH como donador de electrones. El enzima implicado en su síntesis es la NO-sintasa (L-arginina-NADPH-oxidoreductasa-NO-sintasa), quien convierte el grupo guanidina terminal de la L-arginina en NO con un compuesto intermediario de ω -hidroxil-L-arginina. Requiere oxígeno y 4 cofactores (grupo hemo, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina), así como la presencia de calcio-calmodulina en las enzimas denominadas constitutivas (FIG.27)

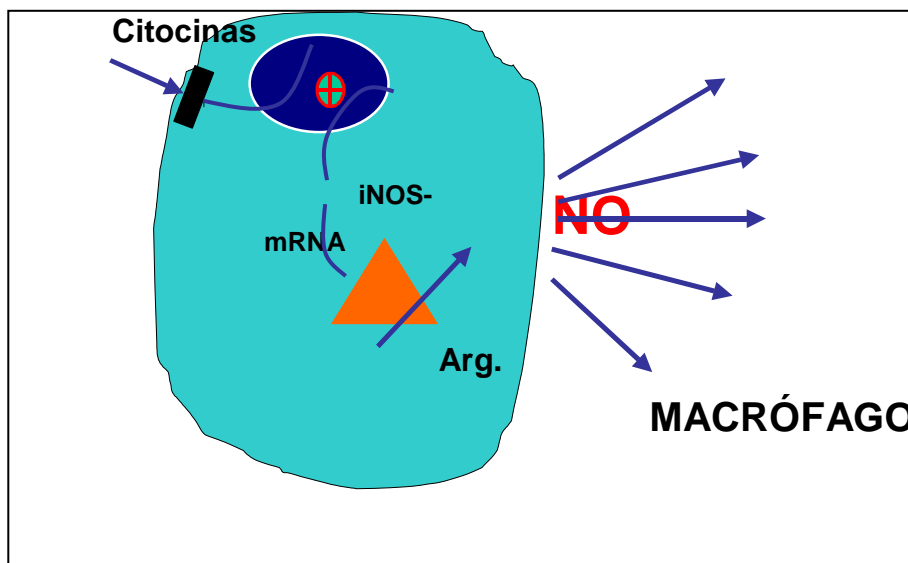


Figura 27

Ruta de síntesis del NO en el macrófago

El NO se produce a partir del aminoácido, L-arginina por las óxido nítrico sintasas (NOS) y está involucrado en diversos procesos patofisiológicos y fisiológicos.

La enzima implicada en su síntesis es la NO-sintasa, quien convierte el grupo guanidina terminal de la L-arginina en NO. Requiere oxígeno y 4

cofactores, así como la presencia de calcio-calmodulina en las enzimas denominadas constitutivas

Se conocen tres isoformas del enzima productor del NO que se clasifican según la localización celular donde fueron descubiertas (esta clasificación se mantiene aunque se sabe que no es real puesto que las células endoteliales pueden expresar ambos tipos y la eNOS o NOS I también se expresa en células no endoteliales) con un 60% de similitud entre sus moléculas, dos de ellas expresadas constitutivamente (cNOS o NOS III) y otra inducible por estímulos inmunológicos (iNOS o NOS II).

cNOS:

- eNOS: La isoenzima endotelial fue la identificada en primer lugar y es la responsable de los efectos a nivel vascular.

- nNOS: La isoenzima neuronal, inicialmente aislada en las células del sistema nervioso central y periférico, se ha encontrado también en células β -pancreáticas, células musculares estriadas, células epiteliales del pulmón, etc.

iNOS:

- La isoenzima inducible desempeña un importante papel en las reacciones inmunológicas y de defensa, es independiente del calcio y fue identificada como inducible en los macrófagos, no estando expresada inicialmente de forma constitutiva, pero tras la exposición a productos bacterianos y citocinas, puede encontrarse en un amplio número de células, no sólo en macrófagos, sino también en células hepáticas, células musculares lisas y células endoteliales de los vasos.

Las formas eNOS se encargan de la producción en condiciones fisiológicas. Su liberación, a niveles bajos, es pulsátil en función del estrés sobre el órgano y de la acción de otros agentes vasoactivos, como las prostaglandinas I_2 y E_2 y el tromboxano A_2 .

La enzima iNOS difiere de las otras dos porque produce un flujo continuo y de gran cantidad de NO, unas mil veces más que la cNOS, desde el

momento en que es inducida; algunos autores apuntan la posibilidad de que, en situaciones de activación, esta enzima podría sufrir un efecto de control en la producción del NO por retroalimentación negativa, ejercido por el propio NO producido. Los diferentes estudios realizados hallaron que, entre otros, los principales estímulos para la activación de la iNOS son los productos derivados de las bacterias (LPS, restos de la pared, etc.), $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, el $\text{TNF-}\alpha$, los RLO, el $\text{NF-}\kappa\text{B}$, y el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF).

El $\text{NF-}\kappa\text{B}$ parece ser un blanco central tanto por activadores como inhibidores de la expresión de la iNOS.

La inhibición de la expresión de la iNOS se lleva a cabo por numerosos agentes, como glucocorticoides, $\text{TGF-}\beta 1$ y antioxidantes y esta inhibición se ha demostrado que es debida a la inhibición de la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Esta inhibición puede llevarse a cabo a través de la captura directa de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por las interacciones proteína-proteína, bloqueando la translocación nuclear de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, por la inhibición de la actividad de transactivación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ²⁸⁶ o por el incremento en la expresión de I- κB , el inhibidor específico de $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Otra serie de citocinas parecen inhibir su producción (IL-4 e IL-10), causando el mismo efecto inhibitor el factor de crecimiento de los macrófagos y el $\text{TGF-}\beta$. (Fig. 28)

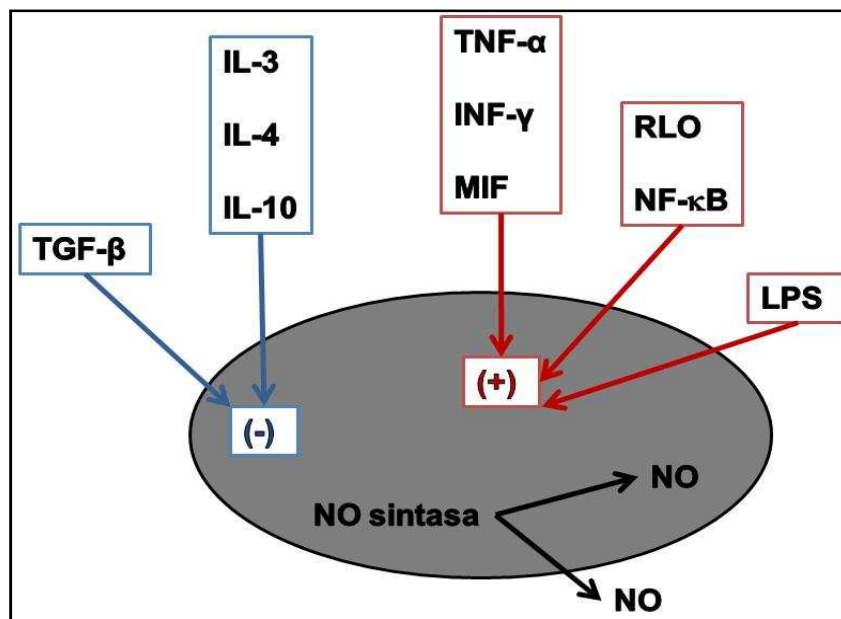


Figura 28

Síntesis de NO en los macrófagos

La enzima cNOS se eleva tras la cirugía como mecanismo de respuesta a la agresión o estrés quirúrgico. La enzima iNOS se incrementa en los riñones que han sufrido isquemia y son viables. En riñones no viables, no se expresa ninguna actividad enzimática (cNOS, iNOS).

Efectos del NO

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 mediados por sí mismo, y los 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.

En *tercer lugar*, el NO reacciona muy rápidamente con el anión superóxido (O_2^-) y como resultado la formación de peroxinitritos ($ONOO^-$). Los peroxinitritos son oxidantes muy potentes capaces de modificar las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

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 ($< 1\mu M$), los efectos directos predominan, mientras que a mayor concentraciones ($> 1\mu M$), los efectos indirectos van a ser más importantes.

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 conducen a la controversia.

Entre los efectos beneficiosos, parecen demostrados los siguientes:

- 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.¹⁶⁵
- Inhibe la adhesión y agregación plaquetaria mediante el incremento de los niveles intracelulares de GMPc, evitando así la trombosis del vaso.
- Hace disminuir la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 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.¹¹⁶

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 radicales libres del oxígeno por parte de los neutrófilos.^{234.}

- 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.^{48.}

- Modula las hemoproteínas que pueden actuar como receptores de los radicales libres del oxígeno.

- Actúa como un mensajero intracelular sin requerir transportador de membrana.

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

DIANA	RESPUESTA
Guanilato-ciclasa. Plaquetas. Células musculares lisas.	Elevación del GMPc. Inhibición de la agregación y adhesión. Relajación.
Leucocitos.	Inhibición de la NADPH-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 vaso-activos.

Tabla IV

Algunas de las acciones biomoleculares del óxido nítrico

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 más 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 IR 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 radicales libres del oxígeno y de citocinas proinflamatorias.

En publicaciones más recientes 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 macrófagos.

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 vasoconstricción.

Recientes estudios demuestran la capacidad del NO de reducir la producción excesiva de endotelina-1 durante la I/R renal ejerciendo sus efectos protectores.¹³⁷

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.

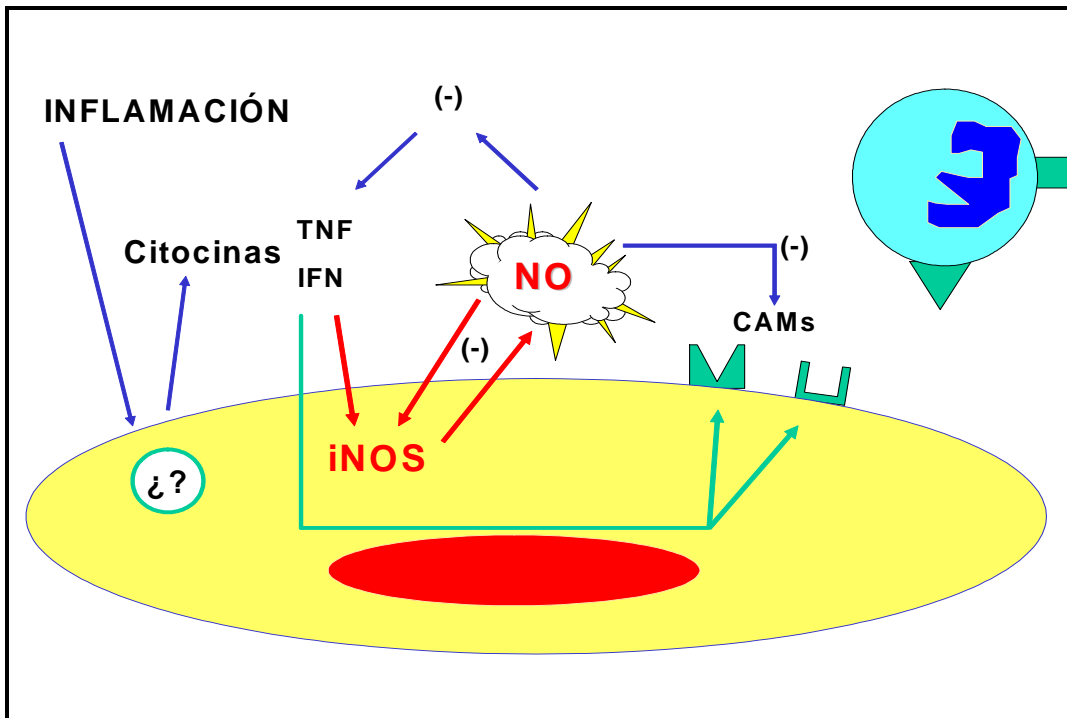


Figura 29

Posible mecanismo de acción del NO en la inflamación

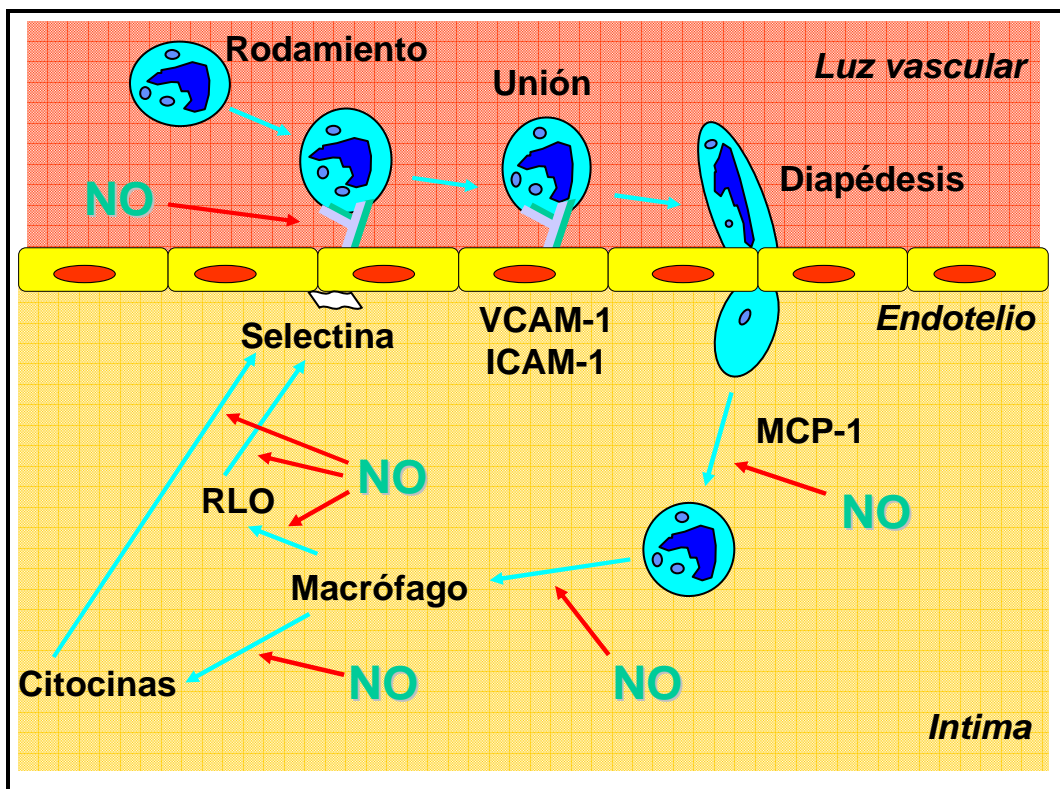


Figura 30

Infiltración de monocitos.

Hay evidencias halladas en modelos experimentales de trasplante renal cuyos resultados muestran que el NO tiene un papel clave en el trasplante renal y en fenómeno de rechazo agudo. [Lu Y.P. y cols., 1999]

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 citotóxica.¹³⁷ (FIG.30)

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. Unos autores aseguran que los peroxinitritos son los mediadores de la toxicidad por NO; de igual manera que otros autores los describen en modelos de inflamación en riñón de rata, asegurando su carácter perjudicial.

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 autores.²⁶⁶

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.^{29, 288} La gran expansión de la producción de NO por la iNOS, estimulada durante el proceso inflamatorio, parece ser altamente lesivo.³⁶ Por el contrario, la tasa fisiológica de producción a bajas dosis por parte de la cNOS parece tomar parte en una actuación predominantemente protectora y moduladora de la respuesta inflamatoria; esa producción basal es la que justifica su efecto protector, descrito en trabajos sobre I/R renal en ratas.^{36, 135} Por otra parte, el desequilibrio entre la expresión

y la actividad de eNOS e iNOS es muy importante en la patofisiología del ARF lo cual conlleva a una disminución en la actividad de la eNOS y a un incremento importante en la expresión de iNOS.^{76, 77.}

Está claro que el NO puede comportarse como protector y como tóxico dependiendo de las circunstancias que se analicen.^{165.}

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.^{69, 120.}

En el ARF tanto las células renales endoteliales como las células epiteliales tubulares proximales producen citocinas y quimiocinas y como resultado la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos, linfocitos, macrófagos, células NK, células Treg) hacia el intersticio del riñón. Las células inflamatorias en el riñón producen citocinas pro y antiinflamatorias que podrían incrementar o disminuir la inflamación en el riñón.

Los mecanismos por los cuales la adherencia y la infiltración leucocitaria causan daño endotelial y epitelial tubular por isquemia no está claro todavía, pero parece involucrar a la liberación de los RLO,^{47.} la liberación de potentes vasoconstrictores incluyendo las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos, así como el daño endotelial directo vía la liberación de la endotelina y un decremento en el NO.^{165.}

5.3.- Factores transcripcionales

5.3.1.- El factor de transcripción inducible por hipoxia

Por otra parte, 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, HIF-1, juega un papel importante.^{162.}

Curiosamente, el sistema de HIF-1 no sólo puede activarse en condiciones de hipoxia, sino también en condiciones inflamatorias.

El HIF es el regulador principal de la respuesta celular a la hipoxia, es una proteína ubicua y heterodimérica compuesto por dos subunidades: HIF-1a y HIF-1b. En una situación de normoxia, la HIF-1a se degrada por hidroxilación y es destruida, mientras que cuando se encuentra en una situación de falta de oxígeno como es el caso de la hipoxia, la HIF-1a no se degrada, sino que uniéndose a la HIF-1b da lugar a la HIF y es cuando realmente da lugar a la activación y estimulación de diferentes genes y en este momento son más de 24 los genes regulados por el HIF-1; sin embargo parece que pueden ser muchos más.^{253, 254.}

El desarrollo de determinados genes en tejidos de ratones knockout ha permitido la investigación del papel de HIF-1 en inflamación por hipoxia in vivo.

Dependiendo del tipo celular en el que se produzca la inflamación, el HIF puede actuar como proinflamatorio o como antiinflamatorio.^{117.}

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 .

A pesar de que HIF-1 es fundamental para la respuesta a la hipoxia por parte de la célula, no es el único, el principal, es el factor nuclear κ B.

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 es comprobado 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.^{92.}

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.^{146.} 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; las cuales 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.⁹²

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-3.²⁶⁰

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

5.3.2.1.- Proteínas I κ Bs

En células que no han sido activadas, el NF- κ B se encuentra en el citoplasma en forma inactiva debido a la asociación con las proteínas inhibitorias (I κ Bs), en el citosol.⁹²

Las proteínas I κ Bs son caracterizadas por secuencias repetidas de ankiryra que son esenciales para su interacción con los dímeros de NF- κ B, y comprenden tres grupos funcionales:

- Las proteínas I κ B típicas I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ ,²⁶⁰ las cuales 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 las cuales pueden ser procesadas para formar los miembros de la familia NF- κ B, p52 y p50, respectivamente, o pueden ser degradadas.

- Y las proteínas atípicas I κ B ζ , BCL-3 y I κ BNS, las cuales generalmente no se expresan en células no activadas, pero una vez activadas llevan a cabo sus efectos en el núcleo.

Aunque los I κ Bs son similares en su estructura, cada uno de ellos tiene preferencia en sus propias uniones: la clásica (el heterodímero RelA:p50) predominantemente regulados por I κ B α y es el miembro de la familia I κ B mejor estudiado, por otra parte, I κ B ϵ , regula preferencialmente RelA:RelA, así como los dímeros c-Rel:RelA y el papel de I κ B β que es el menos conocido, aunque se ha demostrado que se une al heterodímero RelA:p50 asociado con sitios κ B sobre el DNA sugiriendo que podría regular su función nuclear. Las tres I κ Bs tienen distintas cinéticas en cuanto a la degradación por el proteosoma una vez estimuladas. I κ B α , es degradada más rápidamente que I κ B β e I κ B ϵ , en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS y TNF- α y es resintetizada de manera NF- κ B dependiente para constituir un circuito de retroalimentación negativa en el cual se sintetiza nuevamente I κ B 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 I κ B α deteriora la terminación de la actividad de NF- κ B seguida de la estimulación con LPS y TNF- α .⁷²

En cuanto a I κ B β e I κ B ϵ tanto la resíntesis como la degradación se produce con una cinética menor.

Las proteínas atípicas I κ B ζ , BCL-3 y I κ BNS su regulación y sus funciones son muy diferentes.²⁶⁰

5.3.2.2.- Proteínas IKKs

La familia de las cinasas de los inhibidores de NF- κ B (IKKs) está constituida por IKK α , IKK β e IKK γ 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 active.^{262.}

Los homodímeros o heterodímeros de IKK α o IKK β fosforilan a las proteínas I κ B, induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma permitiendo así la liberación de NF- κ B que se transloca a núcleo.^{271.}

Aunque otras cinasas están involucradas en la fosforilación de las I κ Bs, las IKKs se caracterizan por la rapidez de su activación, la acción simultánea sobre ambos residuos de las Serinas (Ser) en las I κ Bs 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 con agentes de quimioterapia, luz ultravioleta y radiación ionizante entre otros.^{218.}

Dado que existen tantos activadores de NF- κ B, es de esperarse 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.

