

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMÁTICA RENAL EN UN  
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERURICEMIA:  
PARTICIPACIÓN DE NALP-3 Y SUS FUNCIONES CANÓNICAS  
Y NO-CANÓNICAS**

**Trabajo de Tesis para optar al  
Título de Doctor en Medicina y Cirugía**

**Médico Cirujano  
Cesar Andrés Romero**

**CÓRDOBA  
REPÚBLICA ARGENTINA  
2014**

## COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

### **Director:**

**Prof. Dr. Jorge H. Mukdsi**

Prof. Adjunto del Centro de Microscopía Electrónica.

Facultad de Ciencias Médicas.

Universidad Nacional de Córdoba.

### **Integrantes:**

**Prof. Dr. Luis I. Juncos**

Prof. Consulto de la Facultad de Ciencias Médicas.

Universidad Nacional de Córdoba.

**Prof. Dr. Rodolfo E. Ávila**

Prof. Adjunto de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología.

Facultad de Ciencia Médicas.

Universidad Nacional de Córdoba.

**Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía**

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS  
OPINIONES DE ESTA TESIS”

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Centro Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo con la reglamentación vigente en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Durante la ejecución, el autor fue Profesor Asistente del Centro de Microscopía Electrónica y contó con el apoyo financiero de subsidios del SECyT, CONICET, y FONCYT, otorgados al Centro de Microscopía Electrónica.

**A mi esposa e hijas.  
A mis padres.  
A mis maestros.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mis agradecimientos a la Prof. Dra. Alicia Inés Torres, Directora del Centro de Microscopía Electrónica por darme la posibilidad de realizar mi tesis doctoral y por brindarme su apoyo y consejo en todo momento.

Al Prof. Dr. Jorge H. Mukdsi por guiarme y brindarme toda su experiencia y apoyo durante la realización de la tesis, y por haberme demostrado las virtudes del trabajo en equipo.

A la Comisión de Seguimiento, Prof. Dr. Luis I Juncos y Prof. Dr Rodolfo E. Ávila, por su buena disposición en todo momento y sus agudas sugerencias.

A todos los Docentes e Investigadores del Centro de Microscopía Electrónica por compartir sus conocimientos, vivencias y su buena disposición para fortalecer este trabajo.

A la Dra. Alexandra Latini de la Universidad Federal de Santa Catarina (Brasil) y a la Prof. Dra. Ana L. De Paul del Centro de Microscopía Electrónica, por brindarme la posibilidad de mi experiencia en fisiología mitocondrial.

A la Prof. Ana Cabanillas de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC) por su cooperación desinteresada.

A mis compañeros del Centro de Microscopía Electrónica por su gran ayuda en mis experimentos y la compañía brindada en estos años.

A los Ingenieros Roal Pitau y Nestor Boetto, por su soporte técnico en microscopía electrónica y por sus experiencias compartidas.

Al personal técnico, Sra. Elena Pereyra, Sra. Lucia Artino y Sra. Mercedes Guevara, por su desinteresada asistencia técnica y excelente trabajo en la preparación de los cortes finos para microscopía electrónica.

Al Sr. Técnico Cristian Giacomelli por su colaboración en el procesamiento de materiales para microscopía fotónica.

Al Sr. Oscar Correa por su silencioso e imprescindible trabajo en el cuidado de los animales del bioterio.

Quiero agradecer también a todos los Profesores que colaboraron con mi crecimiento personal, mostrándome lo fascinante de la ciencia ya en mis épocas de estudiante y primeros años de médico, y enseñándome el compromiso, respeto y cariño por los pacientes.

Por último quiero agradecer a mi familia, a mis hijas y esposa que son mi gran motivación y que han tenido que tolerar mis ausencias.

A mi padre, ejemplo de responsabilidad y conducta. A mi madre por enseñarme a soñar altos ideales; a mis hermanas por todo el cariño y apoyo; a mi tía Perla por sus consejos, apoyo y ejemplo.

## Abreviaturas

**ABC:** sistema avidina-biotina

**ABCG2:** ATP-binding cassette sub-family G member 2

**ALL:** grupo de animales tratados con alopurinol

**$\alpha$ -SMA:**  $\alpha$ -actina de músculo liso

**Ang II:** angiotensina II

**AOX+U:** grupo de animales tratados con ácido oxónico y ácido úrico

**BMP-7:** proteína morfogénica del hueso-7

**°C:** grado centígrado

**C:** grupo de animales controles

**Ca<sup>++</sup>:** ión divalente de calcio

**CBF-A:** CArG box-binding factor-A

**cm:** centímetro

**cPLA2:** fosfolipasa A2 citosólica

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina- tetrahydrochloride

**DAMPs:** patrones moleculares asociados a daño

**DDR2:** discoidin domain receptor tyrosine kinase 2

**EDTA:** ácido etildiaminotetraacético

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**EGTA** ethylen glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacético

**EnaC:** canal epitelial de sodio

**ERC:** enfermedad renal crónica

**ERK:** Extracellular signal-regulated kinases

**Ets-1:** E26 transformation specific sequence-1

**FGF:** factor de crecimiento fibroblástico

**FSP1:** proteína específica de fibroblastos-1

**FTS-1:** fibroblast transcription site-1

**g:** gramo

**GLUT9:** transportador de glucose-9

**h:** hora

**HGF:** factor de crecimiento hepatocitario

**HIF-1:** factor inducible por hipoxia 1

**HMGA2:** high mobility group AT-hook 2

**HMGA2:** high mobility group AT-hook 2



**H-ras:** proteína del sarcoma de rata

**HSP47:** proteína de choque térmico 47

**HTA:** hipertensión arterial

**IL:** interleuquina

**IL-1R:** receptor de IL-1

**ILK:** Integrin-linked kinase

**IPAF:** Ice protease-activating factor, also known as NLR family, card domain containing 4 (NLRC4), CARD, LRR, and NACHT-containing protein (CLAN) and Caspase recruitment domain-containing protein 12 (CARD12)

**LEF:** lymphoid enhancer-binding factor

**M:** mol

**MAVS:** molécula adaptadora asociada a mitocondrias

**MBT:** membrane basal tubular

**mA:** miliamper

**mg/kg:** miligramo por kilo

**mg/L:** miligramo por litro

**mg:** miligramo

**min:** minuto

**ml/min:** mililitro por minuto

**ml:** mililitro

**mm:** milímetro

**mM:** milimolar

**MMP:** metaloproteinasas

**MOPS:** ácido 3-(N-morpholino) propanesulfónico

**MPT:** mitochondrial permeability transional

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

**Naip:** proteína inhibitoria de la apoptosis de la familia NLR

**Nalp1:** proteína 1 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD

**Nalp3:** proteína 3 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD

**Nalps:** proteína que contiene dominios NACHT, LRR y PYD

**NCC:** canal simport sodio cloro

**Nf- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NKCC2:** co-transportador de sodio-potasio-2cloros

**NLR:** receptor Nod-like

**NLRP3:** nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin, domain containing. **Actual denominación para NALP-3**

**nm:** nanómetro

**NO:** óxido nítrico

**NOD:** nucleotide-binding oligomerization domain containing

**NOX4:** NADPH (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato) oxidase-4

**NPT:** Sodium/phosphate cotransporter

**OAT:** organic anion transporter

**p38-MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinases

**PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos

**PAR-1:** Protease-activated receptors

**PBS:** tampón fosfato salino

**PBS-BSA:** tampón fosfato salino-albúmina bovina

**pKa:** pH al cual la fracción no ionizada de este corresponde al 50% y el otro 50% está ionizada

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**RCR:** respiratory control ratio

**RER:** retículo endoplásmico rugoso

**RhoA:** miembro A de la familia de homólogo Ras

s: segundo

**SCL22A9:** solute carrier family 22, member 9

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

**Slap:** Src-like adaptor protein

**SLC22A12:** solute carrier family 22, member 12

**Smad:** contracción de las palabras mothers against decapentaplegic (MAD) y small body size

**TCF:** factor de células T

**TEM:** transición epitelio-mesenquimática

**TGF-β:** factor de crecimiento transformante tipo β

**TGFR:** receptor del Factor del Crecimiento Transformante Beta

**TLR4:** Toll-like receptor 4

**TNF-R:** receptor del factor de necrosis tumoral

**tPA:** activador del plasminógeno tisular

**TRIS-HCl:** tris(hidroximetil)aminometano y ácido clorhídrico

**μg:** microgramo

**μl:** microlitro

**μm:** microméetro

**μm<sup>2</sup>:** micras cuadradas

**UI/ml:** unidades internacionales por mililitro

**URAT1:** transportador de urato-1

**UT-A:** transportador de urea-A

**MAVS:** proteína de mitocondrial de señalización anti-viral

**W:** watss

**ZO-1:** proteina de zónula ocludens 1

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>14</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
La transición epitelio-mesenquimática	17
La proteína FSP1	23
Epitelio tubular e intersticio renales	24
Transición epitelio-mesenquimática y riñón	28
Acido úrico y riñón	32
La familia de los receptores Nod-like	37
NLRP3 [NALP3], sus vías canónicas y no canónicas y el riñón	41
Mitocondrias, NLRP3 [NALP3] y ácido úrico	42
<b>Hipótesis</b>	<b>45</b>
<b>Objetivos</b>	<b>46</b>
<b>Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
Animales y Desarrollo de Modelos Experimentales	48
Análisis morfológico con Microscopía Fotónica	49
Caracterización ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión	50
Estudio inmunohistoquímico de secciones en parafina	51
Inmunolocalización a nivel de Microscopía Electrónica	53
Técnica de Western Blotting	54
Análisis de la funcionalidad mitocondrial	55
Análisis estadístico	57
<b>Capítulo 3: RESULTADOS</b>	<b>58</b>
Función renal: cambio inducido por ácido úrico	59
Cambios macroscópicos de riñones de ratas tratadas con ácido óxónico y suplementadas con ácido úrico	60
Análisis morfológico de la corteza renal de rata macho hiperuricémicas	61
Inmunolocalización de la proteína FSP1 a nivel de microscopía fotónica y electrónica	64
Inmunolocalización de NLRP3 [NALP3] a nivel de microscopía fotónica y electrónica de transmisión en rata macho controles y con altos niveles de ácido úrico	67
Análisis de la expresión de caspasa 1-beta (inmunohistoquímica y Western blotting)	

en rata macho controles, tratadas con ácido oxónico/ácido úrico y allopurinol	69
Inmunomarcación de Smad 2/3 a nivel de microscopía fotónica y electrónica	
en rata macho Wistar controles y con altos niveles de ácido úrico	71
Colocalización subestructural de NLRP3 [NALP3] y Smad 2/3 fosforilado en	
tejido renal de ratas Wistar con altos niveles de ácido úrico	73
Análisis morfo-funcional de la población mitocondrial	73
<b>Capítulo 4: DISCUSIÓN</b>	<b>77</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>90</b>
<b>Capítulo 5: BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>91</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>112</b>

## RESUMEN

La fibrosis renal y la consecuente pérdida de las funciones del riñón son elementos comunes en la enfermedad renal crónica. La transición epitelio mesenquimática (TEM) representa estadios tempranos del proceso de fibrosis. Recientemente se ha vinculado a la inmunidad innata en los procesos de injuria y fibrosis renal. Los pacientes con hiperuricemia presentan una mayor progresión a la enfermedad renal crónica, y mayor prevalencia de hipertensión arterial, induciendo fibrosis renal en modelos animales. No se conoce la participación de la inmunidad innata en la injuria renal inducida por ácido úrico. Para conocer la participación de la inmunidad innata en los procesos de TEM y fibrosis renal inducidos por ácido úrico se recurrió a un modelo desarrollado en rata Wistar macho con elevados niveles de ácido úrico (AOX+U). Para esto se suplementó la dieta con ácido oxónico al 2% (inhibidor de uricasa) y ácido úrico 2% durante 7 semanas. Dos grupos controles fueron considerados para comparar los hallazgos, un grupo con dieta estándar sin los agregados (C) y un segundo grupo control con suplemento de ácido oxónico y úrico, y además allopurinol en agua de bebida (ALL). Los niveles de ácido úrico y urea fueron testeados durante el tratamiento. A las 7 semanas los animales fueron sometidos a eutanasia y tejido renal fue obtenido para análisis de expresión proteica, análisis histológicos (fotónico y electrónico de transmisión) y para estudio mitocondrial: actividad de complejos de cadena respiratoria y respirometría de alta resolución mitocondrial.

En el modelo antes expuesto se constató un incremento plasmático del ácido úrico en el grupo AOX+U, con deterioro de la función renal. Esto se asoció con mayor fibrosis intersticial e infiltrado inflamatorio mononuclear. Se observó por microscopia fotónica y electrónica de transmisión el fenómeno de TEM al corroborarse la expresión de la proteína marcadora FSP1 en células tubulares, disrupción de la membrana basal e invasión al intersticio renal. El receptor de la inmunidad innata Nalp3 actualmente conocido como NLRP3 presentó aumento en la expresión en las células epiteliales tubulares con altos niveles de ácido úrico. Esto fue prevenido por allopurinol. Ambas vías, canónica a través de caspasa 1 beta y no canónica a través de factor de transcripción Smad 2/3 se encontraron activas en la injuria inducida por ácido úrico en comparación con los grupos controles. No se pudo demostrar alteraciones morfológicas ni fisiológicas en mitocondrias renales como nexo entre el ácido úrico y la activación de NLRP3.

Concluimos que el incremento del ácido úrico en ratas macho Wistar induce programas de TEM renal evidenciándose una participación de la inmunidad innata a través del receptor NLRP3 y sus vías canónicas y no canónicas.

## SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) is associated with renal fibrosis and loss of kidney functions. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) represents early stages of fibrosis. Currently the innate immunity has been associated with kidney injury and fibrosis. Hyperuricemic patients have more progression to CKD and higher prevalence of hypertension. Animals models have shown renal fibrosis induced by uric acid. It is not known the role of innate immunity in the uric acid induced damage in kidney. To describe the participation of the innate immunity in EMT and kidney fibrosis induced by uric acid we used a rat model with higher plasma levels of uric acid uric (AOX-U). These rats were feeding with oxonic acid 2% and uric acid 2% in regular chow during 7 weeks. Two control groups were included, “control group” (C) receiving regular chow without the supplements and the “ALL” group receiving not only the oxonic and uric acid supplement but also allopurinol in drinking water. The plasmatic uric acid and urea levels were checked during the follow-up. At 7 weeks the animals were euthanized and kidney tissue was harvested to protein expression analysis, histology and mitochondrial physiologic studies.

This model shows an increase of plasma uric acid levels and also the decreases in kidney function in the AOX+U group. The uric acid levels were associated with fibrosis and mononuclear inflammatory infiltrates in kidney. The EMT process was showed by light and electronic microscopy, by the expression of FSP1 protein in kidney epithelial cells, basal membrane disruption, and invasion of interstitial space. NLRP3 receptor was increased in cell with high uric acid levels, and this was prevented by allopurinol. Both, the canonical (caspase-1 dependent) and non-canonical (Smad 2/3) pathways were activated in the uric acid induced injury, in compares with the C and ALL groups. In regard of the nexus between the uric acid and NLRP3 receptor we were not able to demonstrate any neither morphological nor physiological alterations in kidney mitochondria exposed to uric acid. We conclude that in a rat model the high uric acid levels induce EMT programs, showing a role of innate immunity through the canonical and non-canonical ways of NLRP3 receptor.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**



### *La transición epitelio-mesenquimática*

Por numerosos años se ha aceptado que toda célula procede de otra célula, presentando similitudes morfo-funcionales con sus parentales [1]. En esta teoría se considera implícitamente que una célula solo podrá:

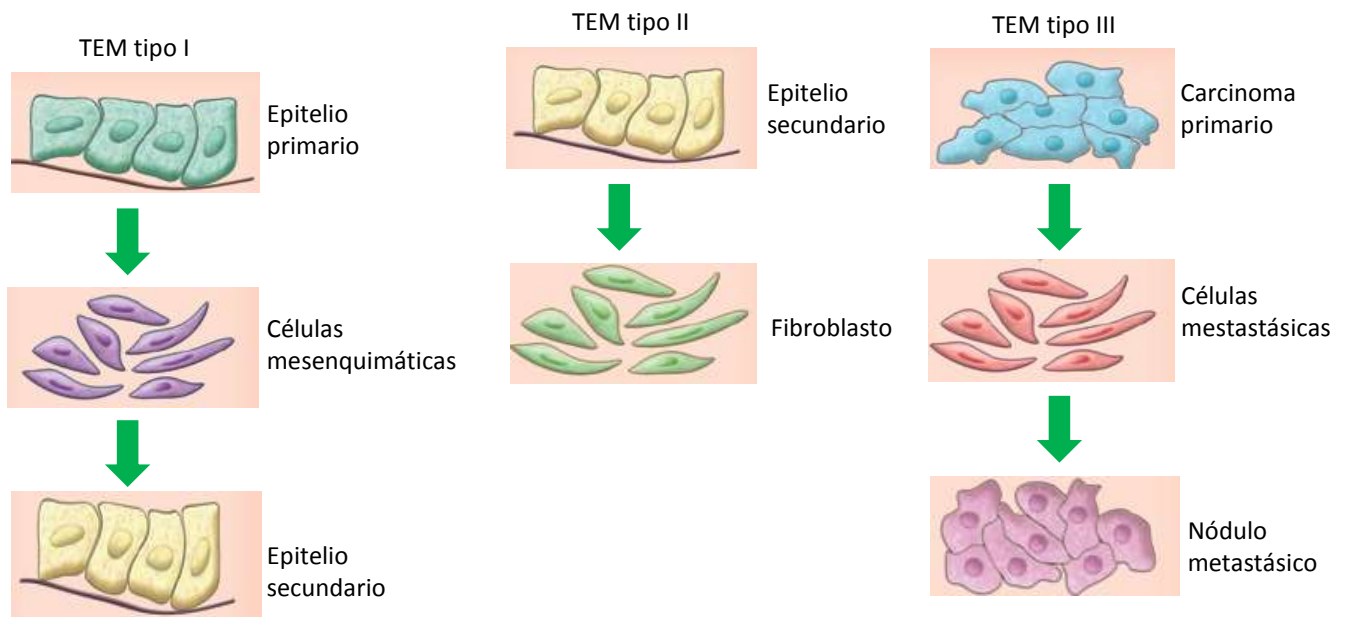
- dividirse asimétricamente para preservar la progenie
- dar origen a sus células hermanas ó
- sufrir diferenciación hacia linajes específicos

En este sentido los epitelios de los metazoos son emblemáticos, cubriendo en su estado de madurez tanto las superficies externas como conformando o revistiendo órganos internos [2]. Ya que esta variedad de tejido sirve para funciones altamente especializadas, se ha asumido que un estado de diferenciación terminal es necesario una vez que el desarrollo completo ha sido alcanzado [3].

Actualmente, estos conceptos paradigmáticos han sido desafiados por las ciencias biológicas al considerar que, epitelios maduros pueden cambiar su fenotipo a partir de presiones morfogénicas y regresar a estadios previos de su diferenciación y especialización. Así surge el concepto de Transición Epitelio-Mesenquimática (TEM), proceso que favorece que células epiteliales polarizadas que normalmente interactúan con su membrana basal, sufran una serie de cambios bioquímicos que les permiten adquirir características fenotípicas de células mesenquimáticas, otorgándole capacidad de migración, invasividad, resistencia a la apoptosis y una notable capacidad de producir matriz extracelular. El fenómeno concluye con la degradación de la membrana basal y la migración de la nueva célula mesenquimática desde la capa epitelial donde se formó [4, 5].

La TEM es una variante de transdiferenciación que cumple múltiples funciones en los organismos pluricelulares, a saber: la dispersión de células embrionarias, la formación de fibroblastos en tejidos lesionados o el inicio de la diseminación neoplásica de los carcinomas [6-8]. Esto ha conducido a la clasificación de la misma en tres subtipos básicos: tipo I (embrionaria), II (inflamatoria) y III (neoplásica) (Figura 1). Si consideramos el sentido más puro de la terminología utilizada para este proceso celular, la TEM de un epitelio terminalmente diferenciado daría origen a fibroblastos tisulares [9].

Cuando la TEM es analizada en los tres subtipos arriba mencionados, es importante considerar la existencia de mecanismos comunes subyacentes, reconociendo ciertas similitudes fenotípicas, pero sin olvidar la existencia de algunas diferencias. En este sentido la TEM tipo I nunca produce fibrosis ni un fenotipo invasivo, y puede generar el



**Figura 1.** Esquema de los TEM tipo I, II, y III. Modificado de Zeisberg y Neilson (J Clin Invest 119:1429-1437. 2009).

proceso reverso es decir la transición mesénquimo-epitelial originando un epitelio secundario. En tanto la TEM tipo III experimentada por los carcinomas, le confiere a dichas células la capacidad de invadir y metastatizar.

Mientras que los estudios tradicionales han reforzado la importancia del aumento de la matriz extracelular como el elemento principal que contribuye al deterioro de la capacidad funcional de los órganos injuriados, como pulmón, hígado, y riñón, actualmente se ha focalizado la trascendencia del epitelio de estos órganos como posible fuente de fibroblastos intersticiales [10-12].

Debido a que el objeto de estudio del presente trabajo de investigación se centra en la injuria inducida por el ácido úrico en el riñón, a continuación se describe la TEM tipo II.

*La transición epitelio-mesenquimática como fuente de fibroblastos (TEM tipo II): criterios diagnósticos*

En la TEM II los tejidos adultos o maduros dan origen a miofibroblastos/fibroblastos como respuesta a la injuria asociada a la reparación de heridas, regeneración tisular y órgano-fibrosis. Ocurre como respuesta a un evento de reparación a trauma o lesión inflamatoria y cesa una vez que este estímulo es subsanado [5]. Fibroblastos cultivados a partir de diversos tejidos, tienen perfiles genéticos diferentes y que se comportan de manera disímil ante la exposición a una variedad de matrices extracelulares y citoquinas. Esto conduce a postular que una vez que los fibroblastos

originados por esta variante de TEM, se ubican en el intersticio próximo al epitelio, los tejidos quedan sensibilizados ante injurias desencadenantes de una respuesta fibrogénica inducible a consecuencia de una inflamación persistente [13-15].

Desde las primeras descripciones del fenómeno de TEM tipo II llevadas a cabo en estudios *in vitro*, se ha procurado establecer criterios que permitan demostrar y entender cómo, las células epiteliales se transforman en fibroblastos tanto en los sistemas de cultivos celulares como en los tejidos. En la tabla 1 se mencionan tales criterios, algunos de los cuales serán analizados en el presente trabajo [16].

Las investigaciones realizadas *in vitro* han puesto en evidencia la importancia de moléculas del tipo del TGF- $\beta$  y del EGF como inductoras de este cambio fenotípico. En este sentido, estudios en cultivos de células epiteliales tubulares renales, que fueron estimuladas con los factores antes mencionados en medio libre de suero originaron, posterior a cinco días de tratamiento, TEM tipo II [17, 18]. Por otra parte, la remoción temprana de los mismos permitió la restitución del fenotipo epitelial, sugiriéndose la reversibilidad del proceso [4]. Finalmente, dos aspectos de importancia de los sistemas *in vitro* son: la resistencia a la muerte celular programada o apoptosis y la capacidad de migración celular que adquieren las células durante el proceso de TEM [19, 20].

El análisis de la TEM tipo II *in vivo* es más complejo que los estudios realizados *in vitro*. Experimentos desarrollados en células epiteliales alveolares, en endotelio cardíaco y en hígado, han demostrado la importancia del uso de genes reporteros que se expresan en los fibroblastos neoformados, denotando el origen epitelial de los mismos [10, 11, 21].

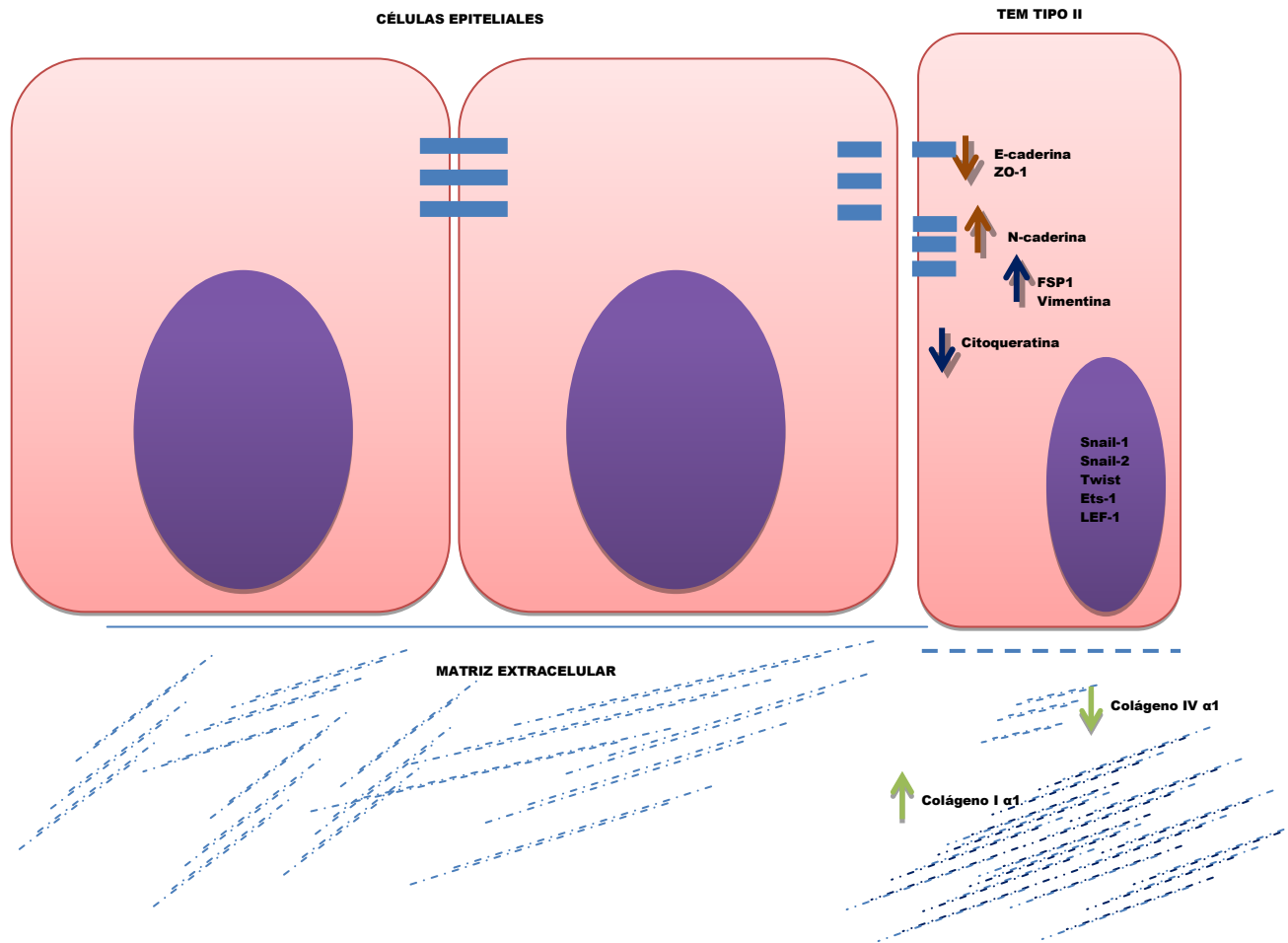
Sin embargo, cuando esta metodología no está disponible, la expresión de la proteína FSP1 en células epiteliales o endoteliales, adyacente a zonas de disrupción de las membranas basales y ocasionales elongaciones citoplasmáticas hacia el intersticio son marcadores de este fenómeno [7]. Okada y colaboradores [4, 22] han reportado, en un modelo de enfermedad renal poliquística, que células epiteliales tubulares FSP1+ también expresan HSP47, con síntesis *de novo* de colágeno tipo I o la pérdida parcial o completa de E-caderina y citoqueratina. Además, las células epiteliales en plan de sufrir TEM, neo-expresan factores de transcripción y relocalizan al factor CBF-A y al complejo  $\beta$ -catenina/LEF [18, 23, 24].

Estos antecedentes nos permiten entender y plantear a la TEM como un proceso plástico, con diversos estadios intermedios y con variable expresión de los factores anteriormente mencionados.

**Tabla 1.** Criterios mayores y menores de TEM en sistemas biológicos desarrollados *in vitro* e *in vivo* [16].

<p><b><u>Criterios de TEM in vitro</u></b></p> <p><b><u>Criterios Mayores</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-Expresión <i>de novo</i> de FSP1 y DDR2</li><li>-Sobreexpresión de HSP47, colágeno I (<math>\alpha 1</math>), colágeno 2 (<math>\alpha 2</math>), o vimentina</li><li>-Cambio en la expresión de caderina</li><li>-Relocalización nuclear de CBF-A o <math>\beta</math>-catenina/LEF or expresión <i>de novo</i> de: Snail, Slug o Twist</li><li>-Ausencia de marcadores epiteliales; pérdida de la expresión de citoqueratina o ZO-1</li><li>-Cambios en la morfología celular: aspecto fusiforme con redistribución de las fibras de estrés y pérdida de la polaridad</li><li>-Resistencia a la apoptosis</li><li>-Motilidad incrementada</li><li>-Fenotipo estable una vez retirado el estímulo de inducción</li></ul> <p><b><u>Criterios Menores</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-Abundantes filamentos intermedios y microfilamentos</li><li>-Pérdida de la condensación cromatínica asociada con la presencia de múltiples nucléolos</li><li>-Abundante RER, lisosomas y pérdida de las uniones intercelulares a nivel ultraestructural</li></ul> <p><b><u>Criterios de TEM in vivo</u></b></p> <p><b><u>Criterios Mayores</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-Uso de un constructo reportero epitelial que se expresa localmente en los fibroblastos recientemente formados</li><li>-Expresión <i>de novo</i> de FSP1 y posiblemente de DDR2 asociada con disrupción de la membrana basal</li><li>-Sobreexpresión de HSP47, colágeno 1 (<math>\alpha 1</math>), colágeno 2 (<math>\alpha 2</math>), N-caderina o vimentina</li><li>-Relocalización nuclear de CBF-A o <math>\beta</math>-catenina/LEF o expresión <i>de novo</i> por hibridación <i>in situ</i> de Snail, Slug, o Twist</li><li>-Pérdida parcial o total de marcadores epiteliales tales como citoqueratina, E-caderina o ZO-1</li><li>-Morfología celular fusada con redistribución de fibras de estrés o pérdida de la polaridad</li></ul> <p><b><u>Criterios Menores</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-Localización de células con características transicionales cerca del compartimiento epitelial</li><li>-Exclusión de posibles células progenitoras derivadas de médula ósea</li></ul>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Durante el desarrollo de la TEM, cualquiera sea su tipo, se *up* o *down* regula la expresión de diversas moléculas que pueden ser consideradas como biomarcadores de este proceso. La Figura 2, permite una visualización en conjunto de la localización estas proteínas.



