



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

Facultad de Medicina y Grado en Medicina

**“ALTERACIONES MORFOFUNCIONALES
EN PROCESOS QUE CURSAN CON
FIBROSIS RENAL”**

Trabajo de Fin de Grado

Alumno: Ana Carolina Vaz Pinto

Tutor: Prof. Dr. D. Miguel A. Arévalo Gómez

2017





ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. CUATRO FASES DEL PROCESO FIBRÓTICO.....	6
2.1.1. <i>Fase de daño y activación celular.....</i>	6
2.1.2. <i>Fase de señalización fibrogénica.....</i>	8
2.1.3. <i>Fase fibrogénica.....</i>	9
2.1.4. <i>Fase destructiva.....</i>	10
2.2. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR IMPLICADOS EN LA PATOGÉNESIS RENAL.....	11
2.2.1. <i>TGF-β.....</i>	11
2.2.2. <i>ROS.....</i>	13
2.2.3. <i>Angiotensina II.....</i>	13
2.2.4. <i>Endogлина.....</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	16
5.2. DESARROLLO DEL ESTUDIO.....	16
5.2.1. <i>Realización de la ligadura unilateral de uréter.....</i>	16
5.2.2. <i>Obtención de las muestras para el estudio.....</i>	16
6. RESULTADOS.....	17
6.1. HEMATOXILINA - EOSINA.....	17
6.2. TRICRÓMICO DE MASSON.....	18
6.3. INMNOHISTOQUÍMICA PARA FIBRONECTINA.....	19
6.4. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA COLÁGENO I.....	20
7. DISCUSIÓN.....	21
8. CONCLUSIONES.....	22
9. BIBLIOGRFÍA.....	23



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ag II: Angiotensina II

AT1: Receptor 1 de Angiotensina

EDA: Etilendiamina

EMT: Transición Epitelio-Mesénquimal

Eng: Endogлина

ERC: Enfermedad Renal Crónica

MEC: Matriz Extracelular

MMPs: Metaloproteinasas de Matriz

OUU: Obstrucción Ureteral Unilateral

PAI-1: Inhibidor de Activador de Plasminógeno-1

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SMA: Actina de Músculo Liso – α

TFG: Tasa de Filtración Glomerular

TFG- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

T β RI: Receptor I del TFG- β

T β RII: Receptor II del TFG- β

VTGF: Factor de Crecimiento del Tejido Conjuntivo



1. RESUMEN

Introducción: El riñón puede verse afectado por múltiples patologías, que cuando actúan de manera crónica, y el proceso se perpetúa en el tiempo, origina un daño histológico y funcional crónico, con la aparición de fibrosis, llevando todo ello al fracaso renal. La fibrosis renal se define como la acumulación de cantidades anormales y excesivas de matriz extracelular en el riñón.

El factor clave que desencadena el proceso de fibrosis es el TGF- β 1, un factor de crecimiento que induce directamente en los fibroblastos y las células mesangiales renales la transcripción de proteínas profibróticas. Indirectamente promueve también la acumulación de matriz al disminuir la síntesis de proteasas. Igualmente, origina la proliferación de las células infiltradas y residentes.

Material y métodos: Se llevó a cabo una revisión bibliográfica usando distintas fuentes de información y dos bases de datos, Pubmed y Medline, de donde se recogió información de los últimos años. Además, hemos completado el trabajo con un estudio experimental empleando ratones de la cepa C57BL7/6J, a los que se les practicó una ligadura unilateral de uréter, modelo experimental bien conocido que desarrolla fibrosis,

Objetivos: Los objetivos del trabajo han sido realizar una actualización bibliográfica del proceso de fibrosis renal y comprobar con un estudio histológico e inmunohistoquímico las diferentes respuestas morfológicas de los tejidos renales, sujetas a un proceso profibrótico.

Resultados: El estudio experimental efectuado en los animales, reveló las características típicas de una nefropatía obstructiva, como son las alteraciones túbulo-intersticiales con aparición de fibrosis.

Discusión: La revisión realizada constata la relevancia de los procesos fibróticos que afectan al riñón tras sufrir este una agresión continuada y que desembocan en un fracaso de la víscera. Los procesos histológicos que suceden los hemos podido corroborar en el estudio experimental realizado en ratones.

Conclusiones: El incremento de la matriz extracelular renal sucede por un incremento anómalo de su producción y la disminución de su degradación. Todo ello debido a la activación de moléculas como TGF- β 1 que desencadenan la producción de tejido fibroso. Los estudios experimentales, permiten constatar estos fenómenos.



2. INTRODUCCIÓN

Los riñones tienen gran importancia en el mantenimiento de la homeostasia del organismo, y para ello, disponen de una arquitectura única, compuesta fundamentalmente por nefronas, intersticio y vasos sanguíneos, que les permite realizar tareas como la regularización del equilibrio hidro-electrolítico del cuerpo, la filtración y excreción de productos del catabolismo celular y, además, es una glándula endocrina. Los traumatismos, infecciones, isquemia o algunas enfermedades sistémicas, pueden afectar a estas estructuras renales y llevar a una disfunción renal.(1)

Ante una lesión renal, los mecanismos de reparación tisular responden con un aumento de la deposición de componentes de matriz extracelular, en proceso de cicatrización normal. Si este proceso se perpetúa, se favorece la producción de matriz extracelular en exceso, el tejido renal dañado es sustituido por un tejido acelular rico en colágeno, formando un tejido cicatricial, que disminuye la funcionalidad del riñón. Estas lesiones en el riñón se caracterizan por glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial con atrofia tubular, hiperplasia de la íntima vascular y, finalmente: fibrosis renal generalizada(1), que puede ser definida como la acumulación de cantidades anormales y excesivas de colágeno, fibronectina y otras moléculas fibrogénicas en el riñón.(2)

La fibrosis renal es, por consiguiente, un proceso en el que la estructura y la función renal se alteran progresivamente debido a la excesiva deposición de componentes de la matriz extracelular (MEC) tanto en los glomérulos (glomeruloesclerosis) como en el intersticio (fibrosis túbulo-intersticial), por aumento de su síntesis y disminución de su degradación. La fibrosis es la vía común final para todas las enfermedades renales que conducen a insuficiencia renal crónica, independientemente de cual sea la causa que la origine, que llevará a la insuficiencia renal progresiva y sus complicaciones.(3)