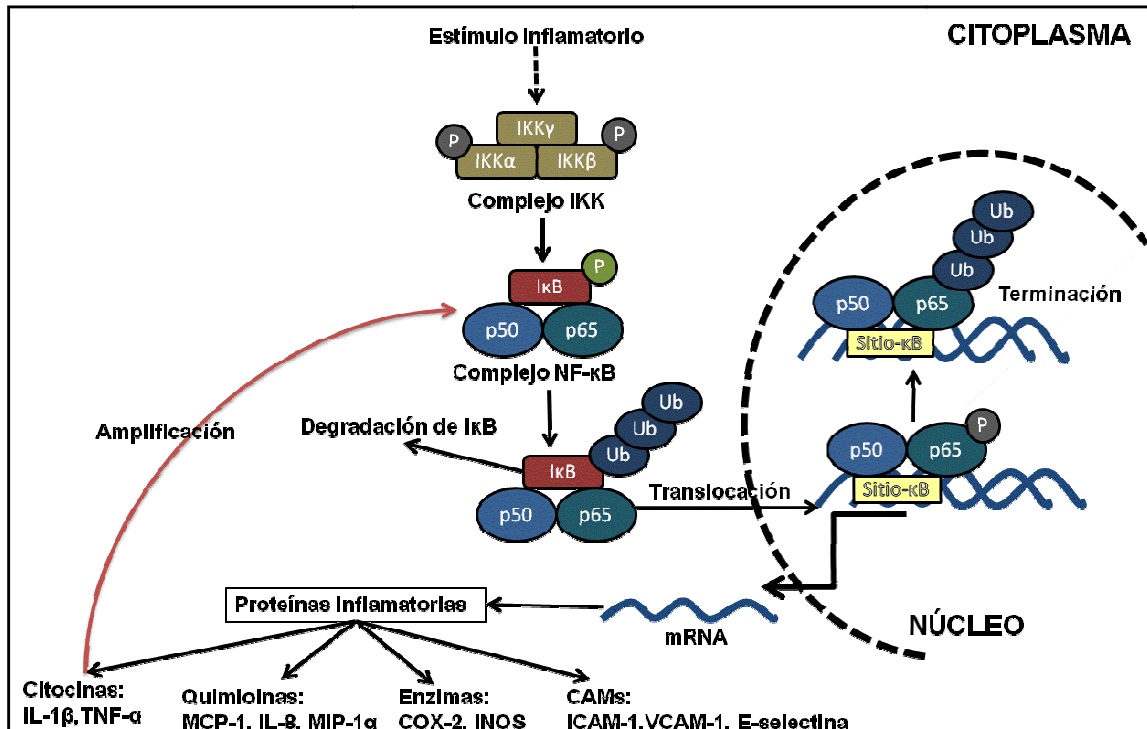


Figura 31

En condiciones normales, NF κ B (p65-p50) se encuentra atrapado en el citoplasma, formando un complejo inactivo con la subunidad inhibitoria I κ B. Después de su activación, I κ B 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 I κ B cinasa (IKK), complejo formado como ya hemos dicho de dos subunidades catalíticas (IKK- β , IKK- α) y una subunidad reguladora NEMO.²⁶²

Una vez que el complejo IKK es activado, se fosforila la I κ B α en la Ser32 y en la Ser36, llevando a su poliubiquitinización y su posterior degradación por el proteosoma 26S permitiendo así, la liberación de NF- κ B (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 κ B, 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 citoplasma.⁹²

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.²⁰³

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 hipoxia²¹⁸. NF- κ B también es activado por la luz ultravioleta, por el estrés oxidativo dañado endotelial y por otros mecanismos.

La ciclooxigenasa 2, IL-6, y proteína inflamatoria del macrófago 2 (MIP-2), son algunos de los genes diana identificados por NF- κ B inducido por la hipoxia, y estos factores subrayan la importancia de la señalización inflamatoria.

- **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), linfotoxina 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 núcleo.^{92.}

5.3.2.4.- NF- κ B e hipoxia

Mientras que varios grupos han identificado previamente, como la hipoxia juega un papel en la señalización de NF- κ B, el mecanismo por el cual una disminución del oxígeno disponible, pueda inducir la activación de un factor de transcripción, que es predominantemente activado por las vías de señalización tradicionales de receptor-ligando, no está clara. Si bien, la señalización clásica NF- κ B es sensible a una amplia gama de ligandos y emplea a un gran número de moléculas de señalización, estas vías de transducción de señales convergen en el complejo IKK. Como ya hemos visto anteriormente la activación de NF- κ B es controlada por las cinasas IKK, principalmente IKK β , mediante la fosforilación de los inhibidores I κ B en respuesta a la infección y la inflamación.

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 . [Rius J. y cols., 2008] Recientemente, han demostrado un mecanismo por el cual la hipoxia activa NF- κ B a través de la activación de IKK β , lo 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).^{218.}

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.^{254.}

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.^{31, 248}

Se ha demostrado en un estudio in vivo²⁴⁸ que la activación de NF- κ B se produjo durante la isquemia y alcanzó su punto máximo después de 15 minutos de la reperfusión, lo que lleva a la liberación de los mediadores de la inflamación.

Se ha demostrado que la activación de NF- κ B puede fomentar el desarrollo del infarto de miocardio después del daño por I/R.^{156, 189.} 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.^{148.} 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.^{148.}

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.^{37.}

Trabajos posteriores han demostrado que la ablación de la actividad de IKK, a través de la anulación de los genes que codifican para IKK γ o de los genes que codifican IKK α e IKK β , es crucial para el mantenimiento del epitelio del colon.

Otros estudios demuestran que la activación de NF- κ B a través de los receptores Toll-like en respuesta a microorganismos intestinales o ácido hialurónico es necesario para el mantenimiento del epitelio intestinal y pulmonar.

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.

5.3.2.6.- Inhibición de NF- κ B

Además de su amplio papel en la regulación en la respuesta inmune y el metabolismo celular, un amplio número de estudios demuestra, que la señalización anormal de NF- κ B es crítica para el desarrollo de varias enfermedades, especialmente enfermedades inflamatorias y tumores. Por ello, se ha hecho un gran esfuerzo para identificar una gran variedad de moléculas tanto naturales como sintéticas para inhibir su activación o función.

En los últimos años ha crecido el campo de la exploración de fármacos antiinflamatorios cuyo blanco de acción es algún componente de la vía I κ B/NF κ B.^{146.}

Debido a su implicación en numerosos procesos, se discute en un reciente estudio sobre el desarrollo investigaciones sobre la inhibición selectiva de los distintos componentes en la vía de activación I κ B/NF κ B. Por ejemplo, la preservación de la actividad de IKK α podría ser importante en la finalización de la respuesta proinflamatoria. Los atípicos miembros de la familia I κ B podrían facilitar la inducción de respuestas antimicrobianas mientras también son capaces de acabar con la susceptibilidad al shock.

En cuanto a BCL-3 (miembro de la familia I κ B), podría ser utilizado para intervenciones terapéuticas. La relación con otras importantes vías de señalización celular, como p38 o p53, pueden alterar la transcripción de ciertos genes dependientes de NF- κ B. Finalmente, los mecanismos que son responsables para la terminación de la actividad de NF- κ B son también muy importantes para la comprensión del papel de NF- κ B en la fisiología normal o en enfermedades. Por lo que, la investigación sobre NF- κ B, seguirá buscando nuevas señales sobre los mecanismos de regulación en la inflamación.^{74.}

El daño por I/R causa muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis. Recientemente se ha demostrado que pequeños daños llevan a la apoptosis mientras que daños más grandes llevan a la necrosis.

5.4.- Receptores tipo toll (TLRs)

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

El receptor TLR2 podría ser un componente de la respuesta proinflamatoria, ya que aumenta su expresión tubular en la ARF isquémica, y si silenciamos el gen TLR2 previene de la disfunción renal inducida por isquemia; de la infiltración neutrofílica; de la apoptosis tubular y de la inducción de MCP-1, TNF-, IL-6 e IL-1

Las células epiteliales de los túbulos renales expresan TLR-2 y TLR-4, y dicha expresión está incrementada durante el ARF provocado por isquemia, endotoxemia y nefrotoxicidad.⁹ Los ratones deficientes en TLR-2 y los tratados con un oligonucleótido antisentido para TLR-2 están protegidos del daño renal isquémico.

Se ha observado un incremento significativo de la expresión de TLR-4 en las células epiteliales tubulares e infiltración de leucocitos riñones isquémicos.²¹⁵

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-4.⁵⁵

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-4²¹⁵ disminuye el daño en modelos de I/R experimental.

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.

5.5.- Células inflamatorias

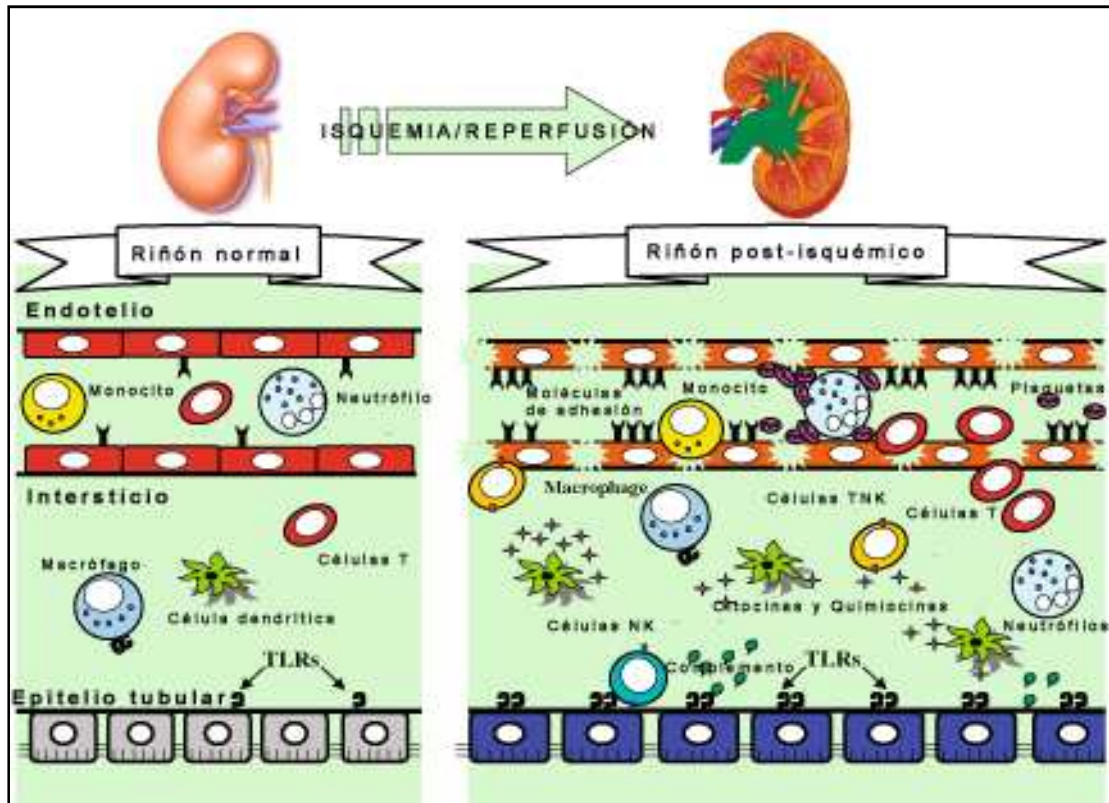


Figura 32

Células inflamatorias Hye Ryouon Jang & Gang Jee Ko & Barbara A. Wasowska & Hamid Rabb 2009

5.5.1.- 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.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para conocer el papel exacto de los neutrófilos en ARF y permanece en controversia.²⁵ El ARF inducido por la isquemia, nefrotoxicidad y endotoxemia está asociado con un incremento de la filtración de neutrófilos en el riñón.⁵⁸ Está demostrado que los neutrófilos están involucrados en el daño tubular y juegan un importante papel en la ARF.

Numerosos estudios demuestran la acumulación de neutrófilos en el ARF isquémico demostrando un efecto beneficioso de las terapias anti-ICAM-1

y en ratones en los que se les han disminuido los neutrófilos periféricos en ARF.

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 reduce la entrada de neutrófilos al tejido postisquémico, asociado a una preservación de la función del riñón.²²¹ Sin embargo, en otro estudio, las ratas a las que se les ha disminuido los neutrófilos periféricos no estaban protegidas del ARF isquémico.

También en ratones a los que se les ha administrado un anticuerpo monoclonal (RB6-8C5) que tiene como resultado una disminución en los neutrófilos en sangre periférica tiene una pequeña disminución en la creatinina en plasma durante el ARF isquémico pero no se observa una reducción en la NTA a pesar de la carencia en la infiltración neutrofílica en el riñón. Además, la actividad de la caspasa-1 y de IL-18 estaban significativamente incrementadas.

Un estudio reciente investiga el papel de la catepsina G liberada por los neutrófilos activados utilizando ratones knockout en daño por I/R renal, y demuestra que la ausencia de catepsina G, tiene disminuido en un 70% la apoptosis tubular.²⁴⁰ Por lo tanto, hay estudios que demuestran tanto papeles perjudiciales como beneficiosos de los neutrófilos en el ARF.

5.5.2.- Linfocitos

Se ha demostrado que los linfocitos son importantes moduladores en la respuesta inflamatoria tanto innata como adaptativa en modelos de ARF.

En un estudio, los ratones deficientes en células T CD4 y en células T CD8 estaban protegidos del ARF isquémico.

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 son también protectores contra el ARF isquémico.

Se ha investigado en ratones deficientes, en CD3, CD4 y CD8, los efectos de las células T sobre la permeabilidad vascular renal en ARF 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).¹⁵⁸

En contraste con otros estudios, la ausencia de linfocitos T helper mediante un anticuerpo (GK1.5) no era suficiente para prevenir del ARF isquémico.⁵⁸

También se ha estudiado el papel de los linfocitos T en el ARF inducido por cisplatino en ratones desnudos (nu/nu) en células T helper y en células CD4 y CD8. Los ratones deficientes en células T helper y CD4 estaban protegidos del ARF causado por el cisplatino y si le transferimos células T helper a los ratones nu/nu aumenta la disfunción renal y el daño tubular.¹⁵⁸

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 sobrerregulación de FoxP3, un único marcador para las células Tregs que es esencial para su función y desarrollo.

Las Tregs median el ARF isquémico a través de la IL-10 mediante la supresión del sistema inmune innato. La ausencia parcial de las Tregs con un anti-CD25 empeora el ARF isquémico resultando en una mayor infiltración neutrofílica y macrofágica en el riñón y un incremento en la transcripción de citocinas innatas en el riñón.¹²⁹

5.5.3.- Células natural killer

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.

Las NK están incrementadas en el riñón, en nefropatía inducida por adriamicina, si quitamos las NK con un anticuerpo anti-asialo GM-1 el riñón está protegido de la nefropatía.

Un estudio ha investigado sobre el papel de las NK en células epiteliales tubulares renales en cultivo y 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 del ARF.

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 ARF en ratón.

Se ha demostrado que la anestesia con isoflurano protege contra el ARF isquémico ya que reduce la inflamación y la modulación neutrofílica y macrófaga renal, y la afluencia de las células NKT en el ratón.¹⁵¹

5.5.4.- Macrófagos

Los macrófagos son conocidos como fuente de caspasas proinflamatorias y citocinas como IL-8. e IL-1 β .

La infiltración macrófaga 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 piensa 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 del ARF isquémico en la rata y en el ratón^{44, 111}.

La ausencia de los macrófagos en el riñón durante el ARF utilizando clodronato encapsulado en liposomas^{200, 111.} o técnicas genéticas^{66.} tienen como resultado la protección del ARF isquémico.

Un anticuerpo anti-B7-1 bloquea la adherencia celular mononuclear en vasos rectos en ratas y atenúa el ARF isquémico tanto funcional como histológicamente.

Parece ser que en ratones knockout en osteopontina se disminuye la infiltración macrofágica postisquémica y la fibrosis intersticial.

Los mecanismos de protección contra el ARF isquémico por la ausencia de macrófagos todavía no se conocen. Se ha estudiado la IL-18 liberada por los macrófagos en el desarrollo del ARF en ratones, y se ha demostrado que no está involucrada en el desarrollo de la ARF.^{94.}

El ARF inducido por cisplatino está asociado con un incremento en la mieloperoxidasa renal, la cual es producida por macrófagos y neutrófilos.^{58, 158.} Estudios in vitro demuestran que la administración del cisplatino incrementa la citotoxicidad mediada por los macrófagos contra las células neoplásicas.

Además en cuanto a la infiltración macrofágica renal, era recientemente demostrado, que se lleva a cabo después de haberse producido la ARF inducido por el cisplatino, ya que la ausencia de macrófagos utilizando, clodronato encapsulado en liposomas, no protegía de la ARF inducido por cisplatino, en un modelo de ratón.

5.5.5.- Células dendríticas

La principal función de las DC es la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Los precursores de las DC 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 DCs, lo cual tiene como resultado la pérdida de actividad fagocítica, expresión de moléculas coestimuladoras e interacción con células T.

Las DCs están presentes de forma abundante en el intersticio de riñones de ratón normal, esas DCs expresan el marcador CD11c, y también expresan

el MHC. Las DCs forman una cadena contigua a través de todo el riñón, y juegan un importante papel en la ARF isquémica. Después de la I/R renal, las DCs residentes liberan TNF- α , IL-6, MCP-1 y RANTES y la ausencia de DCs antes del daño isquémico reduce significativamente los niveles de TNF- α en el riñón.⁵¹

Hay interacciones entre las DCs y las NK que son importantes en la respuesta inflamatoria. La activación de las NK induce la maduración de las DCs. Las DCs inmaduras son vulnerables a las citolisis autólogas mediadas por las NK, mientras que las DCs maduras son protectoras. La activación de las DCs 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 DCs activados aumenta la producción de NK, de INF- γ , proliferación y citotoxicidad.²⁷⁰

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 intersticial.¹⁵⁵ Además se van a producir cambios en

la permeabilidad vascular que se manifiestan clínicamente como edema.^{63, 257.}
(Fig. 33)

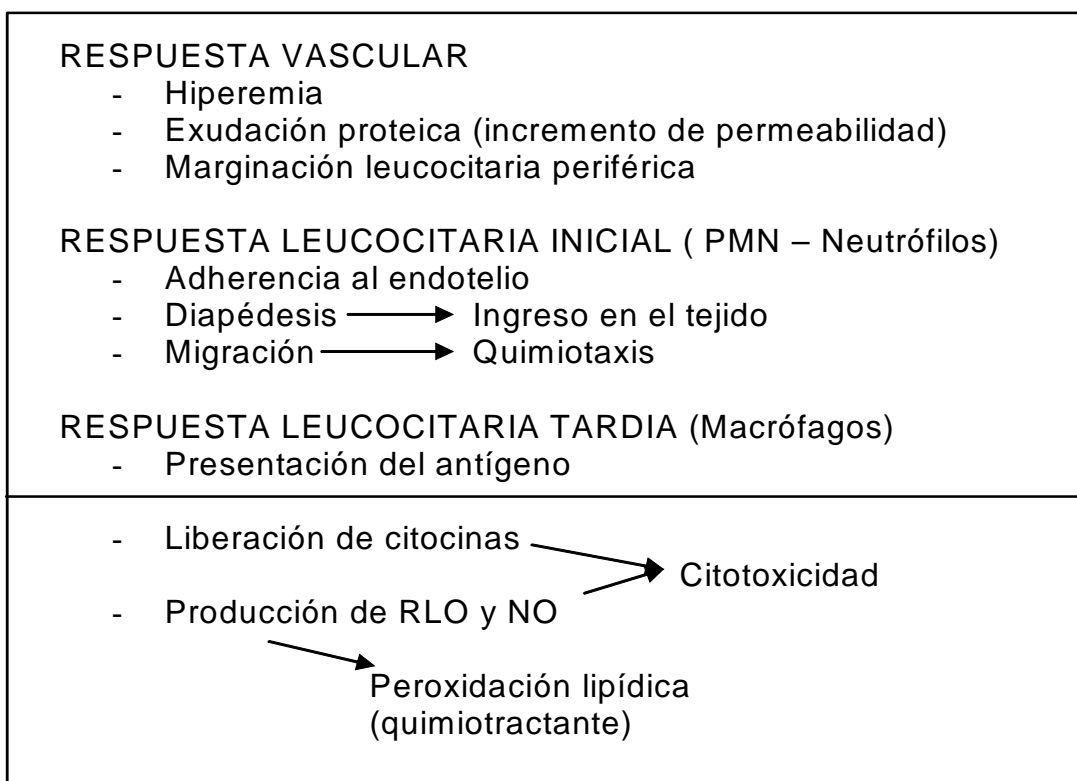
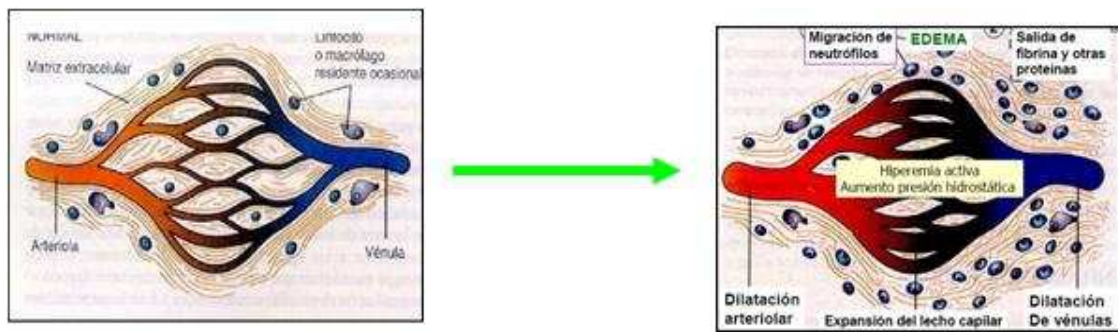


Figura 33

Respuestas ante la inflamación

Las células que van a participar en el proceso inflamatorio son principalmente leucocitos (neutrófilos y monocitos) y el endotelio.^{253.} 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 RLO. (FIG.34)^{221.}

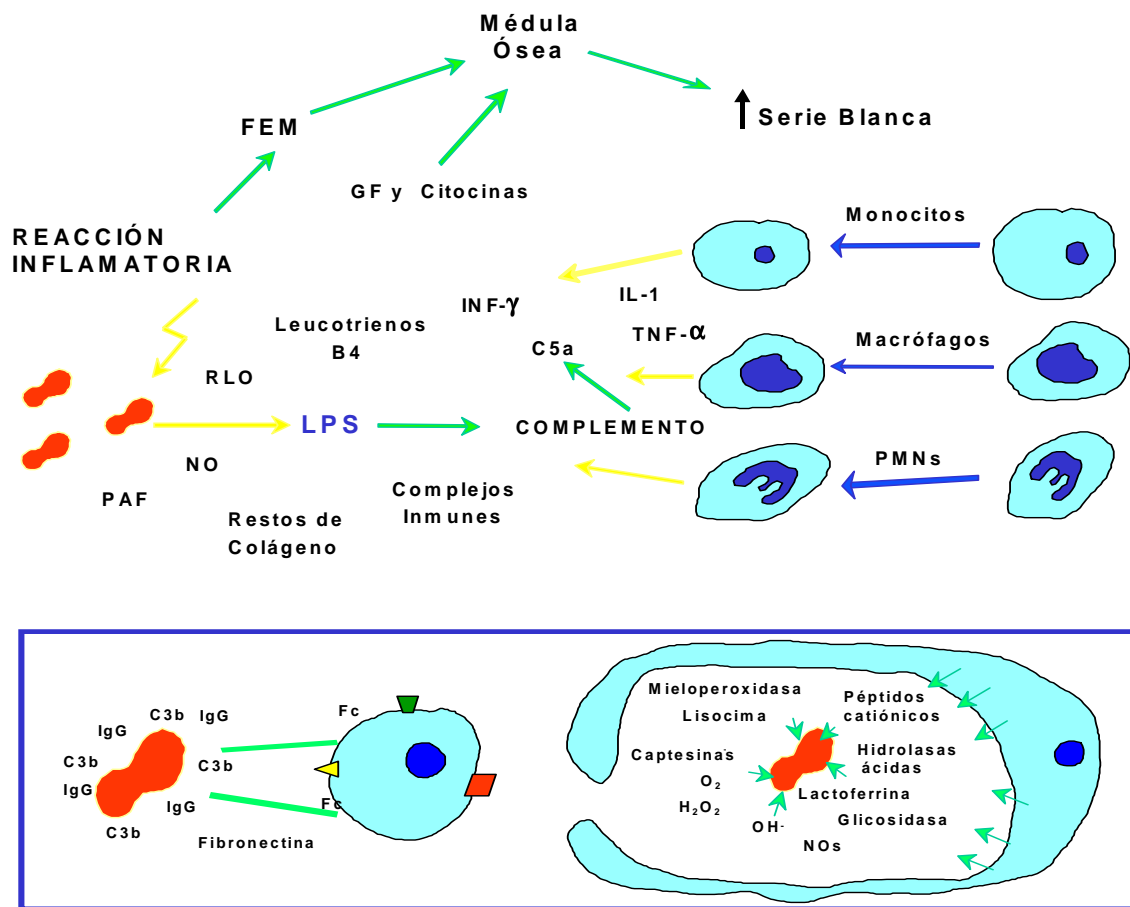


Figura 34
Esquema de la respuesta inflamatoria.