**Figura 2.** Esquema representativo de los biomarcadores TEM tipo II. Se generan cambios moleculares, asociados a incrementos (▲) o disminuciones (▼) de proteínas de membranas celulares, del citoesqueleto, de factores de transcripción y de la matriz extracelular.

Los biomarcadores de TEM pueden ser analizados de acuerdo a los siguientes criterios:

*-Marcadores de superficie celular*

Un cambio de la expresión de los diferentes tipos de caderinas ha sido considerado casi prototípico de la TEM. Una disminución de los niveles de la E-caderina, con incremento del tipo N, como el que se observa en células mesenquimáticas, fibroblastos y células neoplásicas, ha sido usada para el seguimiento de este cambio fenotípico durante el desarrollo embriológico y la progresión del cáncer. Debido a que la caderina-OB es un marcador de activación fibroblástica, un cambio del subtipo E al OB es de interés en la TEM tipo II, asociada a fibrogénesis [25].

Un aspecto de importancia en este fenómeno, es la relocalización de las células epiteliales desde el microambiente de las membranas basales hacia la matriz extracelular fibrilar. En este contexto la integrina  $\beta_6$  y el receptor de tirosina quinasa DDR2 juegan

roles fundamentales. [26-28]. DDR2, tras su unión al colágeno tipo I o X, *up-regula* la expresión de la MMP-1 y consecuentemente favorece la motilidad celular [28].

#### *-Marcadores del citoesqueleto*

Un marcador controvertido de TEM es el filamento intermedio vimentina, el cual se expresa en fibroblastos, células endoteliales y células hematopoyéticas [29, 30]. Un aspecto de importancia es que, como esta proteína se inmunolocaliza transitoriamente en células epiteliales adultas en respuesta a diversas injurias, no debería ser analizada como un marcador de TEM tipo II durante la fibrogénesis [31]. Otro biomarcador citoesquelético es el  $\alpha$ -SMA, uno de los seis miembros de la familia de las actinas. En los organismos adultos, una expresión predominante de esta proteína se observa en las células musculares lisas vasculares y en las mioepiteliales [32]. La TEM tipo II se asocia a la presencia de miofibroblastos que eventualmente pueden expresar este biomarcador. Tanto en la fibrosis cardíaca, como en un modelo murino de poliquistosis renal se ha demostrado que la mayoría de las células  $\alpha$ -SMA+, son muy diferentes de los fibroblastos derivados en esta variante de TEM [33, 34].

Otro marcador del citoesqueleto es la  $\beta$ -catenina, una proteína de membrana citoplasmática asociada a caderinas y que es un activador co-transcripcional junto al factor TCF/LEF. Durante la TEM la  $\beta$ -catenina, puede ser localizada en citoplasma -como reflejo de su disociación de la E-caderina- o a nivel del núcleo celular [35].

Finalmente solo se mencionará a FSP1, como el prototipo de marcador fibroblástico, el que se detecta en la TEM tipo II y III [36, 37]. Este factor, uno de los objetos de estudio del presente trabajo de investigación, será abordado más en extenso con posterioridad.

#### *-Factores de transcripción*

Entre los factores de transcripción involucrados en este cambio geno-fenotípico se encuentra FTS-1. Este factor es un regulador de la expresión de una diversidad de genes involucrados en la TEM, entre ellos FSP1, Twist, Snail-1, HMGA2, LEF1, Ets-1, E-caderina,  $\beta$ -catenina, ZO-1,  $\alpha$ -SMA, y vimentina [4].

La familia del factor de transcripción Snail tipos 1, 2 y 3, es un punto de regulación de diversas vías de señalización involucradas en TEM, proceso en el que se encuentra activada [38]. Si bien Snail es reconocido como un supresor de la E-caderina, también cumple funciones tan importantes como: el incremento de la expresión de marcadores de células mesenquimáticas/fibroblásticas (vitronectina y fibronectina), la disminución de los

marcadores epiteliales como claudinas y citoqueratinas, la inhibición de la proliferación celular y el aumento de los niveles de MMP. Se ha demostrado que Snail-1 se halla sobreexpresado en biopsias renales humanas con compromiso túbulo-intersticial y activado en ratones transgénicos con *snail-1* inducible por tamoxifeno resultando en TEM tipo II y fibrosis renal [39].

El factor de transcripción hélice-asa-hélice Twist ha sido demostrado en los tres tipos de TEM, vale decir durante la morfogénesis embrionaria, la fibrosis tisular y en el desarrollo metastásico [40, 41].

#### *-Proteínas de la matriz extracelular*

Entre las moléculas asociadas a TEM y localizadas en los intersticios se halla la fibronectina, proteína considerada como el andamiaje sobre el que se construye esa matriz extracelular, lo que la ubica como un marcador de TEM tipo I. Sin embargo, dada a su natural sobreexpresión en matrices fibróticas y desmoplásicas, su utilidad como biomarcador en TEM II y III es muy limitada [42, 43]. Pese a esto, investigaciones desarrolladas *in vitro*, han demostrado el incremento de sus niveles en ambos tipos TEM [25, 44].

De los marcadores de membranas basales, la laminina es el mejor biomarcador del proceso en cuestión. El tipo I de esta proteína se halla *down-regulado* en ensayos *in vitro* en líneas de carcinomas mamarios, con disrupción y pérdida de su expresión en sistemas *in vivo* durante la fibrosis intersticial renal [45, 46]. En contraste, la *up-regulación* del tipo V está asociada a TEM tipo III en el carcinoma hepatocelular y al tipo II descrito en la fibrosis pulmonar idiopática [47, 48].

#### **La proteína FSP1**

Una de las más interesantes proteínas encontradas en la proteómica del fenómeno de TEM es la FSP1, también conocida en los seres humanos como S100A4 y considerada un marcador prototípico de tal mecanismo [7, 49].

En el proceso de fibrosis tisular, la mayoría de las células epiteliales que sufren TEM tipo II la expresan tempranamente en su transición hacia fibroblastos y, en ratones cuyas células albergan un reportero para FSP1, se ha revelado que más de un tercio de todos los fibroblastos FSP1+ de hígados y riñones fibróticos derivan de TEM [11, 37].

De manera no menos importante se ha corroborado que en modelos animales de cáncer, las células neoplásicas a menudo expresan FSP1, como parte del programa molecular de TEM tipo III [50]. En relación a este biomarcador y al mecanismo de TEM

tipo I, se la considera de poco valor para su determinación, pues su expresión se vincula solo con la aparición del mesénquima embrionario donde se la detecta [10].

Como miembro de la súper familia de las proteínas S100, FSP1 ha sido implicada en interacciones entre el citoesqueleto y la membrana plasmática, en transducciones mediadas por  $\text{Ca}^{++}$ , y en el crecimiento y diferenciación celulares [10, 51]. Se ha postulado que, ante la presencia del ión divalente antes mencionado, FSP1 dimeriza y se une a la porción c-terminal de p-53 a nivel citoplasmático. Este cambio molecular podría incrementar los niveles de  $\beta$ -catenina libre, facilitando y perpetuando de esta manera el fenotipo de TEM, confiriendo motilidad a células en proceso de transición o induciendo angiogénesis [17, 52-54]. Hasta aquí podríamos decir que la neo-expresión de FSP1 indica la potencial presencia de un programa molecular determinante del fenotipo fibroblástico observado en la TEM.

Por otro lado el análisis del promotor del gen de *FSP1* ha demostrado que este es parte de un transcriptoma que es compartido por los genes de otros tantos factores como c-myc, c-Fos, H-ras, Slap, TGF- $\beta$ , FGF-1, 2, y 8, vimentina,  $\alpha$ -SMA, agregan, colágeno tipo I y III y las MMP 2 y 9, complejizando de esta manera el análisis de este cambio genotípico [37].

### **Epitelio tubular e intersticio renales**

Los riñones son órganos con una estructura compleja, la que se asocia a la diversidad de funciones que cumple. Entre ellas se cuentan: la excreción de productos de desecho, la regulación del balance de solutos y agua corporales, la regulación de la presión arterial y la secreción de hormonas [55]. El parénquima de éste órgano se divide en dos regiones fácilmente reconocibles: la corteza y la médula. El riñón humano es un órgano multipapilar. Su corteza es continua e indivisa; en tanto la médula, es discontinua con pirámides individuales que drenan regiones discretas de la corteza suprayacente. Cada lóbulo en este tipo de riñón puede ser observado como la contraparte de un riñón unipapilar entero como el que presentan las ratas y conejos [56].

La corteza renal es la porción más externa del parénquima y se localiza entre la cápsula del órgano y los vasos arcuatos. Este sector contiene los glomérulos y una población heterogénea de segmentos tubulares. Los túbulos renales corticales incluyen: los segmentos rectos alineados en los rayos medulares que se extienden desde la unión córtico-medular hasta la cápsula, y los segmentos contorneados localizados entre los rayos medulares en el laberinto cortical [55]. La porción medular del riñón se extiende desde los



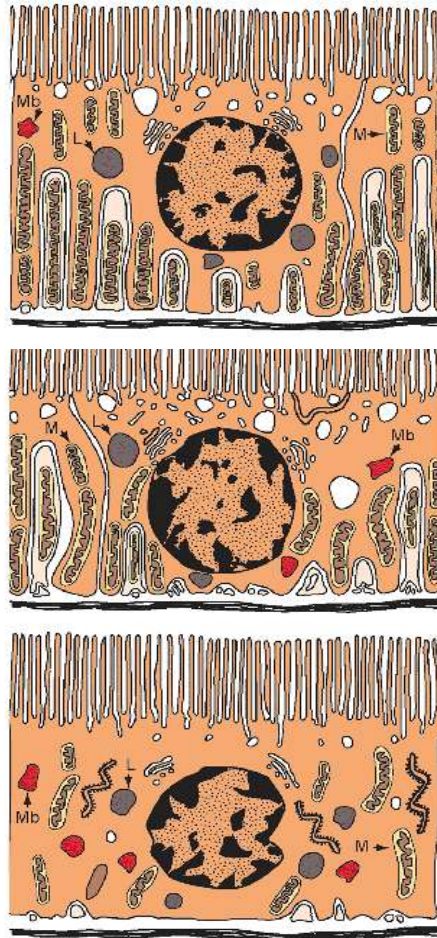
vasos arcuatos hasta las puntas papilares. Esta región se divide en médula externa e interna en relación a la presencia o no de las asas del nefrón. A su vez, la médula externa se subdivide en las bandas externa e interna. La primera banda se caracteriza por la presencia de los perfiles de los túbulos proximales. A su vez la médula interna ha sido dividida de manera arbitraria en 2 o 3 regiones [55].

La *porción tubular* de la nefrona y conductos colectores consiste en un túbulo de naturaleza epitelial con variable estructura y función. Así se describen:

-Túbulo proximal: este túbulo tiene porciones contorneadas y rectas, las cuales han sido divididas en ratas y en base a su ultraestructura en los segmentos S1, S2 y S3 (Figura 3) [56]. El segmento S1 corresponde a la porción inicial del túbulo contorneado proximal, caracterizándose por células epiteliales cuboidales altas, con abundantes microvellosidades y mitocondrias verticales localizadas en profundos plegamientos de las membranas basolaterales [56]. Este segmento también contiene numerosas vesículas endocíticas y un prominente compartimiento lisosomal. El segmento S2, comprende la última parte del túbulo contorneado y la porción inicial del recto proximal. Sus células son cuboidales, con un corto ribete en cepillo, con pocas mitocondrias y escasos elementos del sistema endosómico-lisosomal. Una particularidad es que los plegamientos de la membrana basolateral son reducidos. En la rata se aprecia tanto en este segmento como en el S3, la presencia de numerosos peroxisomas [57]. Finalmente, S3 se caracteriza por largas microvellosidades y membranas plasmáticas basolaterales menos interdigitadas y escasas mitocondrias, cuando se lo compara con los otros segmentos. En el túbulo contorneado proximal se produce la absorción de muchos solutos inorgánicos (sodio, potasio, bicarbonato, cloro, entre otros), orgánicos (glucosa, aminoácidos) y agua [58].

-Rama delgada del asa del nefrón: esta porción se caracteriza por la presencia de una estructura celular con pocas organelas y compartimientos de membranas plasmáticas simples. Este segmento contiene cuatro tipos distintivos de células, conocidas como los tipos I, II, III y IV [59]. Presenta permeabilidad al agua y no a los solutos, participando en el mecanismo de contracorriente, que permite la concentración y dilución de la orina [58].

-Rama ascendente gruesa del asa del nefrón: en el borde de la médula interna y externa se produce una abrupta transición de las porciones delgadas hacia los limbos ascendentes gruesos de Henle. Estas porciones se hallan tapizadas por un epitelio cuboidal, que exhibe mitocondrias altas, empaquetadas y orientadas en sentido vertical. A nivel apical se observan pequeñas vesículas endocíticas y microproyecciones de las membranas plasmáticas hacia el espacio luminal [60].



**Figura 3.** Esquema ultraestructural de los segmentos del túbulo renal proximal. S1 (esquema superior); S2 (esquema medio); S3 (esquema inferior). Histology for Pathologists. 3<sup>ra</sup> edición. Capítulo IX. 2007.

En la rata se han identificado dos tipos celulares, conocidos como células lisas y rugosas, en relación a la cantidad de microproyecciones presentes [61]. La presencia en este segmento del co-transportador NKCC2, sensible a furosemida, permite la reabsorción de solutos, manteniendo la osmolaridad intersticial. Además de la reabsorción de sodio, también se reabsorbe calcio y magnesio. Por ser este segmento relativamente impermeable al agua, se obtiene una orina relativamente diluida. Por último, la porción distal contiene a la mácula densa, constituida por las células epiteliales especializadas del aparato yuxtaglomerular que participa en el balance túbulo-glomerular, el cual regula el flujo sanguíneo glomerular, preservando la filtración en el corpúsculo renal [58].

-Túbulo distal: con este término se incluyen tres porciones morfológica y funcionalmente diferentes: el contorneado distal, el segmento de conexión y la porción inicial del túbulo colector. La primera porción presenta características similares al limbo grueso ascendente, salvo que los núcleos se localizan en la porción apical del epitelio. El segmento de conexión se identifica en el laberinto cortical y se caracteriza por la

heterogeneidad celular: células del túbulo contorneado distal, de conexión, intercaladas y principales [62]. Una de las principales funciones de este segmento es la secreción de potasio, regulada por mineralocorticoides y la absorción de sodio a través del cotransportador NCC sensible a tiazidas. En las regiones más distales, la presencia del canal EnaC, sensible a amiloride participa en la retención de sodio.

-Conducto colector: los segmentos del conducto colector son identificados de acuerdo a la región que ocupan a través de la corteza, en el rayo medular y en la médula propiamente dicha [63]. Se halla constituido por células principales y dos tipos de células intercaladas; las de tipo A y las de tipo B, cuyas proporciones varían a lo largo de éste túbulo, desapareciendo el último tipo en la porción terminal del conducto [64, 65].

Además de la participación en la secreción de potasio, esta región cumple una función importante en la acidificación y concentración de la orina, presentando canales de agua (aquaporinas) y de urea (UT-A) sensibles a vasopresina.

El *intersticio cortical y medular* es el compartimiento extravascular peritubular y consiste de una matriz de colágenos tipo I y III en humanos y I, III y V en ratas, glicosaminoglicanos sulfatados y no sulfatados, glicoproteínas tales como fibronectina y un fluido que alberga a células y al plexo de capilares [66]. El volumen intersticial cortical normal se estima que en los seres humanos es de hasta el 20%, en tanto en ratas es entre el 7% y 9% y se divide en peritubular y en el de las vainas conectivas periarteriales [67, 68]. El primero de ellos se halla representado por zonas muy delgadas de separación entre túbulos adyacentes, con escasa celularidad y es el sector que contiene a los capilares peritubulares, los que se asocian estrechamente a las membranas basales tubulares. El correspondiente a las vainas perivasculares es un tejido conectivo laxo que se extiende hasta las arteriolas aferentes. Contiene fibroblastos, macrófagos, fibras nerviosas y linfáticos. El intersticio medular es más prominente que el cortical y se incrementa conforme se avanza hacia la papila renal: 3 al 5% en la banda externa de la médula externa, 10% en la banda interna de la médula externa, hasta alcanzar el 40% en la médula interna [67].

Las células del espacio intersticial incluyen a los fibroblastos y a un pequeño número de células migratorias del sistema inmunes: células dendríticas, macrófagos y linfocitos [69, 70]. Los fibroblastos del intersticio renal han sido clasificados en varios subtipos, como se describirá a continuación, aunque presentan características similares: todos contienen moderado desarrollo de las organelas proteinopoyéticas, tales como

perfiles anastomosados de RER, ribosomas libres y aparato de Golgi, núcleo estrellado y un citoesqueleto rico en actina, que forma placas de anclaje citoplasmáticas [71].

-Fibroblastos de las vainas perivasculares: contienen organelas más numerosas y un citoesqueleto de actina más complejo que los fibroblastos corticales.

-Fibroblastos corticales: son células con ramificaciones delgadas y largas, que establecen interconexiones con la matriz y células vecinas, sirviendo como un andamiaje para glomérulos, túbulos y vasos renales [72].

-Fibroblastos medulares: los de la porción medular externa son semejantes a los anteriormente descritos. Los que ocupan el espacio medular interno exhiben gruesos y cortos procesos celulares y se orientan de manera perpendicular al eje de los túbulos, como peldaños de una escalera.

-Células medulares cargadas de lípidos: son abundantes en la médula interna y contienen precursores de prostaglandinas [73].

Las células dendríticas que funcionan como presentadoras de antígenos, son el segundo tipo más frecuente de células intersticiales renales y se localizan preferentemente en la banda interna de la médula externa [74].

Los macrófagos se localizan predominantemente en las vainas conectivas arteriales, con grandes citoplasmas, cortos procesos celulares y un marcado desarrollo del sistema fagocítico, vacuolas y vesículas endocíticas [75].

Finalmente, debemos considerar que los linfocitos son raros a nivel del intersticio de un riñón normal y que neutrófilos y células plasmáticas están virtualmente ausentes en este compartimiento.

### **Transición epitelio-mesenquimática y riñón**

Algunos conceptos de este tópico ya fueron considerados en general. La progresión de la ERC, es considerada como un proceso irreversible que eventualmente conduce al fallo renal terminal, una condición clínica grave que lleva a los pacientes a ser dependientes de la diálisis o de un transplante del órgano [76, 77].

Esto genera un gran impacto en la sociedad desde los aspectos sanitarios y económicos [78].

Los mecanismos patogénicos que subyacen a la ERC, se caracterizan por la progresiva pérdida de la función renal a consecuencia de un lento depósito y acumulación de matriz extracelular, conduciendo a una fibrosis tisular difusa. Es conocido que el deterioro de este órgano es determinado por la extensión y severidad de las lesiones

intersticiales, tanto en modelos animales como en el ser humano. Independientemente de la injuria inicial, ha sido descrito como un proceso monótono, caracterizado por la activación *de novo* de miofibroblastos intersticiales positivos para  $\alpha$ -SMA [79, 80].

Mientras que el rol de los fibroblastos/miofibroblastos en la fibrosis renal está bien establecido, su origen y activación permanecen aún controvertidos. Se ha sugerido que derivan de células residentes del riñón o provienen de células progenitoras de la médula ósea. Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado la participación del fenómeno de TEM tipo II en el aporte de células productoras de matriz extracelular. Se debe considerar que el concepto de *TEM tubular* implica un proceso por el cual este tipo celular pierde su fenotipo epitelial y adquiere nuevos y característicos rasgos mesenquimáticos. Aunque la TEM, en la fibrosis renal fue originalmente postulada como una hipótesis, evidencias crecientes han implicado a este proceso como una de las principales vías que conduce a la generación hasta el 30% de los de fibroblastos/miofibroblastos en la enfermedad renal progresiva [5].

Strutz y colaboradores [7] demostraron, en un modelo murino de daño renal inducido por anticuerpos anti-membrana basal tubular, que células epiteliales renales expresan la proteína FSP1, postulando la posible existencia de TEM. Por otro lado, Ng y colaboradores [81] pusieron en evidencia cambios morfológicos y fenotípicos de éste proceso en un modelo de nefrectomía 5/6; mientras que en la nefropatía por obstrucción ureteral unilateral se demostró la coexpresión *de novo* de  $\alpha$ -SMA y marcadores epiteliales con la producción de fibronectina y colágeno tipo I [82].

Poco se conoce respecto a la existencia de un segmento específico de la nefrona que pueda sufrir TEM. Aunque la mayoría de los sistemas usados para la demostración de este fenómeno *in vitro*, son células epiteliales tubulares proximales, no sería sorprendente que bajo ciertos estados de injuria los segmentos distales también podrían participar del progresivo daño fibrótico del órgano, teniendo en cuenta el origen embriológico en común de ambas partes de la nefrona [83]. Por otro lado, el hecho de que la estimulación de células epiteliales de túbulo colector mIMCD-3 con TGF- $\beta$ 1, no sufra cambios compatibles con el fenotipo mesenquimático, refuerza la idea de que el mecanismo de TEM remedaría en realidad una reversión hacia el estado embriológico [84, 85]. Finalmente, cabe destacar que las células del epitelio parietal glomerular podrían estar también comprometidas por este cambio fenotípico, como se demostrara en ratas con ERC [86].

De manera más que interesante, estudios realizados en biopsias renales humanas han demostrado la existencia de este cambio morfo/funcional. En este sentido, Rastaldi y colaboradores [87], han comprobado que independientemente del diagnóstico histopatológico, la TEM tipo II está presente en grado variable. Estos investigadores corroboraron además, que el número de células con TEM se asocia al nivel de creatinina sérica y al daño intersticial, ubicando a este cambio geno-fenotípico en el centro de las investigaciones actuales.

#### Reguladores extrínsecos de TEM tipo II en riñón

Numerosos factores han sido involucrados como reguladores de la TEM en riñón. En la tabla 2, se enumeran aquellos que promueven o inhiben tal proceso.

De los muchos factores identificados, quizás el profibrótico más importante, como ya se mencionara sea el TGF- $\beta$ . Esta proteína, tiene la propiedad de iniciar y completar el proceso de TEM.

El TGF- $\beta$ , funciona como un efector consecuencia de otros factores. Así es que tanto, el FGF-2, la IL-1 y la Ang II tienen acciones sinérgicas sobre el epitelio tubular cuando se administran a cultivos que en el medio presentan TGF- $\beta$ 1, promoviendo los cambios moleculares y morfológicos de TEM [25, 88, 89]. Además de los factores solubles arriba mencionados otros extracelulares juegan también un rol de gran importancia: colágenos tipo I y IV. El primero actúa como promotor y el segundo como supresor del proceso; habiéndose demostrado que la disrupción en la composición e integridad de la membrana basal tubular induce cambios *in vitro* [90]. En este sentido las integrinas de membranas también pueden desarrollar un papel importante en la inducción de TEM (Figura 4). Otros factores extrínsecos inductores de TEM en el riñón son HIF-1 y la vía de plasmina, tras la escisión del plasminógeno por el tPA o la urokinasa [91].

Otro grupo que debe ser considerado es el de los que regulan negativamente la TEM. En este contexto el HGF, es un bloqueante de la transformación fenotípica de las células epiteliales tubulares por TGF- $\beta$  [84]. De la misma manera, estudios llevados a cabo con la proteína BMP-7 han demostrado que la misma puede suprimir la TEM tanto *in vitro* como *in vivo* [92].

**Tabla 2.** Factores extrínsecos involucrados en la TEM renal

<u>Factores promotores y/o inductores de TEM</u>
-TGF- $\beta$
-EGF
-FGF-2
-IL-1
-Ang II
-MMP-2
<u>Factores supresores de TEM</u>
-HGF
-BMP-7

Vías de señalización intracelular mediadoras de TEM II en riñón

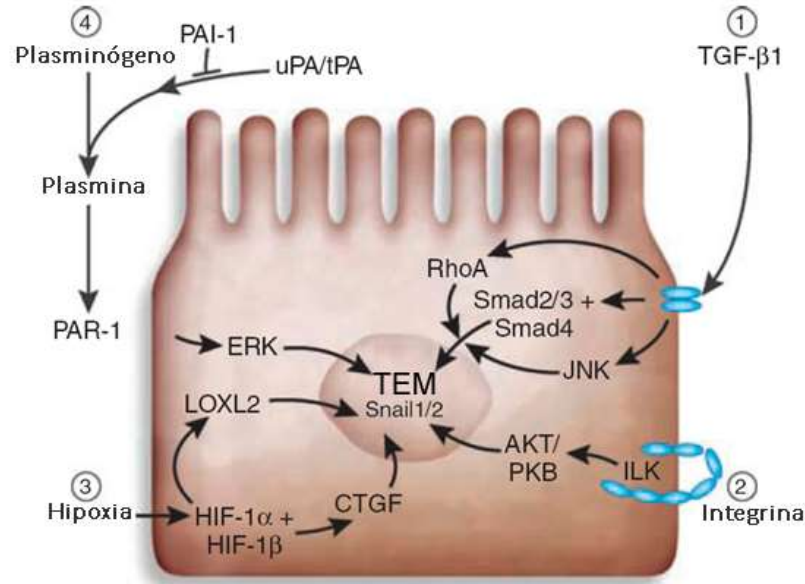
Los mecanismos moleculares que subyacen a esta transformación, son altamente complejos y hasta ahora poco entendidos. Múltiples vías de transducción de señales han sido involucradas en este contexto [93, 94]. Sin embargo, dada la trascendencia de la vía del TGF- $\beta$ 1-Smad 2/3 es que nos centramos en su descripción (Figura 5).

La señalización TGF- $\beta$ 1 es transducida a partir de dos receptores de membrana del tipo de serina/treonina quinasa conocidos como tipo I y II y los mediadores intracelulares Smads [95]. Luego de la estimulación con el factor TGF- $\beta$ 1, se produce la fosforilación de Smad 2/3, la asociación de este dímero con Smad 4 y la subsecuente translocación al núcleo celular, donde controlan la transcripción de genes dependientes de la vía en cuestión (Figura 5) [94,96].

Pese a ser desarrollado con más detalle en el curso de este trabajo de investigación una mención especial merece el receptor de inmunidad innata NALP3 ó NLRP3, que a través de su vía no canónica, sería intermediario de la vía TGF- $\beta$ , fosforilando Smad 2/3.

De esta manera Wang y colaboradores [97], demostraron la disminución de Smad 2/3 fosforilada y la consecuente fibrosis en un modelo de injuria renal en ratones Knock-out para este receptor, mientras que la sobre expresión de NLRP3 aumento notablemente la expresión de Smad 2/3.

Además de la clásica señalización a través de las vías de las Smad, TGF- $\beta$ 1 puede activar en células epiteliales tubulares renales varias otras vías, tales como p-38 MAPK, Akt/proteína quinasa B, RhoA y  $\beta$ -catenina [98, 99].



**Figura 4.** Esquema de los principales factores inductores TEM en el riñón. 1) Vía TGF- $\beta$ : a través de la fosforilación de Smad 2/3 y junto a la dimerización de Smad 4, se traslocan a núcleo para inducir genes participantes en TEM. 2) Vía de integrinas a través de la señal AKT. 3) Vía inducida por hipoxia a través del HIF-1. 4) Vía de plasmina a través de su receptor PAR-1 y la vía de ERK. Tomado y traducido de Strutz y colaboradores (Kidney Int 75:475-478. 2009).

De manera más que interesante se ha demostrado que la sobreexpresión inhibitoria de Smad 7 al abolir la fosforilación de Smad 2, impide la transformación fenotípica de las células tubulares renales, ubicando a la TEM inducida por TGF- $\beta$ 1 como primariamente dependiente de una señalización Smad intacta [100].