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología que afecta a casi el 10% de la población(4) y puede definirse como un daño renal establecido durante 3 o más meses y confirmado por marcadores de daño renal o biopsia renal, con o sin disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG), o una disminución de la TFG con valores por debajo de 60 mL/min/1.73m² durante 3 o más meses, con o sin daño renal. El daño renal en los pacientes con enfermedad renal crónica se determina mediante marcadores de daño renal, como son la proteinuria, la presencia de sedimentos urinarios anormales, las medidas



químicas en sangre y orina anormales. Una biopsia renal y el consiguiente análisis histopatológico, confirmará el diagnóstico.(4,5)

Generalmente, la fibrosis renal es debida a una inflamación crónica, de etiología múltiple, y se caracteriza por la presencia de atrofia cortical y tubulointerstitial que reducen el tamaño renal. En las patologías fibróticas renales, el proceso normal de recambio de las moléculas de la matriz extracelular se encuentra alterado por la presencia de determinados factores de crecimiento y citosinas hormonas y otras moléculas, que inducen la síntesis de componentes de la matriz e inhiben los mecanismos que controlan su degradación.(5)

Los procesos fibróticos que afectan al riñón los podemos separar en dos grandes grupos: Nefropatías intersticiales y glomerulopatías.(6) En fases tempranas, la pérdida de la filtración glomerular ocurre lentamente y el efecto más destacado es la alteración de la función tubular.(7,8) En contraste con la enfermedad glomerular, la hipertensión se desarrolla tardíamente y ocurre tras un descenso significativo de la TFG.(9)

Las lesiones tubulointersticiales afectan tanto a la corteza como a la médula. Si bien las lesiones primarias ocurren en túbulo e intersticio. Por último, mencionar que muchas de las enfermedades desarrollan anomalías estructurales y funcionales en el glomérulo. Las células epiteliales tubulares son un componente integrante de la patogénesis de estas enfermedades por su participación en los cambios progresivos intersticiales.(10,8)

Se caracterizan por el aumento del volumen intersticial debido, fundamentalmente, a la fibrosis y a los distintos grados de infiltración de células inflamatorias crónica.(11) Es una reacción inflamatoria que se perpetúa o que escapa a los mecanismos de control en la defensa normal frente al daño.(12)

2.1. El Proceso Fibrótico sigue cuatro fases:

2.1.1. Fase de daño y activación celular

Para las células tubulares epiteliales el daño inicial puede ser directo, como ocurre en caso de obstrucción de vías urinarias o en condiciones nefrotóxicas, o indirecto, como consecuencia de isquemias secundarias a enfermedades vasculares, daño glomerular o incremento en la carga de reabsorción tubular.(13)



El proceso fibrótico se inicia en el epitelio tubular que secretando quimiocinas, las cuales atraen a más células mononucleares, y factores de crecimiento (entre ellos el Factor de Crecimiento Transformante Beta - TFG- β) que a su vez estimulan a los fibroblastos intersticiales. El factor inicial desencadenante también puede inducir en las células tubulares la producción de una amplia variedad de moléculas inflamatorias o profibróticas, y la síntesis de proteínas de matriz, tanto en la membrana basal como en el intersticio.(13) En fases posteriores los cambios celulares del epitelio tubular contribuyen al daño crónico de la función renal. Las células tubulares responden al estímulo inicial proliferando o hipertrofiándose, pero, a medida que progresa la enfermedad, pueden entrar en apoptosis o sufrir la llamada transición epitelio-mesénquima (EMT) en la que se transforman en miofibroblastos. La EMT es el proceso mediante el cual las células epiteliales renales experimentan una conversión fenotípica que da lugar a miofibroblastos productores de matriz extracelular en respuesta a diversas lesiones renales.(2) Sin embargo, últimamente han surgido estudios discrepantes sobre la participación de la EMT en estos procesos.(1,14)

Respecto a las células infiltradas, pueden proceder de la proliferación in situ de los macrófagos intersticiales residentes(15) pero la mayoría son células que han migrado desde la sangre al intersticio a través del endotelio capilar. Se cree que el estímulo para este flujo se encuentra en las moléculas quimioatrayentes secretadas a través de la membrana basolateral de los túbulos o que pasan a través de las células tubulares desde la luz al intersticio directamente. Esto amplía la respuesta inflamatoria, al producir más moléculas proinflamatorias que pueden incrementar el daño tubular y reclutar más células inflamatorias o estimular la proliferación de fibroblastos, la migración o la síntesis de colágeno.(16)

La mayoría de las células infiltradas son linfocitos T y, en menor medida, células agresoras naturales. La acumulación intersticial de monocitos produce una gran cantidad de citosinas quimioatrayentes, que a su vez contribuyen a la amplificación de la respuesta inflamatoria(16). En el parénquima renal también se reclutan mastocitos y macrófagos que participan en el daño proteolítico y contribuyen al proceso fibrogénico como fuente de moléculas profibróticas.(12)



Las células infiltradas y el tejido fibroso ocupan de forma gradual el espacio intersticial dando lugar a una fibrogénesis irreversible al reemplazar por nueva matriz el espacio dejado por la atrofia tubular y el daño parenquimatoso.(17)

Los fibroblastos intersticiales se activan en respuesta al daño estimulado por diversas moléculas que proceden de células tubulares estimuladas, leucocitos o de los propios fibroblastos y proliferan y sintetizan matriz extracelular.(13) La matriz extracelular puede ejercer un control sobre los fibroblastos mediante un sistema bidireccional de integrinas. Y una de las citocinas clave involucrada en la estimulación de los fibroblastos es TGF- β . (11)

En el riñón alterado, los miofibroblastos se agregan alrededor de los túbulos dañados y de las arteriolas, siendo los miofibroblastos los mayores responsables del exceso de producción de matriz extracelular. La oclusión microvascular, debida a la fibrosis, y la constricción de los vasos, por la acción de los miofibroblastos y los agentes vasoactivos, provocan isquemia tisular, alteraciones en la hemodinámica glomerular y aumento en la producción de Angiotensina II (Ag II), lo que amplifica la fibrogénesis y perpetúa el daño.(11)

2.1.2. Fase de señalización fibrogénica

Debido a los acontecimientos celulares inducidos por el daño inicial, se sintetizan una serie de moléculas que se unen a sus receptores correspondientes en las células tubulointersticiales, y producen la acumulación de matriz en la membrana basal y en el espacio intersticial.(18)