5.6.1.- 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.¹¹

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: (FIG.35)

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.⁵

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 químicos.⁵⁷.

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.

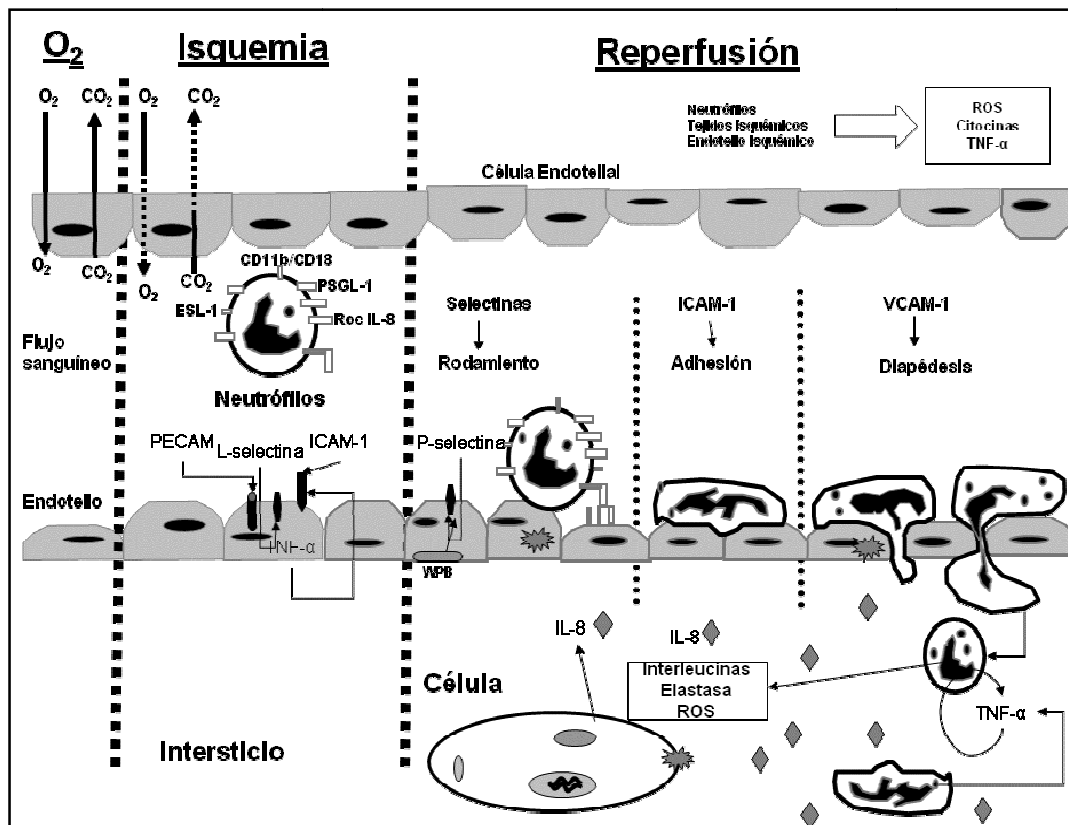


Figura 35

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.^{219.}

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. (Fig. 36)

5.6.2.- 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.^{145.}

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 postisquémica.^{144.}

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.

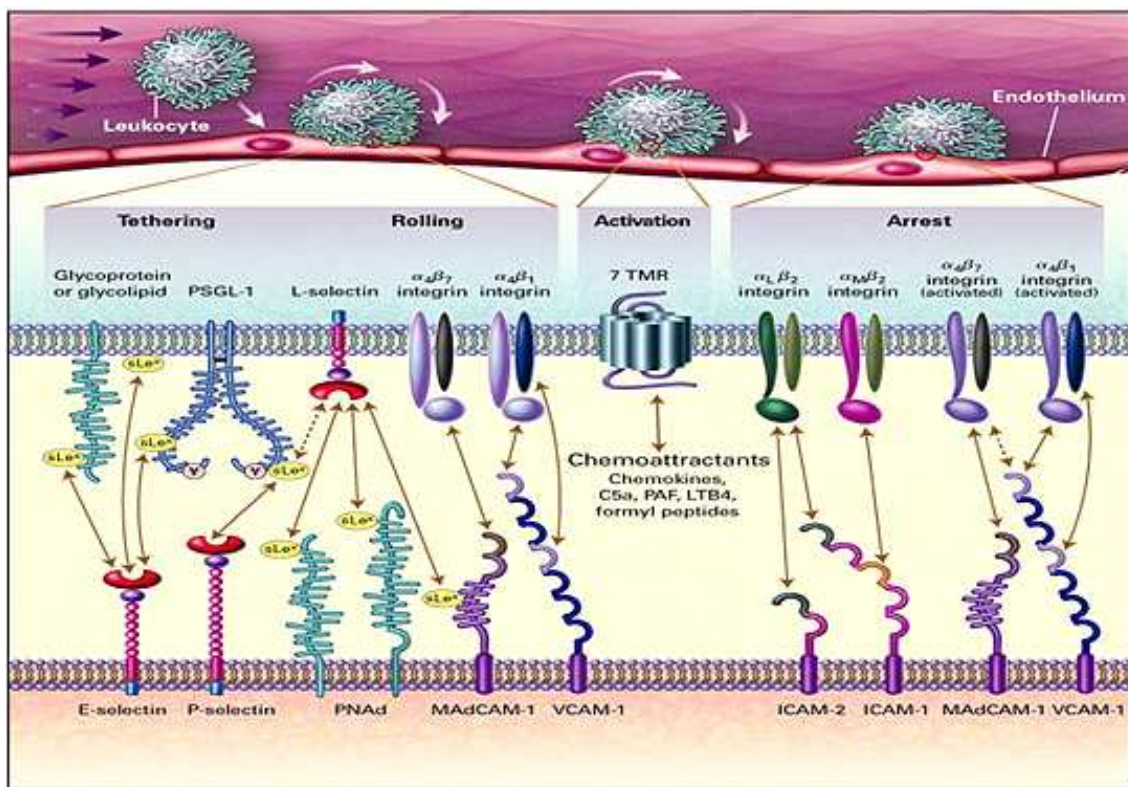


Figura 36

CAMs implicadas en la Interacción leucocito-endotelio.^{267.}

5.6.2.1.- Familia de las selectinas

Son las moléculas de adhesión celular que vehiculizan el contacto inicial en las interacciones leucocito-endotelio.^{155.}

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 selectinas (Tabla V):

- Molécula de adhesión leucocitaria (L-selectina).^{182.}
- 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 activadas.^{16.}

CAMs	SINÓNIMOS	CÉLULA DONDE SE EXPRESA	LIGANDO	CÉLULA DONDE SE EXPRESA EL 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

Tabla V

Familia de las selectinas

* 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 extendida con alta afinidad).^{198.}

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.^{15,}

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 del linaje mieloide (Mac-1), CD11b/CD18].
- α X β 2-integrina (p150.95, CD11c/CD18) [Bilslund C.A. y cols., 1994]
- 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 mieloide 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.¹⁴¹

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.

CAMs	SINÓNIMOS	CÉLULA EN LA QUE SE EXPRESA	LIGANDO	CÉLULA EN LA QUE SE EXPRESA EL 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,CR 3	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

$\alpha 4\beta 7^{**}$		Linfocitos	MAdCAM-1	Endotelial	Adhesión
$\alpha D\beta 2$	CD11d/CD18	Monocito	ICAM-3, Fibrinógeno, Vitronectina	Endotelial	Adhesión

Tabla VI

Familia de las integrinas

* 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 siguientes²⁰¹. (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).¹⁹⁰.
- MAdCAM-1
- CD99²²⁸.

- 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.¹⁹⁰

Las JAMs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas contituidas por dos dominios Ig extracelulares.²⁰¹

La CD99 es una molécula expresada tanto en neutrófilos como otros leucocitos y en las uniones interendoteliales y participan en la transmigración leucocitaria.²⁴

CAMs	SINÓNIMOS	CÉLULA EN LA QUE SE EXPRESA	LIGANDO	CÉLULA EN LA QUE SE EXPRESA EL 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	α4β7, 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

Tabla VII

Superfamilia de las inmunoglobulinas

* 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 eficientes.

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 vascular.^{57.}

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.^{16.}

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 adhesión.^{268.}

Aparte de las selectinas y sus ligandos, las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$, 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 funcionamiento.^{126.}

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 Rac2.^{16.}

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 dendríticas.^{287.}

5.6.3.2.- Activación y quimiotaxis

5.6.3.2.1.- 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 son inducidas y secretadas por mediadores inflamatorios de manera espectacular.

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. 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,²³⁷ 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.

5.6.3.2.2.- 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 (α L β 2) y Mac-1 (α M β 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 bidireccional.²³⁷

Sin embargo, las integrinas- α 4, 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

5.6.3.3.1.- 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 transmigración 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.^{228.}

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 transmigración.^{208.}

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.

5.6.3.3.2.- Papel funcional de las moléculas de adhesión 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.^{20.} 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).^{17.}

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.¹⁶

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.¹⁸

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 interaccionan 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 y eficiente consecución del proceso de extravasación leucocitaria.¹⁸

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.²⁷⁸

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 trans migración 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 trans migraciones 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 trans migración 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 trans migración 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 interendoteliales.^{32, 265.} Este proceso tiene lugar preferentemente en la microvasculatura.^{32.} (Fig. 37)

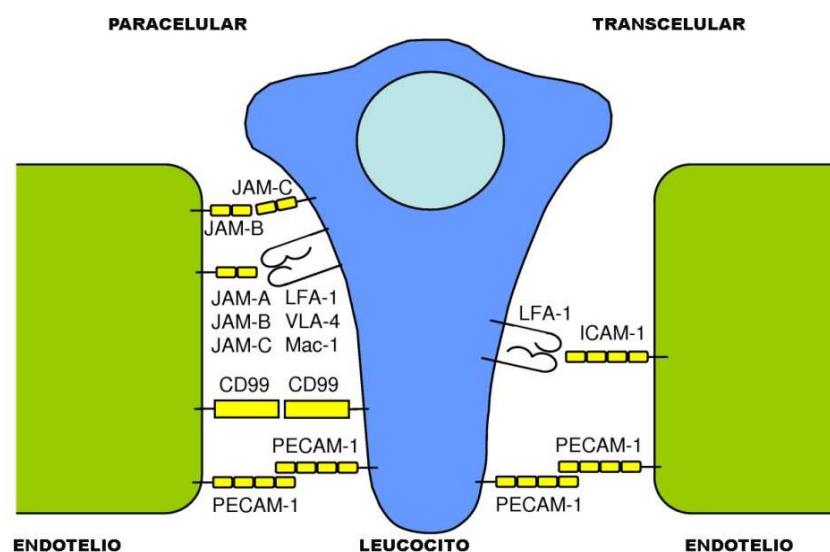


Figura 37
Trans migración leucocitaria

- 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.

Una vez que los leucocitos encuentran un sitio apropiado para transmigrar (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-1²³⁸. 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.^{190, 265}.

Dos tipos de uniones interendoteliales son relevantes para el proceso de trans migración.

Las uniones estrechas (zonula occludens) 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-1.²⁰¹.

Jerárquicamente, el determinante más importante de la barrera endotelial son las zonulas adherens que se forman por la interacción homofílica de VE-cadherina.²⁶⁴ 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 neutrófila in vivo.

Estudios in vitro indican que huecos de VE-caderina pueden formarse transitoriamente durante la diapedesis de leucocitos.^{238.}

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.^{190, 201, 265.}

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^{145.} La función de JAM-A en la diapedesis 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.^{201, 274.}

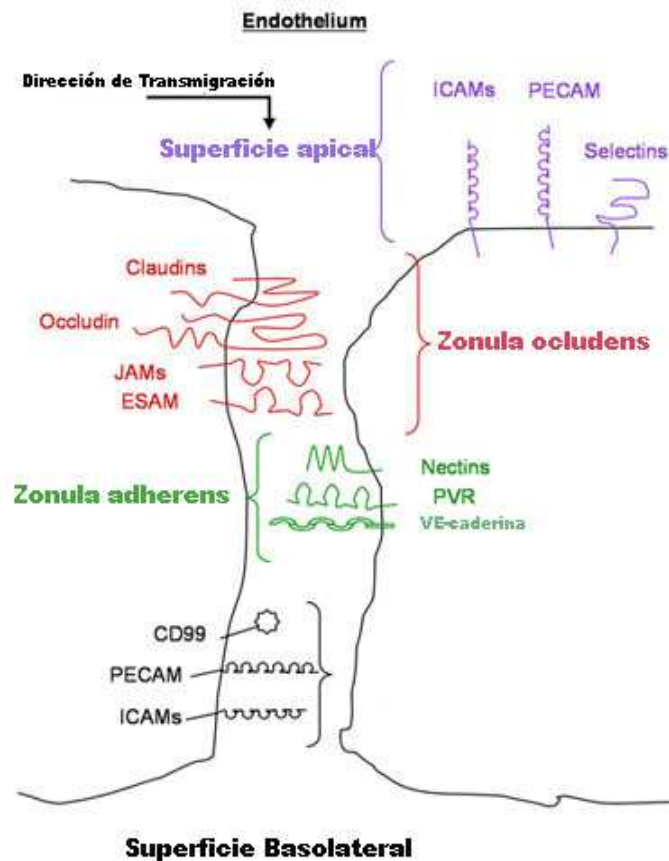


Figura 38

Otra molécula de adhesión importante en la regulación de la trans migración de leucocitos es PECAM-1.¹⁹⁰ 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*.¹⁹⁰ 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-fosfatidilinositol (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.²²⁴

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 transmigratorios durante la diapédesis.^{238.}

- 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^{++} 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 transendotelial.^{208.}

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 rotura de la membrana basolateral sin poner en peligro la función de barrera endotelial.

Se han probado numerosas terapias antiinflamatorias contra distintas moléculas diana en el endotelio. Se ha demostrado la eficacia del bloqueo de la P-selectina contra el daño producido durante procesos de I/R (trasplante, trombosis, ictus, etc.), así como los efectos beneficiosos de anticuerpos anti-ICAM-1 en modelos animales.

También existen numerosos estudios de enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas en los que se aplicaron terapias basadas en anticuerpos anti-TNF, anti-VCAM-1 o anti-ICAM-1.^{96, 206.}

La reducción o la prevención de la I/R es una estrategia importante para una mejora a corto plazo, así como del rendimiento del injerto a largo plazo después del trasplante.

Las estrategias pre-trasplante de reducción de la lesión de I/R se encuentran en la reducción del tiempo de isquemia fría a través de una optimización logística de transporte del injerto, los procedimientos basados en máquinas de perfusión, o la optimización de soluciones de preservación.

Otra estrategia es el acondicionamiento previo del donante con sustancias que tienen la capacidad de reducir el daño por I/R. Las estrategias post-trasplante para reducir la lesión por I/R incluyen la administración de sustancias que interfieren con el proceso inflamatorio que afecta principalmente a la acción de las quimiocinas, citocinas, o la infiltración de leucocitos. Por otro lado, se han investigado estrategias contra la apoptosis han sido investigadas con el fin de reducir la muerte celular y, por tanto, proteger el injerto de la pérdida celular. Uno de los problemas prácticos en la prevención y en el tratamiento del daño por I/R es que muchas opciones de tratamiento tuvieron éxito en modelos experimentales, mientras que sólo unos pocos se han introducido en los ensayos clínicos. Hay mucho trabajo por hacer en el futuro para convertir los conocimientos derivados de los enfoques experimentales al éxito de la práctica clínica.

Con el objetivo de mejorar el desarrollo y progresión del daño provocado por la I/R y por la respuesta inflamatoria, diferentes trabajos han demostrado el efecto protector de algunas sustancias sobre la lesión por I/R, administradas en distintos momentos.^{36.} Esta tesis pretende estudiar el efecto aditivo de una sustancia citoprotectora, que ya ha demostrado su eficacia sobre la lesión por I/R, en otros tejidos, dicha sustancia es la Cardiotrofina-1 (CT-1)

6.NNT-1/BSF-3

La proteína denominada CLC/CLF (citocina similar a la cardiotrofina) es una citocina recientemente clonada y descriptivamente nombrada novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3; GenBank no. AF176912). La misma citocina fue descrita de forma independiente y también nombrada por su homología con la cardiotrofina-1, Citocina Similar a la Cardiotrofina (GenBank no. AF172854) .Pero se ha demostrado que NNT-1/BSF- 3 es un segundo ligando funcional para el complejo receptor de CNTF (CNTFR).¹²

La proteína denominada CLC/CLF, es un mediador de comunicación celular y ha sido caracterizada como un miembro perteneciente a la familia de citocinas de interleucina-6 (IL-6), junto con: el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M (OSM), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1), interleucina 11 (IL-11), e interleucina 31 (IL-31).

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, a través de la fosforilación de proteínas asociadas a su dominio intracelular. Gp-130 está presente en casi todas las células del organismo. La unión de la CLC a su complejo receptor induce la activación de varias rutas de señalización, a través de las vías de señalización activará genes involucrados en proliferación y supervivencia celular, síntesis de proteínas y protección de la apoptosis.

Producida por los linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, gliales, fibroblastos etc, media potentes acciones sistémicas en órganos distantes de su origen local inflamatorio. Poseen efectos pleiotrópicos y redundantes en el organismo y están involucradas en una gran variedad de respuestas biológicas, incluyendo respuesta inmune, inflamación, desarrollo neuronal y hematopoyesis. 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.

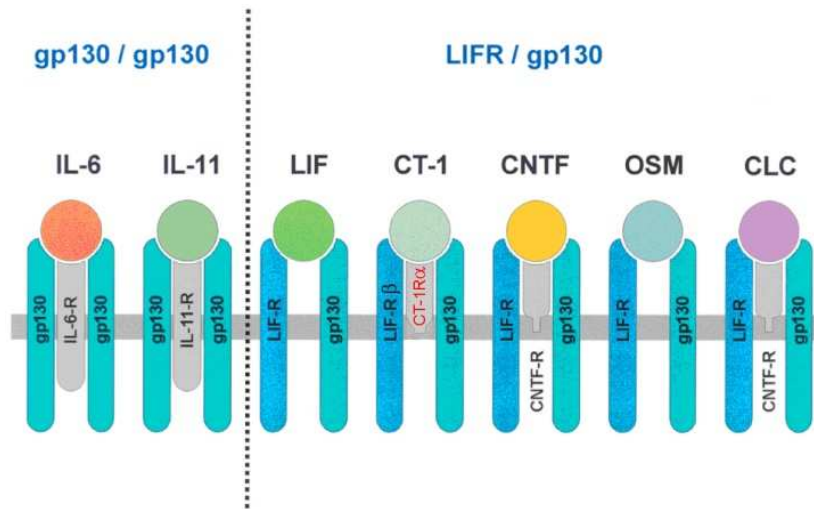


Figura 39

Los receptores de la CLC/CLF forman un complejo trimérico para activar la cascada de señalización.

La unión de CLC a sus receptores (proteínas transmembrana altamente glicosiladas) induce la heterodimerización de la cadena gp130R, la subunidad β del receptor LIF (LIFR β) y un tercer componente conocido como la subunidad α del receptor CNTFR α (Receptor α del factor neurotrófico ciliar).

La activación del receptor de CLC/CLF induce una serie de señales intracelulares que incluyen la activación temprana de tirosina cinasas de la familia de las janus cinasas (JAK) y a la fosforilación de las tirosinas de gp130. Los principales efectores de las JAK son el grupo de factores de transcripción citosólicos STAT3 (proteínas activadoras de la transcripción y transductoras de la señal) y de ERK1/2 (señal extracelular regulada por cinasas $\frac{1}{2}$), respectivamente.

Por este motivo, las dos vías diferentes de señalización y transducción intracelular de la CLC/CLF se les conoce, como la vía de JAK-STAT y la vía ERK1/2 y ambas son activadas.

JAK/STAT

En situaciones normales las proteínas STAT están latentes en el citoplasma y van a ser activadas por fosforilación en sus residuos de tirosina conservados (en la posición 705 en el caso de STAT3), por las proteínas JAK.