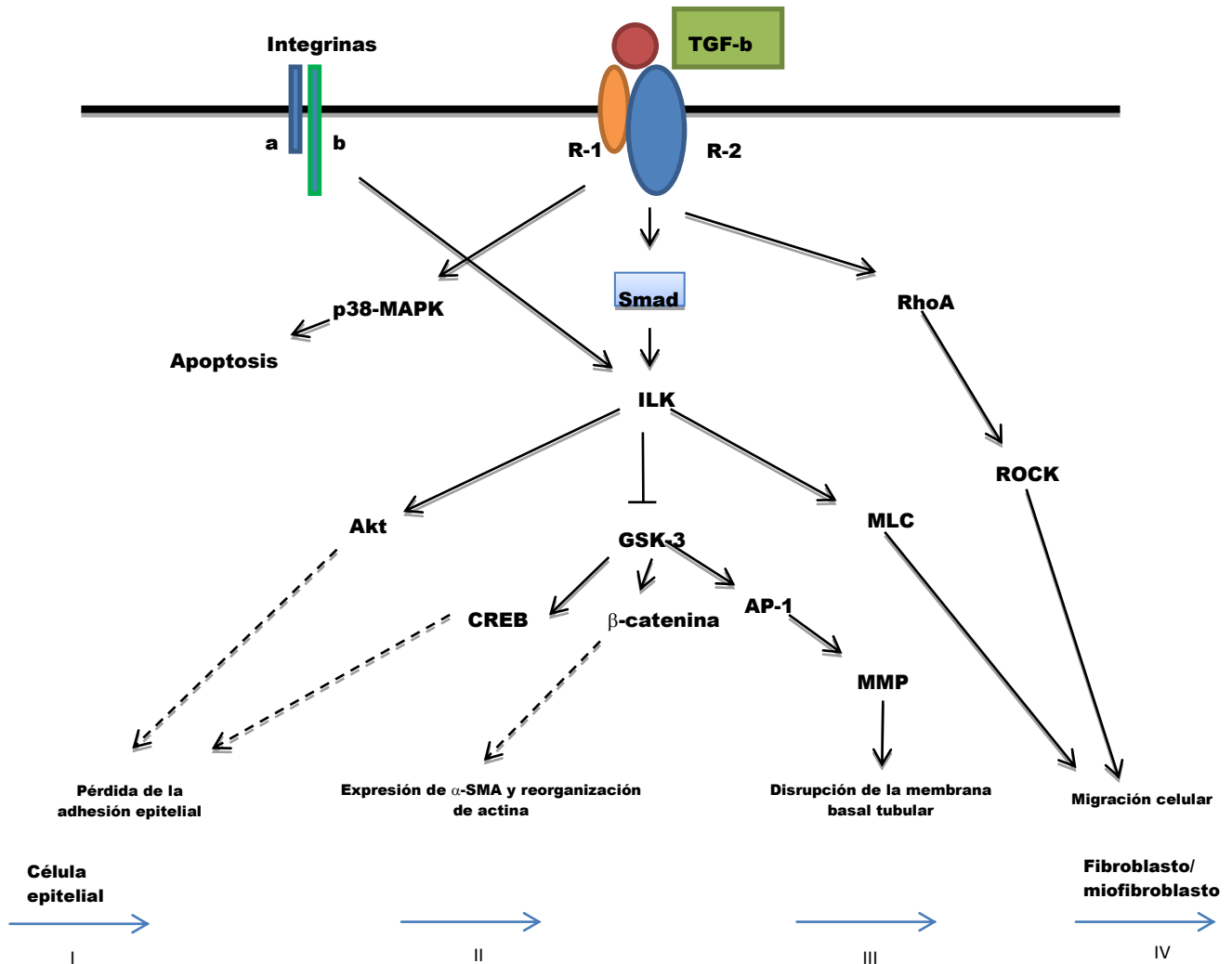
Algunas investigaciones han demostrado que ILK es una molécula *downstream* clave en el proceso de TEM inducida a través de la vía que estamos analizando. ILK es una proteína quinasa de serina/treonina involucrada en la regulación de múltiples procesos mediados por integrinas, tales como la adhesión y los cambios en la morfología celulares, expresión de genes y depósito de matriz extracelular (Figura 5) [101].

### Acido úrico y riñón

El ácido úrico (2,6,8-trihidroxi purina) es el producto final del metabolismo de las purinas en humanos, pero es un producto intermediario en la mayoría de los mamíferos, ya que es convertido en alantoina. Se produce principalmente en el hígado por la acción de la



enzima xantino oxidasa, y es inhibible por el allopurinol y el febuxostat (Figura 6), aunque virtualmente todos los tejidos pueden producirlo.



**Figura 5.** Esquema de las vías de señalización reguladas por TGF-β1 y Smad. Se destaca como la vía TGF-β1 y Smad conforman redes estimuladoras (flechas continuas) e inhibitorias (flechas interrumpidas), que conducen a la transición de una células epitelial hacia un fibroblasto-miofibroblasto en cuatro etapas (I-IV). Modificado de Liu (J Am Soc Nephrol 15:1-12. 2004).

El ácido úrico es un ácido débil, diprótico ( $pK_{a1} = 5,3$ ) por lo que a pH fisiológico el 99% se encuentra disociado

En condiciones *in vitro* puede disociar un segundo protón ( $pK_{a2} = 10,3$ ) [102]. En humanos la eliminación del ácido úrico se realiza principalmente por vía renal, esto queda demostrado en los pacientes con ERC donde los niveles plasmáticos se encuentran elevado.



**Figura 6.** Metabolismo del ácido úrico. A partir de nucleótidos purinérgicos provenientes de la dieta o de la degradación endógena se produce la síntesis de los metabolitos intermediarios. La enzima xantino oxidasa, inhibible por allopurinol es la última etapa en la síntesis del ácido úrico. En animales no homínidos la presencia de uricasa (inhibible por ácido oxónico) convierte el ácido úrico en alantoína que es el metabolito final de excreción.

Así casi 2/3 del ácido úrico es excretado por los riñones, mientras que el otro 1/3 restante lo es por el intestino, donde es metabolizado por bacterias de la flora intestinal por un proceso denominado uricolisis intestinal [103]. El manejo renal del ácido úrico presenta notables diferencias entre las especies. Los homínidos exhiben niveles entre 1 a 2 órdenes de magnitud mayor, por el déficit de uricasa, de esta manera las cantidades y la eficiencia en el manejo del mismo es diferente. Se acepta que en humanos, ratas y ratones el resultado neto del manejo renal de ácido úrico es la reabsorción, mientras que en cerdos, conejos y aves predomina la secreción. En humanos luego de la filtración a nivel glomerular se produce reabsorción, luego secreción, y finalmente reabsorción post-secretoria en el túbulo contorneado proximal, mientras que en roedores tanto el túbulo proximal como el distal participan en la reabsorción y secreción del ácido úrico [103]. Diferentes transportadores renales se han identificado en el manejo del ácido úrico: URAT1, también conocido como SLC22A12, es uno de los más importantes tanto en humanos como en ratas [102, 104]. Este canal se encuentra en el borde microvellosa de las células tubulares proximales, reabsorbiendo el ácido úrico al intercambiarlo con aniones. Luego los uratos pasan a la sangre a través de la membrana basolateral, utilizando otros transportadores como el OAT1 y OAT3. El transportador URAT1 es inhibible por pirazinamida, benzbromarona, losartan y probenecid. El importante rol de este transportador en la reabsorción de ácido úrico queda evidenciado en el cuadro de hipouricemia idiopática que presentan los pacientes con una mutación inactivante de este

canal, los que exhiben un aumento de la fracción excretada de ácido úrico en más de un 60% [105]. Diferentes estudios de asociación genética han demostrado que polimorfismos de este transportador son responsables en parte de las diferencias en los niveles de ácido úrico en humanos [106]. De la misma manera el transportador SCL22A9 [GLUT9] tiene importante función en la reabsorción del ácido úrico. En la secreción del ácido úrico están involucrados los transportadores activos: ABCG2, NPT1 y NPT4 [102].

El rol fisiológico del ácido úrico no está aclarado. Se lo ha considerado desde un simple metabolito de descarte hasta producir beneficios evolutivos, que explican la pérdida de la uricasa en homínidos al favorecer el desarrollo de sal sensibilidad, y de esta manera lograr retener mayor cantidad de sodio y agua favoreciendo la supervivencia.

Actualmente se ha asociado al ácido úrico con la enfermedad cardiovascular y la inflamación, incluso independientemente de la formación de cristales. Aportando a esta disyuntiva, las propiedades físico-químicas del ácido úrico demuestran tanto un comportamiento anti-oxidante *in vitro* como pro-oxidante en algunos sistemas biológicos [103]. Recientemente se ha demostrado que cristales de ácido úrico pueden activar, por mecanismos no del todo aclarados, el receptor de inmunidad innata NLRP3 y desencadenar una respuesta inflamatoria [107].

Niveles plasmáticos de ácido úrico mayores de 7 mg/dl en hombres o mayores de 6 mg/dl en mujeres son considerados hiperuricemia. Diferentes defectos genéticos pueden llevar a la producción exagerada de ácido úrico y al depósito de cristales en diferentes tejidos, denominándose Gota a la artritis mediada por cristales de ácido úrico. Estados de lisis tumoral también pueden provocar cuadros similares. Sin embargo, en la mayoría de las personas la hiperuricemia es asintomática o con aislados episodios de gota. La hiperuricemia moderada asintomática es un estado bioquímico particularmente común en los seres humanos con hipertensión arterial, síndrome metabólico o ERC. Por otro lado se conoce que aproximadamente entre un 20% a un 60% de pacientes con gota, tienen un compromiso de leve a moderado de la función renal y que entre un 10% a 25% desarrollan ERC [108, 109].

Evidencias epidemiológicas han sugerido una asociación significativa e independiente entre los valores de ácido úrico y el deterioro renal, existiendo efectos beneficiosos de la reducción de tales niveles y el control del estado hiperuricémico [110, 111]. Sin embargo, por muchos años ha existido controversia acerca de si el ácido úrico *per se* ejerce un rol etiológico en la disfunción y progresión del daño túbulo-intersticial [112]. La mayoría de los animales, como ya se mencionara tienen bajos niveles de ácido

úrico sérico por la presencia de la uricasa hepática [113]. Esto ha conducido a que el estado de hiperuricemia en roedores deba ser inducido por la administración de un inhibidor de la uricasa hepática, el ácido oxónico, a los fines de generar un modelo experimental para el estudio de la hiperuricemia y la disfunción renal [113].

Trabajos llevados a cabo por Kang y colaboradores [114] han demostrado, en un modelo experimental de riñón remanente e hiperuricemia, que los animales exhiben, tras cuatro semanas de tratamiento con ácido oxónico: hipertrofia renal, hipertensión arterial, proteinuria, compromiso de la función del órgano y un mayor grado de glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial que los animales controles, sin la formación de cristales de ácido úrico en los lúmenes tubulares. Mazzali y colaboradores [113], postularon la participación de los sistemas renina-angiotensina y del NO como mecanismos de daño renal inducido por el ácido úrico. Estos autores demostraron un aumento del contenido de renina a nivel del aparato yuxtglomerular, asociado a una reducción de la expresión de la enzima NOS1 en la mácula densa. Esto llevó a postular claros efectos de vasoconstricción en la arteriola aferente y eferente, implicando de esta manera a AngII en la patogénesis del daño renal inducido por ácido úrico. Por otro lado, Sánchez-Lozada y colaboradores [115], en ratas con leve hiperuricemia, demostraron un incremento en la expresión renal de la proteína de nitratación y superoxidación lipídica, NOX4; conjuntamente con un aumento en los niveles de AngII, otorgando al estrés oxidativo un rol importante en la lesión túbulo-intersticial medida por el ácido úrico. Recientemente se han comprobado cambios bioquímicos de TEM mediados por la molécula antes mencionada. De esta manera Ryu y colaboradores [116], han corroborado, tanto en ratas tratadas con ácido oxónico como en la línea de células tubulares NRK, disminución de la expresión de E-caderina e incremento de  $\alpha$ -SMA, con una atenuación de la fibrosis intersticial en los animales tratados con allopurinol. Además, se estableció que el ácido úrico aumentó la expresión de los factores de transcripción Snail y Slug, ambos asociados con una disminución de la síntesis del marcador epitelial arriba mencionado.

Sin embargo, y si bien los antecedentes descriptos establecen claramente que el ácido úrico es un factor deletéreo *per se* de la función renal actuando a través de múltiples mecanismos, como la disfunción endotelial [117], el estrés oxidativo [118], la inflamación [119], generando cambios en la expresión de marcadores epiteliales/mesenquimáticos [116]; hasta el presente no se han descripto modificaciones morfológicas subcelulares de TEM en estados de aumento leve de sus niveles ni se ha analizado la participación del receptor NLRP3 en la génesis del daño túbulo-intersticial inducido por ácido úrico.

### *La familia de los receptores Nod-like*

Los vertebrados son seres multicelulares frecuentemente expuestos a una multiplicidad de agentes infecciosos y no infecciosos. En animales inferiores la primera línea de defensa contra estas noxas es la inmunidad innata, que consiste en una serie de respuestas estereotipadas ante la presencia de señales peligrosas infecciosas o no infecciosas. En animales superiores, se agrega la respuesta inmune adaptativa que confiere más especificidad y memoria en las respuestas inmunitarias. En este contexto el concepto de inmunidad innata se ha transformado a partir de la identificación de los receptores Toll-like de membrana y los NLR expresados en citosol [120].

Los productos celulares endógenos asociados con injuria tisular o señales de daño, tales como sustancias tóxicas, ácidos nucleicos alterados o la presencia de compuestos celulares normales en localizaciones intra o extracelulares atípicas pueden estimular a los mecanismos innatos a través de los anteriormente mencionados NLR [121].

Si consideramos en conjunto a la familia de proteínas NLR, estas exhiben la siguiente estructura química general:

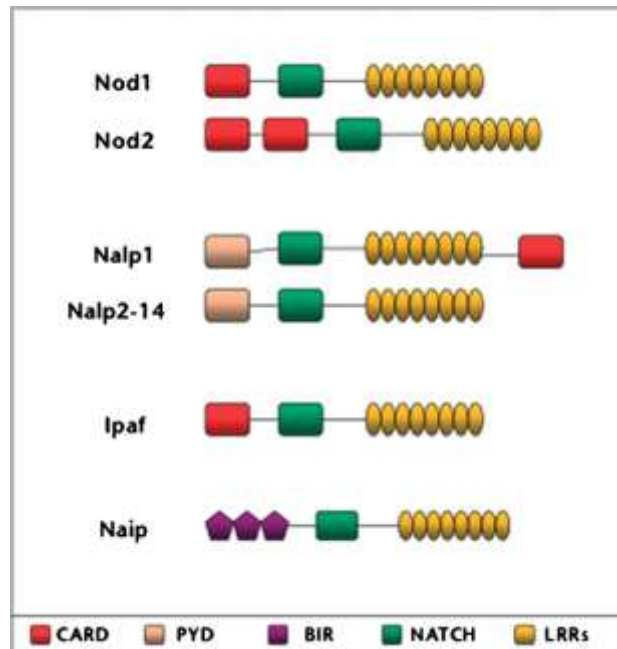
- un dominio C terminal rico en repeticiones de leucinas (LRR)
- un dominio NACHT (Naip, CIITA, HET-E) y TP-1
- un dominio N terminal efector

Basados en el dominio N-terminal es que, las proteínas NLR han sido clasificadas en las siguientes subfamilias: NOD, IPAF, Nalps y Naip (Figura 7) [122].

### *Los inflamasomas*

El término de inflamasoma fue acuñado para describir a complejos proteicos de alto peso molecular que activan a caspasas y consecuentemente a la citoquina inflamatoria IL-1 $\beta$ , y deriva etimológicamente de la unión de las palabras inflamación y el sufijo “soma” que en griego significa cuerpo, el que es frecuentemente utilizado en la biología celular y molecular, como lo expresan los conceptos de ribosoma, proteasoma, liposoma y apoptosoma [123]. Las caspasas son proteasas producidas intracelularmente como zimógenos catalíticamente inactivos que usualmente sufren procesamiento durante su activación [124].

Entre ellas se encuentran las llamadas caspasas inflamatorias [125]. En los mamíferos se han descrito las caspasas humana y murina-1 y -12 y las caspasas murinas -11, -4 y -5 [122].



**Figura 7.** Esquema de la familia de los receptores Nod-like. Los pertenecientes a la subfamilia Nalp presentan el subdominio denominado pirina. Extraído de Lam y colaboradores (J Pathol 214:136-148. 2008).

Estas enzimas tienen como principales sustratos a las pro-citoquinas, pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18, and posiblemente pro-IL-33, todas ellas mediadoras cruciales de la respuesta inflamatoria. La caspasa 1, la que será objeto de estudio en este trabajo, fue la primera en ser descubierta en los mamíferos. Sin embargo, recién en 2002 se demostró que puede ser activada por la vía de los inflamomas [126].

#### Inflamomas prototípicos: NLRP3 [NALP3]

A pesar de la diversidad de esta familia de complejos macromoleculares se han descrito tres inflamomas prototípicos: NALP1, NALP3 e IPAF [127]. A continuación se describe a NALP3 actualmente conocido como NLRP3, cuya expresión será analizada en el presente trabajo de investigación.

NLRP3 abarca a un complejo proteico multimérico, que entre sus componentes incluye al polipéptido descrito, a la proteína adaptadora ASC y a la caspasa-1 [128]. Como ya se mencionara, una vez activada esta caspasa, la misma cliva a la región del aminoácido 116 del extremo N-terminal de la pro-IL-1 $\beta$  citosólica, para convertirla en su forma activa de IL-1 $\beta$  [129]. También, se ha demostrado que esta caspasa puede activar IL-18 e IL-33, habiéndose comprobado que la inhibición de la producción de ROS inhibe la

secreción de IL-1 $\beta$ , sin comprometer la de IL-18, con lo que existirían mecanismos diferenciales para el procesamiento de estas moléculas por el inflamasoma NLRP3 [130, 131]

En relación a los mecanismos de activación del inflamasoma NLRP3, estos están siendo gradualmente descifrados, conociéndose que responden a los llamados DAMPs y PAMPs. Es bien conocido que antes de la activación del inflamasoma son necesarias señales de inducción o “cebado” de la vía, para aumentar los niveles del receptor NLRP3 y de la pro- IL-1 $\beta$ . Sin este “priming” de la vía de la activación del inflamasoma es ineficaz. Básicamente cualquier receptor o vía de señalización que aumente los niveles celulares de Nf- $\kappa$ B es suficiente para lograr este efecto; así la activación de TLR4, del TNF-R o del IL-1R han demostrado capacidad de facilitar la activación del inflamasoma [132].

Se ha documentado un amplio rango de compuestos tanto endógenos como exógenos que activan al inflamasoma NLRP3, e incluyen ARN bacteriano, ATP, toxinas como la Nigecirina que inducen la formación de poros en paredes bacterianas, drogas anti-virales del tipo de imidazoquinolina y cristales de aluminio, sílice, asbestos, colesterol y uratos [133, 134]. Notablemente la capacidad que tienen varios cristales de activar al inflamasoma NLRP3 ha originado gran interés, pues esto ha permitido un mayor entendimiento de mecanismos patogénicos de importantes enfermedades. Por ejemplo, el fenómeno inflamatorio de la gota y la inflamación vascular asociada a la arterioesclerosis, resulta de la activación de NLRP3 por cristales de ácido úrico y colesterol, respectivamente [135, 136]. Además, la activación de NLRP3 es disparada por los bajos niveles intracelulares de potasio y por las radiaciones ultravioletas [135, 137, 138]. La gran diversidad de agonistas descritos ha llevado a proponer mediadores comunes de la activación del inflamasoma NLRP3. Hasta el presente se han postulado tres posibles modelos por los cuales se pueden activar estos inflamasomas: eflujo de potasio, la generación de ROS y la desestabilización de fagolisosomas que conduce a la liberación de catepsina-b al citoplasma celular [138].

Diferentes estudios lograron evitar la activación del inflamasoma NLRP3 ante diversos agonistas inhibiendo el eflujo de potasio incrementando la concentración extracelular o utilizando bloqueadores de canales de aquel ión [135, 139].

El segundo mecanismo más estudiado es el que implica la activación a través de la generación de ROS. Originalmente se demostró que la producción de ROS dependiente de NADPH era un agonista directo de NLRP3. Sin embargo, estudios provenientes de pacientes y animales con deficiencia de NADPH comprobaron que la activación del

inflammasoma permanecía sin alteraciones. Una segunda fuente de ROS como se explicará mas adelante pueden ser las mitocondrias y, una alteración mitocondrial llevar a la activación del inflammasoma. Sin embargo, bloqueando la producción de ROS se ha comprobado que el inflammasoma puede ser igualmente activado, complejizando el entendimiento de las vías de activación del mismo [140-142].

Finalmente un tercer mecanismo propuesto es la desestabilización lisosomal y la liberación de catepsina-b, la cual sería la mediadora de la activación del inflammasoma [140] independientemente de ROS.

Es probable que diferentes mecanismos funcionen simultáneamente ante algunos estímulos severos, o por el contrario que diferentes agonistas despierten distintas vías de activación. En este sentido, se ha demostrado que la MAVS es fundamental en la activación del inflammasoma y en la interacción del NLRP3 con la mitocondria, pero solo ante estímulos no mediados por cristales. Así el animal *knockout* para MAVS muestra una activación adecuada cuando es estimulado por ácido úrico o sílice, pero no cuando es estimulado por ATP o nigericina [143].

El rol de este prototipo de inflammasoma en diversas enfermedades respiratorias, cardiovasculares, renales y metabólicas destaca su importancia. Es bien conocida la participación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades inducidas por cristales como silicosis, gota, aterosclerosis y en diferentes nefropatías. Mulay y colaboradores [144] utilizaron un modelo de nefropatía aguda por oxalatos, los cuales precipitan en los lúmenes de los túbulos renales como sales de oxalato de calcio describiendo así, una vinculación entre inflammasomas e inflamación estéril, con la participación de las células dendríticas renales como el sitio donde se produce la activación del complejo macromolecular que estamos analizando [145].

En tanto, otros autores, han demostrado que la presencia crónica de estos cristales son también inductores de este inflammasoma, por lo que su activación también es un factor del fallo renal progresivo en esta nefropatía [146]. De igual manera se ha comprobado a nivel renal la participación de NLRP3 en la cistinosis, a través de la activación mediada por cristales de cistina [147]. En modelos de nefropatía crónica, se ha reportado el papel de NLRP3 en la progresión de la enfermedad renal, correlacionándose el grado de activación del mismo con el daño renal, incluso en material proveniente de biopsias humanas [148]. Pese a la gran actividad de investigación en esta área la participación del inflammasoma en la nefropatía inducida por ácido úrico y sus mecanismos de activación no han sido descritos.



### *NLRP3 [NALP3], sus vías canónicas y no canónicas y el riñón*

Al presente se han acumulado evidencias que involucran la participación del ya descrito receptor NLRP3 en diversas patologías renales tanto por sus *efectos canónicos* dependientes de IL-1 $\beta$  e IL-18 estimuladoras de la inflamación; como por sus *acciones no canónicas*, independientes de caspasa y dependientes de Smad 2/3, que pertenece a la señalización TGF- $\beta$ /Smad en la TEM y fibrosis intersticial (Figura 8) [149].

#### *Funciones canónicas de NLRP3 [NALP3] en riñón*

La expresión de NLRP3 en los compartimientos subcelulares dentro del riñón no ha sido hasta el presente completamente caracterizada.

Se conoce que los fagocitos mononucleares renales, como macrófagos y células dendríticas, expresan todas las moléculas constitutivas del inflamasoma NLRP3, y podrían sufrir un tipo de muerte celular conocida como piroptosis, tras la activación de caspasa-1 [150].

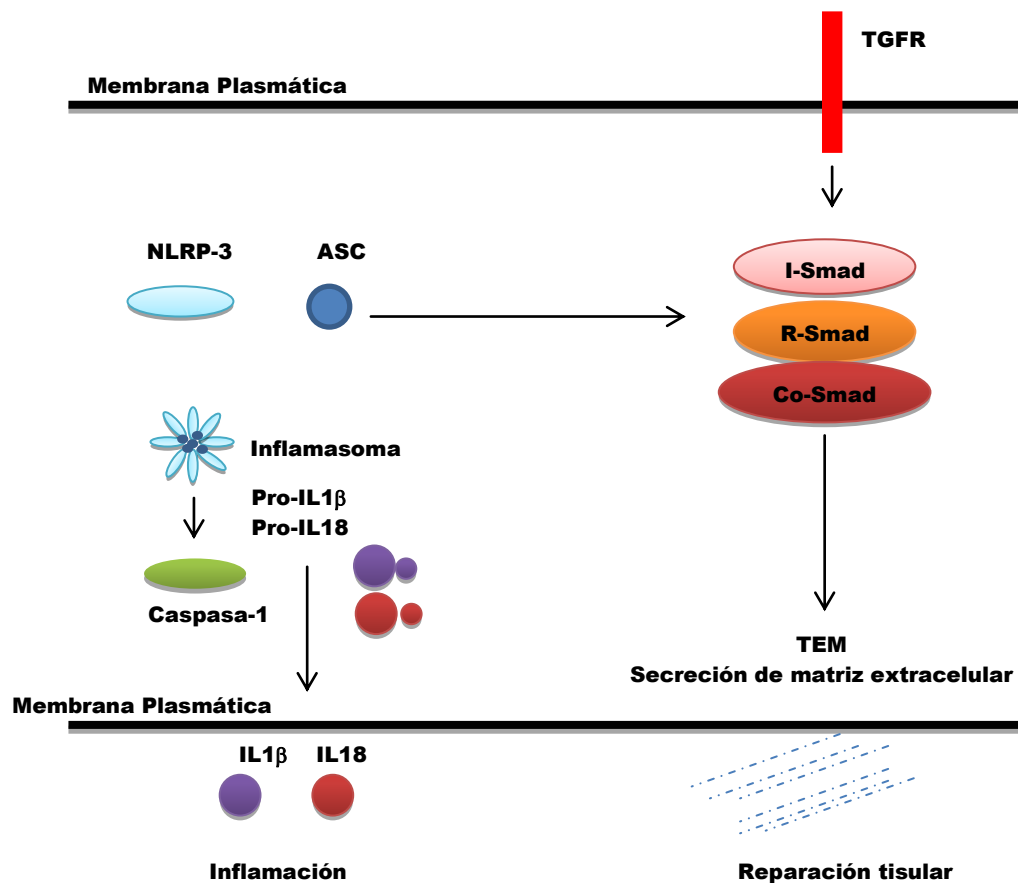
Sin embargo, a pesar de que las células parenquimatosas renales no-inmunes, no secretarían IL-1 $\beta$ , pues no expresan su precursor luego de la activación de NF-k, varios reportes han informado de la síntesis y secreción de IL-18 por células epiteliales tubulares [150-152]. Esto implica que el eje NLRP3/caspasa-1 está también presente en células renales no inmunes. Zhang y colaboradores [153], han demostrado la expresión tanto de NLRP3 como de ASC en podocitos, corroborando la producción de bajos niveles de IL-1 $\beta$  en una línea transgénica de este tipo celular.

Como ya se describiera, se ha comprobado la participación del inflamasoma NLRP3 en la nefropatía experimental por oxalato; así como también su rol en la inflamación post-necrosis isquémica renal [144, 154].

Además se considera a la uromodulina (antiguamente conocida como proteína de Tamm-Horsfald) como un estímulo para la activación de NLRP3 en el asa ascendente gruesa de Henle, una vez que es liberada al intersticio renal con posterioridad al daño tubular [155].

#### *Funciones no-canónica de NLRP3 [NALP3] en riñón*

Diferentes estudios han reportado la activación del receptor NLRP3 sin participación de caspasa ni la secreción de IL-1 $\beta$ .



**Figura 8.** Esquema integral de los efectos mediados por NLRP3, TGF- $\beta$ 1 y Smad. Modificado de Anders y Lech (Kidney Int 84:225-228. 2013).

Por otro lado la estimulación con TGF- $\beta$ , requiere de la presencia de NLRP3 y ASC (pero no caspasa) para la fosforilación de Smad 2/3 [97]. De este modo NLRP3, parece estar involucrado en la TEM de células tubulares, un proceso que como ya fuera analizado se halla asociado con la atrofia del parénquima, la fibrosis intersticial y la ERC. Se ha demostrado la participación del inflamasoma a través de sus vías no canónicas en diferentes modelos de fibrosis, isquemia renal y nefritis lúpica, todos ellos poniendo en evidencia la necesidad del receptor NLRP3 y no de los otros componentes del inflamasoma (ASC y Caspasa) [156-158].

Estos resultados sustentan una participación no-canónica del inflamasoma NLRP3 en la fibrosis renal y sobre todo en la TEM.

### **Mitocondrias, NLRP3 [NALP3] y ácido úrico**

Muchos circuitos metabólicos y vías de señalización han involucrado a la mitocondria en diferentes procesos fisiológicos y patológicos a partir de las diversas funciones que esta organela cumple en las células eucariotas. Solo unos pocos ejemplos de

las mismas incluyen: la fosforilación oxidativa, la biosíntesis y catabolismo de diversas moléculas, la homeostasis del calcio y la producción de ROS a nivel intracelular [159].

La fosforilación oxidativa es una gran fuente de ATP en las células eucariotas y ocurre a través de la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  a nivel mitocondrial. La reducción del  $O_2$  a través de una serie de complejos proteicos (I al IV) es usada para generar un gradiente de  $H^+$  que permite la síntesis de ATP en el complejo V. Este proceso conduce a la formación de varias especies intermediarias de ROS, las que incluyen  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y los radicales hidroxilos. Por lo tanto la mitocondria constituye la principal fuente celular de ROS.

Como ya se analizara previamente, una amplia variedad de señales de daño pueden activar a los inflamasomas NLRP3. Estas incluyen señales exógenas como los lipopolisacáridos bacterianos y endógenas, tales como el ATP y los cristales de urato monosódico los que son indicativos de malfuncionamiento celular [160]. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estos estímulos disparan la activación de NLRP3 son poco conocidos. A pesar de esto hay trabajos que proponen un mecanismo de integración mediado por organelas.