El papel fundamental del TGF- β en el desarrollo de la fibrosis se caracteriza por su activación y su unión a receptores específicos de membrana celular, que desencadenan una serie de acontecimientos que promueven la fibrosis. TGF- β contribuye directamente a la acumulación de matriz extracelular estimulando la transcripción de genes que expresan componentes de la matriz como colágenos tipo I, III y IV, fibronectina y laminina, a la vez que promueve la acumulación de matriz al aumentar la producción de inhibidores de proteasas y disminuir la actividad de las mismas. (11,19,20)



TGF- β también estimula la migración y proliferación de fibroblastos y su proliferación a miofibroblastos, la quimiotaxis de monocitos y macrófagos y los procesos de EMT.(21)

Casi todos los modelos de fibrosis renal, humanos o experimentales, tienen como denominador común la sobreexpresión de TGF- β .(22) La Ag II estimula la producción de TGF- β por células mesangiales, células tubulares renales y fibroblastos.(21) Se ha demostrado que la inducción de TGF- β mediada por Ag II juega un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. La endotelina-1 aumenta la expresión de TGF- β y promueve la fibrosis por estimulación directa de síntesis de matriz extracelular y por su capacidad de disminuir la actividad colagenasa. El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) está implicado en la fibrogénesis intersticial renal debido a su capacidad para transformar fibroblastos en miofibroblastos.(21)

2.1.3. Fase fibrogénica

La cicatriz intersticial está constituida por proteínas y glicoproteínas normales de la matriz intersticial (colágenos I, III, V, VII, XV, fibronectina), componentes que normalmente están limitados a las membranas basales tubulares (colágeno IV y laminina) y proteínas sintetizadas de novo como tenascina, algunas isoformas de fibronectina y ciertas cadenas de laminina.(21) La primera en aparecer tras el daño es la fibronectina, que es producida por fibroblastos y miofibroblastos, células mesangiales, macrófagos y células epiteliales tubulares (23) y gracias a sus propiedades quimiotácticas y adhesivas interviene en el reclutamiento de los fibroblastos y la deposición de otras proteínas extracelulares.(24)

Hay que tener en cuenta que en estadios iniciales la cicatriz intersticial constituye una estructura muy inestable y susceptible de ser degradado, pero con el transcurso del tiempo, los puentes de unión que se establecen le aportan estabilidad y resistencia a la actividad de las proteasas.(25)

Las regiones perivasculares y periglomerulares de la corteza están implicadas en los procesos tempranos de la enfermedad y, a medida que esta progresa también lo hace el grosor de su membrana basal.(13) En fases tardías además se observa una atrofia progresiva de los túbulos dañados y una contracción de los miofibroblastos, que parecen contribuir en gran medida al aumento descontrolado de tejido fibroso.(17)



Al mismo tiempo, como ya habíamos mencionado, en el proceso fibrótico se acelera la síntesis de componentes de matriz, se inactiva la maquinaria enzimática encargada de su degradación: de las Metaloproteinasas de Matriz (MMPs), que además de degradar estimulan la activación y la proliferación de la cascada dependiente de plasmina, etc.(26)

2.1.4. Fase destructiva

La acumulación y la expansión de los componentes de la matriz en el espacio intersticial tiene un efecto destructivo sobre el parénquima renal y, por tanto, sobre su función. Los túbulos renales (80% del volumen renal) se ven atrofiados como consecuencia de la fibrogénesis que ellos mismos han contribuido a iniciar.(21)

La apoptosis va asociada a la fibrosis. La isquemia tubular probablemente favorece la muerte celular por apoptosis y/o necrosis ya que la matriz intersticial fibrótica, además de aislar a los túbulos de su aporte de oxígeno, obstruye los capilares peritubulares postglomerulares. La pérdida de los túbulos y la disminución del área de superficie de los capilares peritubulares son una característica histopatológica de la enfermedad renal progresiva asociada a la pérdida de la función renal.(25)

La patogénesis de la enfermedad renal crónica se caracterizará, por tanto, por la pérdida progresiva de la función renal y la acumulación de matriz extracelular en el glomérulo y en el intersticio tubular, lo que originará una fibrosis generalizada.(5)

Se ha analizado la composición de la matriz extracelular en el glomérulo esclerosado mediante inmunohistoquímica, mostrando un cambio en la distribución y composición de la matriz glomerular en la progresión de la enfermedad.(27) En estadios iniciales de afectación glomerular no se detectan colágenos I y III pero en fases más avanzadas, el mesangio presenta una marcada tinción de colágenos IV y VI, laminina y fibronectina, extendiéndose el área ocupada por fibronectina a las paredes de los capilares glomerulares. A medida que la glomerulosclerosis progresa disminuye la intensidad de todos ellos y se observa la expresión focal de colágenos I y III en los glomérulos esclerosados y hialinos y en zonas adyacentes. La intensidad de tinción es mayor en casos de cápsulas de Bowman gravemente dañadas.(28)



Con el avance de la enfermedad también se detecta muerte celular en el glomérulo y la matriz va sustituyendo el espacio dejado por las células del parénquima renal.(29) La progresión del daño glomerular por acúmulo excesivo de matriz extracelular implica la disminución del diámetro de los capilares glomerulares y la TFG, que finalmente origina la aparición de insuficiencia renal crónica.(30)

Existe una gran variedad de mecanismos implicados en el daño. El daño hemodinámico origina alteraciones en las células mesangiales por aumento de la filtración, la hipertensión y la distensión glomerular.(31)

2.2. Mecanismos de señalización extracelular implicados en la patogénesis renal

2.2.1. TGF- β

Como hemos visto, un factor clave, en el proceso de la fibrosis renal es el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β), que es una citoquina multifuncional, que se expresa fundamentalmente durante el desarrollo embrionario y se sobreexpresa en diversas situaciones patológicas en el adulto, como ocurre en las enfermedades renales, y regula un amplio espectro de procesos celulares tales como crecimiento, diferenciación, apoptosis, reparación de heridas y la patogénesis de la fibrosis.(32) En los mamíferos hay 3 isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 y en el humano, la TGF- β 1 es la isoforma más significativa, y es el regulador principal de la recuperación tisular por varios estímulos.(2,5,32,33)