Una vez activados se translocan al núcleo celular, donde se unen a elementos de respuesta específicos, regulando la transcripción de un gran número de genes diana. Posteriormente los STAT son desfosforilados y vuelven al citoplasma. La familia de STAT está formada por siete miembros y dependiendo de la posición de la tirosina fosforilada se va a activar un STAT u otro. La vía JAK/STAT estimula proliferación celular, diferenciación, migración celular y apoptosis y está involucrada en la respuesta inflamatoria.

También se ha demostrado que la CLC actúa como modulador *in vivo* de distintas respuestas celulares, como la respuesta inflamatoria, mediante la expresión de la proteína SOCS3 (Supresor de la señalización de citocinas). Esta proteína actúa como regulador negativo intracelular de la ruta JAK/STAT.

Una importante característica de estas proteínas es que su expresión está regulada positivamente por las STATs, estableciéndose así un circuito de retroalimentación negativa.

Las SOCS regulan negativamente la vía JAK-STAT a través de tres mecanismos. En primer lugar, las SOCS se unen, por medio de su dominio SH2, al receptor de citocinas, impidiendo el acceso de las STATs. En segundo lugar, las SOCS son capaces de unirse a los residuos de fosfotirosinas de JAK, impidiendo la actividad quinasa de ésta. Por último, las SOCS facilitan la ubiquitinación de JAKs, con lo que inducen su degradación en los proteasomas.

ERK1/2

ERK1/2 es un miembro muy importante perteneciente a la familia MAPK (proteínas cinasas activada por mitógenos).

Cuando las cinasas de la familia SRC (SHP2, Shc...), se unen a los receptores (LIFR β o gp130) que ya han sido fosforilados en residuos de tirosina, estas son también fosforiladas y activadas. Una vez activada SHP2 se asocia al complejo de proteínas Shc-Grb2-Sos, y Ras es activado, entre las vías dependientes de Ras podemos citar la vía Ras/MAPKs

Su actividad está regulada a través de cascadas compuestas por MAPK, MAPK kinasa, (MEK), y las MAPKK kinasa (MEKK). En mamíferos existen tres grupos de MAPK: ERK1/2, p38 y JNK.

Cuando ERK1/2 es translocado al núcleo participa en multitud de procesos celulares como son diferenciación celular, motilidad, proliferación y apoptosis.

La señalización a través de ERK1/2 es crítico para la regulación de la evolución del ciclo celular. En cambio ERK 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 antiapoptótica.

Aunque los dos vías de señalización JAK/STAT y ERK1/2 no son excluyentes, se ha observado una regulación cruzada entre ellas, pudiendo compensar una de las vías un déficit en la otra.

Tanto el papel de STAT3 como el de SHP2 son considerados factores fundamentales en la señalización de la CLC.

CLC requiere la interacción con el receptor de citocina soluble CLF para la secreción eficiente.

Las mutaciones en los genes que codifican la CLC y CLF (CLCF1 y CRLF1, respectivamente) son letales en el desarrollo temprano. Esto indica que CLC / CLF, juega un papel importante durante el desarrollo embrionario.^{97, 41, 43, 82, 131.}

CLC / CLF también puede regular el desarrollo del riñón y CLC ha sido identificado como un factor de permeabilidad potencial en el suero de pacientes con glomeruloesclerosis focal y segmentaria.^{178, 229.}

Esta citocina posee funciones inmunorreguladoras, CLC y CLF se expresan en el sistema inmune y ambos ADNc fueron clonados a partir de células T^{233, 56, 235, 239.}

La administración de altas dosis de CLC o sobreexpresión de CLC en ratones resulta en la expansión de células B, a pesar de la falta de expresión del receptor de CNTF por estas células.²³⁵

Por lo tanto la citocina CLC/CLF puede reclutar, además de CNTFR, otra alternativa como receptor aún no identificado.

7.- INFLAMACIÓN Y ODONTOLOGÍA.

El estudio de la respuesta inflamatoria ha sido de gran importancia en la medicina. A lo largo de los años se ha ido conociendo más sobre su regulación. Celso que definió el proceso mecánico y vascular de la misma (calor, rubor, dolor, tumor) ha ido avanzando su conocimiento describiendo procesos bioquímicos, y que grupos celulares eran los responsables de los mismos hasta llegar a definir el proceso molecular o genético. El estudio y mayor conocimiento de la respuesta inflamatoria es de gran utilidad en cualquier campo de la medicina ya que la respuesta inflamatoria es la misma independientemente del agente causal que la active.

En Odontología el estudio y conocimiento de este proceso y su regulación es de gran importancia ya que existen numerosos procedimientos y enfermedades Orales de los diferentes campos de esta ciencia, en los que la inflamación está presente bien de una manera primaria siendo la causante de la aparición o mantenimiento de una enfermedad en la cavidad oral o bien de una manera secundaria condicionando el tratamiento dental o la calidad de vida del paciente post-tratamiento. Uno de las enfermedades con mayor incidencia en la población actual es la enfermedad periodontal, por lo que la ampliación del estudio del proceso inflamatorio en esta enfermedad es de gran importancia debido a su gran prevalencia.

7.1. Inflamación en la enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal es una enfermedad cavidad oral que cursa con una elevada prevalencia entre la población Española, (Entre el 85- 94% de la población española mayor de 35 años presenta algún problema relacionado con las encías)¹. Cuando hablamos de enfermedades periodontales debemos diferenciar dos grandes grupos. Las enfermedades que acontecen sobre la encía: enfermedades gingivales y la que sus problemas se localizan más allá en el periodonto: enfermedades periodontales.

Las enfermedades gingivales son una amplia familia de patologías diferentes y complejas que se encuentran confinadas en la encía y son el

resultado de diferentes etiologías², se pueden ver problemas de índole exclusivamente inflamatoria, como las gingivitis.

La encía clínicamente sana no tiene por qué ser histológicamente perfecta, es aquella que el paciente puede lograr mediante un buen control de placa, histológicamente la encía sana poseerá poco o nada infiltrado inflamatorio. Esta encía Sana está formada por un epitelio oral queratinizado que se continúa con el epitelio de unión, adherido a la superficie dentaria a través de hemidesmosomas y en el cual puede observarse neutrófilos y macrófagos. El soporte del epitelio oral y de unión, es el tejido conectivo, que contiene fibras colágenas, que mantienen la forma de los tejidos sanos, por debajo existe una red vascular que provee al epitelio de varios nutrientes, células de defensa y moléculas.

La encía sana se caracteriza por un infiltrado de células inflamatorias, con predominio de neutrófilos asociados con el epitelio de unión y con linfocitos del tejido conectivo subyacente. Se producirá gingivitis si existe suficiente acumulación de placa como para que los productos bacterianos inicien una respuesta inflamatoria importante.

Las características predominantes de la gingivitis son las reacciones inflamatorias e inmunes a la placa bacteriana. La reacción inflamatoria es visible tanto microscópica como clínicamente en el periodonto afectado y representa la respuesta del huésped a la placa bacteriana y sus productos. Los procesos inflamatorios e inmunes se producen en los tejidos gingivales para proteger al huésped del ataque microbiano local, evitando que los microorganismos se extiendan o invadan los tejidos. En algunos casos, estas reacciones de defensa del huésped pueden ser perjudiciales para éste, porque la inflamación puede dañar células vecinas y las estructuras conectivas. Además, las reacciones inflamatorias que se extienden a tejidos conectivos puede inducir la pérdida de hueso alveolar. Así, estos procesos defensivos, paradójicamente representan en una buena medida del daño tisular observado en la gingivitis y la periodontitis.

Tras la ausencia de limpieza los microorganismos comienzan a colonizar las superficies dentarias, se inicia la evidencia de signos clínicos de inflamación

(gingivitis) estas alteraciones inflamatorias se resuelven o revierten con la eliminación de los agentes patógenos, aunque los cambios inflamatorios pueden permanecer confinados al área gingival durante varios años, o puede evolucionar hacia una enfermedad periodontal produciendo la pérdida de inserción conectiva del hueso alveolar.

La periodontitis o enfermedad periodontal ha sido definida como la inflamación que compromete todo los tejidos de soporte del diente. Es la extensión de la inflamación desde la unidad dentogingival hacia la unidad dentoalveolar (ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular). Diferentes estudios han sugerido que una de las secuelas de una respuesta inflamatoria incontrolada es la destrucción del tejido periodontal, las enzimas producidas en el proceso inflamatorio tienen una participación activa del proceso degradando diferentes componentes estructurales de la matriz extracelular, provocando la destrucción de la inserción periodontal.

7.2.- Diagnóstico de la enfermedad periodontal.

Un correcto diagnóstico periodontal es necesario para la realización de una terapia periodontal exitosa en nuestro paciente. Entendiendo que la enfermedad periodontal es un proceso infeccioso-inflamatorio, diferentes variables se deben analizar clínicamente para determinar el diagnóstico. El diagnóstico entonces es un análisis concienzudo de la expresión clínica de la enfermedad, desde gingivitis hasta periodontitis.

Parámetros clínicos:

- Profundidad de sondaje.
- Nivel de inserción clínica.
- Sangrado al sondaje
- Distancia a la línea mucogingival.
- Movilidad dental.
- Actividad de la enfermedad (progresión)
- Pérdida Ósea radiográfica.

Durante muchos años el diagnóstico de la enfermedad periodontal se ha basado en el estudio de estos parámetros clínicos y radiográficos. Pero otros

métodos tienen por objetivo el estudio de la respuesta inflamatoria del huésped. Así, como métodos inmunológicos o bioquímicos que determinen los mediadores liberados en la infección periodontal. Uno de los métodos utilizados es el estudio de los componentes del líquido o fluido gingivo-crevicular sistema de defensa inespecífico a través del cual se pueden determinar citoquinas y/o interleuquinas , que son marcadores de riesgo.

Distintos procesos que estudian: los patógenos responsables, los mediadores de la inflamación, los parámetros de destrucción ósea y del conectivo, los factores genéticos y de riesgo ambiental y adquirido, se llega a la conclusión de que actualmente no existe ningún método capaz de identificar a la población de riesgo de padecer la enfermedad periodontal ni los períodos de actividad. Ello en gran medida se debe a que existen muchas incógnitas en la patogenia del proceso y que es preciso seguir la búsqueda de un parámetro eficaz que me ayude en la toma de decisiones a la hora de enfocar el tratamiento y la prevención del proceso.

El diagnóstico biológico de la enfermedad periodontal se basa en el estudio de:

- Los patógenos responsables
- Los mediadores de la respuesta inflamatoria
- Parámetros de destrucción ósea y del colágeno.
- Factores genéticos.
- Factores de riesgo ambiental y adquiridos.

Durante algunos años se utilizaron las técnicas de microscopio de contraste de fases y de campo oscuro, en ellas se veían organismos móviles y espiroquetas sin identificar ninguna especie concreta mas, por ello no se suele utilizar actualmente por la poca información que ofrece.

7.2.1.- Tratamiento

La enfermedad periodontal es considerada una enfermedad infecciosa-inflamatoria, que de acuerdo al grado de compromiso puede llevar a la pérdida total de los tejidos de soporte del diente. Considerando que la etiología de la enfermedad es principalmente infecciosa (placa bacteriana), el tratamiento se

enfoca fundamentalmente en el control de la infección y reducción de la inflamación. El tratamiento clásico de la enfermedad periodontal se puede clasificar en cuatro fases: eliminación o reducción de los factores sistémicos, eliminación de las causas locales, corrección de los defectos causados y de mantenimiento. Este puede verse cumplimentado por un tratamiento antibiótico

Conociendo los mecanismos inflamatorios de la destrucción tisular y los mediadores que la promueven, podemos plantearnos la búsqueda de fármacos que inhiban su síntesis mecanismo de acción y sus consecuencias.

Algunos mediadores bioquímicos y productos de la inflamación como las citoquinas son utilizados hoy en día para el diagnóstico y estudio de posibles tratamientos de la enfermedad periodontal, debido a su estrecha relación con la reabsorción ósea, se piensa que pueden ser utilizados como marcadores de la enfermedad y por tanto su control ser un factor en el tratamiento de estas enfermedades. Diferentes estudios han mostrado que, por ejemplo, la administración de drogas antiinflamatorias como los inhibidores de la ciclooxigenasa, pueden disminuir la destrucción del tejido periodontal en animales⁴

II.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

II. Hipótesis y objetivos

1.- HIPÓTESIS

Una vez evaluadas las vías de señalización en las que está involucrada la CLC y sus aparentes mecanismos protectores frente a la respuesta inflamatoria planteamos que:

“La administración profiláctica de NNT-1/BSF-3 en un modelo experimental de trasplante renal experimental, hará disminuir la respuesta inflamatoria inducida por el mecanismo de isquemia-reperfusión determinando una mayor viabilidad celular y consecuentemente una menor lesión orgánica que determinará una mayor supervivencia del injerto.”

2.- OBJETIVOS

1. Reproducir un modelo experimental de trasplante renal en la rata.
2. Estudiar la respuesta inflamatoria inducida, tanto en la fase de preservación como en la de perfusión.
3. Administrar un tratamiento profiláctico con NNT-1/BSF-3 en la fase de preservación.
4. Evaluar los efectos beneficiosos del tratamiento propuesto.
5. Sentar las bases para el planteamiento de ensayos clínicos futuros.

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 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, citocinas pro- y anti-inflamatorias, iNOS, moléculas de adhesión 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 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. Sonicador 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®).

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 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 NNT-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 NNT-1 dependiendo del grupo experimental).

2.1.2.2.- 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 coloca 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 NNT-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 NNT-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 izquierda. 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 los puntos próximos, 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 seccionar 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 los puntos separados, tanto si la sutura es continua como discontinua. Utilizamos anastomosis venosa término-lateral 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 término-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 manejar 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 extirpar el riñón derecho con cuidado de dejar el uréter derecho bien ligado.

2.2.- Modelos experimentales

Hemos empleado un total de 162 animales que se han distribuido como sigue:

2.2.1.- Ensayo de preservación renal

Para evaluar el efecto de la NNT-1 sobre la preservación renal realizamos el siguiente experimento utilizando 40 riñones extraídos de 20 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 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).
- **NNT-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 NNT-1 (N=5).
- **NNT-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 NNT-1 (N=5).

- **NNT-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 NNT-1 (N=5).
- **NNT-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 NNT-1 (N=5).

Una vez obtenido el riñón se divide sagitalmente en 2 partes iguales introduciéndolas instantáneamente en nitrógeno líquido, conservándose en tubos de criocongelación a -80°C.

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: estrés oxidativo (radical libre anión superóxido), la citocina proinflamatoria (TNF-α), óxido nítrico (iNOS), la molécula de adhesión VCAM-1 y el factor de transcripción nuclear (κB).

2.2.2.- Ensayo de trasplante renal:

Evaluamos la eficacia de la CT-1 en un modelo experimental de trasplante renal homólogo y ortotópico utilizando 142 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=10, N=5 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=12, N=6 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=20, N=10 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 (el resto de animales se dejaron evolucionar hasta el día 30 para el estudio de la mortalidad). (N=40, N=20 trasplantes).
- **Tx NNT-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 NNT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=10, N=5 trasplantes).
- **Tx NNT-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 NNT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=10, N=5 trasplantes).
- **Tx NNT-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 NNT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=10, N=5 trasplantes).
- **Tx NNT-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 (el resto de animales se dejaron evolucionar hasta el día 30 para el estudio de la mortalidad). Se administró 0,2µg/ml de NNT-1 en las soluciones de perfusión y preservación tal y como se indica en la descripción de la técnica quirúrgica. (N=30, N=15 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 (κB).

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. Radical libre: Anión superóxido.
4. Técnica de Elisa para el estudio de:
 - a. Citocinas Proinflamatorias: Factor de necrosis tumoral- α ,
 - b. Citocina Antiinflamatori: Interleucina-6.
5. Técnica de Western blot para el estudio de:
 - a. Moléculas de adhesión celular: sICAM-1, VCAM-1 y sVCAM-1
 - b. iNOS.
 - c. Factor de transcripción κB (p-p65)

Supervivencia:

Los animales 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.

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 4° 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 4°C. La fracción soluble que se obtuvo se dividió en alícuotas y se congeló a -80° 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 Boveris¹⁰⁶ 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^- /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:

- 1°.- Reducción del citocromo C inespecífica: sin SOD.
- 2°.- 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.

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 -80°C .

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-6) 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 μl por pocillo de Capture Antibody diluido. Tapamos la placa e incubamos toda la noche a T^{a} 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 μl 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 μl de Reagent Diluent a cada pocillo. Incubamos a T^{a} 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 μl de muestra o Standards en Reagent Diluent o en un diluyente apropiado por pocillo. Cubrimos con una tira adhesiva e incubamos 2 horas a T^{a} ambiente. Repetimos la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 μl de la

Detection Antibody, diluido en Reagent Diluent, por pocillo. Cubrimos con una nueva tira adhesiva e incubamos 2 horas a T^a ambiente. Repetir la aspiración/lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa. Añadimos 100 µl de la dilución para trabajar de Streptavidin-HRP a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar durante 20 minutos a T^a 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 µl de Substrate Solution a cada pocillo. Incubamos durante 20 minutos a T^a ambiente. Proteger la placa de la luz directa. Añadir 50 µl 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 DuoSet ELISA Development System rat TNF- α /TNFSF1A, R&D SYSTEMS.

Interleucina-6 (IL-6): kit DuoSet ELISA Development System rat IL-6, 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, Na_2VO_4 1 mM, PMSF 100 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

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.²⁸⁰ La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (MicrotestTM 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.⁴³⁵ 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.²⁴⁰ 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 T^a 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 VIII)

	<u>Carga</u>	<u>Bloqueo</u>	<u>Anticuerpo primario</u>	<u>Anticuerpo secundario</u>
<u>pNF-κB p65</u> Cell Signaling #3031 Pm:65kDa/Gel:12%	150 μ g	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>VCAM-1</u> Santa Cruz Biotechnology, INC. sc-1504), Pm: 90-132Kda/Gel: 10%	150 μ g	TTBS, 3% BSA, 6h, RT	Goat policlonal (TTBS, 3%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Donkey-anti- goat(SantaCruzBiotechnolog y, #2020),1:5000(TTBS,3%BS A), 30´, agitación constante, RT
<u>ICAM-1</u> Santa Cruz Biotechnology, #1511 Pm: 85- 110KDa/Gel: 10%	150 μ g	TTBS 3%BSA, 3h, RT	Goat policlonal (TTBS, 3%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Donkey-anti- goat(SantaCruzBiotechnolog y #2020),1:5000(TTBS,3%BS A),30´ agitación constante, RT
<u>iNOS</u> Cell Signaling #2977 Pm:130kDa/Gel:8%	150 μ g	TTBS, 5%Leche, 2h, RT	Rabbit policlonal, (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%	150 μ g	TTBS, 5%Leche, 2h RT	Rabbit policlonal, (TTBS, 5%BSA), overnight, agitación constante, 4°C	Anti-rabbit (Cell Signaling #7074),1:2000 (TTBS, 5%Leche), 1h, agitación constante, RT

Tabla VIII

Metodología del Western blot.

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

1.-RESULTADOS DE LA FASE PRESERVACIÓN

1.1.- Estudio del estrés oxidativo: Anión superóxido

Los riñones del grupo preservación control (sin NNT-1) presentan una mayor producción de anión superóxido que los observados en el Grupo Simulado desde las 6 horas de preservación. Los riñones del grupo preservación que recibió NNT-1 tienen menos producción de ASO que los del grupo preservación control a las 6 y 24 horas (Figura 1).

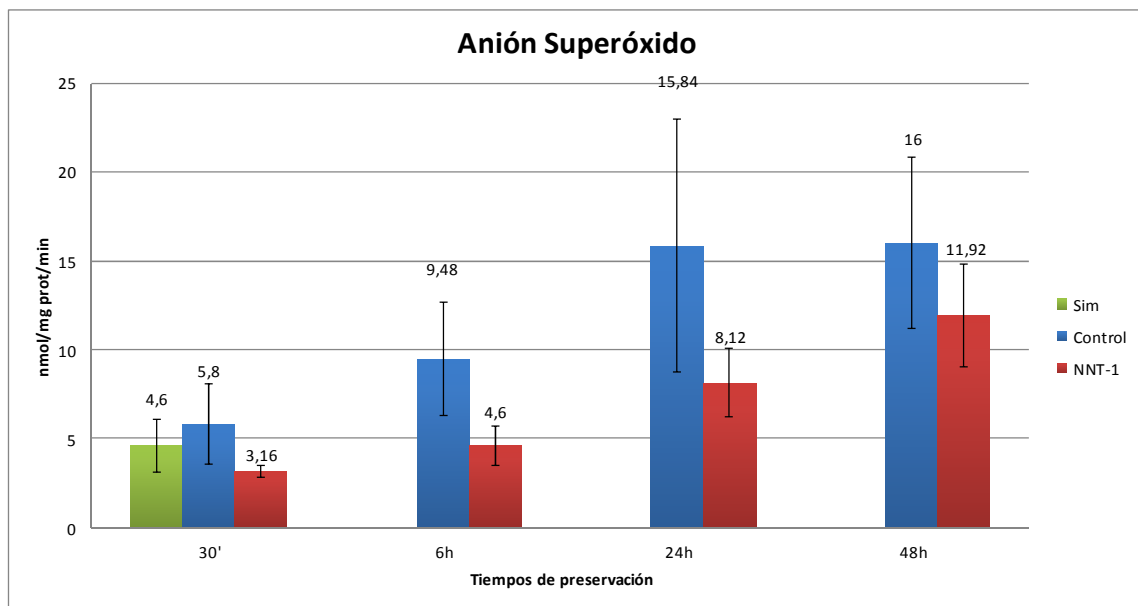


Figura 1.- Niveles de Anión Superóxido (nmol/mg prot/min) en la de preservación

* $p < 0,05$ vs Sim

$p < 0,05$ vs Control

1.2.- Estudio de las Citocinas

TNF- α

El estudio de la concentración de TNF- α en la solución de preservación demostró una mayor concentración de esta citocina en el Grupo Control respecto del NNT-1, a las 24 y 48 horas de preservación. A las 48 horas ambos grupos presentaron diferencias significativas con el Simulado (Figura 2).