Hasta el momento dos grupos han postulado a la mitocondria como la principal fuente de ROS que dispararía la activación de NLRP3, constituyéndose así en la posible organela integradora de estas señales [161, 162]. Sin embargo, la mitocondria ha sido vinculada a inflamasoma independientemente de la generación de ROS. Zhou y colaboradores [162], han hipotetizado que la mitocondria regularía a NLRP3 en dos niveles. Uno de ellos es en respuesta a uratos monosódicos, donde tanto NLRP3 como ASC se relocalizan en mitocondrias y en membranas del retículo endoplásmico asociadas a mitocondrias. Y un segundo nivel, la activación del inflamasoma NLRP3 por sílice, aluminio y ácido úrico afecta la depleción de los canales mitocondriales aniónicos dependientes de voltaje, los que completamente pueden abolir la generación de ROS (Figura 9). La activación de NLRP3 mediada por virus o drogas como el linezolid también puede ser mediada por mitocondrias [132].

No menos importante es la vinculación del ADNmt con la activación de NLRP3 al menos bajo ciertas condiciones [162]. Estas investigaciones llevadas a cabo en macrófagos derivados de médula ósea, han demostrado que el ADNmt liberado al citosol en respuesta a LPS y ATP, favorece la óptima liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Figura 9). Curiosamente, se ha demostrado que también es importante la proteína conocida como MPT, pues su inhibición bloquea la secreción de las interleuquinas arriba mencionadas, lo cual identifica

un circuito en el cual NLRP3 podría actuar de manera *upstream* y *downstream* de la mitocondria [162].

Por otro lado diferentes estudios han vinculado al ácido úrico con la disfunción mitocondrial. Lanasa y colaboradores demostraron que en cultivos celulares, la exposición a altos niveles de ácido úrico induce un estado de estrés oxidativo mitocondrial, pérdida del potencial de membrana y alteración morfológica de las mismas [163].

Quang y colaboradores [164] en células endoteliales comprobaron que la hiperuricemia induce aumento del anión superóxido y peróxido de hidrogeno mitocondrial, mediado por el incremento del calcio intra mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial fue prevenida por el bloqueo de los intercambiadores mitocodriales de sodio-calcio. Siguiendo esta misma línea, se ha reportado en un modelo *in vivo* que los niveles de ácido úrico inducirían una pérdida de la masa mitocondrial y mayor estrés oxidativo [165]. Considerando estos datos la relación entre el ácido úrico y la mitocondria podrían constituir un nexa patogénico entre la activación de NLRP3 y la hiperuricemia.



**Figura 9.** Esquema de la participación integral de señales de daño (DAMPs), mitocondrias y NLRP3 como generadores de interleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-18.

## ***HIPÓTESIS***

La progresión del daño túbulointersticial renal crónico inducido por un estado de hiperuricemia genera cambios morfológicos y bioquímico de transición epitelio-mesenquimática con la participación de NALP3, actualmente conocido como NLRP3 en sus acciones canónica y no canónicas.

La comprobación de la hipótesis planteada podría develar posibles blancos terapéuticos para prevenir, detener la progresión o revertir la enfermedad renal crónica, mejorando así la calidad de vida de la población y reduciendo la morbi-mortalidad asociada a estos estados. Consecuentemente descenderían los costos en salud pública y se evitaría la disminución de la población económicamente activa afectada por esta dolencia.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Analizar la presencia morfológica de la transición epitelio-mesenquimática (TEM) y de moduladores de la inmunidad innata a nivel renal en un modelo de enfermedad renal progresiva.

### Objetivos Específicos

- Evaluar la expresión de la proteína FSP1 como marcador de TEM y como indicador de daño renal generado por la hiperuricemia.
- Caracterizar a nivel ultraestructural el modelo de daño túbulo-intersticial inducido por ácido úrico, demostrando la localización subcelular de los factores asociados a TEM.
- Examinar la participación del inflamasoma NLRP3 [NALP3] en la progresión del daño túbulo-intersticial inducido por ácido úrico.
- Analizar cambios en la expresión de caspasa-1beta en el estado de hiperuricemia.
- Evaluar la expresión de Smad 2/3 fosforilada en la lesión renal inducida por ácido úrico.
- Analizar el estado morfo/funcional mitocondrial en un modelo de hiperuricemia *ex vivo*.
- Estudiar el efecto de la hiperuricemia sobre la actividad mitocondrial *in vitro*.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Animales y Desarrollo de Modelos Experimentales*

En el presente trabajo de investigación se emplearon ratas de la cepa *Wistar*, machos, exocriadas, de 2 meses de edad, con un peso de 200 a 250 g. Todos los animales fueron mantenidos en un bioterio con fotoperíodo (10 h de oscuridad y 14 h de luz) y temperatura ( $25 \pm 2$  °C) controlados, con acceso a agua corriente y alimento balanceado (Cargill, División Nutrición Animal, S.A.C.I., Córdoba), suplementado con semillas de girasol y avena.

Con el objetivo de generar un incremento significativo de los niveles de ácido úrico a nivel plasmático se analizaron inicialmente diferentes modelos experimentales utilizando un bloqueante de la uricasa hepática, el ácido oxónico (Oxinic acid potassium salt 97%, Sigma-Aldrich; St Louis, Mo, USA) con el agregado en algunos casos de ácido úrico (Uric acid U2625, Sigma-Aldrich; St Louis, Mo, USA). De forma paralela y con el propósito de confirmar que los hallazgos observados sean secundarios al ácido úrico y no al bloqueante enzimático, se les administró en el agua de bebida allopurinol en una dosis 150 mg/L (Gador, Argentina).

### *Modelos experimentales*

Modelo I: ácido oxónico al 2% administrado por vía oral en alimentos procesados.

Modelo II: ácido oxónico administrado por inyección subcutánea (250 mg/kg).

Modelo III: iguales condiciones al modelo anterior + ácido úrico por vía intraperitoneal (250 mg/kg).

Modelo IV: ácido oxónico y ácido úrico administrados por vía subcutánea a una dosis de 250 mg/kg.

Modelo V: ácido oxónico y ácido úrico ambos al 2% vía oral (AOX+U).

En función de los niveles de ácido úrico y al estado de disfunción renal (niveles de urea) alcanzado por los animales de experimentación se optó por el Modelo V, analizándose los siguientes grupos experimentales:

Grupo C: ratas controles con dieta normosódica (C).

Grupo AOX+U: ratas sometidas a dieta normosódica y suplementada con ácido oxónico + ácido úrico ambos al 2% (AOX+U), por un período de 7 semanas.

Grupo ALL: ratas tratadas con ácido oxónico + ácido úrico ambos al 2% + allopurinol (ALL), por un período de 7 semanas.

Para cada experimento se utilizó al menos 4 ratas por grupo.



### *Evaluación de los modelos experimentales*

En los grupos experimentales se evaluaron los niveles de ácido úrico y urea, en muestras de suero a través de kits comerciales en un laboratorio de análisis clínicos especializados (LACE) de la ciudad de Córdoba, Argentina, donde se empleó el método enzimático por autoanalizador. Las determinaciones antes mencionadas se realizaron los días 0, 28 y 49 de tratamiento.

Las muestras fueron recolectadas de sangre capilar a través de una incisión de la cola de los animales de experimentación, previa anestesia con isoflurano 2,5% (Forane, Abbott).

### *Análisis morfológico con Microscopía Fotónica*

Cumplidas las 7 semanas de tratamiento los animales de los diferentes grupos experimentales fueron anestesiados según peso corporal con xilazina 7 mg/kg (Alfasan, Holanda)/ketamina 80 mg/kg (Ketonal, Richmon, Argentina) por vía intraperitoneal. Se corroboró la pérdida de la respuesta a reflejos doloroso (plantar y cola). Posteriormente se realizó fijación de los tejidos por perfusión intravascular. Para esto se canalizó el ventrículo izquierdo con aguja curva 13-gauge, realizándose un corte en aurícula derecha para permitir la exanguinación mientras se iniciaba la perfusión con solución fisiológica 0,9% heparinizada (10 UI/ml) a 20 ml/min hasta lograr el aclaramiento total de los tejidos. Con posterioridad la solución de perfusión fue reemplazada por formol al 4% en buffer PBS (pH 7). Finalizada la perfusión, se separaron fragmentos de tejidos renales. Algunos se colocaron en una solución de formol al 4% para su posterior inclusión en parafina y otros en solución de Karnovsky 4% (formol 8% y glutaraldehído 4%) para el análisis ultraestructural. Las muestras incluidas en parafina fueron cortadas (micrótomo tipo Minot) con un espesor de 4  $\mu$ m, desparafinadas, hidratadas y coloreadas con la técnica de tricrómico de Masson. Esta técnica fue empleada a los fines de realizar un estudio del componente túbulo-intersticial. Para dicho análisis se utilizó el método estandarizado "point-counting" con una grilla ocular de 10 x 10 a 400X de magnificación, y contando la cantidad de puntos coincidentes con el área intersticial en 10 campos consecutivos de 100X de la corteza renal de cada animal en el grupo C y AOX+U. Se consideró área intersticial a todo los puntos que no se correspondían con células tubulares, lúmenes, glomérulos o espacios vasculares. Para dicho análisis se utilizó el software Image J V1.34s (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) [166].

Para el análisis de la inflamación y fibrosis intersticial renal se empleó un estudio semicuantitativo en cortes con tinción de tricrómico de Masson, procediéndose a la captura de un total de 110 áreas fotográficas (55 en grupo C y 55 en grupo AOX+U) a una magnificación de 400X y tomadas al azar de regiones continuas de la corteza renal. El grado de infiltrado inflamatorio fue caracterizado como: *leve o ausente* (sin infiltrado o presencia de hasta un foco de menos de 5 células mononucleares intersticiales), *moderado* (hasta dos cúmulos de 5 células o más) y *severo* (tres o más cúmulos de 5 células o más; o infiltrado continuo cubriendo más del 10% del área analizada). El análisis fue realizado por tres patólogos independientes (estudio cegado), con una buena concordancia entre ellos, con diagnóstico unánime en el 86,3% de casos y con un estadístico Kappa igual a 0,73 ( $p < 0,001$ ).

### **Caracterización ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión**

Con el objetivo de analizar la morfología ultraestructural pequeños fragmentos de riñón de los grupos C y AOX+U se fijaron por inmersión en solución de Karnovsky al 4%, durante 4 h a temperatura ambiente, procesándose el material por la siguiente técnica:

- Lavado: tres lavados con agua destilada, de 10 min cada uno.
- Postfijación con tetróxido de osmio al 1%, a temperatura ambiente por 2 h, en rotor.
- Lavado con agua destilada.
- Deshidratación con acetona de graduación creciente 50%, 75% durante 5 min en cada una; 90% por 10 min y 100% destilada y deshidratada sobre tamiz molecular N° 3 (Merk) durante 15 min. Este paso se realiza a temperatura ambiente y en rotor.
- Inclusión en una mezcla de resinas epóxicas (medio de inclusión) compuesta de:

Araldita 506

Epon

Anhidrido dodecenilsuccínico (DDSA)

Diobutilftalato (DBP)

Acelerador dimetilaminobenceno (BDMA)

La inclusión fue realizada de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1- Infiltración en una mezcla de partes iguales del medio de inclusión y acetona 100% durante 3 h como mínimo.
- 2- Pre-inclusión en una mezcla completa de Epon/Araldita a temperatura ambiente durante 6-8 h.

3- Inclusión final: en Epon/Araldita a 60 °C durante 24 h.

Con posterioridad las muestras fueron cortadas con ultramicrotomo a un espesor de 80 nm y recolectadas en grillas de níquel para luego ser contrastadas con una solución de acetato de uranilo alcohólico a saturación (1 min), lavadas con agua destilada y expuestas finalmente a una solución de citrato de plomo por un lapso de 2 min, para ser observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Zeiss Leo 906.

### **Estudio inmunohistoquímico de secciones en parafina**

Con el material incluido en parafina, se realizaron inmunomarcaciones empleándose anticuerpos policlonales para las proteínas FSP1, NLRP3, caspasa 1 y Smad 2/3 fosforilada.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-BSA al 1% empleándose las siguientes concentraciones:

anti-FSP1 (Abcam, ab27957) 1:200

anti-NLRP3 (Santa Cruz, sc34410) 1:150

anti-caspasa 1beta (Abcam, ab17820) 1:100

anti-Smad 2/3 fosforilada (Millipore) 1:100

Se utilizaron como anticuerpos secundarios:

-anti-conejo biotinilado: 1:130 para FSP1, caspasa 1beta y Smad 2/3 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

-anti-cabra biotinilado: 1:200 para NLRP3 (Santa Cruz).

El amplificador de señal empleado fue el sistema avidina-biotina (ABC) (Vectastain ABC Kit-Vector Laboratories USA) y como revelador el cromógeno diaminobencidina (DAB) (3,3´diaminobenzidine- tetrahydrochloride-Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Para demostrar la especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas, las secciones fueron incubadas con PBS-BSA 1%, en reemplazo de los anticuerpos primarios (control negativo) y se emplearon los siguientes controles de positividad:

-FSP1: inmunomarcación en tejido amigdalino humano.

-Smad 2/3 fosforilada: carcinomas folicular y papilar de tiroides.

A continuación se detalla la técnica inmunohistoquímica aplicada:

- *Desparafinización en tres xiloles y en etanoles de graduación decreciente e hidratación en agua destilada*
- *Recuperación antigénica*
  - Micro-ondas (potencia 800 W) en buffer citrato (pH 6) o EDTA (pH 8), durante 30 s al 100% de potencia y posteriormente al 20% de potencia por 14 min.
  - Lavado con PBS y aspirar exceso de líquido.
- *Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena*
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Baker) al 3 % en metanol por 15 min.
  - Lavado en PBS: 2 lavados de 5 min cada uno.
- *Bloqueo de uniones no específicas*
  - Suero normal de cabra 1:20 en PBS-leche 1,5% o PBS-BSA al 1% a temperatura ambiente por 30 min.
- *Incubación con anticuerpo primario*
  - 1 h a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4 °C.
  - Lavados con PBS, 3 veces por 5 min cada uno.
- *Sistema de revelado*
  - Antisuero secundario biotinilado diluido en PBS-BSA 1% por 30 min a temperatura ambiente.
  - PBS: 3 lavados de 5 min cada uno.
  - Sistema ABC, en una dilución de 1:100 en PBS durante 30 min a temperatura ambiente.
  - Lavados con PBS por 5 min.
  - DAB (2,3 mg. de DAB en 3,3 ml de TRIS-HCl 0,2 M pH 7.6). Incubación: DAB diluida en tampón TRIS-HCl 0,2 M pH 7.6 al que se agrega 50 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%.
- *Contracoloración*
  - Hematoxilina durante 30 s
- *Deshidratación y Montaje*
  - Inmersión de los cortes en etanol de graduación creciente durante 2 min y dos pasajes en xilol de 2 min cada uno. Montaje con bálsamo sintético y cubre objeto.

En las secciones de riñones incluidos en parafina y donde por la técnica de inmunohistoquímica se analizaron las proteínas de interés FSP1, NLRP3, caspasa 1 y Smad 2/3 se empleó una superficie total de  $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  contabilizando el número de túbulos que expresaran dichas moléculas en al menos 2 células epiteliales. Se utilizó el

software Image J V1.34s (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) y AxioVision V4.8.2 (Carl Zeiss Microimaging).

### **Inmunolocalización a nivel de Microscopía Electrónica**

#### **A- Procesamiento del material**

La fijación para la inmunolocalización se realizó por inmersión con Karnovsky al 1,5 % en buffer cacodilato y la inclusión de los fragmentos de tejido renal fue llevada a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Deshidratación: etanol 50°, 70°, 90°; durante 15 min en cada uno a temperatura ambiente.

La preinclusión e inclusión se realizó en resina acrílica LR White (The London Resin Co. Ltd) de acuerdo al siguiente procedimiento.

- Preinclusión: LR White-alcohol 90°: por 2 h.

LR White: por 30 min. Luego se realiza un cambio para dejarlo toda la noche.

- Inclusión en LR White, en anaerobiosis a 50° durante 24 h, en cápsulas de gelatina.

#### **B- Técnica inmunocitoquímica**

Los fragmentos de corteza renal incluidos en LRW fueron seccionados en cortes finos de 80 nm (color de interferencia dorado) con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Jeol JUM-7. Los cortes se montaron en grillas de níquel de 250 barras sin soporte. Los cortes se inmunomarcaron sobre gotas de los reactivos depositados sobre parafilm.

El protocolo de las reacciones inmunocitoquímicas comprendió la siguiente secuencia:

- Bloqueo con PBS-Albúmina al 1%, por 15 min a temperatura ambiente.

- Incubación con anticuerpo primario; toda la noche a 4 °C.

anti-FSP1: 1:50

anti-NLRP3: 1:50

anti-Smad 2/3 fosforilada: 1:50

- Lavado con PBS.

- Bloqueo con PBS-Albúmina al 1% por 15 min a temperatura ambiente.

- Incubación con proteína A oro coloidal y/o Ig-G anti-conejo unida a oro (dilución 1:20), por 30 min a 37 °C.

- Lavado con agua destilada.

- Secado de los cortes a 37 °C.
- Coloración con solución acuosa saturada de acetato de uranilo por 30 s. Los cortes fueron examinados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906.

### **Técnica de Western Blotting**

#### **A- Separación electroforética de proteínas en base al peso molecular en condiciones desnaturizante de homogenatos renales**

Fragmentos de tejido renal cortical, previo al contacto con la solución de fijación, fueron obtenidos y lisados en hielo con la adición de 200 µl PBS refrigerado con Igepal CA-630 1.25%, EDTA 1 mM, PMSF 2 mM, leupeptin 10 µg/ml y aprotinin 10 µg/ml. Posteriormente se realizó centrifugación a 14,000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y guardado en alícuotas congeladas a -70 °C hasta su uso.

La concentración total de proteínas fue medida con un kit comercial (Bio-Rad kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las proteínas fueron desnaturizadas por calor y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, usando una concentración del 4% en el gel concentrador y 10% en el gel de corrida.

Las dimensiones de los geles fueron 8.2 cm x 5 cm x 1 mm (Miniprotean II, Bio Rad) donde se sembraron 50 ug de proteína para la determinación de caspasa-1 beta.

Para verificar el peso molecular de las proteínas de interés se utilizó un marcador de pesos moleculares (Full Range Rainbow Molecular Weigh; Amersham Pharmacia Biotech).

#### **B- Transferencia e inmovilización a un soporte sólido**

Completada la electroforesis se realizó la transferencia. Una porción de membrana de nitrocelulosa (0.45 µm de poro, Hybond ECL Amershan.) con una dimensión similar al gel, se equilibró durante 15 min en la solución preparada de acuerdo a Towbin y colaboradores [167] compuesta por 25 mM Tris, 192 mM de Glicina y 20% de metanol. Posteriormente se pusieron en contacto la membrana con el gel de poliacrilamida y en una cuba (Bio-Rad) se efectuó la transferencia durante 1 h a 300 mA, en agitación constante.

#### **C- Formación y detección del complejo antígeno-anticuerpo**

- Bloqueo de sitios de unión no específica con PBS-Tween 20 (0,1%)-leche 5%; 1h en agitación a temperatura ambiente.

- Incubación con anticuerpo primario anti-caspasa 1 (1:200. Abcam, ab17820) diluido en PBS-Tween-20 (0,1 %)-leche 5% a temperatura ambiente, en agitación.
- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, en agitación a temperatura ambiente.
- Incubación con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Jackson Immunoresearch Labs Inc, West Grove, PA, USA) diluido 1:2500 en PBS-Tween-20 (0.1%)-leche 5% por 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, en agitación.
- Incubación con agente de detección quimioluminiscente (Kit ECL Amersham).
- Exposición de la membrana a una placa fotográfica (Kodak) para la detección de las señales quimioluminiscentes procedentes de los blots de las proteínas (Hyperfilm ECL Amersham).
- Revelado y fijación de la placa fotográfica (Kodak).

Las densidades de las bandas correspondientes a los resultados del Western blot fueron analizados con el programa Image J 1.47 software (National Institute of Health, USA).

### **Análisis de la funcionalidad mitocondrial**

Estos experimentos se llevaron a cabo en el Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC (Florianópolis-Brasil) bajo la supervisión de la Profesora Dra. Alexandra Susana Latini. Se realizaron estudios de fisiología mitocondrial utilizando oxígrafo de alta resolución (Oroboros Oxigraph 2K, Austria). Se analizaron los estados respiratorios 3 y 4, para obtener el índice de control de respiración (RCR) que es la relación de estado 3/estado 4. Para esto se añadió en cada cámara del oxígrafo sustrato para complejo respiratorio I, NAPH dependiente (Piruvato 2 M + Malato 0,8 M) seguido de un periodo de estabilización (estado IV), tras lo cual se adicionó ADP 0,5 M (estado 3). Lo mismo se realizó para el complejo II, FADH<sub>2</sub> dependiente, con el agregado previo de Rotenona 1 mM para inhibir el complejo I, utilizándose como sustrato del complejo II Succinato (1mM), y luego del periodo de estabilización (estado IV) se agregó ADP 0,5M (estado 3).

#### **1) Estudios *in vitro* de estados respiratorios**

##### **A) Mitocondrias aisladas de riñón de rata Wistar macho**

Se realizó el aislamiento de mitocondrias renales según técnica ya descrita por Latini y colaboradores [168]. Resumidamente, a partir de pequeños fragmentos de tejidos renal, los cuales fueron homogenizados a 300 rpm con homogenizador mecánico en

solución respiración compuesta por fosfato monopotasio 4,5 mM, sacarosa 300 mM, ácido 3-(N-Morpholino) propanesulfónico/ácido 4-morpholinepropanesulfónico (MOPS, Sigma M1254) 5 mM, EGTA (Sigma E3889) 1 mM y albumina sérica bovina 0,1%. Posteriormente se realizó centrifugación fraccional, iniciándose a 3000 g durante 10 min a 4 °C. A continuación se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda centrifugación a 17.000 g, obteniéndose un pellet conformado principalmente por mitocondrias, el cual fue resuspendido en 250 µl de solución respiración. El dosaje del contenido total de proteínas de la suspensión se efectuó a través de kit comerciales (Bradford) a fin de sembrar cantidades equivalentes de proteínas mitocondriales en cada prueba fisiológica.

Posteriormente, se colocaron 0,12 mg/ml de proteína mitocondrial en cada cámara del oxígrafo de alta resolución en 2000 ml de solución respiración con concentraciones crecientes de ácido úrico (5, 7 y 10 mg/dl). Con cada concentración de ácido úrico se obtuvieron los estados respiratorios 3 y 4, y el RCR. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces con mitocondrias de diferentes animales. Cada animal fue testado al menos 3 veces, promediándose las mediciones.

### **B) Cilindros de corteza renal de animales controles**

Cilindros de corteza renal de 1 x 2 mm fueron seccionados con bisturí a 4 °C, y luego permeabilizados con saponina 100 ug/ml de buffer respiración durante 40 min. Posteriormente durante las mediciones fueron inmersos en buffer respiración con concentraciones crecientes de ácido úrico (5, 7 y 10 mg/dl). Con cada concentración de ácido úrico se obtuvieron los estados respiratorios 3 y 4, y el RCR. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces con mitocondrias de diferentes animales. Cada animal fue testado al menos 3 veces, promediándose las mediciones.

### **2) Estudio *ex vivo* de estados respiratorios en mitocondrias aisladas de riñones del modelo de hiperuricemia crónica**

Se procedió a realizar el aislamiento de mitocondrias renales, a partir de pequeños fragmentos de tejidos renal de cada animal del grupo C y AOX+U. Se analizaron mitocondrias de 4 ratas por grupo, y se realizaron al menos 3 mediciones por animal. Se obtuvieron los estados respiratorios 3 y 4, y el RCR.



### **3) Medición de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria por espectrofotometria**

Tejido renal, tanto del grupo C como del AOX+U, fue homogenizado en frío a 1300 rpm con homogenizador mecánico en 250 mM sucrosa, 2 mM EDTA, 10 mM Tris y 50 UI/mL heparina. Los homogenatos fueron centrifugados a 800 g durante 10 min a 4 °C. El pellet resultante fue descartado, tomándose el sobrenadante para el análisis de la actividad de los complejos enzimáticos.

La actividad de los complejos II, II-III y succinato dehidrogenasa fueron determinados de acuerdo al método de Fischer y colaboradores [169]. La actividad de los complejos IV y V fueron medidos según Rustin y colaboradores [170], mientras que los complejos I-III fue analizados de acuerdo al método descrito por Schapira y colaboradores [171]. Finalmente, la actividad del complejo I fue realizada de según Cassina y Radi [172].

#### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó empleando el software SPSS 17.0 (versión de descarga libre desde internet). Se utilizó la prueba de Levene para igualdad de varianzas, test T para comparación de 2 variables cuantitativas de distribución normal, ANOVA para datos cuantitativos de 3 o más variables y el test de Chi cuadrado para las variables cualitativas. Coeficiente Kappa para comparar la concordancia entre la clasificación del infiltrado inflamatorio entre médicos patólogos.

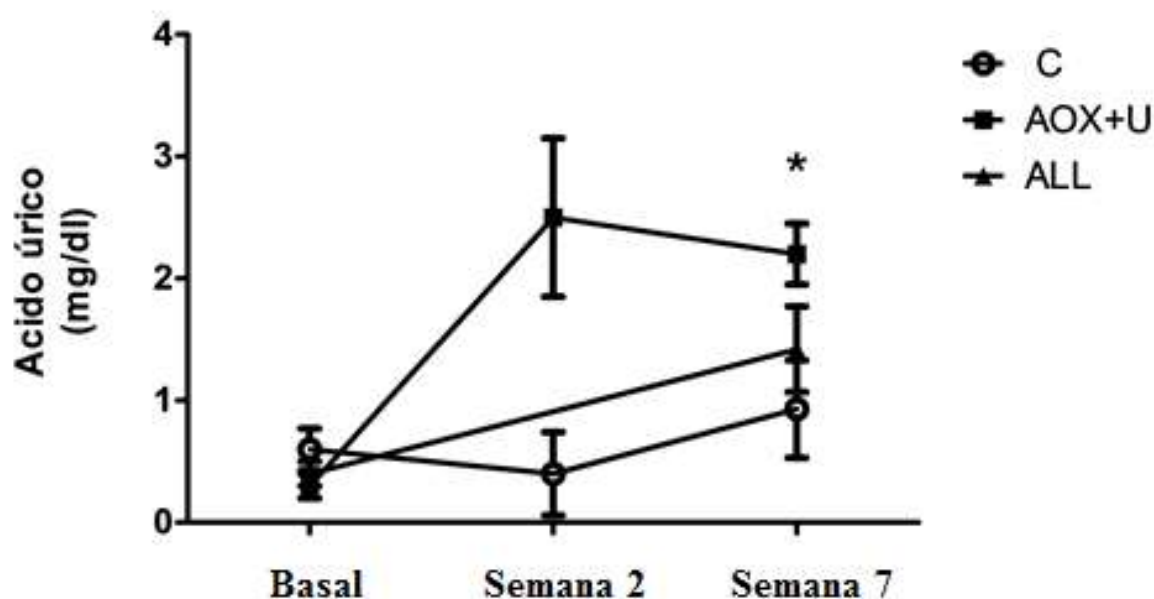
## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

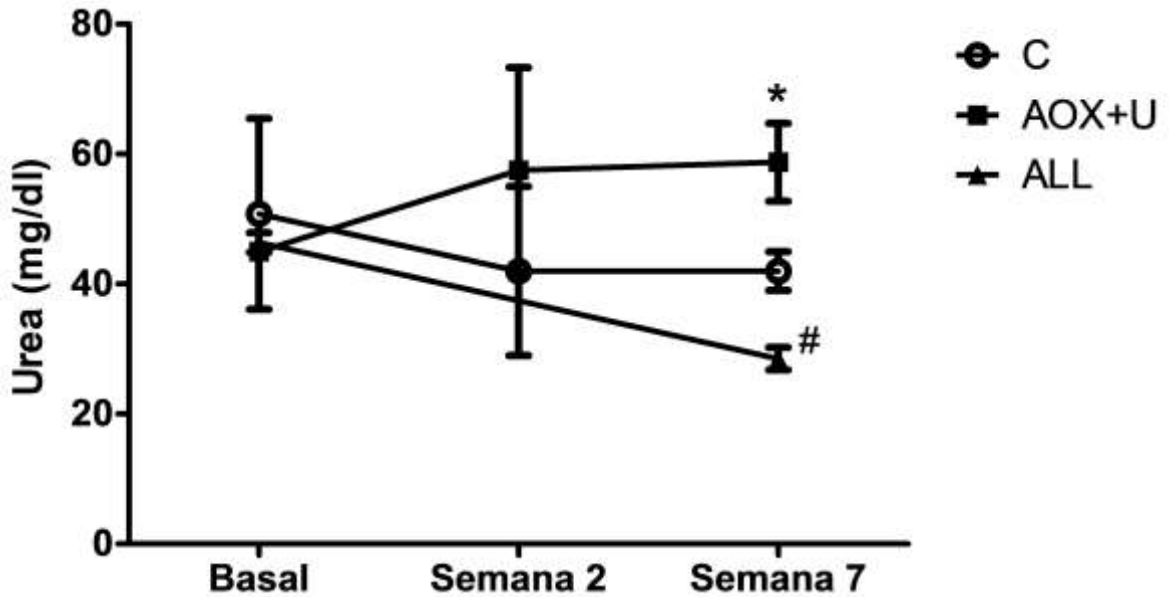
### Función renal: cambio inducido por ácido úrico

El tratamiento de ratas macho de la cepa Wistar con ácido oxónico (inhibidor de la uricasa hepática) suplementado con ácido úrico ambos al 2% (AOX+U), indujo un incremento significativo de los niveles plasmáticos de este último respecto de los animales controles ( $p < 0,02$ ), alcanzando valores de  $2,2 \pm 0,5$  mg/dl en relación a los  $0,9 \pm 0,7$  mg/dl determinados en las ratas sin tratamiento a las 7 semanas (Figura 1). Esta diferencia se pudo objetivar al menos desde las 2 semanas de iniciado el tratamiento. En tanto que el agregado de allopurinol en agua de bebida, evitó tal incremento de los niveles de ácido úrico, alcanzando  $1,0 \pm 0,3$  mg/dl, no demostrándose diferencia respecto al grupo control ( $p = 1,0$ ).