El mecanismo fundamental detrás de la fibrosis renal inducida por TGF- β es la transición epitelial a mesenquimal (EMT) que conduce a cambios morfológicos y fenotípicos de las células epiteliales tubulares que resulta en el desprendimiento de estas células tubulares de la membrana basal tubular y la migración hacia el intersticio.(2)

El proceso de transición epitelial a células mesenquimales tiene múltiples pasos, y uno de los más llamativos es el que provoca que, las células epiteliales pierdan su marcador celular específico (E-cadherina) y adquieren un fenotipo mesenquimal o miofibroblástico, expresan actina de musculo liso- α (SMA).(32,34)

TGF- β 1 promueve la fibrosis renal a través de acciones directas e indirectas a varios tipos de células. El mecanismo más ampliamente estudiado es el efecto directo de TGF- β 1 en



fibroblastos y células mesangiales renales, induciendo su proliferación, migración, activación y la transcripción de moléculas profibróticas, como colágeno, fibronectina, y el inhibidor de activador del plasminógeno-1 (PAI-1). TGF- β 1 puede también inducir una respuesta indirecta, como inducir la apoptosis de células endoteliales y podocitos y puede promover una fibrosis intersticial y glomerular.(32)

La vía de señalización comienza cuando el ligando activo de TGF- β se une a su receptor de tipo II (T β RII) que recluta el correspondiente receptor de tipo I de TGF- β (T β RI). Ambos receptores son necesarios para la transducción de la señal.(32)

Aunque el TGF- β 1 tiene un papel dominante en la iniciación y progresión de la fibrosis renal, sus proteínas Smad efectoras (Smad2, Smad3 y Smad4) ejercen funciones distintas e incluso opuestas en la regulación de la fibrosis. Las Smads son proteínas citoplasmáticas que actúan como efectores intracelulares (a nivel del núcleo), teniendo un papel fundamental en la regulación de la transcripción de genes de colágeno tipo I y III. (3,32)

Resumiendo, el daño tisular la liberación local de altas concentraciones de TGF- β 1 y del PDGF, y la activación de TGF- β 1 latente unido a la matriz extracelular. Los neutrófilos, células T, monocitos y fibroblastos llegan al lugar de la lesión atraídos por el potente estímulo quimiotáctico que supone el TGF- β . La citosina TGF- β 1 induce directamente la transcripción de proteínas de la matriz, al activar a los fibroblastos que incrementan la síntesis de colágeno tipo I, III y IV, fibronectina, laminina, e indirectamente promueve la acumulación de matriz al disminuir la síntesis de proteasas e incrementar la producción de inhibidores de proteasas. TGF- β 1 también induce la proliferación de las células infiltradas y residentes, y modula la expresión de integrinas de superficie celular aumentando la interacción célula-matriz y promoviendo el ensamblaje de las macromoléculas de la matriz.(2,19,32)

El incremento de los colágenos de tipo I y III inducido por TGF- β 1 en los procesos de cicatrización, contribuye de manera importante a la reparación de la matriz dañada por su capacidad para formar fibras, también induce la síntesis de nuevas proteínas de matriz que sólo se expresan durante el desarrollo o en la reparación tisular, como la isoforma etilendiamina (EDA) de fibronectina y la glicoproteína tenascina expresadas en las cicatrices del tejido dañado, pero no en el tejido adyacente. Ambas glicoproteínas facilitan



la unión de nuevas macromoléculas de matriz y modulan la migración, la proliferación y la integración de distintos tipos celulares en el lugar del daño. (35)

Para que ocurra la fibrosis, además de la liberación del TFG- β , son requeridas otras células inflamatorias, inducción de especies reactivas al oxígeno (ROS), activación del sistema de complemento (C5b-9), otras citosinas inflamatorias, y activación inhibidora de las MMP, moléculas vasoactivas (como angiotensina II y endotelina I), y células de interacción extracelular (como las integrinas, ácido hialurónico). Todos estos factores se complementan entre si y contribuyen al desarrollo de la fibrosis renal.(2)

2.2.2. ROS

Otro papel fundamental es el que determinan los ROS, que son compuestos derivados de la molécula de oxígeno por reducción química parcial. En condiciones normales, juegan un rol fisiológicamente importante pero, al mismo tiempo, pueden ejercer efectos tóxicos. Todas las ROS son producidas como consecuencia del metabolismo y son esenciales para la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, un proceso crítico para el sistema inmunológico. También son cruciales en la transducción de señales necesarias para la comunicación y función de las células. El aumento de la ROS activa vías relacionadas con apoptosis celular e inflamación e induce la síntesis de más moléculas profibróticas.(26)

En este aumento de matriz celular existe un punto de no retorno en el que la reparación ya no es posible y el órgano se dirige hacia el colapso.

2.2.3. Angiotensina II

A través de la unión a los receptores AT1, la Ag II induce contracción celular, hipertrofia, proliferación, migración, producción de componentes de la matriz extracelular, respuesta inflamatoria y apoptosis, mientras que la interacción con los receptores AT2 promueve apoptosis e inhibe la proliferación y la hipertensión.(36)



2.2.4. Endoglina

Otra molécula importante en todo el proceso de la fibrosis renal, es la endoglina (Eng), es una glicoproteína que actúa como receptor accesorio transmembrana de la superfamilia TGF- β y desempeña un papel esencial en la morfogénesis vascular. La mayoría de las funciones conocidas de la Endoglina están relacionadas con su capacidad para modular las respuestas celulares dependientes de TGF- β 1. Se expresa principalmente en células endoteliales, aunque también se detecta en otros tipos celulares como los macrófagos, las células mesangiales o los fibroblastos de tejido fibrótico. Eng es un co-receptor TGF- β 1 que participa en su señalización, y se ha verificado su participación en varios procesos fibróticos. Esta glicoproteína se sobreexpresa en los riñones de pacientes con enfermedad renal crónica y en procesos de fibrosis renal.(3,4)

2.3. Inhibidores del Daño Renal

Numerosas investigaciones que emplean la inhibición farmacológica de mediadores tempranos de fibrosis, como macrófagos, fibronectina y el fenotipo del miofibroblasto, han demostrado que atenúan la fibrosis intersticial en diferentes modelos de enfermedades renales.(37,38)



3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología que tiene una elevada prevalencia, una vez que afecta a casi el 10% de la población (4), y que es una resultante originada por varios tipos de patologías renales que actúan de manera crónica en el riñón, afectando su estructura y función, con las consiguientes repercusiones sanitarias y sociales.