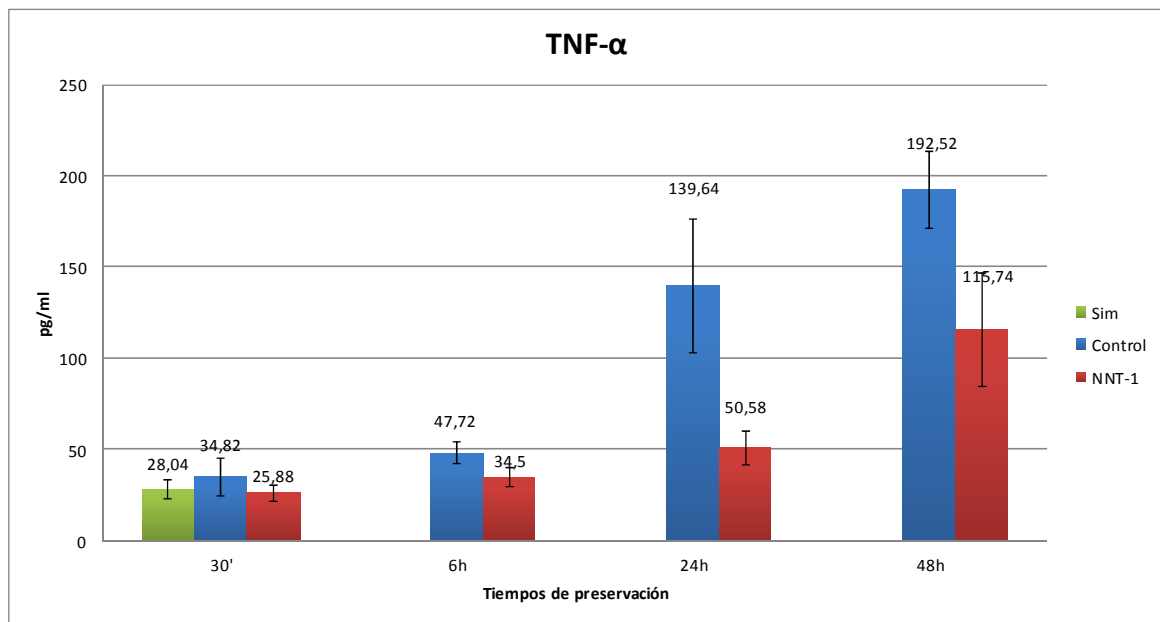


Figura 2.- Niveles de TNF- α (pg/ml) a los 30', 6, 24 y 48 h.

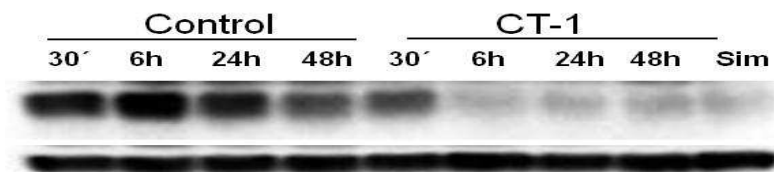
* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

1.3.- Estudio del Óxido Nítrico

iNOS

La expresión de iNOS era mayor en los riñones del grupo preservación control que en los riñones con preservación simulada, y estas diferencias fueron significativas en todos los tiempos estudiados. Cuando se añadió NNT-1 al líquido de preservación, la expresión renal de iNOS era significativamente menor que en ausencia de NNT-1 a las 6 y 24 horas, y solo fue significativamente mayor que en el riñón con preservación simulada a los 30 min y 6 horas de preservación (Figura 3).

A



B

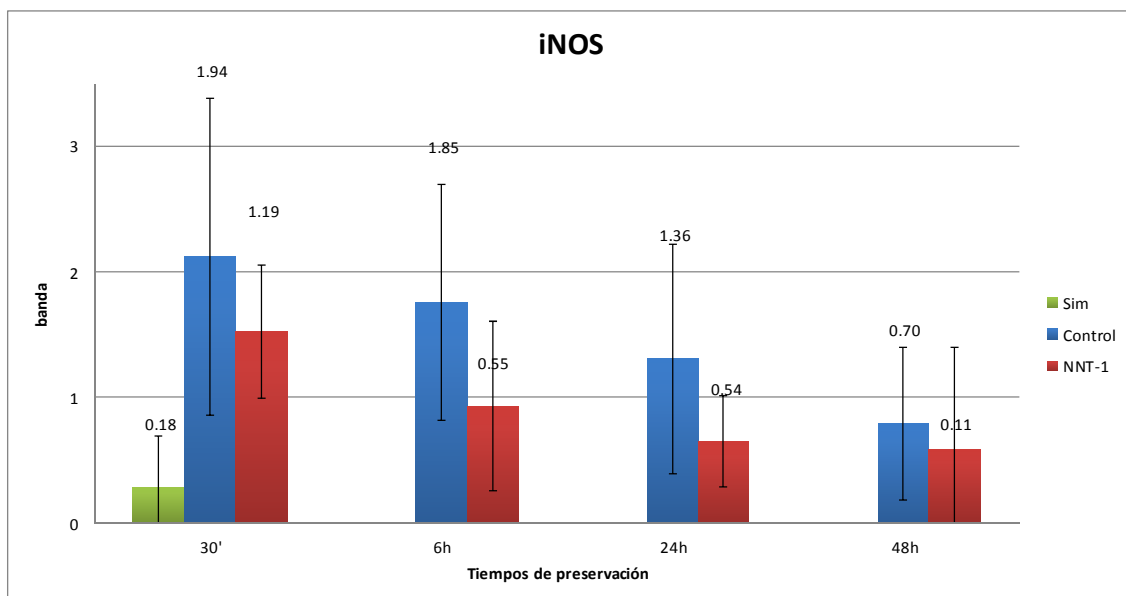


Figura 3.- A: Western blot representativo de iNOS. B: Intensidad de la banda iNOS corregido por tubulina a los 30 minutos 6, 24 y 48 horas.

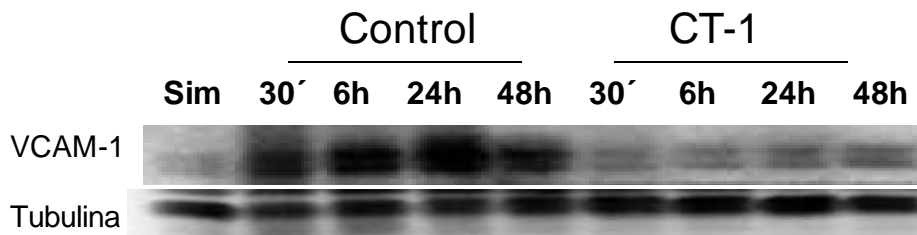
* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

1.4.- Estudio de la interacción leucocito endotelio

VCAM-1

Los riñones preservados sin NNT-1 tenían una expresión de VCAM-1 significativamente mayor que los de preservación simulada. Este aumento no se observó en los riñones que se preservaron con NNT-1 (Figura 4).

A



B

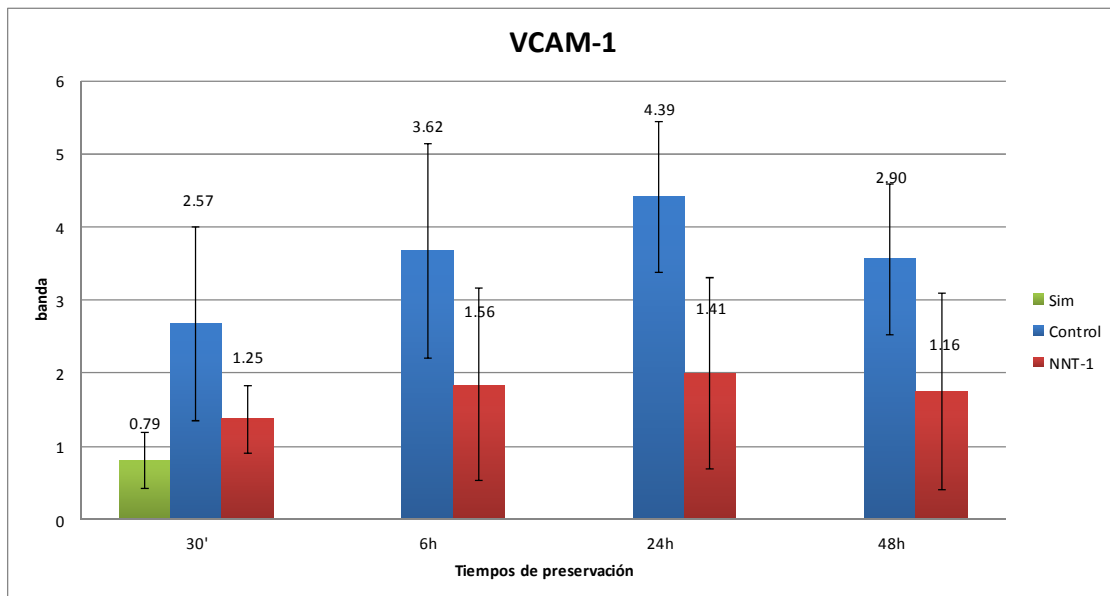


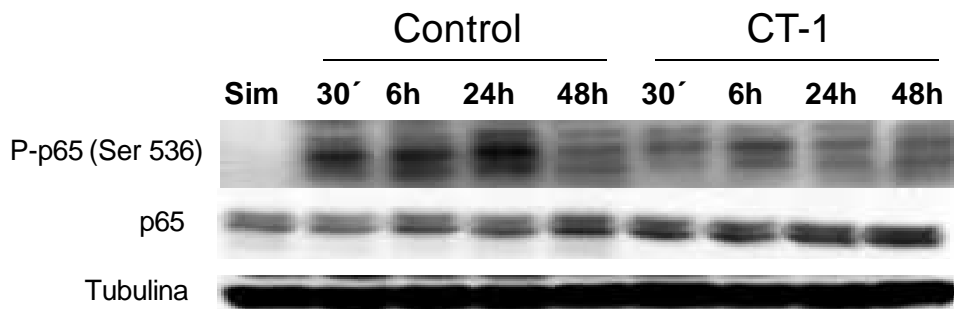
Figura 4.- A: Western blot representativo de VCAM-1. B: Intensidad de la banda VCAM-1 corregido por tubulina a los 30 minutos 6, 24 y 48 horas.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

1.5.- Estudio de la activación de NF- κ B

Los niveles de fosfo-p65 NF κ B (p-p65 NF κ B) eran indetectables en el grupo simulado y mayores en el grupo preservado sin NNT-1 que en el grupo preservado con NNT-1, aunque las diferencias no eran significativas entre estos grupos debido a la variabilidad de los resultados (Figura 5).

A



B

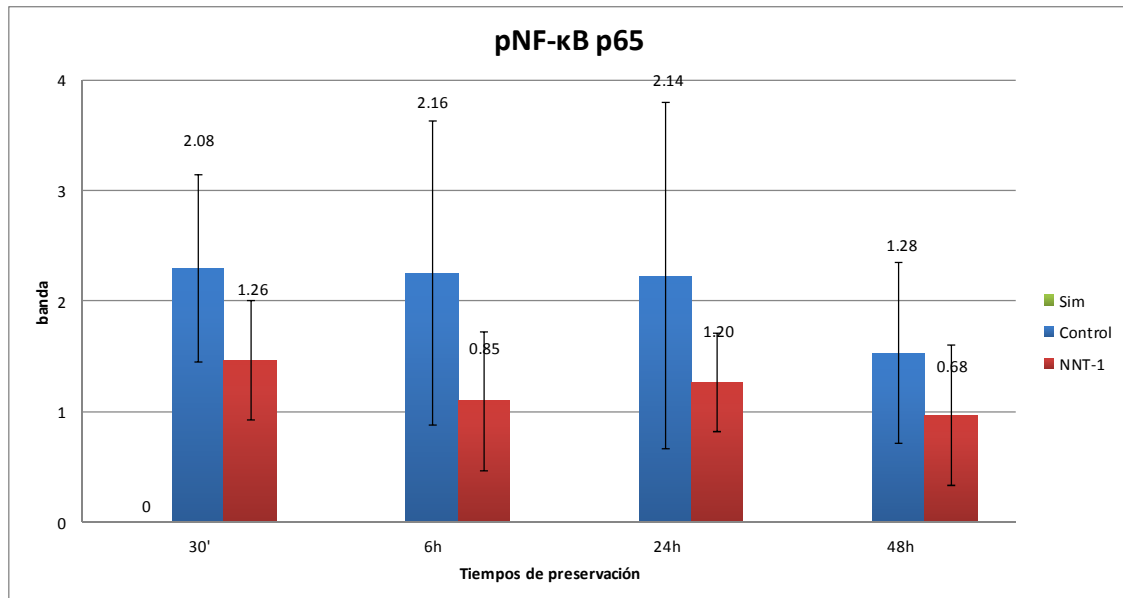


Figura 5.- A: Western blot representativo de p65 NF- κ B. B: Intensidad de la banda p65 NF- κ B corregido por tubulina a los 30 minutos 6, 24 y 48 horas.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

2.-RESULTADOS DE LA FASE TRASPLANTE RENAL

2.1.- 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. Los animales tarados con NNT-1 presentaron una significativa mejor supervivencia durante todo el estudio (Figura 6).

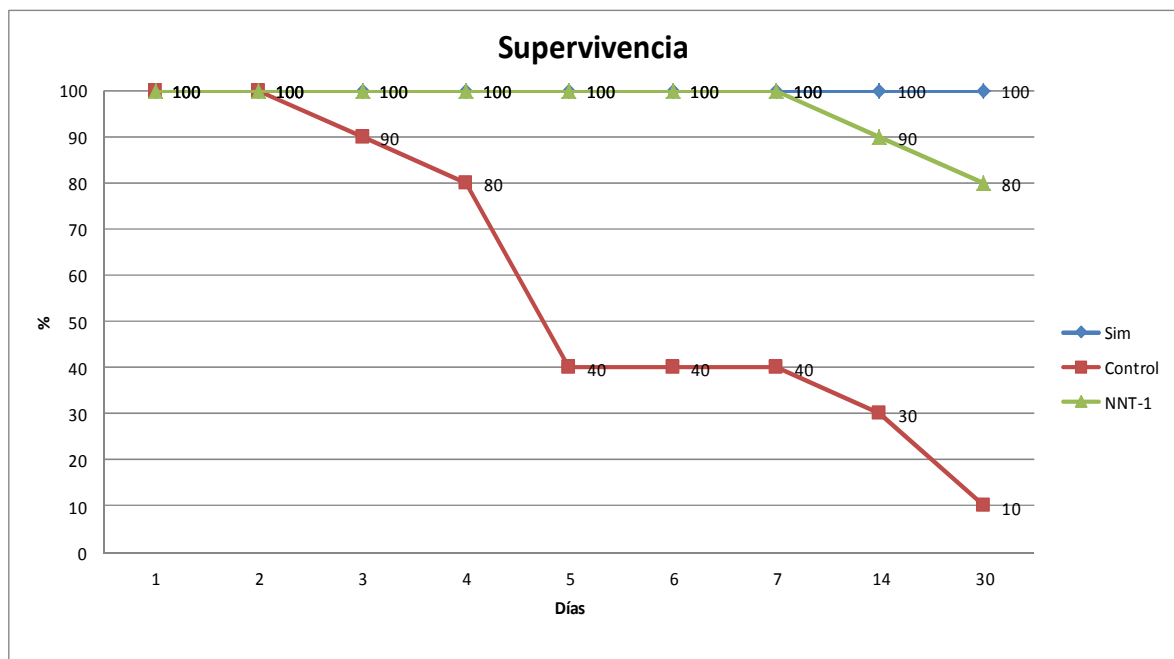


Figura 6.- Supervivencia tras el trasplante renal; expresado en % de animales vivos.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

2.2.- Estudio de la función renal

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, en el grupo trasplante control con respecto al grupo simulado. El grupo tratado con NNT-1 tenía unos valores menores de creatinina plasmática que el grupo trasplante control y no presento diferencias con el Simulado (Figura 7).

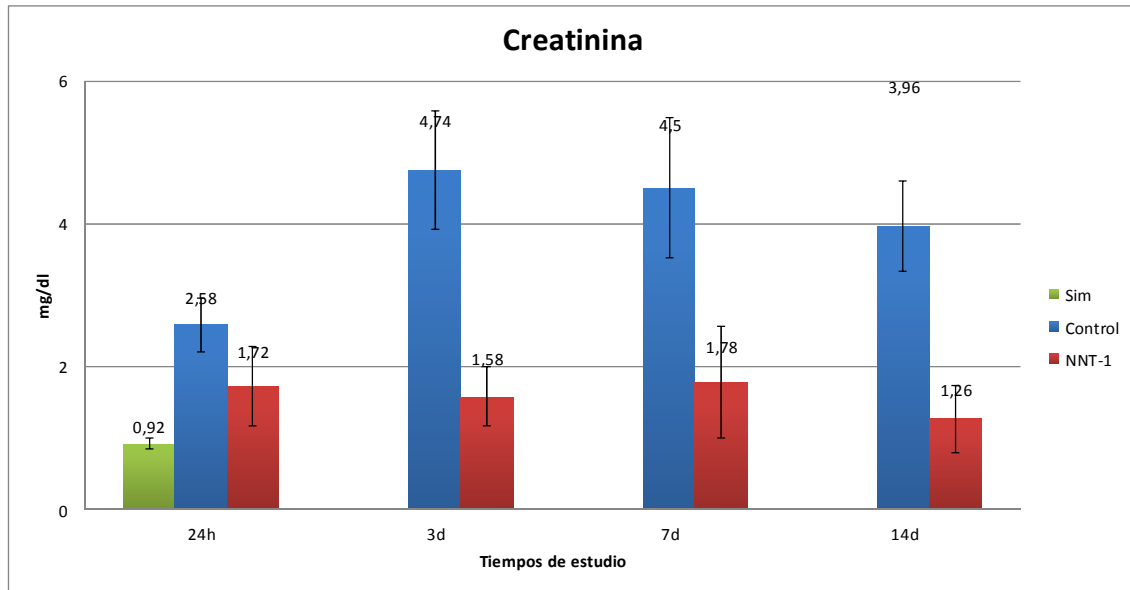


Figura 7.- Concentración de creatinina en plasma (mg/ml) a las 24h, 3, 7, y 14 días post-trasplante.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

Aclaramiento de la creatinina

La tasa de filtración glomerular, medida como aclaramiento de creatinina, fue significativamente menor en el grupo trasplante control que en el grupo simulado, en todos los tiempos post-trasplante estudiados. Cuando los riñones se preservaron con NNT-1, el aclaramiento de creatinina fue similar al del grupo simulado en todos los tiempos estudiados (Figura 8).

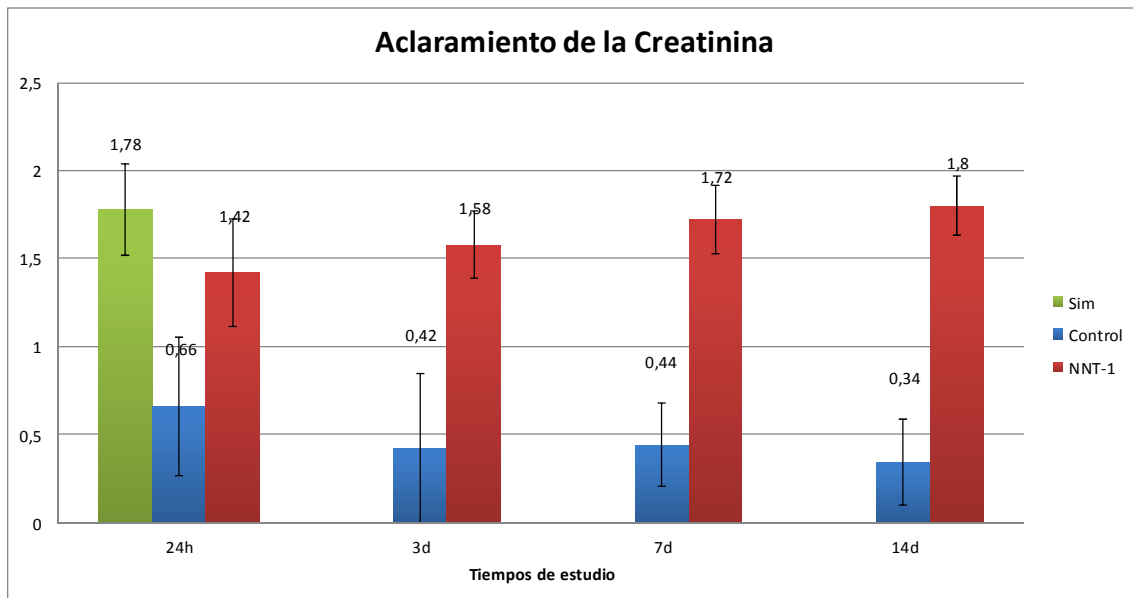


Figura 8.- Aclaramiento de creatinina en plasma a las a las 24h, 3, 7, y 14 días post-trasplante.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

2.3.-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 NNT-1 entre los que no existen diferencias (Figura 9).