A las 7 semanas de tratamiento con AOX+U, los animales experimentaron un aumento significativo de los niveles de urea en plasma, alcanzando valores de  $58,8 \pm 6$  mg/dl, mientras que el grupo C mantuvo promedios de  $42 \pm 3$  mg/dl y el grupo ALL  $28,5 \pm 2$  mg/dl ( $p < 0,001$ ) (Figura 2).



**Figura 1.** Niveles plasmáticos de ácido úrico en ratas Wistar control y sometidas a tratamiento AOX+U. El grupo experimental AOX+U evidencia un incremento significativo de los niveles de ácido úrico respecto del grupo C y ALL desde la segunda semana de tratamiento. C, grupo control; AOX+U grupo con suplemento de ácido oxónico y ácido úrico; ALL, grupo tratado con allopurinol además del ácido oxónico y ácido úrico. \* $p < 0,02$  respecto grupo C y ALL.



**Figura 2.** Niveles plasmáticos de urea. En animales tratados con AOX+U se observa un incremento significativo de los niveles de urea comparados con los animales del grupo C y ALL. C, grupo control; AOX+U grupo con suplemento de ácido oxónico y ácido úrico; ALL, grupo tratado con allopurinol además del ácido oxónico y ácido úrico. \* $p < 0,01$  respecto grupo C y ALL.; #  $p < 0,01$  respecto grupo C y AOX-U.

*Cambios macroscópicos de riñones de ratas tratadas con ácido oxónico y suplementadas con ácido úrico*

Tras 49 días de tratamiento con ácido oxónico suplementado con ácido úrico, los riñones presentaron cambios morfológicos bilaterales en su superficie externa, comparados con los animales controles (Figura 3). La misma exhibió retracciones de aspecto cicatrizal que no arrastraban parénquima al decapsular el órgano. Al corte tal afección solo comprometió zonas renales corticales con una distribución irregular.



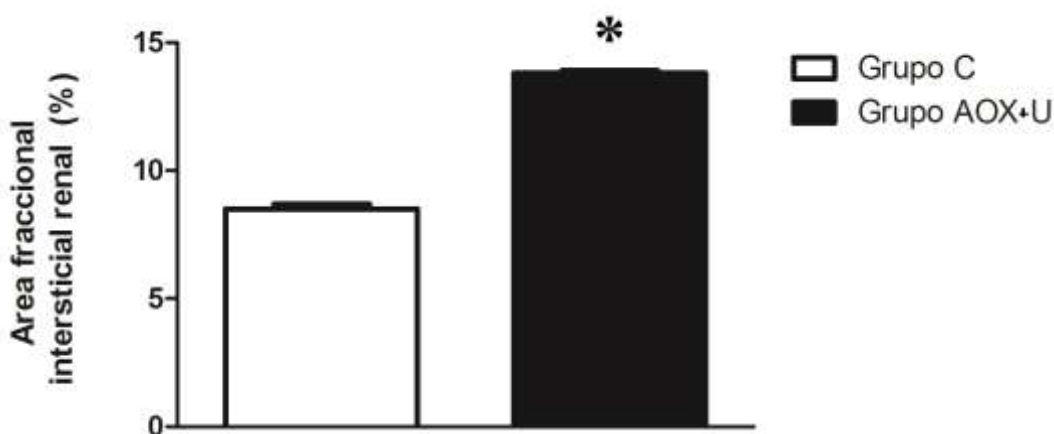
**Figura 3.** Superficie externa de riñones de ratas controles (A) y del grupo AOX-U (B). Se aprecia cicatrización y depresión de la superficie externa del órgano tras su decapsulación.

### Análisis morfológico de la corteza renal de rata macho hiperuricémicas

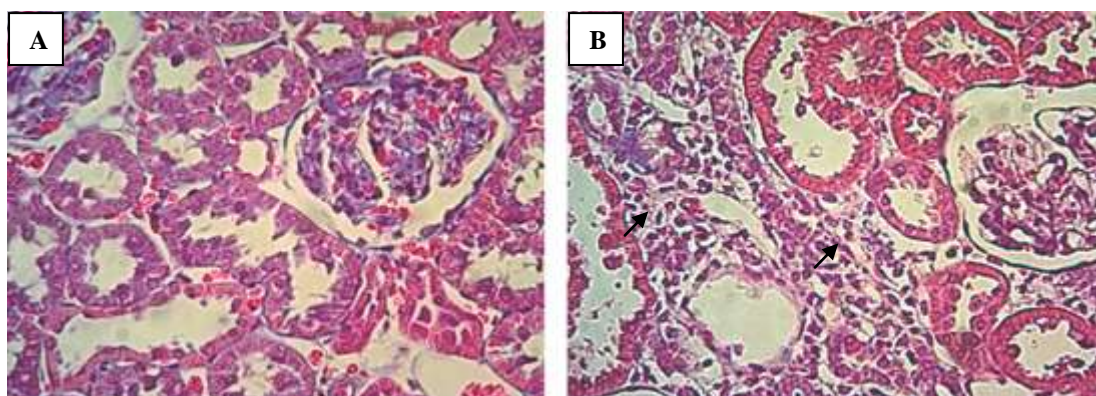
Las áreas corticales renales de los animales del grupo AOX+U exhibieron marcados cambios estructurales a nivel del túbulo-intersticio.

A las 7 semanas de tratamiento, se identificó un incremento relativo del 72% del área intersticial renal en las ratas expuestas a mayores niveles de ácido úrico en comparación con las ratas controles. Así el intersticio renal representó el 8% del área fraccional renal en el grupo C, mientras que los animales con altos niveles de ácido úrico el área intersticial alcanzó el 13,8% ( $p < 0,001$ ) (Figura 4).

El análisis morfológico realizado por microscopía fotónica puso en evidencia marcado infiltrado inflamatorio mononuclear, edema y áreas con incremento de la matriz extracelular intersticial, que adoptaron una distribución multifocal intertubular en los animales hiperuricémicos respecto a los controles (Figura 5).



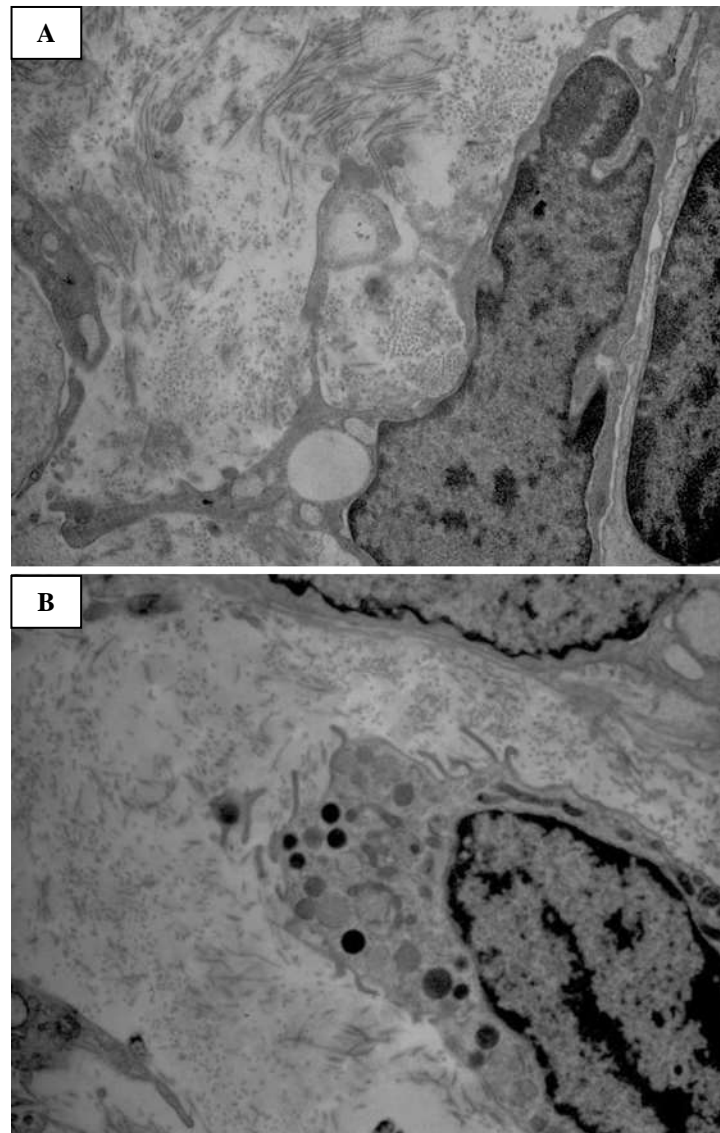
**Figura 4.** Porcentaje del área fraccional renal en ratas macho controles y expuestas a altos niveles de ácido úrico. El grupo AOX+U evidenció una mayor área intersticial renal en comparación al grupo control ( $13,8 \pm 0,02$  vs.  $8,5 \pm 0,08$ ;  $*p < 0,001$ ).



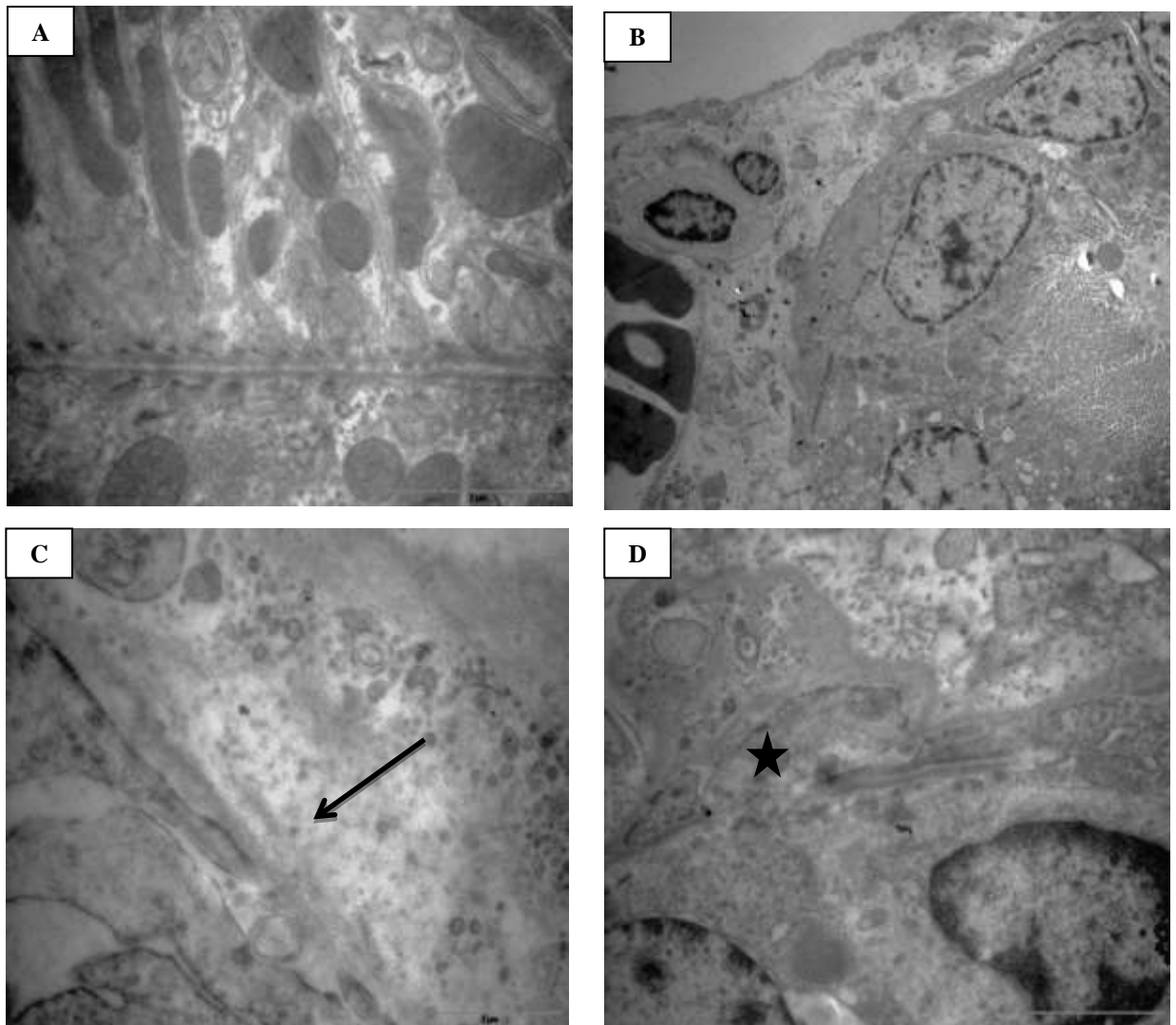
**Figura 5.** Microfotografía fotónica corteza renal de rata macho control (A) y tratada con AOX+U durante 7 semanas (B). En los animales controles (A) se aprecia disposición de espalda contra espalda de los túbulos renales, con escaso intersticio interpuesto. El estado de mayor nivel de ácido úrico (B) se asocia a expansión intersticial debida a infiltrado inflamatorio mononuclear, edema y fibrosis (flechas). Tricrómico de Masson. 400X

El estudio ultraestructural del túbulo-intersticio de los animales del grupo AOX+U mostró numerosas fibras colágenas maduras y fibroblastos (Figura 6-A), así como células linfoides y mastocitos (Figura 6-B), distribuidos en torno a túbulos renales algunos de los cuales exhibieron cambios subcelulares de TEM (Figura 7).

El tratamiento con AOX+U indujo cambios morfológicos subcelulares del epitelio de los túbulos contorneados proximales. Se apreciaron modificaciones en la porción basal de los mismos, con rarefacción de las membranas basales y extensiones citoplasmáticas hacia el espacio intersticial (Figura 7).



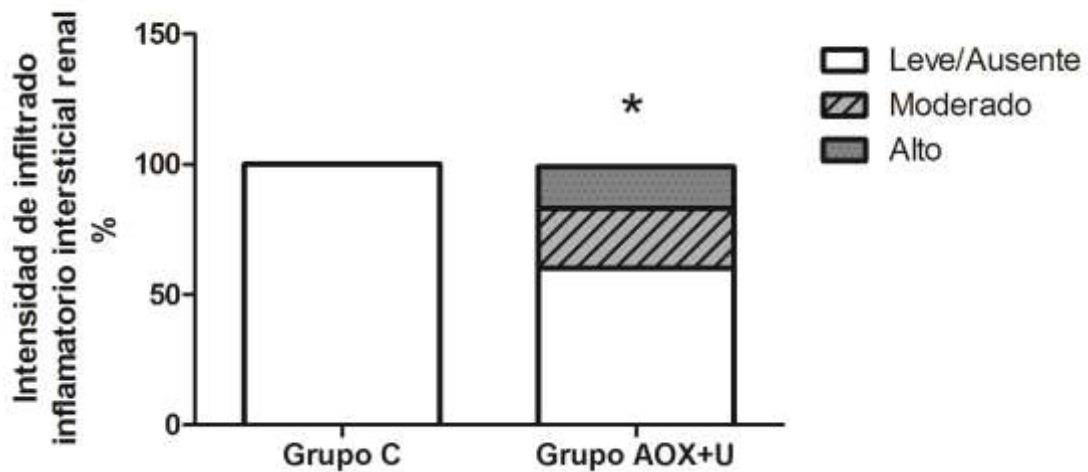
**Figura 6.** Microfotografía electrónica de rata trata con ácido oxónico y ácido úrico por 7 semanas. A-Se aprecia incremento significativo de las fibras colágenas intersticiales así como fibroblasto maduro. B-Mastocito con citoplasma cargado de gránulos marcadamente electrodensos y algunos con discreta electrolucidez. 7500X



**Figura 7.** A-Microfotografía de porción basal de epitelio tubular de rata normouricémica (7000X). B-Micrografía electrónica de rata Wistar macho expuesta a altos niveles de ácido úrico que muestra túbulo proximal con modificaciones estructurales de su membrana basal, edema intersticial e infiltrado inflamatorio mononuclear (3000X). A mayor magnificación y comparando con los túbulos de un animal normouricémico (A), se identifica rarefacción de la membrana basal tubular (MBT) (C-flecha-10000X) y extensiones de citoplasmas epiteliales que atraviesan pérdidas focales de la MBT (D-asterisco- 10000X).

El análisis del infiltrado inflamatorio intersticial en los cortes de parafina del grupo C (n=55 fotos) y AOX+U (n=55 fotos) fue realizado por tres patólogos independientes con una buena concordancia entre ellos, mostrando diagnóstico unánime en el 86,3% de fotos y con un estadístico Kappa igual a 0,73 ( $p < 0,001$ ).

Las ratas del grupo AOX+U presentaron en el 39% de las áreas analizadas un infiltrado inflamatorio con una intensidad de moderada a alta, en tanto que los animales controles se identificaron muy escasas células mononucleares en el espacio peritubular (Figuras 5 y 8).

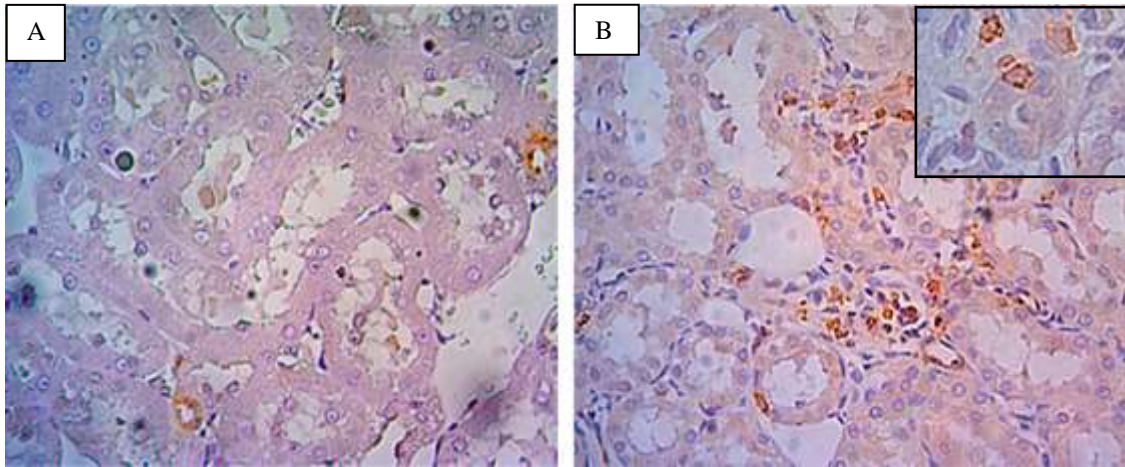


**Figura 8.** Infiltrado inflamatorio intersticial renal. Las ratas Wistar macho con mayores niveles de ácido úrico (AOX+U) presentaron en un 23% y 16 % de las áreas analizadas moderado y alto grado de infiltrado inflamatorio mononuclear respectivamente; mientras que en el grupo control todas las áreas analizadas presentaron escasa o nula cantidad de células inflamatorias mononucleares. \* $p < 0.001$  vs. control.

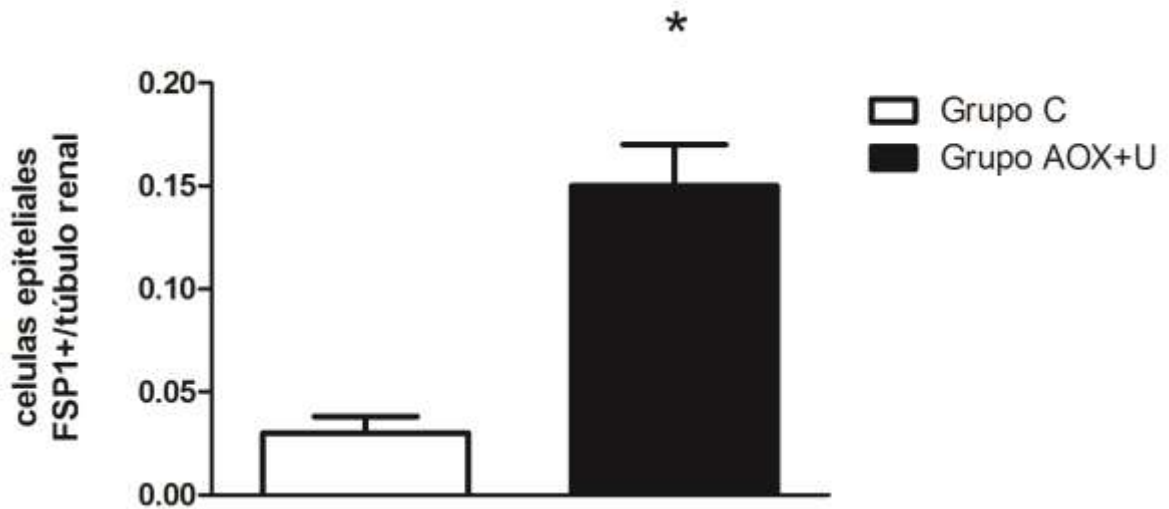
*Inmunolocalización de la proteína FSP1 a nivel de microscopía fotónica y electrónica*

La inmunomarcación realizada en secciones de parafina para FSP1, proteína marcadora del fenómeno de TEM cuando se expresa en células epiteliales, evidenció inmunopositividad citoplasmática para esta proteína. En el grupo control hubo inmunoreactividad predominantemente en las paredes vasculares, mientras que en el grupo AOX+U las células inmunopositivas se distribuyeron tanto a nivel intersticial como en el revestimiento epitelial tubular (Figura 9). Se analizaron 463 túbulos del grupo C, correspondientes a 10 microfotografías a 400X de magnificación por cada animal y en 3 animales y 587 túbulos en el grupo AOX+U, correspondientes a 10 fotos en cada uno de 4 animales y a igual aumento. El análisis de inmunopositividad de la población de células epiteliales tubulares evidenció un incremento de 5 veces en los animales tratados con ácido oxónico/ácido úrico, respecto de los animales con niveles normales de uricemia (Figura 10 y Tabla 1).





**Figura 9.** A- En animales normouricémicos FSP1 inmunomarcó principalmente en paredes vasculares (400X). B-Células inmunoreactivas para FSP1 en compartimiento túbulo-intersticial de rata con altos niveles de ácido úrico (400X). Inset: rata AOX+U exhibe inmunomarcación citoplasmática en células epiteliales tubulares y fibroblasto-mesenquimáticas.



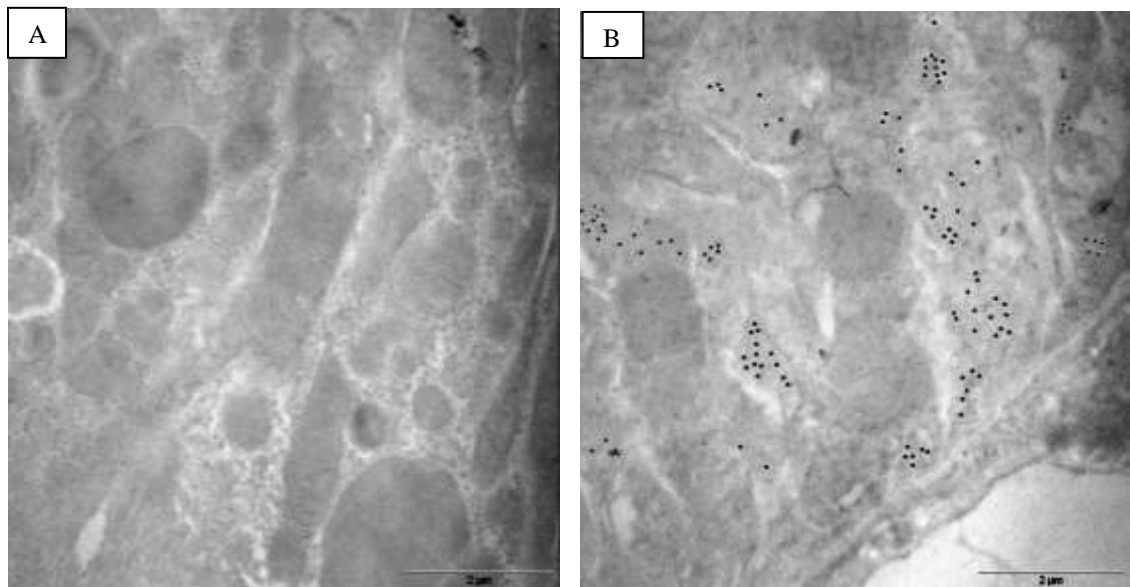
**Figura 10.** Número de células epiteliales por túbulo renal inmunoreactivas para FSP1 e identificadas a nivel de microscopía fotónica aplicando la técnica de avidina-biotina (promedio ± ES). El incremento en los niveles de ácido úrico (AOX+U) produjo un aumento significativo del número de células inmunopositivas respecto al control (C). \* $p < 0,0001$ .

**Tabla 1.** Análisis cuantitativo de la expresión de FSP1 en células epiteliales renales

	<b>Grupo C</b>	<b>Grupo AOX+U</b>	<b>p</b>
<b>FSP1+</b>	11	103	
<b>Túbulos (n)</b>	462	587	
<b>Cél+/Túbulo (<math>X \pm Ds</math>)</b>	0,03 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,17	<0,001

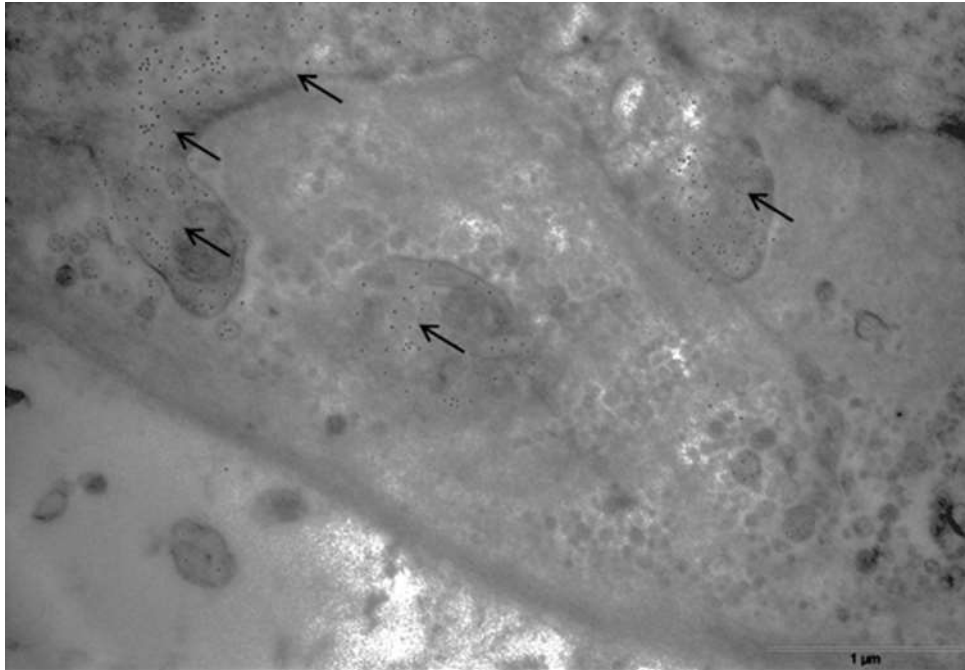
FSP1+: células epiteliales positivas para proteína específica de fibroblasto; Grupo C: control; Grupo AOX+U: grupo con suplemento de ácido oxónico y ácido úrico 2%.

La inmunomarcación para FSP1 realizada a nivel de microscopía electrónica de transmisión, puso en evidencia células epiteliales tubulares positivas en el grupo de ratas tratadas con AOX+U. Las células exhibieron inmunopositividad a nivel del compartimiento citoplasmático, específicamente en matriz citosólica (Figura 11).



**Figura 11.** A-Inmunomarcación ultraestructural para FSP1 en rata normouricémica. B-Inmunolocalización subcelular de FSP1 en epitelio tubular de rata con altos niveles de ácido úrico. Nótese en el grupo AOX+U (B) la presencia de partículas de oro coloidal asociadas a la marcación de la proteína de interés exhibiendo una distribución difusa en matriz citosólica. Barra 2  $\mu$ m.

A los fines de determinar si las células epiteliales tubulares que mostraban cambios morfológicos de TEM también expresaban FSP1, se realizó la inmunodeterminación de esta molécula en las mismas secciones donde se apreciaron los cambios típicos antes mencionados (Figura 12). El análisis inmunocitoquímico permitió la observación de partículas de oro coloidal marcando la proteína analizada a nivel de la matriz citoplasmática de las porciones basales de células epiteliales tubulares.