La fibrosis renal es, por tanto, un tema de gran interés científico que adquiere gran importancia en la Nefrología debido a su estatus como un sello distintivo y común en todos los tipos de enfermedad renal crónica progresiva (ERC).(39)

Por estas razones, hemos querido realizar una revisión bibliográfica relativa a las alteraciones morfofuncionales del proceso fibrótico renal, acompañada de un pequeño estudio experimental histológico e inmunohistológico que compruebe y que evidencie claramente las alteraciones estudiadas.

4. OBJETIVOS

- 4.1.** El objetivo principal del estudio es hacer una revisión bibliográfica respecto a las alteraciones morfofuncionales del riñón, cuando está sometido a una lesión mantenida de forma crónica y cuáles son los principales mecanismos que se ponen en marcha para el desarrollo de la fibrosis renal.
- 4.2.** Por otra parte también queremos analizar y comprobar de manera histológica e inmunohistoquímica las alteraciones fibróticas en un modelo experimental conocido, como es la obstrucción ureteral unilateral (OUU).



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Para la realización de la revisión bibliográfica de las alteraciones morfológicas de la fibrosis renal se efectuó una búsqueda preferentemente en las bases de datos Pubmed y Medline, de artículos publicados en los últimos años, restringidos a los idiomas de inglés, español y portugués, introduciendo como palabras clave “Kidney Fibrosis”, “Morphofunctional changes in kidney fibrosis”, “TGF- β ”, “Molecular Basis of Renal Fibrosis”, “Fibrosis Renal”, “Fibrose Renal”. De esta labor se obtuvieron innúmeros trabajos de los que se seleccionaron aquellos que informaban más concretamente acerca de los mecanismos morfofuncionales del proceso fibrótico.

Igualmente, realizamos un estudio descriptivo, para valorar la respuesta morfológica adaptativa del riñón tras realizar una ligadura de uréter unilateral, que provoca la aparición de fibrosis renal. Para este estudio experimental, se utilizaron 10 ratones machos de la cepa C57BL7/6J. La mitad de los animales fueron sometidos a una ligadura unilateral de uréter, el resto de los animales fueron utilizados como controles.

5.2. Desarrollo del Estudio

5.2.1. Realización de la ligadura unilateral de uréter

Tras la anestesia de los ratones, se les practicó una obstrucción unilateral de uréter (OUU) izquierdo mediante la ligadura del mismo con hilo de seda. La otra mitad de los animales que fue utilizada como control, a los que solo se les practicó una incisión abdominal.

5.2.2. Obtención de las muestras para el estudio

Transcurridos 15 días, desde la ligadura, los animales fueron anestesiados y perfundidos para la fijación de los tejidos, extrayendo los riñones, que fueron procesados para microscopia óptica e incluidos en parafina, obteniendo bloques que se cortaron con un micrótopo de parafina en secciones de 3 μ m. Las secciones así obtenidas, una vez desparafinadas, se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson, o se procesaron para inmunohistoquímica de Fibronectina y Colágeno I.

Todos los estudios fueron aprobados por los Comités de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Salamanca y los ratones fueron atendidos de acuerdo con las normas de la Unión Europea y con el Departamento de Salud y Servicios Humanos Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.



6. RESULTADOS

6.1. Hematoxilina - Eosina

Transcurridos 15 días desde la OUU, los animales ligados desarrollaron una hidronefrosis grave y la tinción con hematoxilina-eosina reveló las características típicas de una nefropatía obstructiva. Así, el espesor total de la corteza y la medula estaba disminuido y se evidenció una compresión medular importante. En la corteza, los túbulos mostraban cambios que iban desde una luz dilatada con un epitelio aplanado y aparición de cilindros hialinos, a diferentes grados de necrosis. En la mayoría de los casos, se observó un infiltrado inflamatorio intersticial, principalmente en las zonas perivasculares (Figura 1A). Con esta tinción no se detectan alteraciones de relevancia en los corpúsculos renales. Los animales control mostraron una estructura histológica renal normal (Figura 1B).

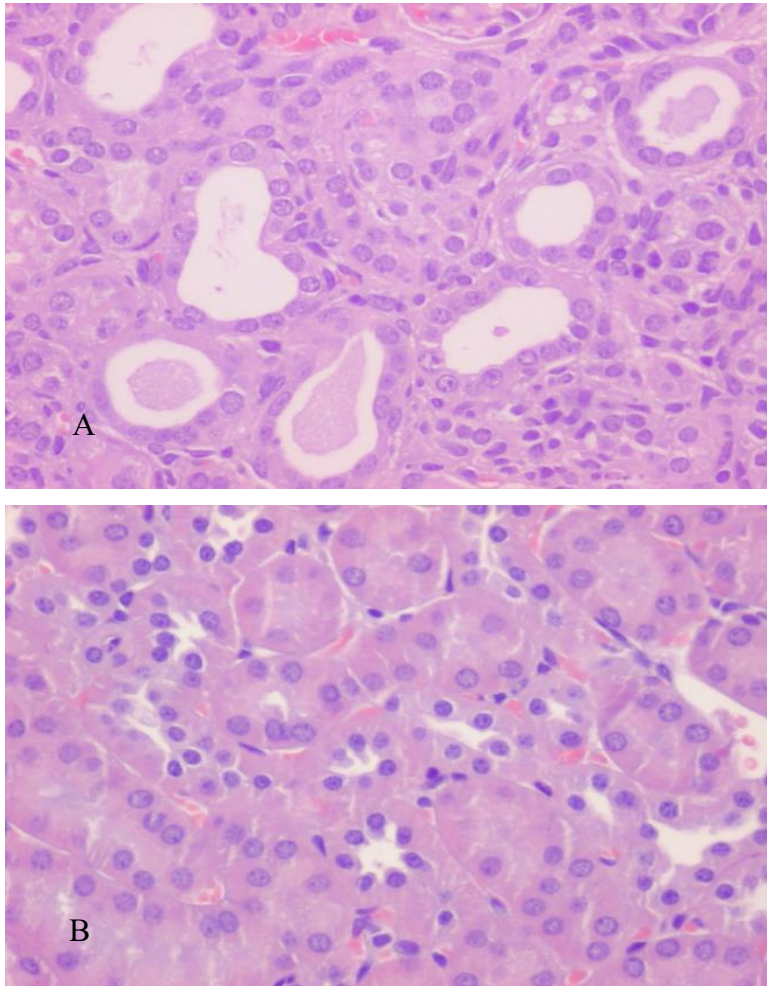


Figura 1 – Fotomicrografías representativas de intersticio renal teñido con Hematoxilina-Eosina. **A:** Grupo con ligadura unilateral de uréter. **B:** Grupo control. Objetivo original del microscopio 20x.