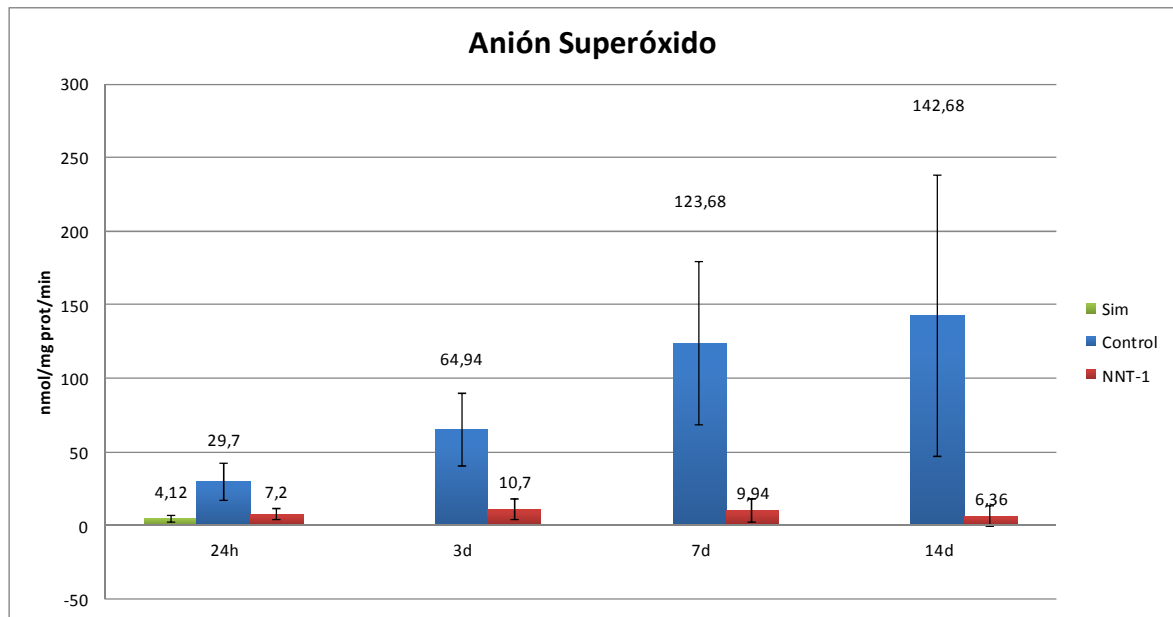


Figura 9.- Producción de anión superóxido.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

2.4.- Estudio de las Citocinas

Factor de Necrosis Tumoral- α

Los niveles plasmáticos de TNF α fueron significativamente mayores en el grupo de trasplante control (preservados sin NNT-1) que en el grupo simulado. El grupo cuyos riñones se preservaron con NNT-1 tenía valores de TNF- α inferiores al preservado sin NNT-1 y similares al simulado en todos los tiempos estudiados. (Figura 10).

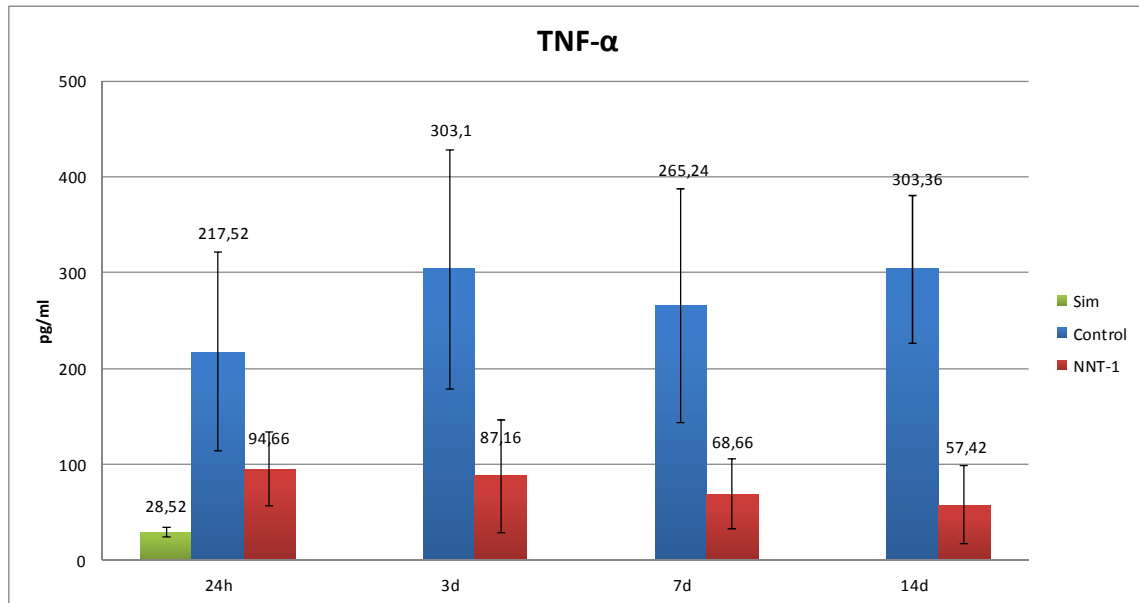


Figura 10.- Valores de TNF- α (pg/ml).

* p<0,05 vs Sim # p<0,05 vs Control

Interleucina-6

Los niveles plasmáticos de IL-6 en el grupo preservado sin NNT-1 eran menores que los del grupo simulado, aunque sin diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados. Cuando se añadió NNT-1 al líquido de preservación, los niveles circulantes de IL-6 eran mayores que cuando no se añadió NNT-1, alcanzando diferencias significativas con el grupo simulado y el grupo sin NNT-1 a los 3 días del trasplante. (Figura 11).

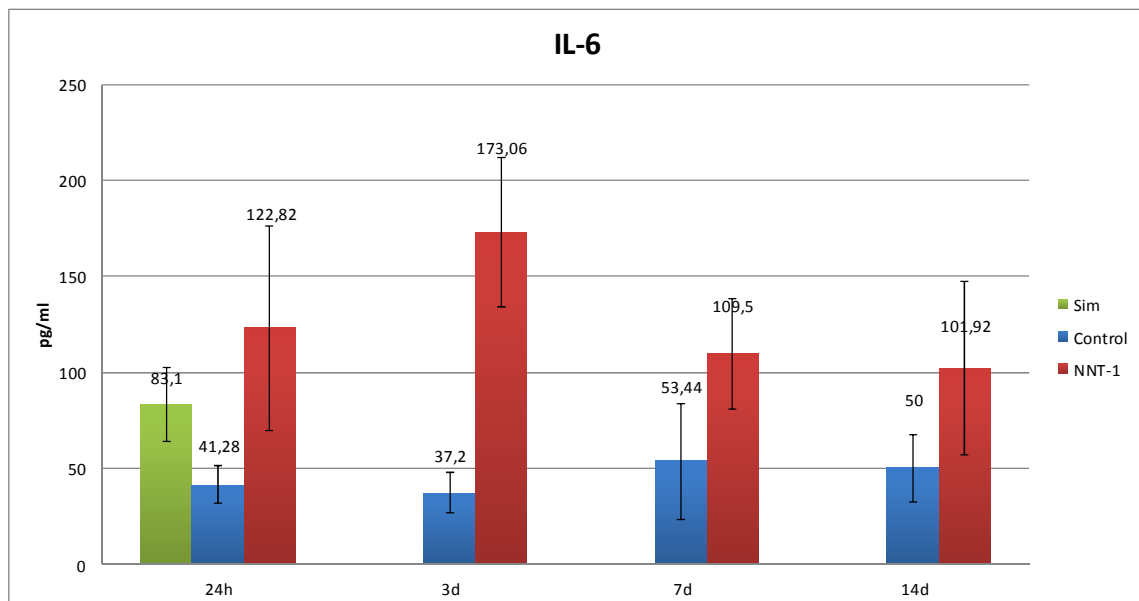


Figura 11.- Valores de IL-6 (pg/ml).

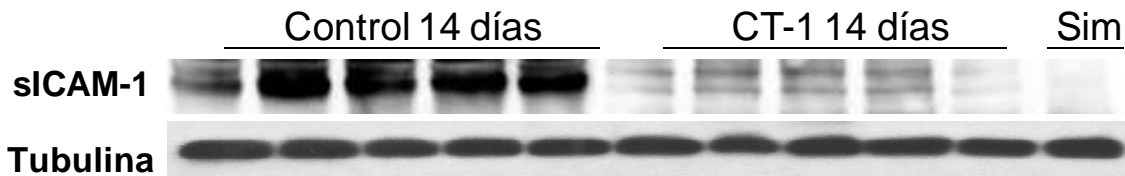
* p<0,05 vs Sim # p<0,05 vs Control

2.5.- Estudio de la lesión endotelial

ICAM-1 soluble

Los niveles circulantes de ICAM-1 soluble eran indetectables en el grupo simulado, siendo mucho mayores en los animales con riñones preservados sin NNT-1 a los 14 días del trasplante. Cuando se añadió NNT-1 los niveles circulantes de NNT-1 eran muy bajos, y significativamente inferiores a los del grupo trasplante control. (Figura 12).

A



B

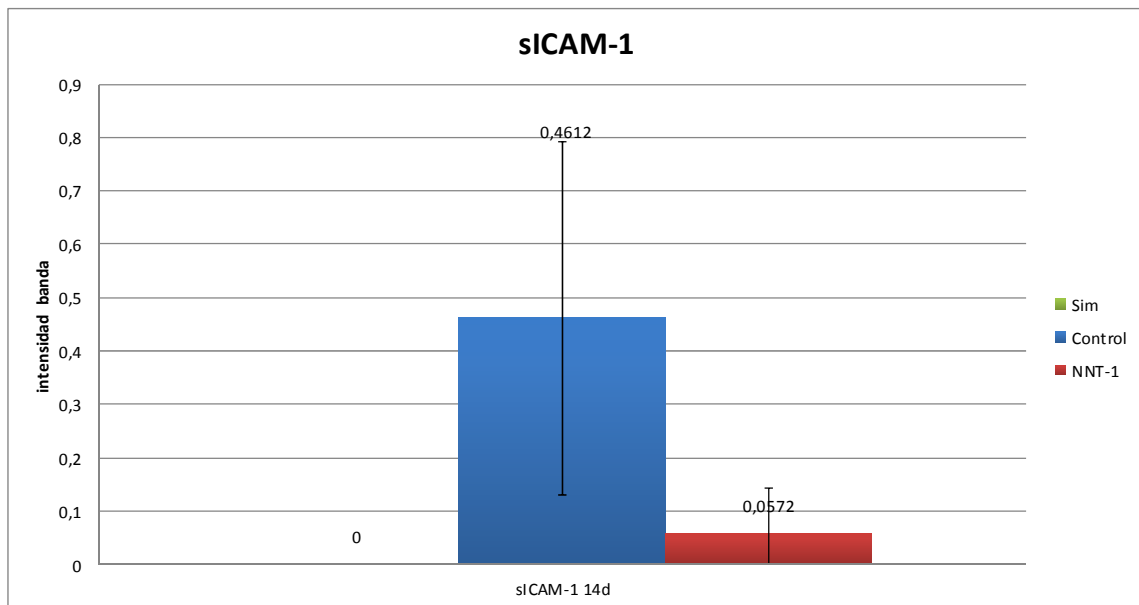


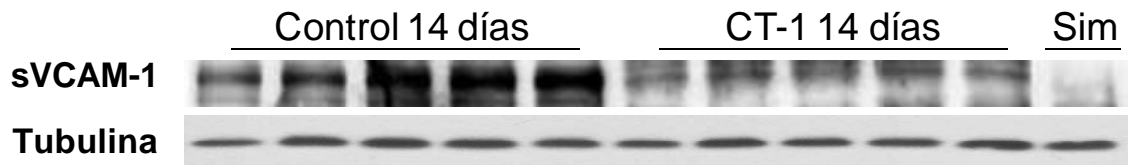
Figura 12.- A: Western blot representativo de sICAM. B: Intensidad de la banda sICAM corregido por tubulina a los 14 días post-trasplante.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

VCAM-1 soluble

Los resultados obtenidos para sVCAM-1 soluble eran similares a los de sICAM-1 (Figura 13).

A



B

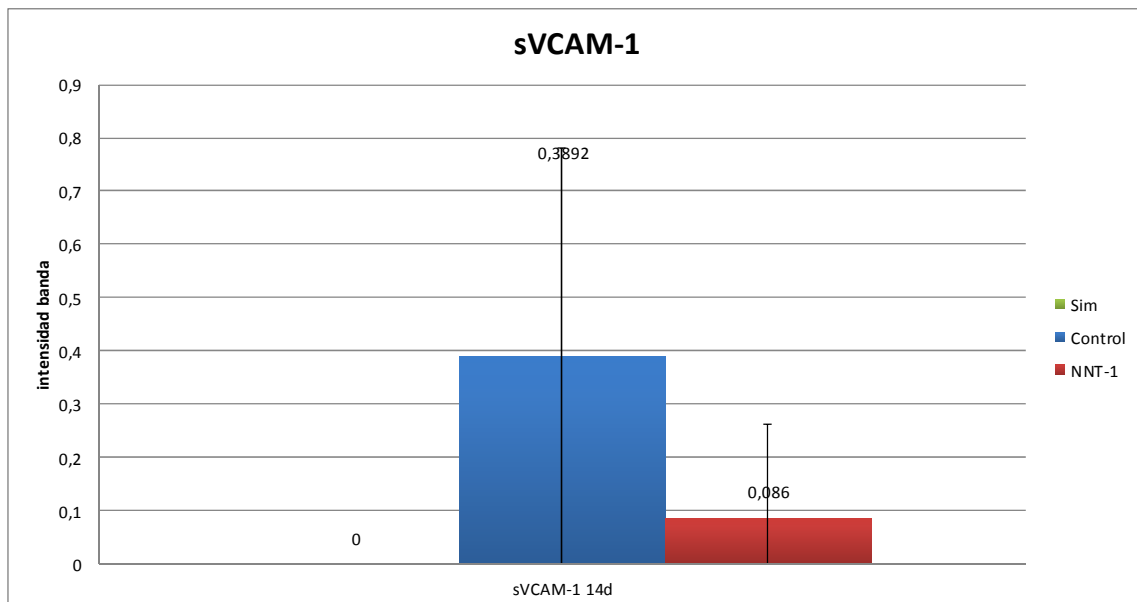


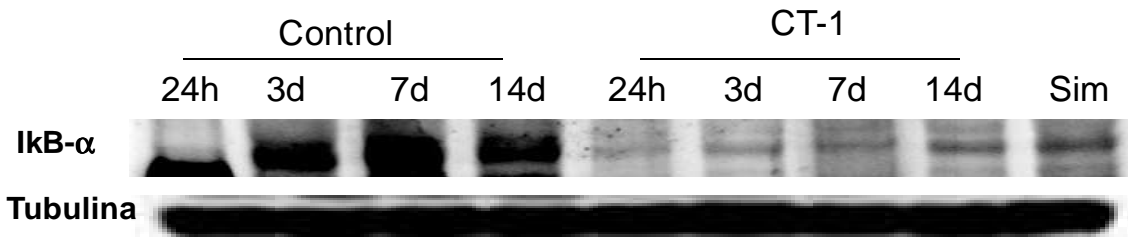
Figura 13.-A: Western blot representativo de sVCAM. **B:** Intensidad de la banda sVCAM corregido por tubulina a los 14 días post-trasplante.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

2.6.- Estudio de la activación de NF-κB: IκB-α

Comprobamos un incremento significativo en el Grupo Control, en todos los tiempos, respecto a los otros Grupos, entre los que no hubo diferencias (Figura 14).

A



B

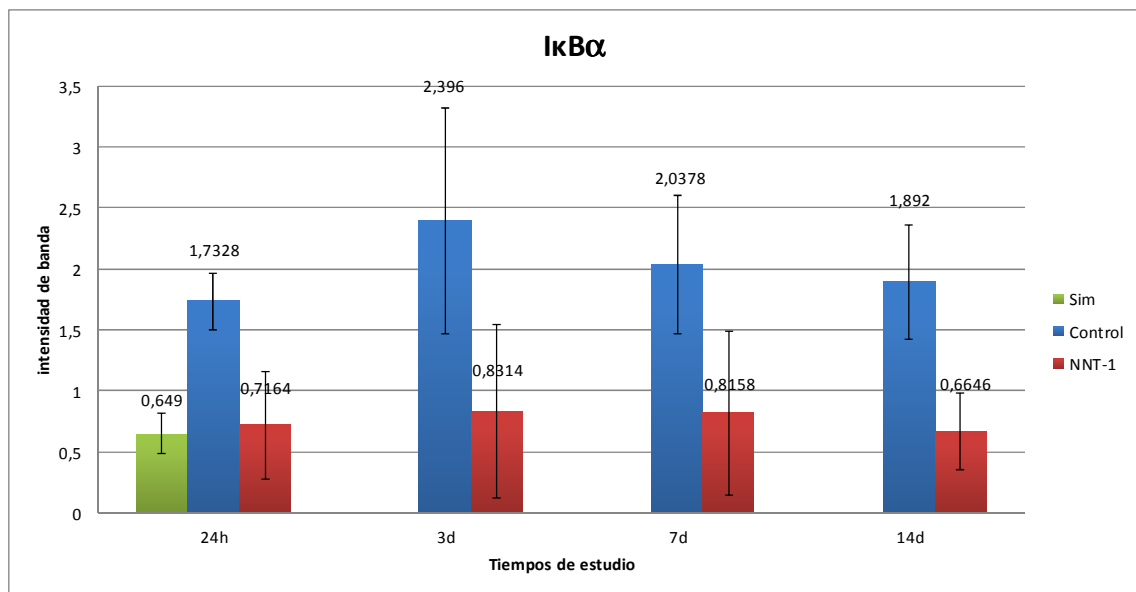


Figura 14.-A: Western blot representativo de IκB-α. **B:** Intensidad de la banda IκB-α corregido por tubulina a las 24 horas, 3, 7 y 14 días post-trasplante.

* $p < 0,05$ vs Sim # $p < 0,05$ vs Control

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 NNT-1 mejorando la lesión por I/R, en otros tejidos^{27, 62, 74, 79, 81, 91, 106, 157, 244} abre el camino para su utilización en todo proceso quirúrgico que implique una situación isquémica y su consiguiente reperfundición, 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 NNT-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.

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.

1.- 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 trasplantado¹⁸⁸.

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.⁹³ Otros estudios apoyan que la mayor duración del injerto produce mayor daño renal.¹⁰² 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.²⁸³ 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 NNT-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^{183, 223}, 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 NNT-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 NNT-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 renal¹⁸³. Asimismo la sobreexpresión de MnSOD o la inhibición de la iNOS en túbulos renales proximales de rata protegen a los mismos de los daños inducidos por isquemia fría¹⁸⁴. Por ello, podemos concluir que los efectos observados de la NNT-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 renal²²³.

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 se correlaciona con la producción de diversas citocinas en hígado⁵³. Aunque en la literatura no hemos encontrado ningún dato de los efectos de la isquemia fría sin reperfusión 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 citocinas¹⁹⁴. Se sabe, por otro lado, que ASO activa NF- κ B y NF- κ B induce TNF- α . NNT-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 NNT-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 NNT-1 podría permitir aumentar el tiempo efectivo de preservación del órgano.

2.- 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. Niveles altos 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. Niveles altos 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 NNT-1 mejorando la supervivencia de los animales trasplantados. Este aumento de la supervivencia puede deberse a varios factores:

2.1.- Función renal

Encontramos unos valores de creatinina sérica, en el grupo tratado con NNT-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 NNT-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 NNT-1.

2.2.- Estrés oxidativo

Comprobamos una disminución en la producción de ASO en el tejido renal postrasplante de los animales tratados con NNT-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 .

2.3.- Citocinas

El incremento de la citocina proinflamatoria TNF- α en el plasma de los animales trasplantados es significativamente menor en el grupo tratado con NNT-1. Los mecanismos implicados en el descenso de los niveles de la citocina por el tratamiento con NNT-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 NNT-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 NNT-1 y que el efecto protector de NNT-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.

2.4.- 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 NNT-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 si 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 NNT-1 en el trasplante renal.

2.5.- Factor transcripcional 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.^{264,310,369.}

Nuestros datos demuestran que en los animales que reciben NNT-1, NF- κ B está menos activada en riñón tras la isquemia. El efecto de NNT-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 NNT-1, provoca en el corazón una disminución de la expresión de iNOS y de la activación de NF- κ B²⁵². Se ha descrito que NNT-1 activa NF- κ B en células endoteliales⁶⁵. Monocitos⁶⁴. Por otro lado se ha

descrito que los efectos citoprotectores de NNT-1 en cardiomiocitos en cultivo ocurren a través de la activación de NF- κ B⁴⁰ Por lo tanto, parece que, dependiendo de las circunstancias, NNT-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 . 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.²⁷⁹ Esta acumulación de los macrófagos en el riñón post-isquémico es debido a la sobreexpresión de quimiocinas en las células tubulares.^{44,248} La disminución selectiva de macrófagos disminuye el daño agudo del riñón isquémico.⁴⁴

Nuestros datos demuestran que en las ratas con I/R que recibieron NNT-1 los niveles plasmáticos de TNF- α son menores que en las ratas que no reciben NNT-1. Benigni et al han demostrado que la NNT-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 . De este modo, NNT-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. La NNT-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.^{86, 282} La inyección intravenosa de NNT-1 a ratas Wistar inducen en el corazón un aumento rápido de la expresión de mRNA de SOCS-1.²⁵² 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.^{127, 195.}

Nuestros resultados también demuestran que, como habíamos visto en estudios anteriores, la I/R renal hace disminuir los niveles circulantes de IL-6, citocina con efecto predominantemente antiinflamatorio.^{69, 70} En las ratas a las que se administra NNT-1, los niveles circulantes de IL-6 son similares o incluso mayores que los del grupo simulado. Este efecto podría participar en el efecto protector renal de la NNT-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 NNT-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.⁴⁹ 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.⁵⁴

La NNT-1 induce la síntesis de IL-6 *in vitro*^{64,65} 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.¹²¹ El mecanismo exacto de cómo la activación de JAK2/STAT3 participa en la expresión de IL-6 inducida por NNT-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.^{65,115}

IL-6 puede provocar *in vivo* tanto efectos antiinflamatorios como proinflamatorios dependiendo de las circunstancias.¹¹⁵ 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.²⁸⁴

Existen observaciones contradictorias con las anteriores, en las que se sugiere que la producción de IL-6 por parte de la NNT-1 podría ser utilizado como un mecanismo regulatorio beneficioso. En un modelo de daño agudo por I/R en corazón de rata¹⁷⁷ 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 NNT-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 NNT-1 y que el efecto protector de NNT-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.^{86.}

Nuestros resultados también corroboran que la I/R renal aumenta la expresión de iNOS, mientras que la administración de NNT-1 disminuye dicho aumento de la expresión. Otros autores han descrito que la administración de NNT-1 disminuye los mediadores de la respuesta inflamatoria y entre ellos la iNOS,²⁷⁹ lo que apoya también nuestras observaciones. Sin embargo, se ha demostrado que la NNT-1 tiene efectos hemodinámicos aparentemente contradictorios con esta observación. Cuando se administra la NNT-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.^{85,280}

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.^{159.} La activación de p65, juega un importante papel en la expresión de iNOS.^{159,286} En nuestro trabajo la NNT-1 disminuye la activación de p65 y también la expresión de iNOS. También en los estudios de sepsis *in vivo*, hay activación de NF- κ B, y aumento de la expresión de iNOS, y ambos fenómenos se inhiben totalmente en las ratas tratadas con NNT-1¹⁵⁴ Por lo tanto, es posible que el efecto de NNT-1 sobre la iNOS esté mediado por la menor activación de NF- κ B.