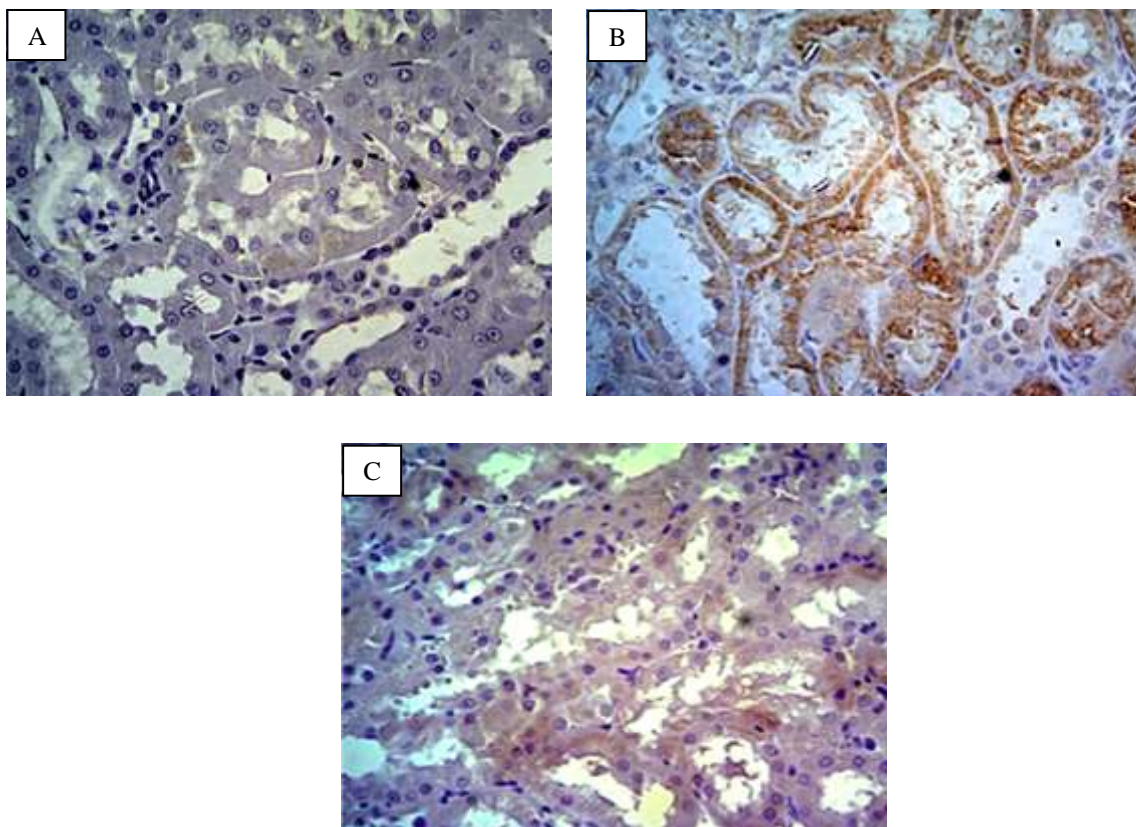


**Figura 12.** Microfotografía electrónica de riñón de rata macho tratada durante 7 semanas con AOX+U. Porción basal de célula epitelial tubular que exhibe fuerte inmunoreactividad para FSP1 a nivel de expansiones citoplasmáticas que invaden la membrana basal tubular (flechas). Barra 1  $\mu$ m.

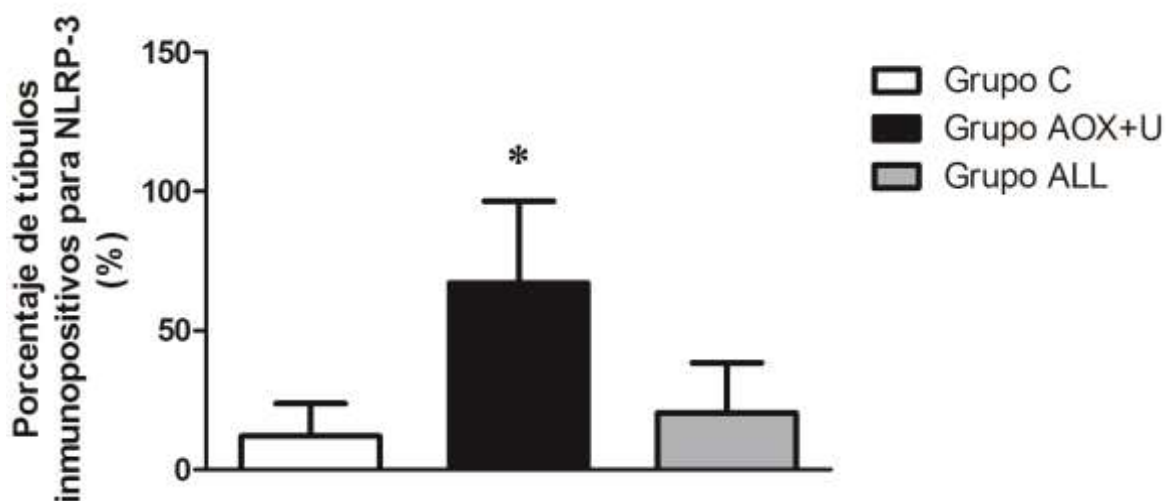
*Inmunolocalización de NLRP3 [NALP3] a nivel de microscopía fotónica y electrónica de transmisión en rata macho controles y con altos niveles de ácido úrico*

El receptor NLRP3 se inmunodetectó en riñones de grupos controles y estimulados con AOX+U durante 7 semanas (Figura 13). En los animales controles (n=4), sólo el 5% de los 496 túbulos analizados resultaron con más de 2 células peroxidasa positivas, mientras que el grupo con altos niveles de ácido úrico (n=4) presentó inmunoreactividad en el 67% de los 396 túbulos analizados, estos cambios fueron prevenidos en el grupo ALL (7% de 340 túbulos analizados), donde los niveles de ácido úrico fueron disminuidos debidos a la presencia de allopurinol (Figura 13 y 14).

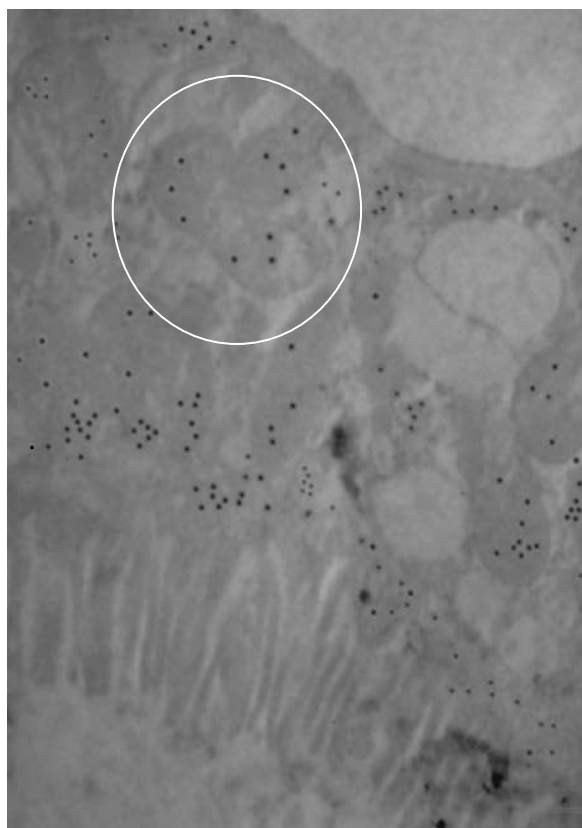
En el análisis ultraestructural la proteína se inmunodetectó solo en células epiteliales tubulares (Figura 15). Las partículas de oro coloidal se localizaron en el compartimiento citoplasmático. A este nivel se apreció inmunomarcación tanto en matriz citosólica como en mitocondrias de animales con mayores niveles de ácido úrico.



**Figura 13.** Expresión de NLRP3 en corteza renal de ratas Wistar a través de técnica de peroxidasa. A las 7 semanas de tratamiento se observa una marcada expresión del receptor en ratas con altos niveles de ácido úrico (B) respecto del grupo control (A). Esta expresión se vio notablemente disminuida en las ratas que además de suplemento de ácido oxónico recibieron allopurinol (C) (400X).



**Figura 14.** Análisis cuantitativo de la expresión de NLRP3 en células epiteliales renales. Se observa un incremento relativo de más de 10 veces en el grupo con altos niveles de ácido úrico (AOX+U) respecto del control (C) y del grupo sometido a tratamiento con allopurinol. \*  $p < 0,001$  (n=4 ratas por grupo, 100-125 túbulos analizados por animal).

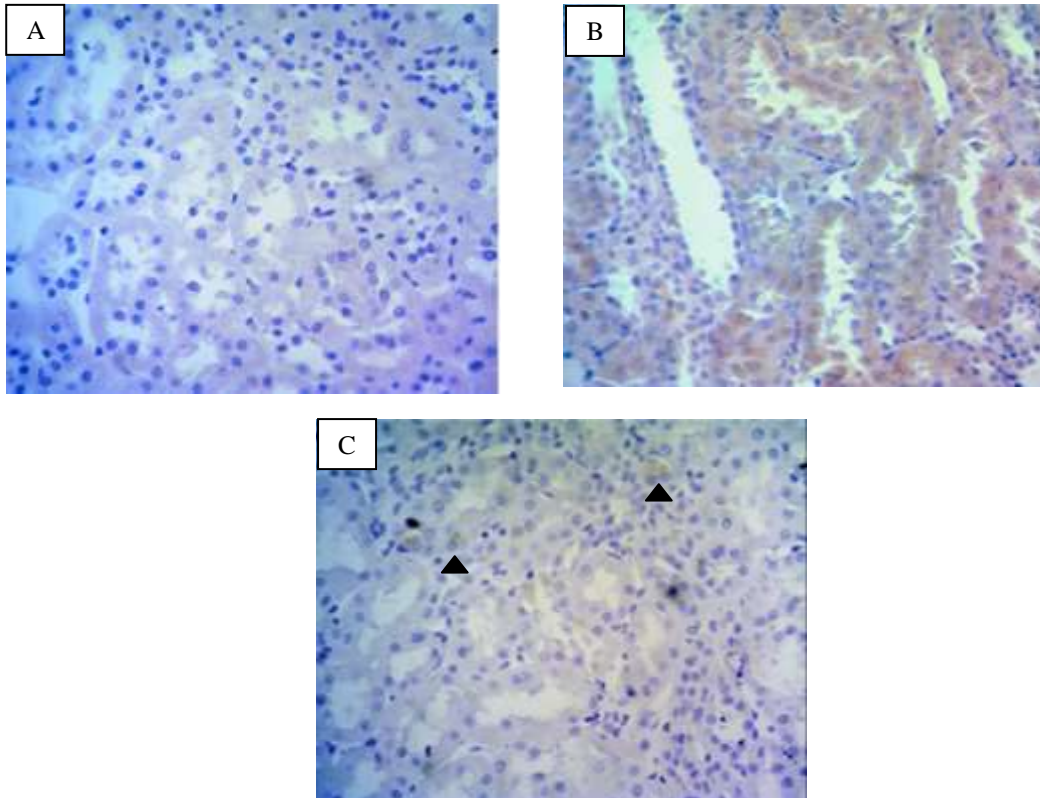


**Figura 15.** Immunolocalización ultraestructural de NLRP3. Célula epitelial tubular proximal de rata tratada con AOX+U que muestra difusa inmunomarcación para la proteína. Partículas de oro coloidal son observadas también en mitocondrias (círculo). 7000X

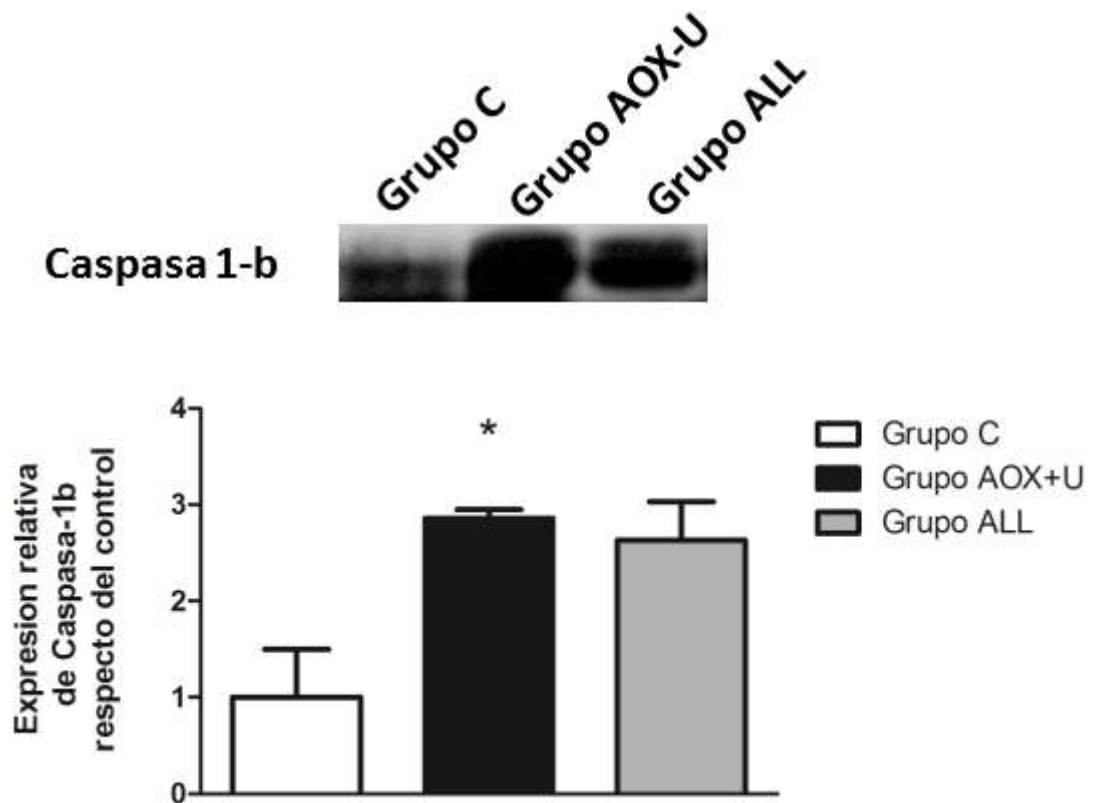
*Análisis de la expresión de caspa 1-beta (inmunohistoquímica y Western blotting) en rata macho controles, tratadas con ácido oxónico/ácido úrico y allopurinol*

Los animales del grupo AOX+U exhibieron por inmunohistoquímica un aumento de los niveles de caspasa 1-beta en el epitelio tubular renal, respecto de los normouricémicos. Si bien el tratamiento con allopurinol generó un claro descenso de la expresión enzimática, aun fue posible la observación de células inmunopositivas para la proteína en estudio (Figura 16). En el análisis cuantitativo caspasa 1-beta fue expresada en el 32% de los túbulos en los animales tratados con ácido oxónico+ácido úrico, mientras que solo 2% del grupo control y 3% del tratado con allopurinol inmunomarcaron para la misma ( $p<0,001$ ).

El análisis de los niveles de caspasa 1-beta, con la técnica de Western blotting, demostró un incremento significativo de su expresión en homogenatos renales totales posterior al tratamiento con ácido oxónico+ácido úrico, respecto de los valores observados en animales controles ( $p<0.001$ ) (Figura 17). El tratamiento con allopurinol, si bien disminuyó los niveles de la enzima, los valores observados no alcanzaron significancia respecto a los del grupo AOX+U.



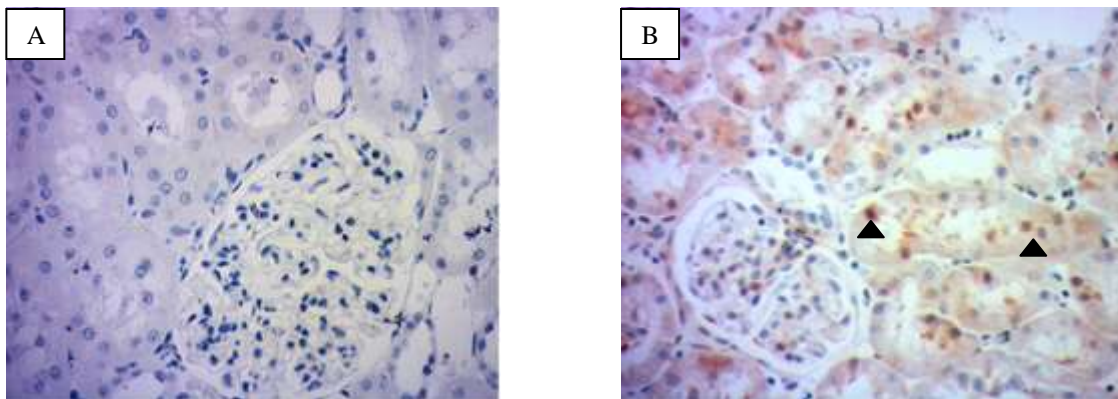
**Figura 16.** Inmunomarcación de caspasa 1-beta. Se destaca la expresión de la proteína en epitelio tubular de ratas tras 7 semanas de tratamiento con AOX+U (B), comparadas con los animales controles (A) y con el grupo ALL (cabeza de flecha) (C) (400X).



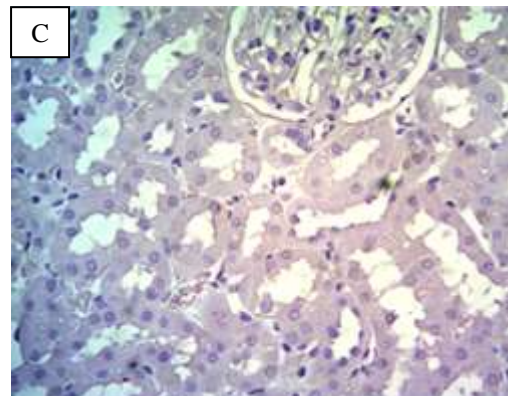
**Figura 17.** Niveles relativos de caspasa 1-beta en extractos totales renales de ratas macho controles (Grupo C) y después del tratamiento con ácido oxónico+ácido úrico (AOX+U) y allopurinol (ALL) detectados por técnica de Western blotting. (media  $\pm$ SEM)(\* $p < 0,001$  AOX+U vs control).

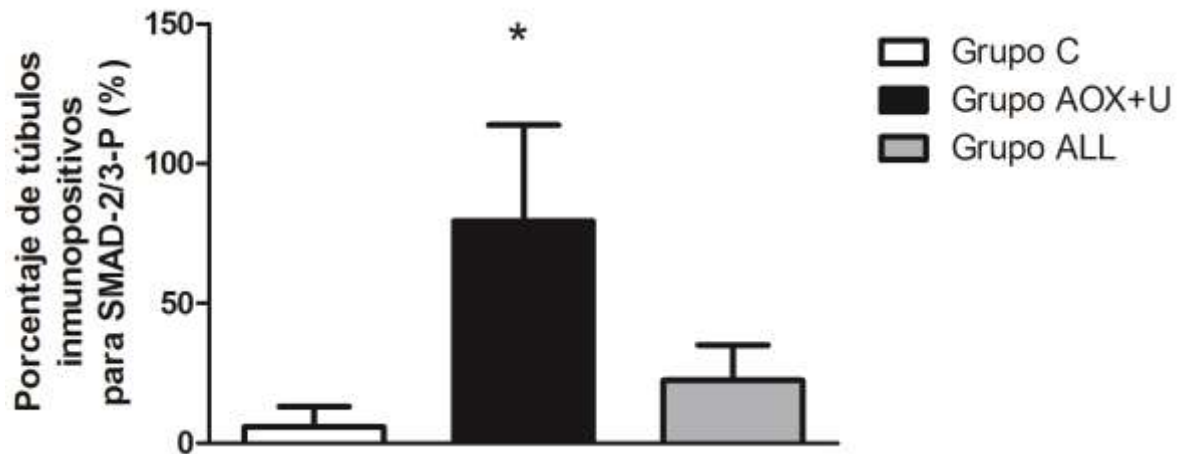
Immunomarcación de Smad 2/3 a nivel de microscopía fotónica y electrónica en rata macho Wistar controles y con altos niveles de ácido úrico

La proteína Smad 2/3 fosforilada fue detectada a través de la técnica de inmunoperoxidasa en el grupo estimulado con AOX+U en comparación con el grupo C y ALL (Figura 18). Las células epiteliales tubulares exhibieron inmunoreactividad tanto a nivel citoplasmático como nuclear, no observándose tal proteína en áreas comprometidas por el fenómeno de inflamación y atrofia tubular. El análisis cuantitativo realizado en 125 túbulos de 4 animales por grupo, demostró un significativo aumento de Smad 2/3 fosforilada, presentando el grupo control sólo un  $5,8 \pm 0,3$  % de los túbulos positivos para peroxidasa, mientras que el grupo con altos niveles de ácido úrico presentó el  $79,4 \pm 34,4$ %. Este incremento fue prevenido por el tratamiento con allopurinol, alcanzando inmunopositividad el  $22,4 \pm 12,6$  % de los túbulos (Figura 19). A los fines de identificar con mayor detalle los compartimientos subcelulares donde se localiza Smad 2/3 se la detectó con la técnica de inmunocitoquímica ultraestructural como se aprecia en la Figura 20.

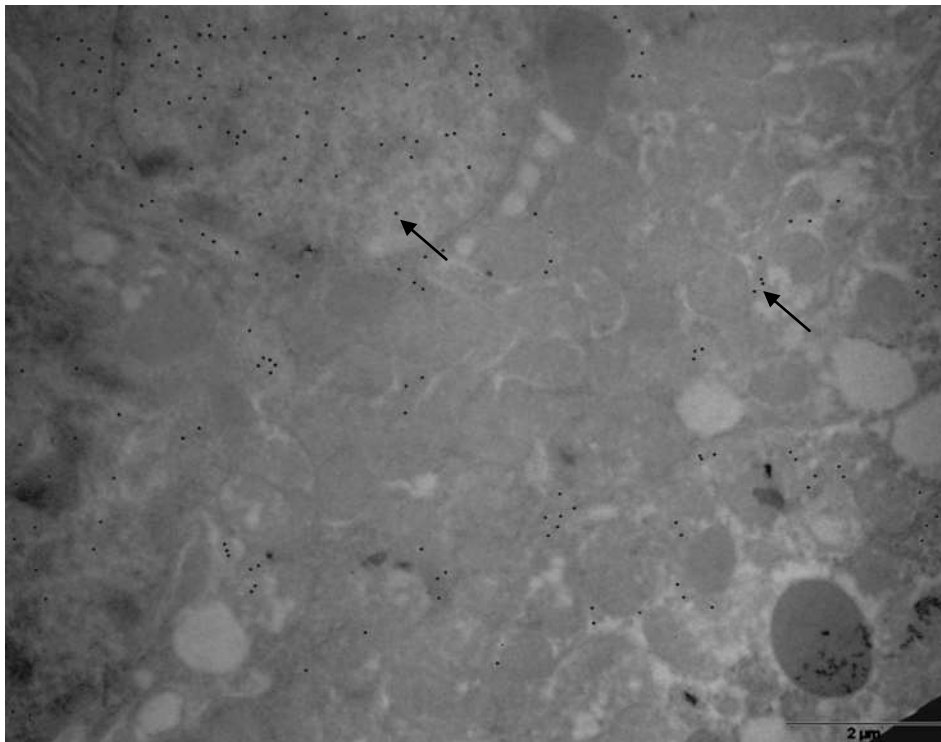


**Figura 18.** Inmunodetección de Smad 2/3 fosforilada en corteza renal de rata control (A), tratada con AOX+U durante 7 semanas (B) y allopurinol (ALL) (C). A diferencia de los riñones de ratas normales (A), el incremento en los niveles séricos de ácido úrico indujo expresión significativa de la proteína Smad 2/3 a nivel nuclear (B-puntas de flecha). El tratamiento con allopurinol (C), indujo una disminución en los niveles de Smad 2/3 siendo semejantes a los observados en los animales controles. 400X





**Figura 19.** Análisis cuantitativo de la expresión de Smad 2/3 fosforilada en células epiteliales renales. Se observa un incremento relativo en el grupo con altos niveles de ácido úrico (AOX+U) respecto del control (C) y del grupo sometido a tratamiento con allopurinol. \*  $p < 0,001$  (n=4 ratas por grupo, 125 túbulos analizados por animal).

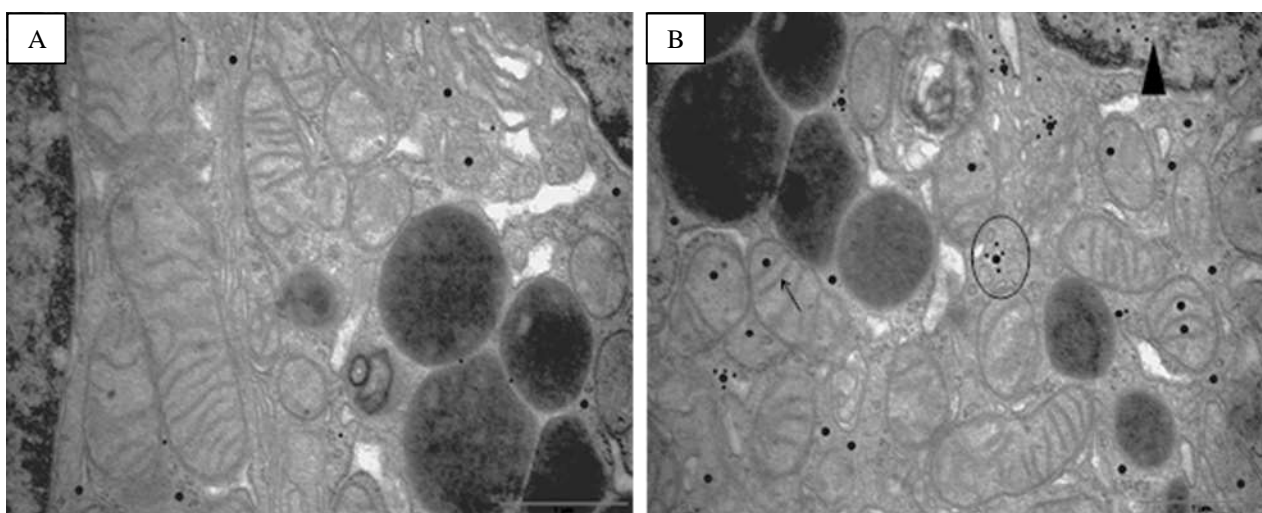


**Figura 20.** Inmunogold para la detección de Smad 2/3. Se identifican dos células epiteliales de túbulos renales de rata Wistar macho tratada con AOX+U, con numerosos oros coloidales en compartimientos citoplasmático y nuclear, asociados a matriz citosólica y a euromatina, respectivamente (flechas). Barra 2  $\mu\text{m}$



Colocalización subestructural de NLRP3 y Smad 2/3 fosforilado en tejido renal de ratas Wistar con altos niveles de ácido úrico

Previamente ya se describió la expresión de NLRP3 (Figuras 13 y 15) y de Smad 2/3 fosforilada (Figuras 18 y 20) en células epiteliales tubulares renales. Para verificar una posible interacción física de ambas moléculas en las células epiteliales renales de animales expuestos a altos niveles de ácido úrico, se realizó la técnica de co-inmunolocalización ultraestructural. El tratamiento con AOX+U por 7 semanas indujo, como se identifica en la Figura 21, un fenómeno de colocalización de ambas moléculas a nivel de la matriz citosólica, ubicándose varias moléculas de Smad2/3 a manera de ramillete alrededor de una molécula de NLRP3. La distancia entre las partículas de oro-coloidal que sugieren, una interacción física ente ambas moléculas osciló ente 16 y 60 nm.

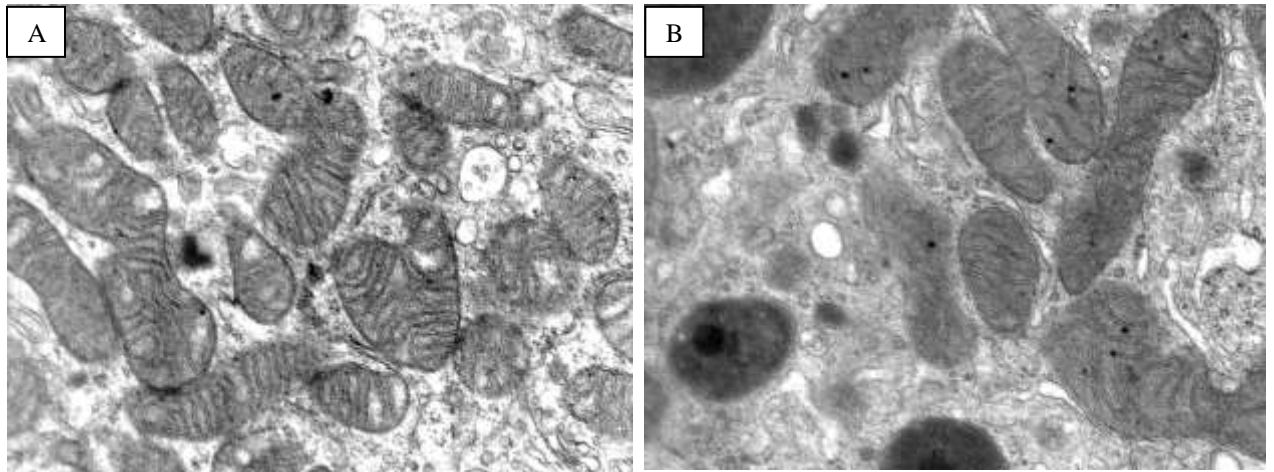


**Figura 21.** Inmunocolocalización de NLRP3 y Smad 2/3 en animales controles (A) y tratados con AOX+U (B). Posterior al estímulo con ácido úrico se demuestra tanto la asociación (círculos) de partículas de oro coloidal que marcan NLRP3 y Smad 2/3, como la translocación de esta última molécula al núcleo de células epiteliales tubulares (cabeza de flecha) y del inflammasoma hacia mitocondrias (flechas). Barra 1 um.