6.2. Tricrómico de Masson

Se observó un aumento de tejido conectivo en los intersticios tubulares de los animales ligados. En el caso de los corpúsculos pudo observarse un aumento de la matriz mesangial en los riñones ligados (Figura 2A). En los riñones control no se evidenció aumento importante de tejido conectivo, (Figura 2B).

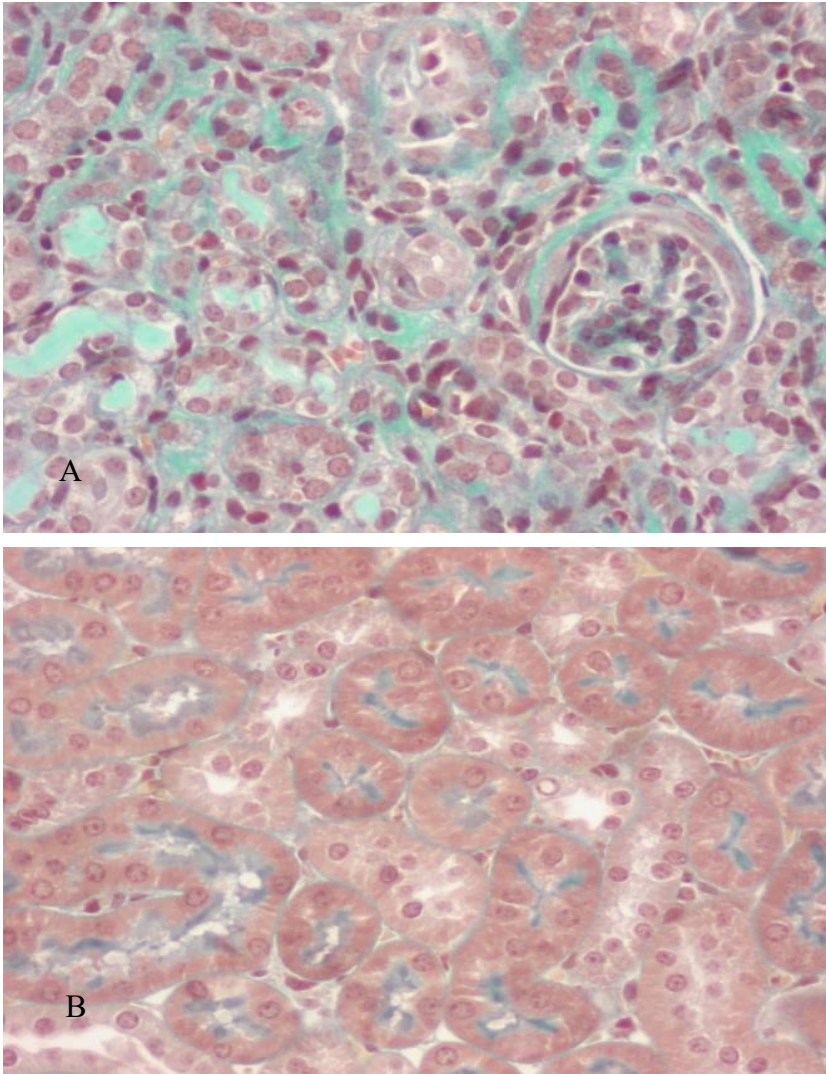


Figura – 2: Fotomicrografías representativas de corteza renal teñida con Tricrómico de Masson. **A:** Grupo con ligadura unilateral de uréter. **B:** Grupo control. Objetivo original del microscopio 20x.



6.3. Inmnohistoquímica para Fibronectina

Cuando se observaron las preparaciones de inmunohistoquímica contra Fibronectina, se evidenció una gran expresión intersticial de la fibronectina (Figura 3A) que contrasta con expresión habitual de la proteína en las membranas basales y una pequeña cantidad alrededor de los capilares peritubulares que se observó en los animales del grupo control (Figura 3B).