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-1 β e IFN- 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- κ B forma un complejo con STAT-3. La interacción directa de STAT-3 y NF- κ B p65 se observó *in vivo* e *in vitro*. La sobreexpresión de STAT-3 inhibe de manera espectacular la inducción de iNOS mediada por IL-1 β o por IFN- γ + LPS. También se ha demostrado que la sobreexpresión de STAT-3 inhibe la actividad de un gen promotor dependiente de NF- κ B, desprovisto de elementos

de unión para STAT sin influir a la actividad del DNA de unión para NF- κ B. Por lo tanto STAT-3, vía interacción directa con NF- κ B p65, actúa como un inhibidor de la actividad de NF- κ B para suprimir la inducción indirecta del promotor de iNOS por citocinas en células mesangiales.²⁸⁶

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.²⁷⁸

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 NNT-1. La administración de NNT-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 IFN- 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 NNT-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 NNT-1 protege del daño renal inducido por I/R y de la inflamación asociada a este proceso.
2. La adición de NNT-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 NNT-1, la respuesta inflamatoria de estos animales es menor que en aquellos en los que se trasplantan riñones preservados sin NNT-1.
4. Cuando se trasplantan riñones preservados durante 24 horas en líquido de la Universidad de Wisconsin conteniendo NNT-1, la supervivencia y la función renal de estos animales son mayores que en aquellos en los que se trasplantan riñones preservados sin NNT-1.

VII.
BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abramov AY, Scorziello A, Duchon MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci*. Jan 31 2007;27(5):1129-1138.
2. Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *The New England journal of medicine*. Aug 23 2007;357(8):797-805.
3. Akbulut G, Dilek ON, 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*. Jan 2005;11(1):11-16.
4. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators of inflammation*. 2009;2009:137072.
5. 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*. Oct 2008;20(5):525-532.
6. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Interaction between the coagulation and complement system. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;632:71-79.
7. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Current opinion in nephrology and hypertension*. Jan 2006;15(1):72-77.
8. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Feb 2005;38(2):367-374.
9. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Dec 2006;374(1-2):33-45.
10. Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock (Augusta, Ga)*. Jul 2009;32(1):4-16.
11. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, Ascon M, Savransky V, Colvin RB, Soloski MJ, Rabb H. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. Sep 1 2006;177(5):3380-3387.
12. Aurélie Jeanne Tormo, Marie-Claude Letellier, Rami Lissilaa, Laurie-Anne Batrville, Mukut Sharma, Walter Ferlin, Greg Elson, Sandrine Crabé, Jean-François Gauchat The cytokines cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/CLF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) differ in their receptor specificities. *Cytokine*. 2012, 60: 653-660.
13. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. Apr 2009;53(4):425-435.
14. Barrantes F, Feng Y, Ivanov O, Yalamanchili HB, Patel J, Buenafe X, Cheng V, Dijeh S, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA. Acute kidney injury predicts outcomes of non-critically ill patients. *Mayo Clinic proceedings*. May 2009;84(5):410-416.
15. 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*. Aug 2007;218:147-164.
16. Barreiro O, Vicente-Manzanares M, Urzainqui A, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F. Interactive protrusive structures during leukocyte adhesion and transendothelial migration. *Front Biosci*. May 1 2004;9:1849-1863.

17. Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F. 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*. Jun 24 2002;157(7):1233-1245.
18. Barreiro O, Zamai M, Yanez-Mo M, Tejera E, Lopez-Romero P, Monk PN, Gratton E, Caiolfa VR, Sanchez-Madrid F. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of cell biology*. Nov 3 2008;183(3):527-542.
19. Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, Hattan N, Chilian WM. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 2004;286(5):F893-902.
20. Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE, Jr., Ley K. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. *American journal of physiology*. Aug 2006;291(2):L200-207.
21. Baskin-Bey ES, Washburn K, Feng S, Oltersdorf T, Shapiro D, Huyghe M, Burgart L, Garrity-Park M, van Vilsteren FG, Oliver LK, Rosen CB, Gores GJ. Clinical Trial of the Pan-Caspase Inhibitor, IDN-6556, in Human Liver Preservation Injury. *Am J Transplant*. Jan 2007;7(1):218-225.
22. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. Apr 1988;45(4):673-676.
23. Billen EV, Christiaans MH, Lee J, van den Berg-Loonen EM. Donor-directed HLA antibodies before and after transplantation detected by the luminex single antigen assay. *Transplantation*. Feb 27 2009;87(4):563-569.
24. Bixel G, Kloep S, Butz S, Petri B, Engelhardt B, Vestweber D. Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood*. Nov 15 2004;104(10):3205-3213.
25. Bolisetty S, Agarwal A. Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more. *Kidney international*. Apr 2009;75(7):674-676.
26. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney international*. Aug 2004;66(2):480-485.
27. Brar BK, Stephanou A, Liao Z, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS. Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation. *Cardiovascular research*. Aug 1 2001;51(2):265-274.
28. Bretschneider HJ. [Survival Time and Recuperative Time of the Heart in Normothermia and Hypothermia.]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Kreislaufforschung*. 1964;30:11-34.
29. Brune B, Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. *Cardiovascular research*. Jul 15 2007;75(2):275-282.
30. Camara AK, Aldakkak M, Heisner JS, Rhodes SS, Riess ML, An J, Heinen A, Stowe DF. 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*. Jun 2007;292(6):C2021-2031.
31. Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, Liu CF, Li P, Wang L, Zhu CF. In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney international*. Mar 2004;65(3):834-845.
32. Carman CV, Springer TA. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Current opinion in cell biology*. Oct 2008;20(5):533-540.
33. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, Devarajan P. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation*. Jul 15 2003;76(1):50-54.

34. Catania A, Lonati C, Sordi A, Gatti S. Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. *Brain, behavior, and immunity*. Oct 2009;23(7):877-884.
35. Celie JW, Rutjes NW, Keuning ED, Soininen R, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Drager AM, Zweegman S, Kessler FL, Beelen RH, Florquin S, Aten J, van den Born J. Subendothelial heparan sulfate proteoglycans become major L-selectin and monocyte chemoattractant protein-1 ligands upon renal ischemia/reperfusion. *The American journal of pathology*. Jun 2007;170(6):1865-1878.
36. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. Oct 2007;376(1-2):1-43.
37. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature medicine*. May 2003;9(5):575-581.
38. Chen Q, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jan 2007;292(1):C137-147.
39. Chronopoulos A, Rosner MH, Cruz DN, Ronco C. Acute kidney injury in the elderly: a review. *Contributions to nephrology*. 2010;165:315-321.
40. Craig R, Wagner M, McCardle T, Craig AG, Glembotski CC. The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry*. Oct 5 2001;276(40):37621-37629.
41. Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, Toliat MR, Nurnberg G, Usala G, et al. Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1. *Am J Hum Genet* 2007;80:971-81.
42. 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*. Aug-Sep 2008;32(6):296-303.
43. Dagoneau N, Bellais S, Blanchet P, Sarda P, Al-Gazali LI, Di Rocco M, et al. Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes. *Am J Hum Genet* 2007;80:966-70.
44. Day YJ, Huang L, Ye H, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr 2005;288(4):F722-731.
45. De Berardis D, Conti CM, Serroni N, Moschetta FS, Olivieri L, Carano A, Salerno RM, Cavuto M, Farina B, Alessandrini M, Janiri L, Pozzi G, Di Giannantonio M. The effect of newer serotonin-noradrenalin antidepressants on cytokine production: a review of the current literature. *International journal of immunopathology and pharmacology*. Apr-Jun 2010;23(2):417-422.
46. Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Current opinion in pediatrics*. Apr 2005;17(2):193-199.
47. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. Jun 2006;17(6):1503-1520.
48. Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovascular research*. Jul 15 2007;75(2):327-338.
49. Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovascular research*. Apr 1 2009;82(1):59-66.
50. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Annals of surgery*. Jun 2009;249(6):889-899.

51. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney international*. Apr 2007;71(7):619-628.
52. Du D, Xu F, Yu L, Zhang C, Lu X, Yuan H, Huang Q, Zhang F, Bao H, Jia L, Wu X, Zhu X, Zhang X, Zhang Z, Chen Z. The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells. *Developmental cell*. Jan 19 2010;18(1):52-63.
53. Duran JA, Gonzalez AA, Garcia DD, Falcon RC, Pereda PS, Alvarez SM, Cobaleda IG, Jaime AA, Gonzalez IA, Bosque AV, Gomez MB, Benitez de Lugo AS. Variation in the levels of inflammatory cytokines depending on ischemic time: effects on respiratory variables. *Transplantation proceedings*. Apr 2009;41(3):980-982.
54. El Kasmi KC, Holst J, Coffre M, Mielke L, de Pauw A, Lhocine N, Smith AM, Rutschman R, Kaushal D, Shen Y, Suda T, Donnelly RP, Myers MG, Jr., Alexander W, Vignali DA, Watowich SS, Ernst M, Hilton DJ, Murray PJ. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol*. Dec 1 2006;177(11):7880-7888.
55. El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M, McCracken R, Kiefer S, Dagher PC. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 2008;295(2):F534-544.
56. Elson GC, Graber P, Losberger C, Herren S, Gretener D, Menoud LN, et al. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol* 1998;161:1371-9.
57. Evans EA, Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science (New York, N. Y.* May 25 2007;316(5828):1148-1153.
58. Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H, Oh DJ, Lu L, Klein CL, Dinarello CA, Edelstein CL. 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*. Jul 2007;322(1):8-15.
59. Ferrareso M, Macor P, Valente M, Della Barbera M, D'Amelio F, Borghi O, Raschi E, Durigutto P, Meroni P, Tedesco F. Posttransplant ischemia-reperfusion injury in trasplanted heart is prevented by a minibody to the fifth component of complement. *Transplantation*. Nov 27 2008;86(10):1445-1451.
60. 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*. Mar 2008;153 Suppl 1:S414-427.
61. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. May 2010;459(6):923-939.
62. Freed DH, Borowiec AM, Angelovska T, Dixon IM. Induction of protein synthesis in cardiac fibroblasts by cardiotrophin-1: integration of multiple signaling pathways. *Cardiovascular research*. Nov 1 2003;60(2):365-375.
63. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney international*. Aug 2004;66(2):486-491.
64. Fritzenwanger M, Meusel K, Foerster M, Kueth F, Krack A, Figulla HR. Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human monocytes. *Cytokine*. Jun 2007;38(3):137-144.
65. Fritzenwanger M, Meusel K, Foerster M, Kueth F, Krack A, Figulla HR. Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine*. Nov 2006;36(3-4):101-106.
66. Furuichi K, Gao JL, Horuk R, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*. Dec 15 2008;181(12):8670-8676.
67. Furuichi K, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury. *Front Biosci*. 2008;13:4021-4028.

68. Galiuto L, Crea F. No-reflow: a heterogeneous clinical phenomenon with multiple therapeutic strategies. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(29):3807-3815.
69. Garcia-Criado FJ, Eleno N, Santos-Benito F, Valdunciel JJ, Reverte M, Lozano-Sanchez FS, Ludena MD, Gomez-Alonso A, Lopez-Novoa JM. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*. Oct 27 1998;66(8):982-990.
70. Garcia-Criado FJ, Rodriguez-Barca P, Garcia-Cenador MB, Rivas-Elena JV, Grande MT, Lopez-Marcos JF, Mourelle M, Lopez-Novoa JM. Protective effect of new nitrosothiols on the early inflammatory response to kidney ischemia/reperfusion and transplantation in rats. *J Interferon Cytokine Res*. Aug 2009;29(8):441-450.
71. Genesca M, Sola A, Hotter G. Actin cytoskeleton derangement induces apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Apoptosis*. Apr 2006;11(4):563-571.
72. Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, Banerjee A. Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*. Oct 30 2006;25(51):6781-6799.
73. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews*. Nov 2008;8(11):837-848.
74. Ghosh S, Ng LL, Talwar S, Squire IB, 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*. Dec 2000;48(3):440-447.
75. Goldberg R, Dennen P. Long-term outcomes of acute kidney injury. *Advances in chronic kidney disease*. Jul 2008;15(3):297-307.
76. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology. *Seminars in nephrology*. Jul 2004;24(4):316-323.
77. Goligorsky MS. Whispers and shouts in the pathogenesis of acute renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant*. Feb 2005;20(2):261-266.
78. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *European journal of anaesthesiology*. Jul 2009;26(7):537-547.
79. Gritman K, Van Winkle DM, Lorentz CU, Pennica D, Habecker BA. The lack of cardiotrophin-1 alters expression of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA but does not impair cardiac injury response. *Cytokine*. Oct 2006;36(1-2):9-16.
80. Guan Z, Gobe G, Willgoss D, Endre ZH. Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep 2006;291(3):F619-628.
81. Habecker BA, Gritman KR, Willison BD, Van Winkle DM. Myocardial infarction stimulates galanin expression in cardiac sympathetic neurons. *Neuropeptides*. Apr 2005;39(2):89-95.
82. Hahn AF, Jones DL, Knappskog PM, Boman H, McLeod JG. Cold-induced sweating syndrome A report of two cases and demonstration of genetic heterogeneity. *J Neurol Sci* 2006.
83. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society transactions*. Apr 2006;34(Pt 2):232-237.
84. Halloran PF. T cell-mediated rejection of kidney transplants: a personal viewpoint. *Am J Transplant*. May 2010;10(5):1126-1134.
85. Hamanaka I, Saito Y, Nishikimi T, Magaribuchi T, Kamitani S, Kuwahara K, Ishikawa M, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Shirakami G, Mori K, Inobe Y, Kishimoto I, Masuda I, Fukuda K, Nakao K. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *American journal of physiology*. Jul 2000;279(1):H388-396.

86. Hamanaka I, Saito Y, Yasukawa H, Kishimoto I, Kuwahara K, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Masuda I, Yoshimura A, Nakao K. 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*. Apr 13 2001;88(7):727-732.
87. Hansen TN, Haworth RA, Southard JH. Warm and cold ischemia result in different mechanisms of injury to the coronary vasculature during reperfusion of rat hearts. *Transplantation proceedings*. Feb 2000;32(1):15-18.
88. Hao CM, Breyer MD. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney international*. Jun 2007;71(11):1105-1115.
89. Hao CM, Breyer MD. Roles of lipid mediators in kidney injury. *Seminars in nephrology*. May 2007;27(3):338-351.
90. Hauet T, Han Z, Doucet C, Ramella-Virieux S, Hadj Aissa A, Carretier M, Papadopoulos V. A modified University of Wisconsin preservation solution with high-NA+ low-K+ content reduces reperfusion injury of the pig kidney graft. *Transplantation*. Jul 15 2003;76(1):18-27.
91. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research*. Feb 15 2004;61(3):448-460.
92. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. Feb 8 2008;132(3):344-362.
93. 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*. Feb 2010;88(1):206-209.
94. He Z, Dursun B, Oh DJ, Lu L, Faubel S, Edelstein CL. Macrophages are not the source of injurious interleukin-18 in ischemic acute kidney injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Mar 2009;296(3):F535-542.
95. He Z, Lu L, Altmann C, Hoke TS, Ljubanovic D, Jani A, Dinarello CA, Faubel S, Edelstein CL. Interleukin-18 binding protein transgenic mice are protected against ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. Nov 2008;295(5):F1414-1421.
96. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. Aug 15 2003;374(Pt 1):1-20.
97. Herholz J, Meloni A, Marongiu M, Chiappe F, Deiana M, Herrero CR, et al. Differential secretion of the mutated protein is a major component affecting phenotypic severity in CRLF1-associated disorders. *Eur J Hum Genet* 2011;19:525–33.
98. Herrero-Fresneda I, Torras J, Lloberas N, Riera M, Cruzado JM, Condom E, Merlos M, Alsina J, Grinyo JM. Cold ischemia in the absence of alloreactivity induces chronic transplant nephropathy through a process mediated by the platelet-activating factor. *Transplantation*. Dec 15 2000;70(11):1624-1631.
99. Hiremath S, Fergusson D, Doucette S, Mulay AV, Knoll GA. Renin angiotensin system blockade in kidney transplantation: a systematic review of the evidence. *Am J Transplant*. Oct 2007;7(10):2350-2360.
100. Horbelt M, Lee SY, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A, Sutton TA. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep 2007;293(3):F688-695.
101. Hosgood SA, Bagul A, Nicholson ML. Minimising cold ischaemic injury in an experimental model of kidney transplantation. *European journal of clinical investigation*. Mar 2011;41(3):233-240.

102. Hosgood SA, Bagul A, Yang B, Nicholson ML. The relative effects of warm and cold ischemic injury in an experimental model of nonheartbeating donor kidneys. *Transplantation*. Jan 15 2008;85(1):88-92.
103. Hoste EA, Kellum JA, Katz NM, Rosner MH, Haase M, Ronco C. Epidemiology of acute kidney injury. *Contributions to nephrology*. 2010;165:1-8.
104. Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, Burmania JA, Hamawy MM, Knechtle SJ. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant*. Mar 2004;4(3):432-437.
105. Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. Apr 2004;39(4):1110-1119.
106. Iniguez M, Berasain C, Martinez-Anso E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, Avila MA, Prieto J. Cardiostrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *The Journal of experimental medicine*. Dec 25 2006;203(13):2809-2815.
107. Jamieson NV. Kidney preservation times, donor types, and long-term outcomes. *Transplantation*. Feb 15 2007;83(3):255-256.
108. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. Jan 2009;130(1):41-50.
109. 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*. 2007;20(1-4):1-22.
110. Jerkic M, Miloradovic Z, Jovovic D, Mihailovic-Stanojevic N, Elena JV, Nastic-Miric D, Grujic-Adanja G, Rodriguez-Barbero A, Markovic-Lipkovski J, Vojvodic SB, Manero MV, Prieto MP, Lopez-Novoa JM. Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. Jan 2004;19(1):83-94.
111. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant*. May 2006;21(5):1231-1239.
112. Johannes T, Ince C, Klingel K, Unertl KE, Mik EG. Iloprost preserves renal oxygenation and restores kidney function in endotoxemia-related acute renal failure in the rat. *Critical care medicine*. Apr 2009;37(4):1423-1432.
113. Johannes T, Mik EG, Ince C. Nonresuscitated endotoxemia induces microcirculatory hypoxic areas in the renal cortex in the rat. *Shock (Augusta, Ga)*. Jan 2009;31(1):97-103.
114. Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy*. Dec 2009;39(12):1786-1800.
115. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2003;149:1-38.
116. Kang-Decker N, Cao S, Chatterjee S, Yao J, Egan LJ, Semela D, Mukhopadhyay D, Shah V. Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *Journal of cell science*. Feb 1 2007;120(Pt 3):492-501.
117. Karhausen J, Haase VH, Colgan SP. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. Feb 2005;4(2):256-258.
118. Kato N, Yuzawa Y, Kosugi T, Hobo A, Sato W, Miwa Y, Sakamoto K, Matsuo S, Kadomatsu K. The E-selectin ligand basigin/CD147 is responsible for neutrophil recruitment in renal ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol*. Jul 2009;20(7):1565-1576.
119. Kaushal GP, Basnakian AG, Shah SV. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney international*. Aug 2004;66(2):500-506.

120. Kaya K, Oguz M, Akar AR, Durdu S, Aslan A, Erturk S, Tasoz R, Ozyurda U. 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*. Feb 2007;31(2):290-297.
121. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci*. 1996;1:d340-357.
122. Kennedy SE, Erlich JH. Murine renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology (Carlton, Vic)*. Oct 2008;13(5):390-396.
123. Kher A, Meldrum KK, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Meldrum DR. Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research*. Sep 1 2005;67(4):594-603.
124. Kheterpal S, Tremper KK, Heung M, Rosenberg AL, Englesbe M, Shanks AM, Campbell DA, Jr. Development and validation of an acute kidney injury risk index for patients undergoing general surgery: results from a national data set. *Anesthesiology*. Mar 2009;110(3):505-515.
125. Kierdorf HP. Renal replacement therapy in acute renal failure. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. Nov 2010;135(47):2341-2346.
126. Killock DJ, Parsons M, Zarrouk M, Ameer-Beg SM, Ridley AJ, Haskard DO, Zvelebil M, Ivetic A. In Vitro and in Vivo Characterization of Molecular Interactions between Calmodulin, Ezrin/Radixin/Moesin, and L-selectin. *The Journal of biological chemistry*. Mar 27 2009;284(13):8833-8845.
127. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H, Kubo M, Yoshimura A. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity*. Nov 2002;17(5):583-591.
128. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron*. 2008;109(4):e102-107.
129. Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, Ju ST, Okusa MD. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. Aug 2009;20(8):1744-1753.
130. Klein CL, Hoke TS, Fang WF, Altmann CJ, Douglas IS, Faubel S. Interleukin-6 mediates lung injury following ischemic acute kidney injury or bilateral nephrectomy. *Kidney international*. Oct 2008;74(7):901-909.
131. Knappskog PM, Majewski J, Livneh A, Nilsen PT, Bringsli JS, Ott J, et al. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:375-83
132. Kokkinos C, Antcliffe D, Nanidis T, Darzi AW, Tekkis P, Papalois V. Outcome of kidney transplantation from nonheart-beating versus heart-beating cadaveric donors. *Transplantation*. May 15 2007;83(9):1193-1199.
133. 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*. May 2009;24(5):1631-1635.
134. Kon ZN, Brown EN, Grant MC, Ozeki T, Burris NS, Collins MJ, Kwon MH, Poston RS. 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*. Feb 2008;33(2):215-221.
135. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets*. Aug 2005;4(4):471-479.
136. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation proceedings*. Dec 2008;40(10):3279-3288.

137. Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, Katayama T, Tsutsui H, Takayama J, Ohkita M, Matsumura Y. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *European journal of pharmacology*. Jul 11 2005;517(3):232-239.
138. Kurts C. Dendritic cells: not just another cell type in the kidney, but a complex immune sentinel network. *Kidney international*. Aug 2006;70(3):412-414.
139. Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Myers BD. Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *The Journal of clinical investigation*. May 15 1998;101(10):2054-2064.
140. Laipanov Kh I, Sergienko VI, Petrosyan EA. Morphological changes in the liver during experimental modeling of acute ischemia and reperfusion of the limb. *Bulletin of experimental biology and medicine*. Jul 2007;144(1):96-99.
141. Lamagna C, Meda P, Mandicourt G, Brown J, Gilbert RJ, Jones EY, Kiefer F, Ruga P, Imhof BA, Aurrand-Lions M. 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*. Oct 2005;16(10):4992-5003.
142. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet*. Jan 29-Feb 4 2005;365(9457):417-430.
143. Lameire NH, De Vriese AS, Vanholder R. Prevention and nondialytic treatment of acute renal failure. *Current opinion in critical care*. Dec 2003;9(6):481-490.
144. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *Journal of cellular and molecular medicine*. Jul 2009;13(7):1211-1220.
145. Langer HF, Daub K, Braun G, Schonberger T, May AE, Schaller M, Stein GM, Stellos K, Buelmann A, Siegel-Axel D, Wendel HP, Aebert H, Roeken M, Seizer P, Santoso S, Wesselborg S, Brossart P, Gawaz M. Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jun 2007;27(6):1463-1470.
146. Latanich CA, Toledo-Pereyra LH. Searching for NF-kappaB-based treatments of ischemia reperfusion injury. *J Invest Surg*. Jul-Aug 2009;22(4):301-315.
147. Laudanna C, Alon R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thrombosis and haemostasis*. Jan 2006;95(1):5-11.
148. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nature medicine*. Dec 2001;7(12):1291-1297.
149. Le Dorze M, Legrand M, Payen D, Ince C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Current opinion in critical care*. Dec 2009;15(6):503-508.
150. Lee CY, Mangino MJ. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis*. Jul 2009;5(3):105-112.
151. Lee HT, Kim M, Kim M, Kim N, Billings FTt, D'Agati VD, Emala CW, Sr. Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep 2007;293(3):F713-722.
152. Leemreis JR, Versteilen AM, Sipkema P, Groeneveld AB, Musters RJ. Digital image analysis of cytoskeletal F-actin disintegration in renal microvascular endothelium following ischemia/reperfusion. *Cytometry A*. Sep 1 2006;69(9):973-978.
153. Legrand M, Almac E, Mik EG, Johannes T, Kandil A, Bezemer R, Payen D, Ince C. L-NIL prevents renal microvascular hypoxia and increase of renal oxygen consumption after ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 2009;296(5):F1109-1117.
154. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. Jul-Aug 2008;14(7-8):502-516.

155. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews*. Sep 2007;7(9):678-689.
156. Liao XX, Li X, Ma ZF, Wang LC, Du ZM, Dong YG, Ma H. [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*. Jul 2008;20(7):413-415.
157. Liao Z, Brar BK, Cai Q, Stephanou A, O'Leary RM, Pennica D, Yellon DM, Latchman DS. Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. *Cardiovascular research*. Mar 2002;53(4):902-910.
158. Liu M, Chien CC, Grigoryev DN, Gandolfo MT, Colvin RB, Rabb H. Effect of T cells on vascular permeability in early ischemic acute kidney injury in mice. *Microvascular research*. May 2009;77(3):340-347.
159. Liu SF, Ye X, Malik AB. 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*. Oct 15 1997;159(8):3976-3983.
160. Llodra Calvo JC*. Encuesta salud oral en España 2010. *RCOE* 2012;17(1):13-4. ISSN: 1138-123X
161. Loe H, Thilader E, Jensen SB. Experimental gingivitis in Man. *J Periodontol*. 1965; 36:177-87.
162. Loor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell death and differentiation*. Apr 2008;15(4):686-690.
163. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney international*. Sep 22 2010.
164. Lopez-Novoa JM. Potential role of platelet activating factor in acute renal failure. *Kidney international*. May 1999;55(5):1672-1682.
165. Lowenstein CJ. Nitric oxide regulation of protein trafficking in the cardiovascular system. *Cardiovascular research*. Jul 15 2007;75(2):240-246.
166. Ison GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 2000;3:867-72.
167. Lutz J, Thurmel K, Heemann U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation. *Journal of inflammation (London, England)*. 2010;7:27.
168. Ma A, Qi S, Chen H. Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*. Jan 2008;6(1):20-43.
169. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. May 27 2007;83(10):1289-1298.
170. Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. Oct 9 2010;411(19-20):1412-1420.
171. Mangino MJ, Tian T, Ametani M, Lindell S, Southard JH. Cytoskeletal involvement in hypothermic renal preservation injury. *Transplantation*. Feb 15 2008;85(3):427-436.
172. Marcen R, del Castillo D, Capdevila L, Fernandez-Fresnedo G, Rodrigo E, Cantarell C, Fernandez-Rodriguez A, Lopez-Oliva MO, Camps J, Aljama P, Ortuno J, Arias M. Achieving chronic kidney disease treatment targets in renal transplant recipients: results from a cross-sectional study in Spain. *Transplantation*. May 15 2009;87(9):1340-1346.
173. Marcen R, Fernandez-Rodriguez A, Rodriguez-Mendiola N, Ponte B, Galeano C, Villafruela JJ, Teruel JL, Burgos FJ, Ortuno J. Evolution of rejection rates and kidney graft

- survival: a historical analysis. *Transplantation proceedings*. Jul-Aug 2009;41(6):2357-2359.
174. Marcen R, Pascual J, Tenorio M, Ocana EJ, Teruel JL, Villafruela JJ, Fernandez M, Burgos FJ, Ortuno J. Chronic kidney disease in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings*. Nov 2005;37(9):3718-3720.
175. Marriotti A. A primer on inflammation. *Compend Contin Educ Dent*. 2004; 25 (7 Suppl 1):7-15.
176. Matesanz R, Mahillo B, Alvarez M, Carmona M. Global observatory and database on donation and transplantation: world overview on transplantation activities. *Transplantation proceedings*. Jul-Aug 2009;41(6):2297-2301.
177. Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Oct 2005;85(10):1210-1223.
178. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:2115-21.
179. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*. Jan 22-28 2005;365(9456):331-340.
180. Meldrum KK, Burnett AL, Meng X, Misseri R, Shaw MB, Gearhart JP, Meldrum DR. 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*. Feb 21 2003;92(3):293-299.
181. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *The American journal of physiology*. Dec 1992;263(6 Pt 2):H1901-1906.
182. Miner JJ, Xia L, Yago T, Kappelmayer J, Liu Z, Klopocki AG, Shao B, McDaniel JM, Setiadi H, Schmidtke DW, McEver RP. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood*. Sep 1 2008;112(5):2035-2045.
183. Mitchell T, Rotaru D, Saba H, Smith RA, Murphy MP, MacMillan-Crow LA. The mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone protects against cold storage injury of renal tubular cells and rat kidneys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. Mar 2011;336(3):682-692.
184. Mitchell T, Saba H, Laakman J, Parajuli N, MacMillan-Crow LA. Role of mitochondrial-derived oxidants in renal tubular cell cold-storage injury. *Free radical biology & medicine*. Nov 1 2010;49(8):1273-1282.
185. Molina A, Ubeda M, Escribese MM, Garcia-Bermejo L, Sancho D, Perez de Lema G, Liano F, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Mampaso F. Renal ischemia/reperfusion injury: functional tissue preservation by anti-activated β 1 integrin therapy. *J Am Soc Nephrol*. Feb 2005;16(2):374-382.
186. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney international*. Aug 2004;66(2):496-499.
187. Molls RR, Savransky V, Liu M, Bevans S, Mehta T, Tudor RM, King LS, Rabb H. Keratinocyte-derived chemokine is an early biomarker of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 2006;290(5):F1187-1193.
188. Moreira P, Sa H, Figueiredo A, Mota A. Delayed renal graft function: risk factors and impact on the outcome of transplantation. *Transplantation proceedings*. Jan-Feb 2011;43(1):100-105.
189. Moss NC, Tang RH, Willis M, Stansfield WE, Baldwin AS, Selzman CH. Inhibitory kappa B kinase-beta is a target for specific nuclear factor kappa B-mediated delayed

- cardioprotection. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. Nov 2008;136(5):1274-1279.
190. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology*. Jun 2003;24(6):327-334.
 191. Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, Waddell TK, Hwang D, Keshavjee S, Liu M. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. *Shock (Augusta, Ga)*. Aug 2007;28(2):227-238.
 192. Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current opinion in pharmacology*. Aug 2006;6(4):379-386.
 193. Myers SI, Wang L, Liu F, Bartula LL. Oxygen-radical regulation of renal blood flow following suprarenal aortic clamping. *J Vasc Surg*. Mar 2006;43(3):577-586.
 194. Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *The Journal of experimental medicine*. Mar 14 2011;208(3):417-420.
 195. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, Seki E, Sato S, Takeuchi O, Takeda K, Akira S, Yamanishi K, Kawase I, Nakanishi K, Kishimoto T. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*. Nov 2002;17(5):677-687.
 196. Natal C, Fortuno MA, Restituto P, Bazan A, Colina I, Diez J, Varo N. Cardiotrophin-1 is expressed in adipose tissue and upregulated in the metabolic syndrome. *American journal of physiology*. Jan 2008;294(1):E52-60.
 197. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. Jun 2008;19(6):1106-1115.
 198. Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walz T, Springer TA. Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity*. Oct 2006;25(4):583-594.
 199. Noguchi K, Ishikawa I, the roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2007; 43:85-101.
 200. Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jan 2008;294(1):F264-271.
 201. Orlova VV, Chavakis T. Regulation of vascular endothelial permeability by junctional adhesion molecules (JAM). *Thrombosis and haemostasis*. Aug 2007;98(2):327-332.
 202. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Molecular immunology*. Apr 2007;44(10):2497-2506.
 203. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. Nov 22 1999;18(49):6853-6866.
 204. Patel NS, Cuzzocrea S, Collino M, Chatterjee PK, Mazzon E, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C. The role of cyclooxygenase-2 in the rodent kidney following ischaemia/reperfusion injury in vivo. *European journal of pharmacology*. May 7 2007;562(1-2):148-154.
 205. Peng SL, Gu X, Dai CL, 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*. Jul 2007;5(4):427-431.
 206. Pennica D, Shaw KJ, Swanson TA, Moore MW, Shelton DL, Zioncheck KA, Rosenthal A, Taga T, Paoni NF, Wood WI. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *The Journal of biological chemistry*. May 5 1995;270(18):10915-10922.

207. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental medicine*. Nov 27 2006;203(12):2569-2575.
208. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PloS one*. 2008;3(2):e1649.
209. Poggio ED, Batty DS, Flechner SM. Evaluation of renal function in transplantation. *Transplantation*. Jul 27 2007;84(2):131-136.
210. Polat KY, Aydinli B, Polat O, Aydin U, Yazici P, Ozturk G, Gundogdu C, Kiziltunc A. The protective effect of aprotinin and alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation proceedings*. Jan-Feb 2008;40(1):63-68.
211. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Critical care medicine*. Mar 2009;37(3):1101-1120.
212. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine*. Jul 2009;37(7 Suppl):S186-202.
213. Pompilio G, Polvani GL, Rossoni G, Porqueddu M, Berti F, Barajon I, Petruccioli MG, Guarino A, Aguggini G, Biglioli P, Sala A. Effects of warm ischemia on valve endothelium. *The Annals of thoracic surgery*. Mar 1997;63(3):656-662.
214. Prakash J, de Borst MH, Lacombe M, Opdam F, Klok PA, van Goor H, Meijer DK, Moolenaar F, Poelstra K, Kok RJ. Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion-induced injury. *J Am Soc Nephrol*. Nov 2008;19(11):2086-2097.
215. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Roelofs JJ, van der Poll T, Florquin S, Leemans JC. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PloS one*. 2008;3(10):e3596.
216. Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl*. Oct 2004(91):S56-61.
217. Rich PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society transactions*. Dec 2003;31(Pt 6):1095-1105.
218. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. Jun 5 2008;453(7196):807-811.
219. Roelofs JJ, Rouschop KM, Leemans JC, Claessen N, de Boer AM, Frederiks WM, Lijnen HR, Weening JJ, Florquin S. Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. Jan 2006;17(1):131-140.
220. Rosen S, Stillman IE. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol*. May 2008;19(5):871-875.
221. Rouschop KM, Leemans JC. Ischemia-reperfusion treatment: opportunities point to modulation of the inflammatory response. *Kidney international*. Jun 2008;73(12):1333-1335.
222. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology*. Jun 2006;290(6):H2247-2256.
223. Saba H, Munusamy S, Macmillan-Crow LA. Cold preservation mediated renal injury: involvement of mitochondrial oxidative stress. *Renal failure*. 2008;30(2):125-133.
224. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Preissner KT, Chavakis T, Santoso S. The neutrophil-specific antigen

- CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *The Journal of biological chemistry*. Aug 10 2007;282(32):23603-23612.
225. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of trasplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 2004;287(2):F181-187.
226. Salahudeen AK. Cold ischemic injury of trasplanted organs: some new strategies against an old problem. *Am J Transplant*. Jan 2004;4(1):1.
227. Sánchez-Conde P, Rodriguez-Lopez JM, Nicolas JL, Lozano FS, Garcia-Criado FJ, Cascajo C, Gonzalez-Sarmiento R, Muriel C. The comparative abilities of propofol and sevoflurane to modulate inflammation and oxidative stress in the kidney after aortic cross-clamping. *Anesthesia and analgesia*. Feb 2008;106(2):371-378, table of contents.
228. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature immunology*. Apr 2004;5(4):393-400.
229. Schmidt-Ott KM, Yang J, Chen X, Wang H, Paragas N, Mori K, et al. Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1993–2002.
230. Schmitz V, Schaser KD, 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*. 2008;40(1):19-25.
231. Schram MT, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. Apr 2005;37 Suppl 1:49-55.
232. Schreinemachers MC, Doorschodt BM, Florquin S, Tolba RH. Comparison of preservation solutions for washout of kidney grafts: an experimental study. *Transplantation proceedings*. Dec 2009;41(10):4072-4079.
233. Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grotzinger J, et al. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem* 2003;278:9528–35.
234. Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, Kemp-Harper BK, Drummond GR. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular research*. Jul 15 2007;75(2):349-358.
235. Senaldi G, Stolina M, Guo J, Faggioni R, McCabe S, Kaufman SA, et al. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* 2002;168:5690–8.
236. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11458–63.
237. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, von Andrian UH, Alon R. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature immunology*. May 2005;6(5):497-506.
238. Shaw SK, Ma S, Kim MB, Rao RM, Hartman CU, Froio RM, Yang L, Jones T, Liu Y, Nusrat A, Parkos CA, Luscinskas FW. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *The Journal of experimental medicine*. Dec 20 2004;200(12):1571-1580.
239. Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:132–8.
240. Shimoda N, Fukazawa N, Nonomura K, Fairchild RL. Cathepsin g is required for sustained inflammation and tissue injury after reperfusion of ischemic kidneys. *The American journal of pathology*. Mar 2007;170(3):930-940.

241. Simmons EM, Himmelfarb J, Sezer MT, Chertow GM, Mehta RL, Paganini EP, Soroko S, Freedman S, Becker K, Spratt D, Shyr Y, Ikizler TA. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney international*. Apr 2004;65(4):1357-1365.
242. Singh P, Deng A, Weir MR, Blantz RC. The balance of angiotensin II and nitric oxide in kidney diseases. *Current opinion in nephrology and hypertension*. Jan 2008;17(1):51-56.
243. Snoeijs MG, van Heurn LW, Buurman WA. Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*. Apr 2010;15(2):190-199.
244. Song J, Zhang YW, Yao AH, Yu Y, Hua ZY, Pu LY, Li GQ, Li XC, Zhang F, Sheng GQ, Wang XH. Adenoviral cardiostrophin-1 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat small-for-size liver transplantation model. *Transpl Int*. Apr 2008;21(4):372-383.
245. Srisawat N, Hoste EE, Kellum JA. Modern classification of acute kidney injury. *Blood purification*. 2010;29(3):300-307.
246. Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in lipid research*. Jul 23 2010.
247. Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Dec 1971;25(6):635-643.
248. Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney international*. Oct 2002;62(4):1160-1170.
249. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvascular research*. Jan 2009;77(1):4-7.
250. Tain YL, Muller V, Szabo A, Dikalova A, Griendling K, Baylis C. Lack of long-term protective effect of antioxidant/anti-inflammatory therapy in transplant-induced ischemia/reperfusion injury. *American journal of nephrology*. 2006;26(3):213-217.
251. Takahashi T, Nishizawa Y, Hato F, Shintaku H, Maeda N, Fujiwara N, Inaba M, Kobayashi K, Kitagawa S. Neutrophil-activating activity and platelet-activating factor synthesis in cytokine-stimulated endothelial cells: reduced activity in growth-arrested cells. *Microvascular research*. Jan 2007;73(1):29-34.
252. Tanimoto K, Saito Y, Hamanaka I, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Kawakami R, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi Y, Shirakami G, Fukuda K, Yoshimura A, Nakao K. SOCS1/JAB likely mediates the protective effect of cardiostrophin-1 against lipopolysaccharide-induced left ventricular dysfunction in vivo. *Circ J*. Nov 2005;69(11):1412-1417.
253. Taylor CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *The Journal of physiology*. Sep 1 2008;586(Pt 17):4055-4059.
254. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *The Biochemical journal*. Jan 1 2008;409(1):19-26.
255. Thurman JM, Lenderink AM, Royer PA, Coleman KE, Zhou J, Lambris JD, Nemenoff RA, Quigg RJ, Holers VM. C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. *J Immunol*. Feb 1 2007;178(3):1819-1828.
256. Thurman JM, Ljubanovic D, Royer PA, Kraus DM, Molina H, Barry NP, Proctor G, Levi M, Holers VM. Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *The Journal of clinical investigation*. Feb 2006;116(2):357-368.
257. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. Apr 2007;123(1):7-13.
258. Trivedi H. Cost implications of caring for chronic kidney disease: are interventions cost-effective? *Advances in chronic kidney disease*. May 2010;17(3):265-270.

259. Turan R, Yagmurdu H, Kavutcu M, Dikmen B. Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *European journal of anaesthesiology*. Feb 2007;24(2):185-189.
260. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*. 2009;27:693-733.
261. Vallon V, Osswald H. Adenosine receptors and the kidney. *Handbook of experimental pharmacology*. 2009(193):443-470.
262. 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*. Sep 1 2007;13(17):4956-4959.
263. Vera T, Henegar JR, Drummond HA, Rimoldi JM, Stec DE. Protective effect of carbon monoxide-releasing compounds in ischemia-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. Apr 2005;16(4):950-958.
264. Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in cell biology*. Jan 2009;19(1):8-15.
265. Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunological reviews*. Aug 2007;218:178-196.
266. Vo PA, Lad B, Tomlinson JA, 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*. Feb 25 2005;280(8):7236-7243.
267. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine*. Oct 5 2000;343(14):1020-1034.
268. von Hundelshausen P, Koenen RR, Weber C. Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation*. Jan 2009;16(1):84-96.
269. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. Jun 1 2008;111(11):5271-5281.
270. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*. Oct 1 2005;106(7):2252-2258.
271. Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell research*. Jan 2010;20(1):24-33.
272. Wang Y, John R, Chen J, Richardson JA, Shelton JM, Bennett M, Zhou XJ, Nagami GT, Zhang Y, Wu QQ, Lu CY. IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. Jul 2009;20(7):1544-1555.
273. Watson CJ, Wells AC, Roberts RJ, Akoh JA, Friend PJ, Akyol M, Calder FR, Allen JE, Jones MN, Collett D, Bradley JA. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *Am J Transplant*. Sep 2010;10(9):1991-1999.
274. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature reviews*. Jun 2007;7(6):467-477.
275. Wen X, Murugan R, Peng Z, Kellum JA. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective. *Contributions to nephrology*. 2010;165:39-45.
276. 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*. Jul 2010;86(1017):405-408.

277. Woroniecki R, Ferdinand JR, Morrow JS, Devarajan P. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. Feb 2003;284(2):F358-364.
278. Yang L, Kowalski JR, Yacono P, Bajmoczy M, Shaw SK, Froio RM, Golan DE, Thomas SM, Luscinskas FW. Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. *J Immunol*. Nov 1 2006;177(9):6440-6449.
279. Yang N, Luo M, Li R, Huang Y, Zhang R, Wu Q, Wang F, Li Y, Yu X. Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat. *Nephrol Dial Transplant*. Jan 2008;23(1):91-100.
280. Yao L, Kohno M, Noma T, Murakami K, Tsuji T, Yu Y, Ohmori K, Mizushige K, Fujita N, Hibi N. Acute effect of human cardiotrophin-1 on hemodynamic parameters in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats. *Hypertens Res*. Nov 2001;24(6):717-721.
281. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. Mar 2009;24(3):1039-1047.
282. Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J, Jr., Chien KR. 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*. Nov 2001;108(10):1459-1467.
283. Yin M, Currin RT, Peng XX, Mekeel HE, Schoonhoven R, Lemasters JJ. Different patterns of renal cell killing after warm and cold ischemia. *Renal failure*. Mar 2002;24(2):147-163.
284. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews*. Jun 2007;7(6):454-465.
285. Yost CC, Weyrich AS, Zimmerman GA. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie*. Jun 2010;92(6):692-697.
286. Yu Z, Zhang W, Kone BC. 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*. Oct 1 2002;367(Pt 1):97-105.
287. Zarbock A, Singbartl K, Kellum JA. Evidence-based renal replacement therapy for acute kidney injury. *Minerva anesthesiologica*. Mar 2009;75(3):135-139.
288. Zhang W, Edwards A. A model of nitric oxide túbulovascular cross talk in a renal outer medullary cross section. *Am J Physiol Renal Physiol*. Feb 2007;292(2):F711-722.
289. Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, Kubo N, Wong A, Min LR, Budohn ME, Garcia B, Jevnikar AM, Min WP. Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. *The American journal of pathology*. Oct 2008;173(4):973-980.
290. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular research*. May 1 2006;70(2):181-190.