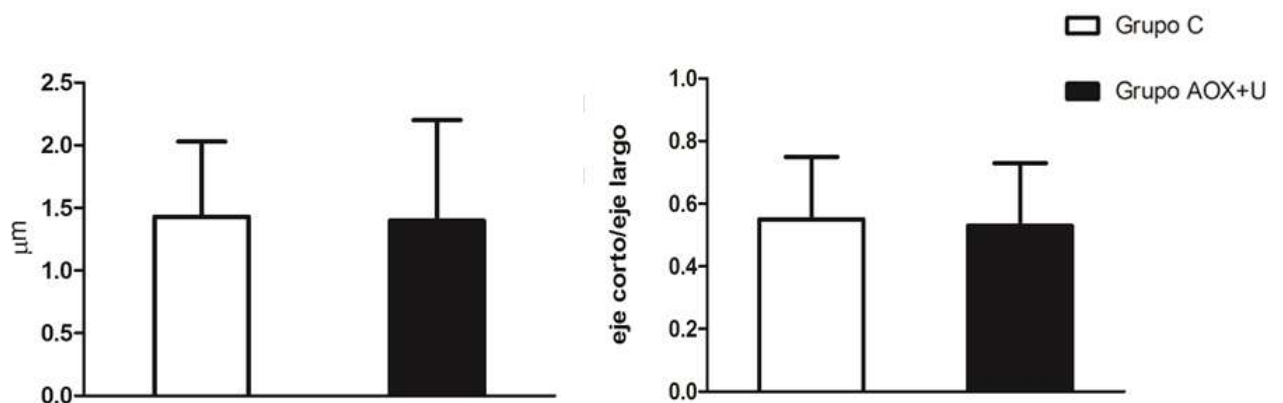
Análisis morfo-funcional de la población mitocondrial

A los fines de determinar si los túbulos proximales de ratas con mayores niveles de ácido úrico, que como se describiera exhibieron cambios de TEM y activación del inflammasoma NLRP3, mostraban modificaciones en la estructura de las mitocondrias, se analizó por microscopía electrónica de transmisión el tamaño y morfología de dichas organelas.

Se estudiaron 178 mitocondrias del grupo control y 194 del grupo AOX+U. Tal evaluación determinó que los animales tratados con ácido oxónico+ácido úrico al ser comparados con los controles, no presentaron diferencias significativas del componente mitocondrial tanto en la longitud de su eje mayor como en su morfología (índice del eje menor/eje mayor) (Figuras 22 y 23).



**Figura 22.** Morfología ultraestructural de mitocondrias de animal normal (A) y con altos niveles de ácido úrico (B). El tratamiento con AOX+U no indujo cambios morfológicos de relevancia en las mitocondrias de los túbulos proximales. 27000X.

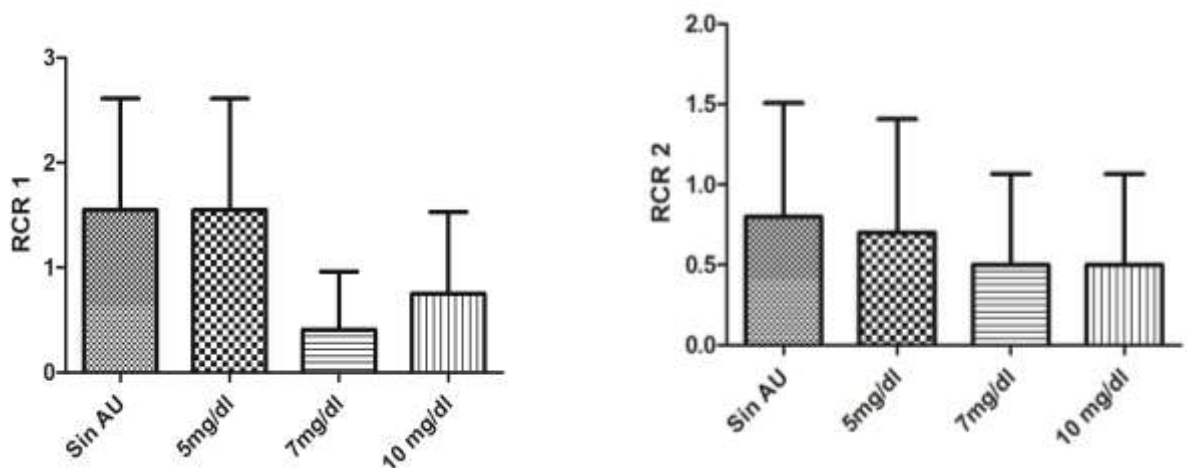


**Figura 23.** Tamaño y morfología mitocondrial. El análisis no reveló diferencias significativas entre las mitocondrias respecto a su longitud ( $1,43 \pm 0,6 \mu\text{m}$  vs  $1,40 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ;  $p=0,56$ ) y su morfología (índice eje corto/largo  $0,55 \pm 0,2$  vs  $0,53 \pm 0,2$ ;  $p=0,36$ ) entre el grupo control y el grupo con altos niveles de ácido úrico.

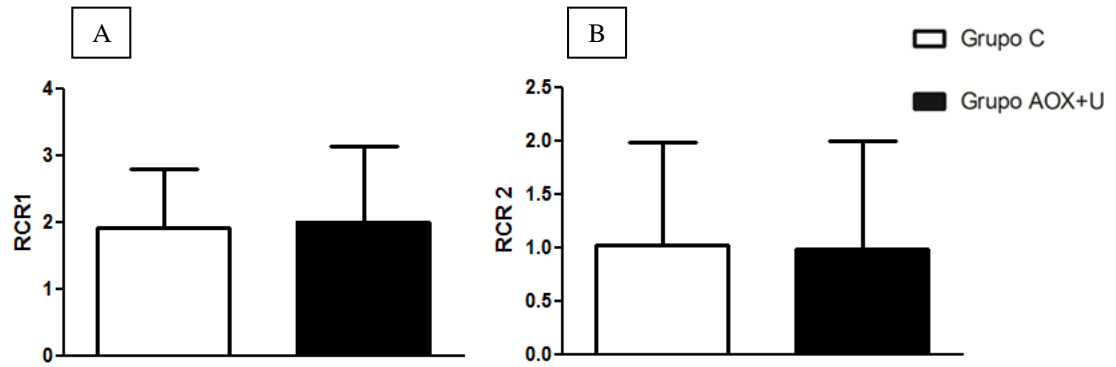
A los fines de determinar el efecto del ácido úrico sobre el estado funcional mitocondrial se realizaron pruebas de fisiología de estas organelas mediante oximetría de alta resolución *in vitro* sobre mitocondrias renales y *ex vivo* en fragmentos de tejido renal de los grupos C y AOX+U.

En los estudios llevados a cabo en mitocondrias aisladas de células renales de ratas macho Wistar y expuestas a niveles crecientes de ácido úrico (n= 4-12 experimentos por grupo), se observó una tendencia descendente del índice de control de respiración (Respiration Control Ratio, RCR) a partir de concentraciones mayores de 7 mg/dl de ácido úrico, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativa ( $p=0,05$ ), tanto para el complejo I (NADH deshidrogenasa) como para el complejo II (Succinato deshidrogenasa) (Figura 24). De igual manera al comparar el estado funcional mitocondrial del grupo C (n=13) y OXA+U (n=16) en fragmentos de tejidos renal, el RCR de los complejos I y II, no mostró diferencias ( $p=0,56$  y  $p=0,99$ ; respectivamente) como muestra la figura 25.

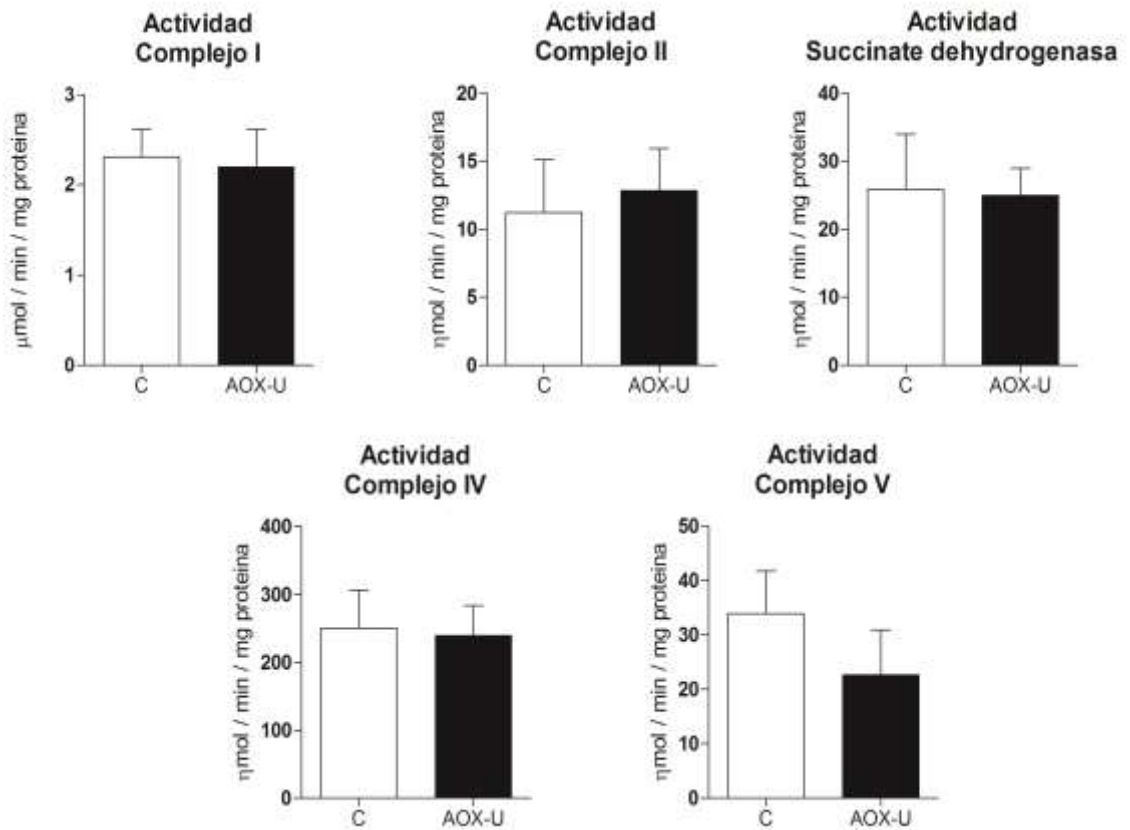
Para confirmar los hallazgos obtenidos por oximetría de alta resolución se realizó el análisis de la actividad enzimática de los complejos mitocondriales por espectroforometría. La figura 26 ilustra la actividad de los complejos I, II, succinato dehidrogenasa y complejos IV y V no encontrando diferencias entre los grupos C y AOX+U ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 26).



**Figura 24.** Índice de acoplamiento mitocondrial analizado *in vitro*. Se observó una tendencia descendente del índice de acoplamiento (Respiration Control Ratio, RCR) con sustrato para complejo I y II pero sin alcanzar diferencias significativas entre los grupos analizados ( $p=0,09$ ) (n=4-12).



**Figura 25.** Índice de acoplamiento mitocondrial analizado en estado de altos niveles de ácido úrico. El índice de acoplamiento mitocondrial (Respiration Control Ratio, RCR) dependiente del complejo I (A) y del complejo II (B), en mitocondrias aisladas de animales controles y tratados con AOX+U no presentó diferencias significativas entre los grupos analizados.



**Figura 26.** Actividad de los complejos enzimáticos mitocondriales analizada por la técnica de espectrofotometría en ratas controles y tratadas con AOX+U. La figura muestra similar actividad enzimática mitocondrial entre el grupo C y AOX-U en todos los complejos mitocondriales evaluados.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

La mayoría de las enfermedades renales en su estadio terminal tienen una tendencia inherente a progresar hacia la fibrosis y la pérdida de la función del parénquima, lo cual puede requerir de diálisis o del trasplante del órgano para suplir alguna de sus funciones. De acuerdo con esto los cuadros patológicos de la ERC en el estadio fibrótico terminal son remarcablemente iguales, mostrando excesivo depósito de matriz extracelular, acumulación de fibroblastos/miofibroblastos, glomeruloesclerosis, atrofia tubular y reducción de capilares peritubulares [173]. En este contexto, la hiperuricemia se ha asociado con pérdida progresiva de la función renal en humanos principalmente en pacientes con ERC estudios en modelos animales han soportado esta pérdida de función con la presencia de fibrosis intersticial [111, 113, 174, 175].

En este marco histopatológico de fibrosis aparece el concepto de TEM, la que inicialmente fuera descrita en el campo de la embriología (TEM tipo I), siendo luego transferida al fenómeno de la fibrosis de diversos órganos (TEM tipo II) y a la diseminación neoplásica (TEM tipo III). Pese a existir criterios diagnósticos *in vitro* e *in vivo* algunos autores han cuestionado la existencia de la TEM tipo II. Se ha reconocido su existencia *in vitro*, habiéndose puesto en duda el fenómeno *in vivo* ya que los marcadores biológicos utilizados pueden no ser específicos, destacando sobre todo la ausencia de imágenes ultraestructurales que demuestren el fenómeno dinámico de pérdida de la membrana basal y la migración de las células epiteliales [176]. En el presente trabajo de investigación, por primera vez demostramos en un modelo *in vivo* criterios morfológicos ultraestructurales de TEM tipo II en riñón. De esta manera se pudieron observar, como células epiteliales tubulares adquieren características fenotípicas y bioquímicas (inmunomarcación con FSP1) de células mesenquimáticas, presentando prolongaciones citoplasmáticas que atraviesan disrupciones de la MBT.

A nivel renal la TEM fue descrita en 1994 en la enfermedad en su estado terminal y según algunos autores no significa que una célula epitelial tubular se transformará por completo en un fibroblasto [177, 178].

En el presente trabajo de investigación se abordó la temática presentada previamente pero en un contexto de suma importancia médica, como es el de los altos niveles de ácido úrico circulantes. Se conoce en la Medicina Clínica que los mismos han mostrado estar vinculados a un sinnúmero de enfermedades tales como gota, HTA, enfermedades cardiovasculares, infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares y enfermedad renal progresiva [114, 179-182].

La asociación del ácido úrico con la enfermedad renal crónica data de 1890 y tal vinculación nació de la asociación de los pacientes con gota y la afección renal en la llamada nefropatía gotosa [183]. Además, un estudio epidemiológico llevado a cabo en pacientes con función renal normal demostró que una concentración de ácido úrico sérico  $> 8$  mg/dl, comparado con niveles menores de 5 mg/dl, está asociada con 2.9 veces de aumento de riesgo para disfunción renal en hombres y de 10 veces en mujeres dentro de los dos años del diagnóstico [174]. Sin embargo, hasta la actualidad existen diversos grados de controversia acerca de si el ácido úrico *per se* ejerce un rol etiológico en tal afección y en la progresión del daño túbulo-intersticial [108, 112]. Se ha considerado que el ácido úrico ejercería dos efectos; primero, generando disfunción endotelial e inflamación y segundo alterando la hemodinámica glomerular [184, 185].

Para poder develar otros posibles mecanismos por los que el ácido úrico afecta la función renal, en el presente trabajo de investigación ratas machos adultas de la cepa Wistar fueron alimentadas con ácido oxónico (inhibidor de la uricasa hepática) suplementado con ácido úrico por un lapso de 7 semanas. Esto fue imprescindible ya que en la mayoría de los mamíferos el ácido úrico es degradado a alantoína por la vía de la enzima urato oxidasa o uricasa, la que es posteriormente excretada por los riñones y eliminada en la orina [186]. En el modelo de hiperuricemia generado en este trabajo de investigación se demostró y en coincidencia con lo reportado por Kang y colaboradores, un compromiso morfo-funcional renal caracterizado por fibrosis cicatrizal e inflamación crónica túbulo-intersticial [114]. Dicho daño, ya sugestivo en el análisis macroscópico, con las típicas retracciones parenquimatosas presentes en las fibrosis renales fue evidenciado a través de técnicas histológicas de microscopía fotónica y electrónica de transmisión. Así se ha descrito que el área intersticial corresponde a un 7-9% del parénquima renal similar a nuestro resultado en el grupo control C que presentó valores del 8%, mientras que el grupo expuesto a altos valores de ácido úrico presentó una expansión del mismo, alcanzando un 14% aproximadamente [58].

En este contexto, el fenómeno fibrótico es considerado por algunos autores como un proceso de biosíntesis y secreción activa de la sustancia extracelular con la acumulación desregulada de la misma ante una injuria crónica [187]. En tanto otros investigadores postulan un modelo de fibrosis en tres pasos en el que las células epiteliales dañadas sintetizan y secretan citoquinas al medio, atrayendo a células inflamatorias al sitio de lesión; estas células infiltrantes secretan nuevos mediadores químicos, los que además de dañar al parénquima estimulan a fibroblastos/miofibroblastos a proliferar y producir matriz

extracelular; desencadenando finalmente la fibrogénesis [173]. Por otro lado Mazzali y colaboradores, consideran como factores de daño renal inducido por el ácido úrico al sistema renina-angiotensina y al NO, complejizando y tornado multifactorial al mecanismo de compromiso túbulo-intersticial generado por tal noxa [113].

Concomitantemente a la fibrosis se ha mostrado en el presente trabajo de investigación el aumento de los niveles de urea plasmático como indicador de pérdida de la función renal. Esto dista del mejor indicador que es el clearance de inulina, ya que la utilización de los niveles de urea como marcador de la función renal puede aumentar en otros estados, como la deshidratación o el alto consumo proteico. Sin embargo, ha sido utilizada como marcador en estudios crónicos en ratas, siendo mejor indicador que los niveles de creatinina sérica [188]. El hecho que el aumento de la urea se mantenga en el tiempo en este modelo sustenta este indicador en relación a la pérdida de función renal. Como se esperaba, el suplemento con allopurinol redujo los niveles de urea, asociado probablemente con el menor daño renal; sin embargo, y llamativamente el grupo con allopurinol presentó niveles de urea más bajo incluso que el grupo control. Así se observó un descenso del 51% en los niveles de urea en comparación al grupo AOX+U y 33% menos urea que el grupo control. Si bien este hallazgo es complejo de fundamentar, se ha reportado en un modelo animal de hiperuricemia asociado a diabetes que el allopurinol aumenta el clearance de urea en un 83% con respecto a los animales hiperuricémicos y en un 57% respecto de los animales controles, no obstante el grupo control de aquel reporte presentó valores plamáticos de nitrógeno ureico más bajos que el grupo allopurinol [189].

La relación entre el daño renal inducido por el ácido úrico, la TEM y la participación del inflammasoma NLRP3 no han sido tomados en consideración hasta el presente.

Cuando se analizan los criterios de TEM descriptos para los sistemas *in vivo*, el ácido úrico indujo en el presente modelo experimental dos de ellos: uno mayor como es la expresión *de novo* de la proteína FSP1 y uno menor correspondiente a la localización de células con características transicionales cerca del compartimiento epitelial [16].

El ácido úrico originó cambios morfológicos ultraestructurales de TEM tipo II a nivel del epitelio tubular renal la cual, posteriormente a esta modificación fenotípica, contribuiría al progresivo daño intersticial observado a las 7 semanas de tratamiento con AOX+U, a través de la síntesis, secreción y acumulación de matriz extracelular a nivel del intersticio renal [190]. El análisis subcelular del modelo experimental de hiperuricemia permitió la observación tanto de cambios focales en la membrana basal de los túbulos



proximales como en el revestimiento epitelial, coincidentes con el concepto de TEM *in situ* [191]. Después del tratamiento con ácido úrico, escasos y dispersos túbulo renales mostraron modificaciones a nivel de sus porciones basales asociadas con disrupción de las membranas de anclaje presumiblemente como resultado de un incremento de la actividad degradativa de la matriz. A nivel de estas áreas, se identificaron también fragmentos de células epiteliales en el intersticio renal. Este hallazgo refuerza la idea de que el ácido úrico podría estimular al epitelio tubular induciendo la síntesis y secreción de enzimas degradativas de las membranas basales tales como MMP-2 y 9 [90]. De la misma manera que lo aquí reportado, en túbulo renales y con el uso de la microscopía electrónica de transmisión en pacientes con enfermedad de injerto vs. huésped, se demostró cambios de TEM a nivel conjuntival. Células epiteliales de este revestimiento ocular, presentaron procesos citoplasmáticos que se extendieron hacia la estroma subconjuntival a través de las láminas basales disruptas [192]. Por otro lado, si bien diversos estudios desarrollados *in vitro* han comprobado que la TEM desencadena una desestabilización secuencial de las uniones celulares y de la maquinaria que controla la polaridad de los epitelios transformado a la célula en un estado plástico y móvil con un fenotipo mesenquimal, no debe soslayarse la dificultad que existe en analizar tal fenómeno *in vivo*, remarcando la existencia de la llamada TEM incompleta [193-195].

Hasta el presente, estudios realizados sobre células epiteliales tubulares proximales han demostrado el fenómeno de TEM; habiéndose discutido la posible participación de otros segmentos de la nefrona en este cambio fenotípico en relación al origen embriológico del órgano [83]. Sin embargo, esta investigación puso en evidencia, tras exhaustivos estudios de secciones seriadas ultraestructurales de riñones de ratas hiperuricémicas que las mismas solo presentaban cambios de TEM en porciones aisladas de túbulo proximales, no visualizándose tales modificaciones morfológicas ni en sectores del epitelio distal ni en túbulo colectores de la nefrona. Esta última observación se halla en coincidencia con el hecho de que TGF- $\beta$ 1 -molécula paradigmática de este cambio morfológico- no induce en células mIMCD-3 cambios compatibles con el fenotipo mesenquimático que se investiga [84, 85].

Tomando en cuenta estos resultados y que la TEM no necesariamente requiere de un cambio fenotípico completo de un tipo celular específico, sino más bien modificaciones reminiscentes de células mesenquimáticas, es que se analizó la expresión de la proteína FSP1. El descubrimiento de la misma por Strutz y colaboradores en la TEM tipo II, abrió las puertas para el estudio de los epitelios como participantes en la fibrosis tisular; y su

presencia en el riñón es considerada por algunos autores como un criterio inobjetable para el diagnóstico de TEM aunque otros, en patologías humanas han puesto en duda su importancia [7, 16, 178]. Pese a esta última consideración la mayoría de las investigaciones han utilizado las técnicas inmunohistoquímicas para la determinación de los marcadores de los linajes epiteliales y fibroblásticos [196, 197]. Un hallazgo relevante del presente trabajo de investigación es que el ácido úrico aumentó el número de células inmunopositivas para la proteína FSP1. Las mismas fueron células epiteliales de túbulo renales aislados y células intersticiales, tornándose evidentes en el área fibrótica/inflamatoria observada a las 7 semanas de hiperuricemia. Este resultado se halla en concordancia con los obtenidos por Iwano y colaboradores, quienes en un modelo murino de obstrucción ureteral determinaron que las células intersticiales FSP1+ derivan del proceso de TEM [37]. Otras investigaciones también han detectado a esta proteína en células epiteliales tubulares de riñones con fibrosis intersticial, indicando que las mismas pueden adquirir rasgos fibroblásticos y, consecuentemente estar involucradas en el desarrollo de la fibrosis renal [7]. La determinación de la proteína FSP1 por inmunocitoquímica ultraestructural en el modelo hiperuricémico demostró su presencia solo a nivel en la matriz citosólica, no evidenciándose organelas subcelulares con marcación específica para la misma. Al presente se conoce que a nivel intracitoplasmático FSP1 interactúa con proteínas del citoesqueleto involucradas en la motilidad celular, tal como la miosina no muscular tipo II [198], regulando además, la función de moléculas de señalización que median la síntesis y secreción de MMP-3 [199]. De la misma manera que otras proteínas S100, FSP1 se presenta como un dímero, sin actividad enzimática que controla los patrones de unión proteica, probablemente modificando la localización o accesibilidad a los mismos, controlando así la disponibilidad de los complejos moleculares involucrados en la TEM [17]. Hasta aquí podemos concluir de acuerdo a los resultados de la presente investigación, que el estado de hiperuricemia estimula la TEM y conduce a una sobreexpresión de FSP1. Sin embargo, la pregunta que surge es ¿ambas evidencias, la morfológica y la bioquímica, coexisten en el mismo tipo celular?. La respuesta que se obtuvo fue afirmativa. El análisis inmunocitoquímico subcelular de FSP1 permitió la observación de partículas de oro coloidal que marcaban a esta proteína a nivel de la matriz citoplasmática de las porciones basales de células epiteliales tubulares que infiltraban el intersticio renal. Esto abre la discusión de tantos años acerca del origen de los fibroblastos/miofibroblastos en la fibrosis renal. En relación a este tópico y coincidente con el hallazgo aquí descrito del escaso número de células epiteliales tubulares sujetas al cambio geno/fenotípico de TEM inducida

por ácido úrico, se ha demostrado recientemente en ratones y con el uso de técnicas de ingeniería genética, que sin bien este fenómeno es uno de los mecanismos involucrados, el mismo aporta sólo el 5% de las células productoras de matriz extracelular, en tanto el 50% procede de fibroblastos residentes, un 35% de médula ósea y el 10% restante de transición endotelio-mesenquimática [200]. Confirmando nuestros hallazgos un reciente reporte ha demostrado que el ácido úrico es un factor que promueve cambios bioquímicos de TEM. En este sentido se ha comprobado tanto en ratas sometidas a una dieta con ácido oxónico como en la línea de células tubulares NRK expuestas a ácido úrico, una disminución de la expresión de E-caderina e incremento de  $\alpha$ -SMA, con una atenuación de la fibrosis intersticial en los animales tratados con allopurinol, habiéndose establecido que el ácido úrico aumenta la expresión de los factores de transcripción Snail y Slug, ambos asociados con una disminución de la síntesis del marcador epitelial arriba mencionado [116]. De esta manera los datos obtenidos en nuestro modelo experimental tras el tratamiento con AOX+U están en concordancia con este y otros estudios, donde el mismo up-regularía además las proteínas de señalización ERK, propiciando la transformación fenotípica de células epiteliales tubulares [201]. También debemos considerar que el ácido úrico tendría de acuerdo a Han y colaboradores un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células tubulares proximales cultivadas, involucrando a las vías de señalización PKC, MAPK, cPLA2 y NF- $\kappa$ B abriendo la posibilidad de que a partir de un epitelio detenido en la progresión de su ciclo celular otros factores inducirían otras modificaciones geno/fenotípicas [202].

Otro de los aspectos de gran relevancia fue demostrar que a nivel intersticial se objetivó la presencia de infiltrados inflamatorios mononucleares focales, que sugieren un proceso intersticial crónico. Aquí vale intentar separar a la conocida nefropatía gotosa, la cual se presenta en pacientes con episodios de gota y que se caracteriza por la presencia de microdepósitos cristalinos (microtofós) rodeados de infiltrado inflamatorio crónico, con células multinucleares y en algunos casos formación de granulomas [203]. Si bien en este estudio no se realizó inmunomarcación para demostrar el tipo de células participantes en el proceso intersticial, en este modelo de moderado aumento de ácido úrico no se detectaron células multinucleadas ni granulomas, tampoco signos indirectos de la presencia de depósitos cristalinos, tanto en el análisis por microscopía fotónica como electrónica de transmisión. Esto coincide con la descripción de Mazzali y colaboradoras donde descartan la presencia de cristales en la injuria inducida por ácido úrico [113].

No obstante en el análisis ultraestructural del modelo experimental AOX+U se observó la presencia de mastocitos en estas ratas hiperuricémicas, comparadas con los animales controles. Los mastocitos son células multifuncionales específicas de tejidos, con diversidad fenotípica en diferentes sitios anatómicos de varias especies, y que han sido descritas en enfermedades renales no-neoplásicas, en las cuales su número se correlacionó con la fibrosis intersticial [204, 205-207].

Además, aquellos mastocitos que en sus gránulos presentan triptasa se definen como MC<sub>T</sub>, en contraste a los tipos MC<sub>TC</sub> que contienen triptasa y chimasas. Los primeros son dependientes de linfocitos T, en tanto los segundos son independientes de los mismos, pareciendo ser diferente la relación de los dos subtipos en el intersticio renal y en diferentes enfermedades de este órgano [208]. Los que se presentaron en el modelo AOX+U exhibieron rasgos ultraestructurales compatibles con el subtipo MC<sub>T</sub>, mostrando gránulo electrón densos con estructuras tipo “scroll” y proyecciones citoplasmáticas que contactaban con los fibroblastos intersticiales [209]. Además, de esta observación algunas de estas células presentaron escasos gránulos electrón lúcidos, sugestivos de un estado de degranulación. Este hallazgo significaría que la triptasa es liberada al espacio extracelular o como ha sido sugerido transferida a otras células por un mecanismo transgranular [210]. La degranulación de este tipo celular a nivel del riñón conduce a la liberación de histamina, heparina y citoquinas, como IL-4 y TNF- $\alpha$ , con la participación intrarenal de RAS en la fisiopatogenia de la injuria crónica de este órgano, influyendo en la función de los fibroblastos [211-213]. Las observaciones obtenidas en el modelo aquí expuesto se correlacionan con un estudio llevado a cabo en ratones donde se identificaron a los mastocitos como células inductoras de esclerosis renal post-trasplante y fibrosis del ventrículo izquierdo en animales hipertensos [214]. Además investigaciones de los mecanismos fibróticos llevados a cabo en ratas han sugerido que este tipo celular promueve tal cambio en la matriz extracelular a partir del reclutamiento de otros leucocitos y la producción de mediadores profibróticos [215]. Por lo tanto los mastocitos en ratas hiperuricémicas podrían cooperar con fibroblastos y linfocitos en el daño intersticial renal.

Hasta aquí podemos resumir que el estado hiperuricémico indujo un cambio morfológico caracterizado por TEM -también referida como cambio fenotípico epitelial-, intenso infiltrado inflamatorio linfocitario y mastocítico, fibrosis y edema, asociado a un incremento significativo de los niveles de urea plasmática, indicativa de disfunción del órgano [216].