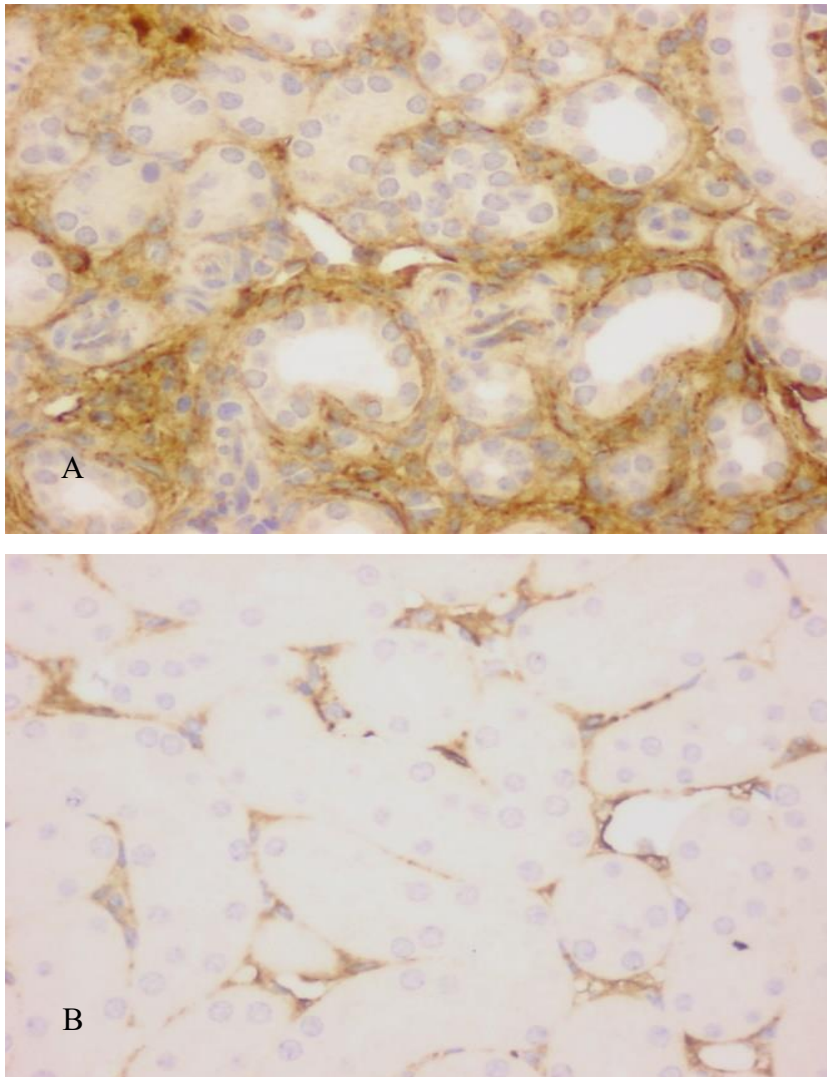


Figura 3 - Micrografías que muestran la expresión de Fibronectina en corteza renal de ratones. **A:** Grupo con ligadura unilateral de uréter. **B:** Grupo control. Objetivo original del microscopio 20x.



6.4. Inmunohistoquímica para Colágeno I

Cuando se observaron las preparaciones de inmunohistoquímica contra Colágeno I, se observa una gran expresión en el intersticio renal en el caso de los riñones con ligadura de uréteres (Figura 4A) que casi es inapreciable en los riñones del grupo control (Figura 4B).

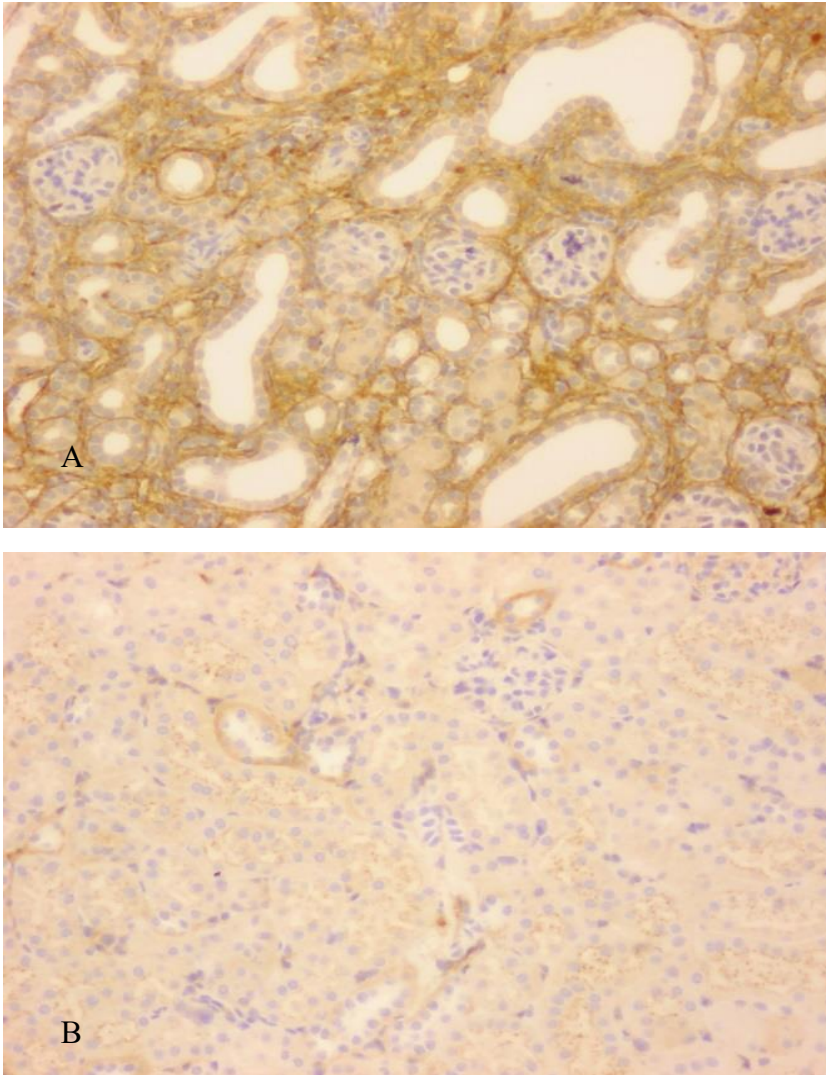


Figura 4 – Micrografías que muestran la expresión de colágeno I en corteza renal de ratones. **A:** Grupo con ligadura unilateral de uréter. **B:** Grupo control. Objetivo original del microscopio 10x.



7. DISCUSIÓN

La fibrosis renal es la vía común final para todas las enfermedades renales, que conducen a la insuficiencia renal crónica, que es una patología que afecta casi el 10% de la población, lo que tiene una gran repercusión socio-sanitaria y hace que el estudio de este proceso sea de vital importancia clínica.(4)

Al realizar la correspondiente revisión bibliográfica, pudimos constatar que prácticamente todos los estudios realizados hasta el momento coinciden en las alteraciones que tienen lugar en las estructuras renales, como son la atrofia cortical, dilatación y alteración de los túbulos renales con fibrosis intersticial y presencia de infiltrado inflamatorio. Siendo, las lesiones glomeruloescleróticas posteriores, en general al desarrollo de fibrosis intersticial.(3,4)

El origen de la fibrosis intersticial, al ser el riñón una víscera con pocos fibroblastos parece ser debido al curioso fenómeno de la EMT, por el cual, células epiteliales se desprenden de los túbulos y se transforman en miofibroblastos que se activan y originan la aparición masiva de matriz extracelular anómala.(2) No obstante, hoy existe en la literatura controversia acerca de la participación de EMT en el proceso.(1,14) El origen de la glomeruloesclerosis parece estar claro en la producción de matriz extracelular en exceso por parte de las células mesangiales activadas tras la agresión correspondiente.(2) Prácticamente todos los estudios coinciden en otorgar al TGF- β 1 un papel clave en el inicio de los procesos fibróticos, ya que desencadena, entre otras funciones, una cadena de acontecimientos mediada por unos receptores de membrana que transmiten las señales vía moléculas citoplásmicas (Smads) hasta el núcleo que responderá transcribiendo las señales que harán que las células fibroblásticas comiencen a fabricar matriz extracelular de una forma descontrolada.(3)

De nuestro estudio experimental efectuado sobre ratones sometidos a obstrucción ureteral hemos constatado que las lesiones primarias ocurren en túbulos e intersticio, y observamos el aumento del volumen intersticial, por aumento fundamentalmente de fibrosis y a distintos grados de infiltración de células inflamatorias, que como sabemos, es una reacción que se perpetúa o que escapa a los mecanismos de control en la defensa normal frente al daño. Las alteraciones patológicas observadas coinciden con lo descrito en la bibliografía que hemos revisado en la primera parte del estudio.



8. CONCLUSIONES

- 8.1. El acúmulo de matriz extracelular en la fibrosis renal progresiva es la consecuencia de dos procesos que ocurren en paralelo: el incremento de la síntesis de componentes de la matriz extracelular y la disminución de su degradación.
- 8.2. La síntesis y deposición de componentes de matriz extracelular es consecuencia de la activación, fundamentalmente, de TGF- β 1 que induce, a su vez, la transformación de las células del epitelio tubular, la activación de los miofibroblastos y las células infiltradas y, en fases posteriores, de las células mesangiales glomerulares.
- 8.3. Con el modelo experimental en animales que hemos utilizado, hemos podido constatar, mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, las alteraciones morfológicas características de la fibrosis renal, descritas en la literatura.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Stribos EGD, Hillebrands JL, Olinga P, Mutsaers HAM. Renal fibrosis in precision-cut kidney slices. *Eur J Pharmacol.* 2016;790(1):57–61.
2. Sutariya B, Jhonsa D, Saraf MN, Sutariya B, Jhonsa D, Saraf MN. TGF- β : the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 2016;38(1):39-49.
3. Muñoz-Félix JM, Pérez-Roque L, Núñez-Gómez E, Oujo B, Arévalo M, Ruiz-Remolina L, et al. Overexpression of the short endoglin isoform reduces renal fibrosis and inflammation after unilateral ureteral obstruction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2016;1862(9):1801–14.
4. Mun M, Pericacho M, Langa C, Martı C. L-Endoglin Overexpression Increases Renal Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction. *Plos One.* 2014;9(10):1–12.
5. Efstratiadis G, Divani M, Katsioulis E, Vergoulas G. Renal fibrosis. *Hippokratia.* 2009;13(4):224–9.
6. Cogan. M. Tubulo-interstitial nephropathies - A pathophysiologic approach. *West JMed.* 1980;132(3):134–40.
7. Piscator M. Early detection of tuular dysfunction. *Kidney Int Suppl.* 1991;34(2):15–7.
8. Palmer B. The renal tubule in the progression of chronic renal failure. *J Investig Med.* 1997;45:346–61.
9. Blythe W. Natural history of hypertension in renal parenchymal disease. *Am J Kidney Dis.* 1985;5(1):50-6.
10. Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ PC. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney Int.* 1998;54(4):747–57.
11. Norman J, Fine L. Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. *Exp Nephrol.* 1999;7(2):539–47.
12. Kelly C. Cellular immunity and the tubulointerstitium. *Semin Nephrol.* 1999;19(4):182–7.



13. Becker G, Hewitson T. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000;9(1):133–8.
14. Vanhove T, Goldschmeding R, Kuypers D. Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. 2017;101(4):29-42.
15. Lan H, Nikolic-Paterson D, Mu W, Atkins R. Local macrophage proliferation in the progression of glomerular and tubulointerstitial injury in rat anti-BM glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1995;48(2):753–60.
16. Nath K. The tubulointerstitium in progressive renal disease. *Kidney Int.* 1998;54(3):992–4.
17. Hewitson T, Darby L, Bisucci T, Jones C, Becker G. Evolution of tubulointerstitial fibrosis in experimental renal infection and scarring. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(5):632–42.
18. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(1):34-59.
19. Border W, Noble N. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* 1997;51(4):1388–96.
20. Roberts A, Sporn M. Transforming growth factor-beta. *Adv Cancer Res.* 1992;51(1):107–45.
21. Eddy A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol.* *Pediatr Nephrol.* 2000;15(1):290–301.
22. Basile D. The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Curr Opin Nephrol.* 1999;8(2):21–30.
23. Van Vliet A, Baelde H, De Heer E, Bruijin J. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol.* 2001;193(1):256–62.
24. Ghraee-Kermani M, Wiggins R, Wolber F, Goyal M, Phan S. Fibronectin is the major fibroblast chemoattractant in rabbit anti-glomerular basement membrane disease. *Am J Pathol.* 1996;148(2):961–7.
25. Duffield JS. Review series Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis.



- 2014;124(6):129-63.
26. Chuang PY, Menon MC HJ. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis. *J Mol Med.* 2012;91(5):549–59.
 27. Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y, Nagai Y, Koide H. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 1990;34(3):239–46.
 28. Tang W, Van G, Qi M. Myofibroblast and alpha-1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 1997;51(4):926–31.
 29. Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Sekikawa T, Ota Z. Role of apoptosis in the proression of glomerulosclerosis. *Contrib Nephrol.* 1996;118(2):41–7.
 30. Wesson L. Physical factors and glomerulosclerosis. Cause or coincidence. *Nephron.* 1998;78(2):125–30.
 31. Harris R, Akai Y, Yasuda T, Homma T. The role of physical forces in alterations of mesangial cell function. *Kidney Int Suppl.* 1994;45(1):17–21.
 32. Meng X, Nikolic-paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Publ Gr.* 2016;21(2):21-32
 33. Sureshbabu A, Muhsin SA, Choi ME. TGF- β signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. 2016;10065(6):596–606.
 34. Cruz-solbes AS, Youker K. *Kidney Development and Disease.* 2017;60(2):345–72.
 35. Wang A, Cohen D, Palmer E, Shepard D. Polarized regulation of fibronectin secretion and alternative splicing by transforming growth factor. *J Biol Chem.* 1991;266(5):15598–601.
 36. Allen A, Zhuo J, Mendelsohn F. Localization and function of angiotensin ATI receptors. *Am J Hypertens.* 2000;13(2):315–85.
 37. Ludewig D, Kosmehl H, Sommer M, Bohmer F, Stein G. PDGF receptor kinase blocker AG1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney after unilateral obstruction. *Cell Tissue Res.* 2000;299(1):97–103.



38. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2002;283(3):861–75.
39. Zhou D, Liu Y. Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. *Nat Publ Gr.* 2015;23(2):2015–6.