Sin embargo, la TEM debe ser considerada como un proceso orquestado y modulado por numerosas moléculas del tipo de citoquinas, factores de crecimiento y señales procedentes de la matriz extracelular [4]. La expresión de las primeras y la infiltración de células inmunes acompañan prácticamente a todas las enfermedades de este órgano así como se observó en este trabajo de investigación. El abordaje del ácido úrico como una señal de daño reconocido por los receptores de la inmunidad innata es pertinente. Las propiedades pro-inflamatorias del ácido úrico se conocen hace mucho tiempo, sobre todo relacionado a los fenómenos de precipitación de cristales en la hiperuricemia sintomática (gota). Sin embargo, desde hace algunos años se ha sugerido al mismo como una señal que puede ser reconocida como de daño o alerta y colaborar con el desarrollo de la inflamación. Así, Shy y colaboradores demostraron que era el ácido úrico al que asociaba la existencia de células inmunes por la presencia de células en proceso de muerte [217]. Algunos años después en el laboratorio del Dr. Tschopp en Suiza se describe al ácido úrico como señal de daño activando al receptor NLRP3, y posteriormente conformado el inflamasoma, produciendo la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 [107]. Esta descripción permitió comprender parte de los fenómenos inflamatorios de muchas patologías inducidas por cristales en diferentes órganos. El rol de la inmunidad innata y sus receptores en el campo de la nefrología es un área novedosa y en crecimiento [218, 219]

A continuación se describen y discuten los resultados obtenidos de la expresión de NALP3, conocido actualmente como NLRP3 en el modelo experimental desarrollado en este trabajo de investigación. Los siguientes hallazgos vienen a reforzar de alguna manera la premisa que ahora es clara: la participación del sistema inmune innato en respuesta a estímulos no-microbianos [220]. Se conoce que el inflamasoma arriba mencionado es activado por varios estímulos y es expresado primariamente en macrófagos y células dendríticas [126, 221]. Sin embargo, la presencia del mismo en los compartimientos subcelulares dentro del riñón no ha sido hasta el presente completamente caracterizada. En las ratas normales el número de túbulos que expresaron esta molécula fue solo del 5%. Este hallazgo se encuentra en concordancia con los trabajos que reportan que en riñones de ratones C57BL/6 el ARNm de NLRP3 presenta los más bajos niveles comparados con otras moléculas del tipo NLR [222]. Es conocido que el receptor NLRP3 necesita de una señal de inducción o “cebado” para aumentar sus niveles de expresión basales, estas señales deben activar el factor de transcripción Nf-k $\beta$  [132]. En este sentido el ácido úrico ha mostrado la capacidad de incrementar Nf-k $\beta$  además de las vías MAPK y PKC, favoreciendo de esta manera la expresión del receptor que posteriormente se ensablará con

la partícula de asociación de caspasa (ASC) y la pro-caspasa-1 para formar el inflamasoma [202]. Ahora, debemos considerar la importancia que esta proteína tiene en la ERC [148]. En nuestro trabajo el ácido úrico indujo una sobreexpresión difusa del receptor NLRP3, alcanzando una inmunopositividad de hasta un 69% de los túbulo renales. Cuando esta molécula fue analizada por inmunomicroscopía electrónica un aspecto de relevancia fue su localización a nivel de las mitocondrias además del citosol de las células epiteliales. Este hallazgo abre un nuevo aspecto concerniente a posibles acciones del ácido úrico a nivel intracelular [217]. Aunque los estudios ultraestructurales no demostraron que la hiperuricemia *per se* genere cambios morfológicos o numéricos a nivel mitocondrial, la determinación de NLRP3 en la matriz de esta organela sugiere que la misma actuaría, como lo propusiera Zhou y colaboradores, como una plataforma de “scaffolding” para el reclutamiento de varios miembros de este inflamasoma, incluida la proteína estudiada en este trabajo [161]. A diferencia de nuestras observaciones, estudios realizados en macrófagos peritoneales estimulados con ácido úrico exhibieron una localización del inflamasoma NLRP3 solo a nivel citoplasmático, no detectándose con el uso de técnicas de microscopía confocal en ninguna otra organela subcelular [223]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la activación del receptor NLRP3 conlleva una relocalización, migrando desde regiones citoplasmáticas hacia las mitocondrias y al retículo endoplásmico liso [161].

Esta discrepancia podría estar asociada a diferencias en la sensibilidad del método utilizado para la detección de la molécula de interés así como a los sistemas celulares en los que fue analizada. Una hipótesis considera que la asociación mitocondria/NLRP3 puede ser solo transitoria y ocurrir para facilitar las interacciones de la última molécula con caspasa-1 permitiendo inclusive modificaciones post-traduccionales; con la subsecuente liberación al citosol de un inflamasoma activo para procesar eficientemente IL-1 [224].

Al presente se ha demostrado la participación de NLRP3 en diversas patologías renales a través de la inducción de interleuquinas (efectos canónicos) y de la señalización TGF- $\beta$ /Smad en la TEM y fibrosis intersticial (efectos no canónicos) [149]. Si bien en el presente trabajo no se analizaron cambios en los niveles de las citoquinas arriba mencionadas, sí se pudo demostrar que la hiperuricemia indujo un aumento significativo de los niveles de la enzima caspasa 1 beta en el epitelio tubular renal respecto de los animales normouricémicos. Notablemente, la expresión de caspasa 1 beta aumento en el 32% de los túbulos, mientras que el receptor NLRP3 como se expuso previamente se expresó en el doble de los túbulos (69%); si bien esto puede ser consecuencia de la

diferente sensibilidad de los anticuerpos y del sistema de amplificación de señal, también podría significar que en algunas células que expresan el receptor NLRP3 se conforma el inflamasoma para inducir citoquinas desde las células epiteliales injuriadas y que en otras, el receptor puede actuar de manera inflamasoma independiente a través de sus vías no canónicas para inducir programas de TEM [97]. El tratamiento con allopurinol generó un descenso de los niveles de caspasa-1beta sin alcanzar los valores observados en las ratas normouricémicas. En coincidencia con lo que aquí se reporta se ha comprobado que los marcadores de activación del inflamasoma, es decir IL-1 y caspasa 1 están incrementados tras 14 días de obstrucción ureteral unilateral [148]. Sin embargo, a pesar de que las células parenquimatosas renales no-inmunes, no secretarían IL-1 $\beta$ , otros reportes han demostrado la síntesis y liberación de IL-18 por células epiteliales tubulares implicando que el eje NLRP3/caspasa-1 está también presente en células renales no inmunes y que el estado de hiperuricemia es un factor inductor del mismo [150-152].

Para evaluar la participación de las vías no canónicas del receptor NLRP3 se estudió la presencia del factor de transcripción Smad 2/3. En los animales con mayores niveles de ácido úrico se objetivó por microscopia fotónica y electrónica de transmisión un aumento de los niveles de Smad 2/3 fosforilada, no solo a nivel del citoplasma tubular sino también con una evidente translocación de la molécula al compartimiento nuclear en zonas del parénquima no afectadas por el daño fibrótico. En esta ocasión la cantidad de túbulos renales con expresión positiva para Smad 2/3 fosforilada fue muy semejante a la de los que expresaron el receptor NLRP3 (79%). Si bien para poder tener certeza de la interacción física entre estas dos moléculas y su rol en la activación de los programas de TEM serían necesarios estudios de co-inmunoprecipitación o co-localización por microscopía confocal o FRET (Förster resonance energy transfer) podemos inferir, con las limitaciones pertinentes a través de la co-inmunolocalización ultraestructural con microscopia electrónica la interacción física de estas dos moléculas [225, 226]. Así se pudo observar en el grupo con altos valores de ácido úrico la presencia de pequeñas partículas de oro interaccionado con una partícula de mayor tamaño de orocoloidal que representa al receptor NLRP3. Esta interacción no fue posible observarla en los animales controles. En este sentido se ha descrito recientemente en células no inmunes, tanto en riñón como en fibroblastos cardíacos que el receptor NLRP3 es clave para la fosforilación de Smad 2/3 y la posterior fibrosis asociada a las vía de TGF- $\beta$  [156]. De este modo NLRP3, parece estar involucrado en la TEM de células epiteliales tubulares, un proceso que como ya fuera analizado se halla asociado con la atrofia del parénquima, la fibrosis intersticial y la ERC

[176]. Por otro lado se ha comprobado que ratones deficientes en esta molécula, se hallan claramente protegidos de la fibrosis inducida por la obstrucción ureteral [148]. Estos resultados indican también, una participación no-canónica del inflamasoma arriba mencionado en la fibrosis renal inducida por el ácido úrico [97].

Analizados en conjunto los resultados hasta aquí discutidos permiten inferir que un incremento del ácido úrico activa a nivel del epitelio tubular renal NLRP3, molécula que ejerce efectos que dependen tanto de caspasa 1- $\beta$ /IL con la consecuente modulación de la respuesta inflamatoria, como de la señalización a través de Smad 2/3 y la puesta en juego de la maquinaria genética que controla el cambio geno-fenotípico conocido como TEM, regulado probablemente la expresión de los marcadores epiteliales y mesenquimáticos.

Finalmente, cabe preguntarse el mecanismo por el cual el ácido úrico activa al receptor NLRP3. En este sentido, considerando que el receptor NLRP3 co-localiza con mitocondrias tras su activación en células no inmunes, y basándonos en que aquellas organelas son una fuente importante de ROS y que estas han sido propuestas como activadores de NLRP3, es atractivo hipotetizar que la acción del ácido úrico sea a través de la inducción de disfunción mitocondrial.

Se ha sugerido que mitocondrias disfuncionantes, con pérdida del potencial de membrana activarían el inflamasoma [161]. Por otro lado se ha propuesto que la hiperuricemia induce disfunción mitocondrial [163, 165]. A su vez se ha demostrado en pacientes con ERC una desregulación de la maquinaria respiratoria de las mismas [227]. Sin embargo, en el presente trabajo de investigación el análisis morfo-funcional mitocondrial no arrojó ninguna diferencia entre los grupos analizados. Así, tanto la longitud como la forma de las mitocondrias fueron similares en el grupo con elevado ácido úrico y en el grupo control. En tanto el análisis de la fisiología mitocondrial a través del índice de acoplamiento RCR no mostró diferencias entre los animales tratados y los controles. Los estudios *in vitro* con diferentes concentraciones de ácido úrico confirmaron estos hallazgos, solo objetivándose una tendencia decreciente a partir de concentraciones mayores a 7-10 mg/dl, muy por encima de las logradas en este modelo. No obstante, para confirmar la ausencia de disfunción mitocondrial se realizó un estudio bioquímico de las actividades de los complejos respiratorios no observándose alteraciones en el modelo estudiado. Una explicación a la diferencia entre nuestros hallazgos y los publicados por Sanchez-Losada y colaboradores, podría ser la diferencia de métodos utilizados, ya que aquel estudio utilizó marcadores indirectos de la función mitocondrial como es la cantidad de ATP y la expresión enzimática de algunos componentes, que dista de reflejar la función.



Pero más importante es que aquel estudio fue realizado a concentraciones de ácido úrico suprafisiológicas (12 mg/dl) [165]. Muy recientemente se ha sugerido que la disfunción mitocondrial asociada a la activación de NLRP3 sería consecuencia del inflammasoma (caspasa dependiente) y no el causal de su activación. Así, al activar al receptor NLRP3 con altas dosis de albúmina en células epiteliales renales se produce una disfunción mitocondrial, la cual es prevenida en células *knockout* para caspasa1beta y/o receptor NLRP3 [228]. Esto soportaría que en células epiteliales no inmunes, en donde no hay activación de caspasa y solo la participación de las vías no canónicas de NLRP3 no exista alteración mitocondrial. Futuros estudios deberán realizarse para establecer el mecanismo por el cual el ácido úrico activa inflammasoma, y en este sentido considerar la inestabilidad lisosomal con la liberación de catepsina b o la participación de otras proteínas mediadoras [229, 230].

*Analizando de una manera integral el daño generado por el estado de hiperuricemia, se comprueba lesión túbulo intersticial fibrótica/inflamatoria por medio de la participación conjunta de un cambio fenotipo del epitelio tubular conocido como TEM y los efectos del inflammasoma NLRP3.*

## CONCLUSIONES

- La hiperuricemia genera daño renal, con cicatrización fibrosa e inflamación crónica linfocitaria y mastocítica intersticial multifocal.
- El ácido úrico es *per se* un factor causal de cambios ultraestructurales de TEM *in situ* del revestimiento de los túbulos renales proximales.
- El cambio morfológico de TEM a nivel del epitelio tubular se asocia a la neo-expresión de la proteína FSP1, la que se incrementa en el citoplasma del epitelio tubular renal.
- El receptor NALP3, actualmente conocido como NLRP3, se expresó en el epitelio tubular tras la estimulación con ácido úrico, distribuyéndose en matriz citosólica y mitocondrias.
- La caspasa 1-beta proinflamatoria incrementó sus niveles de expresión a nivel del citoplasma del epitelio tubular en el estado de hiperuricemia.
- La proteína Smad 2/3 fosforilada aumentó de un modo significativo en citoplasma del epitelio tubular, con translocación al compartimiento nuclear por efectos del ácido úrico.
- El componente mitocondrial renal no exhibió alteraciones morfo-funcionales como nexo entre el ácido úrico y la activación de NLRP3.

## **CAPÍTULO 5**

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Virchow, R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre., ed. Hirschwald. 1858, Berlin, Alemania.
2. Hogan BL, Kolodziej PA. Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nat Rev Genet* 3(7): 513-523. 2002
3. Yeaman C, Grindstaff KK, Hansen MD, Nelson WJ. Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Curr Biol* 9(14): R515-R517. 1999
4. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112(12): 1776-1784. 2003
5. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6): 1420-1428. 2009
6. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154(1): 8-20. 1995
7. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130(2): 393-405. 1995
8. Kiemer AK, Takeuchi K, Quinlan MP. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene* 20(46): 6679-6688. 2001
9. Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 1(6-7): 303-314. 2009
10. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35): 13180-13185. 2006
11. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282(32): 23337-23347. 2007
12. Kalluri R, Zeisberg E, Potenta S, Sugimoto H, Zeisberg M. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 19(12): 2282-7. 2008
13. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet* 2(7): e119. 2006

14. Alvarez RJ, Sun MJ, Haverty TP, Iozzo RV, Myers JC, Neilson EG. Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblasts probed with paracrine cytokines. *Kidney Int* 41(1): 14-23. 1992
15. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12877-12882. 2002
16. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95(1): 333-339. 1982
17. Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273(4 Pt 2): F563-F574. 1997
18. Venkov CD, Link AJ, Jennings JL, Plieth D, Inoue T, Nagai K, Xu C, Dimitrova YN, Rauscher FJ, Neilson EG. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117(2): 482-491. 2007
19. Robson EJ, Khaled WT, Abell K, Watson CJ. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation* 74(5): 254-264. 2006
20. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt KU, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117(12): 3810-3820. 2007
21. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13(8): 952-961. 2007
22. Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG. Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* 58(2): 587-597. 2000
23. Boutet A, Esteban M, Maxwell P, Nieto M. Reactivation of Snail genes in renal fibrosis and carcinomas: a process of reversed embryogenesis?. Reactivation of Snail genes in renal fibrosis and carcinomas: a process of reversed embryogenesis?. *Cell Cycle* 6(6): 638-642. 2007
24. Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int* 26(5): 463-476. 2002

25. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Müller GA, Neilson EG. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61(5): 1714-1728. 2002
26. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 115(2): 339-347. 2005
27. White LR, Blanchette JB, Ren L, Awn A, Trpkov K, Muruve DA. The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(2): F567-F576. 2007
28. Leitinger B, Kwan AP. The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol* 25(6): 355-364. 2006
29. Franke, WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10): 5034-5038. 1978
30. Dellagi K, Vainchenker W, Vinci G, Paulin D, Brouet JC. Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *EMBO J* 2(9): 1509-1514. 1983
31. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 93(5): 2175-2188. 1994
32. Gabbiani G, Kapanci Y, Barazzone P, Franke WW. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical pathologist. *Am J Pathol* 104(3): 206-216. 1981
33. Saito A. EMT and EndMT: regulated in similar ways? *J Biochem* 153(6): 493-495. 2000
34. Nagao S, Yamaguchi T, Kasahara M, Kusaka M, Matsuda J, Ogiso N, Takahashi H, Grantham JJ. Effect of probucol in a murine model of slowly progressive polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 35(2): 221-226. 2000
35. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract* 194(10): 701-704. 1998

36. Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res* 63(12): 3386-3394. 2003
37. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110(3): 341-350. 2002
38. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132(14): 3151-3161. 2005
39. Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* 25(23): 5603-5613. 2006
40. Yu W, Kamara H, Svoboda KK. The role of twist during palate development. *Dev Dyn* 237(10): 2716-2725. 2008
41. Kida Y, Asahina K, Teraoka H, Gitelman I, Sato T. Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *J Histochem Cytochem* 55(7): 661-673. 2007
42. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315(26): 1650-1659. 1986
43. Zeisberg M, Strutz F., Muller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10(3): 315-320. 2001
44. Yang Z, Zhang X, Gang H, Li X, Li Z, Wang T, Han J, Luo T, Wen F, Wu X. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 358(3): 925-30. 2007
45. Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68(4): 989-997. 2008
46. Zeisberg M., Maeshima Y, Mosterman B, Kalluri R. Renal fibrosis. Extracellular matrix microenvironment regulates migratory behavior of activated tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 160(6): 2001-2008. 2002
47. Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C, Antonaci S. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 129(5): 1375-1383. 2005

48. Chilosi M, Zamò A, Doglioni C, Reghellin D, Lestani M, Montagna L, Pedron S, Ennas MG, Cancellieri A, Murer B, Poletti V. Migratory marker expression in fibroblast foci of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 7: 95. 2006
49. Ridinger K, Ilg EC, Niggli FK, Heizmann CW, Schäfer BW. Clustered organization of S100 genes in human and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1448(2): 254-263. 1998
50. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev* 1(2): p. 169-178. 2005
51. Barraclough R. Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1448(2): 190-199. 1998
52. Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 276(25): 22699-22708. 2001
53. Chen H, Fernig DG, Rudland PS, Sparks A, Wilkinson MC, Barraclough R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun* 286(5): 1212-1217. 2001
54. Ambartsumian N, Klingelhöfer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 20(34): 4685-4695. 2001
55. Verlander JW. Normal ultrastructure of the kidney and lower urinary tract. *Toxicol Pathol* 26(1): 1-17. 1998
56. Maunsbach AB. Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. Comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 16(3): 239-258. 1996
57. Zaar K. Structure and function of peroxisomes in the mammalian kidney. *Eur J Cell Biol* 59(2): 233-254. 1992
58. Brenner, B. ed. Brenner and the Rector's The Kidney. Octava edición S. Elsevier. Vol. Vol 1. 2008: Filadelfia. 25-75.2008
59. Imai M, Yoshitomi K. Heterogeneity of the descending thin limb of Henle's loop. *Kidney Int* 38(4): 687-694. 1990



60. Madsen KM, Tisher CC. Structural-functional relationships along the distal nephron. *Am J Physiol* 250(1 Pt 2): F1-F15. 1986
61. Allen F, Tisher CC. Morphology of the ascending thick limb of Henle. *Kidney Int* 9(1): 8-22. 1976
62. Kim J, Tisher CC, Madsen KM. Differentiation of intercalated cells in developing rat kidney: an immunohistochemical study. *Am J Physiol* 266(6 Pt 2): F977-F990. 1994
63. Clapp WL, Madsen KM, Verlander JW, Tisher CC. Morphologic heterogeneity along the rat inner medullary collecting duct. *Lab Invest* 60(2): 219-230. 1989
64. Hansen GP, Tisher CC, Robinson RR. Response of the collecting duct to disturbances of acid-base and potassium balance. *Kidney Int* 17(3): 326-337. 1980
65. Verlander JW, Madsen KM, Tisher CC. Structural and functional features of proton and bicarbonate transport in the rat collecting duct. *Semin Nephrol* 11(4): 465-477. 1991
66. Karkavelas G, Kefalides NA, Amenta PS, Martinez-Hernandez A. Comparative ultrastructural localization of collagen types III, IV, VI and laminin in rat uterus and kidney. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 100(2): 137-155. 1988
67. Clapp W. *Histology for the Pathologist. Adult kidney*, ed. S.S.R.P. 677, New York. 1992
68. Rouiller C. *The Kidney: Morphology, Biochemistry and Physiology. General anatomy and histology of the kidney.*, ed. M.A. Rouiller C, New York: Lippincott 67. 1989
69. Aukland K, Bogusky RT, Renkin EM. Renal cortical interstitium and fluid absorption by peritubular capillaries. *Am J Physiol* 266(2 Pt 2): F175-F184. 1994
70. Kaissling B, Le Hir M. Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int* 45(3): 709-720. 1994
71. Kriz W, Napiwotzky P. Structural and functional aspects of the renal interstitium. *Contrib Nephrol* 16: 104-108. 1979
72. Takahashi-Iwanaga H. The three-dimensional cytoarchitecture of the interstitial tissue in the rat kidney. *Cell Tissue Res* 264(2): 269-281. 1991
73. Muirhead EE. The medullipin system of blood pressure control. *Am J Hypertens* 4(10 Pt 2): 556S-568S. 1991

74. Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 152(5): 2401-2410. 1994
75. Teteris SA, Engel DR, Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int.* 80(2): 139-1345. 1999
76. Yamate J, Tatsumi M, Nakatsuji S, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S. Immunohistochemical observations on the kinetics of macrophages and myofibroblasts in rat renal interstitial fibrosis induced by cis-diamminedichloroplatinum. *J Comp Pathol* 112(1): 27-39. 1995
77. Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15(3-4): 290-301. 2000
78. Port FK, Fenton SSA, Mazzuchi N. ESRD throughout the world: morbidity, mortality and quality of life. *Kidney International* 57: S1-S2. 2000
79. Roberts IS, Burrows C, Shanks JH, Venning M, Mc William LJ. Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* 50(2): 123-127. 1997
80. Badid C, Desmouliere A, Babici D, Hadj-Aissa A, McGregor B, Lefrancois N, Touraine JL, Laville M. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 17(11): 1993-1998. 2002
81. Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 54(3): 864-876. 1998
82. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159(4): 1465-1475. 2001
83. Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* 79(4): 1157-1191. 1999
84. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 13(1): 96-107. 2002
85. El-Nahas AM. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int* 64(5): 1553-1563. 2003

86. Ng YY, Fan JM, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Yang WC, Huang TP, Atkins RC, Lan HY. Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol Dial Transplant* 14(12): 2860-2872. 1999
87. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G, D'Amico G. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int* 62(1): 137-146. 2002
88. Fan JM, Huang XR, Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis* 37(4): 820-831. 2001
89. Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor gene therapy and angiotensin II blockade synergistically attenuate renal interstitial fibrosis in mice. *J Am Soc Nephrol* 13(10): 2464-2477. 2002
90. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Muller GA, Strutz F, Kalluri R. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 159(4): 1313-1321. 2001
91. Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors. *Kidney Int* 75(5): 475-481. 2009
92. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9(7): 964-968. 2003
93. Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(8): 657-665. 2003
94. Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13(10): 2600-2610. 2002
95. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(5): F911-F924. 2003
96. Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, Poncelet AC. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(2): F243-F252. 2003

97. Wang W, Wang X, Chun J, Vilaysane A, Clark S, French G, Bracey NA, Trpkov K, Bonni S, Duff HJ, Beck PL, Muruve DA J. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *J Immunol* 190(3): 1239-1249. 2013
98. ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* 25(2): 64-70. 2000
99. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* 112(4): 503-516. 2003
100. Dai C, Yang J, Liu Y. Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling. *J Biol Chem* 278(14): 12537-12545. 2003
101. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* 13(6): 1464-1472. 2002
102. Bobulescu IA, Moe OW. Renal transport of uric acid: evolving concepts and uncertainties. *Adv Chronic Kidney Dis* 19(6): 358-371. 2012
103. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest* 120(6): 1791-1799. 2010
104. Sato M, Wakayama T, Mamada H, Shirasaka Y, Nakanishi T, Tamai I. Identification and functional characterization of uric acid transporter Urat1 (Slc22a12) in rats. *Biochim Biophys Acta* 1808(6): 1441-1447. 2010
105. Wakida N, Tuyen DG, Adachi M, Miyoshi T, Nonoguchi H, Oka T, Ueda O, Tazawa M, Kurihara S, Yoneta Y, Shimada H, Oda T, Kikuchi Y, Matsuo H, Hosoyamada M, Endou H, Otagiri M, Tomita K, Kitamura K. Mutations in human urate transporter 1 gene in presecretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia. *J Clin Endocrinol Metab* 90(4): 2169-2174. 2005
106. Kolz M, Johnson T, Sanna S, Teumer A, Vitart V, Perola M, Mangino M, Albrecht E, Wallace C, Farrall M, Johansson A, Nyholt DR, Aulchenko Y, Beckmann JS, Bergmann S, Bochud M, Brown M, Campbell H; EUROSPAN Consortium, Connell J, Dominiczak A, Homuth G, Lamina C, McCarthy MI; ENGAGE Consortium, Meitinger T, Mooser V, Munroe P, Nauck M, Peden J, Prokisch H, Salo P, Salomaa V, Samani NJ, Schlessinger D, Uda M, Völker U, Waeber G, Waterworth D, Wang-Sattler R, Wright AF, Adamski J, Whitfield JB, Gyllensten

- U, Wilson JF, Rudan I, Pramstaller P, Watkins H; PROCARDIS Consortium, Doering A, Wichmann HE; KORA Study, Spector TD, Peltonen L, Völzke H, Nagaraja R, Vollenweider P, Caulfield M; WTCCC, Illig T, Gieger C. Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet* 5(6): e1000504. 2009
107. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440(7081): 237-241. 2006
108. Talbott JH, Terplan KL. The kidney in gout. *Medicine (Baltimore)* 39: 405-467. 1960
109. Kang DH, Nakagawa T. Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease. *Semin Nephrol* 25(1): 43-49. 2005
110. Johnson RJ, Kivlighn SD, Kim Y-G, Suga S, Fogo A. Reappraisal of the pathogenesis and consequences of hyperuricemia in hypertension, cardiovascular disease, and renal disease. *Am J Kidney Dis* 33(2): 225-234. 1999
111. Iseki K, Ikemiya Y, Inoue T, Iseki C, Kinjo K, Takishita S. Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* 44(4): 642-650. 2004
112. Wu X, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 34(1): 78-84. 1992
113. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang D-H, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, Johnson RJ. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 38(5): 1101-1106. 2001
114. Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Watanabe S, Han L, Mazzali M, Truong L, Harris R, Johnson RJ. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13(12): 2888-2897. 2002
115. Sánchez-Lozada LG, Soto V, Tapia E, Avila-Casado C, Sautin YY, Nakagawa T, Franco M, Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(4): F1134-F1141. 2008
116. Ryu ES, Kim MJ, Shin HS, Jang YH, Choi HS, Jo I, Johnson RJ, Kang DH. Uric acid-induced phenotypic transition of renal tubular cells as a novel mechanism of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 304(5): F471-F480. 2013

117. Lee DY, Wauquier F, Eid AA, Roman LJ, Ghosh-Choudhury G, Khazim K, Block K, Gorin Y. Nox4 NADPH oxidase mediates peroxynitrite-dependent uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase and fibronectin expression in response to angiotensin II: role of mitochondrial reactive oxygen species. *J Biol Chem* 288(40): 28668-28686. 2013
118. Wang Y, Bao X. Effects of uric acid on endothelial dysfunction in early chronic kidney disease and its mechanisms. *Eur J Med Res* 18: 26. 2013
119. Zhou Y, Fang L, Jiang L, Wen P, Cao H, He W, Dai C, Yang J. Uric acid induces renal inflammation via activating tubular NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One* 7(6): e39738. 2012
120. Fritz JH, Girardin SE. How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *J Endotoxin Res* 11(6): 390-394. 2005
121. Werts C, Girardin SE, Philpott DJ. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ* 13(5): 798-815. 2006
122. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10(2): 417-426. 2002
123. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16. 1997
124. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14(1): 10-22. 2007
125. Kersse K, Vanden Berghe T, Lamkanfi M, Vandenabeele P. A phylogenetic and functional overview of inflammatory caspases and caspase-1-related CARD-only proteins. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6): 1508-1511. 2007
126. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27: 229-265. 2009
127. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 137-161. 2012
128. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20(3): 319-325. 2004
129. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an

- interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23(5): 479-490. 2005
130. Schmidt RL, Lenz LL. Distinct licensing of IL-18 and IL-1 $\beta$  secretion in response to NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One* 7(9): e45186. 2012
  131. Kanneganti TD, Ozören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Núñez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440(7081): 233-236. 2006
  132. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 1319: 82-95. 2014
  133. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081): 228-232. 2006
  134. Latz, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 22(1): 28-33. 2010
  135. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14(9): 1583-1589. 2007
  136. Duewell P1, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464(7293): 1357-1361. 2010
  137. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1 $\beta$  by keratinocytes. *Curr Biol* 17(13): 1140-1145. 2007
  138. Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol* 30(5): 628-631. 2010
  139. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 187(1): 61-70. 2009
  140. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9(8): 847-856. 2008

141. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, Eisenbarth SC, Nauseef WM, Cassel SL, Sutterwala FS. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39(2): 311-323. 2013
142. Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(44): 17963-17968. 2013
143. Subramanian N1, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153(2): 348-361. 2013
144. Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, Migliorini A, Darisipudi MN, Vilaysane A, Muruve D, Shi Y, Munro F, Liapis H, Anders HJ. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *J Clin Invest* 123(1): 236-246. 2013
145. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue-culture studies. *Clin Exp Nephrol* 8(2): 75-88. 2004
146. Knauf F, Asplin JR, Granja I, Schmidt IM, Moeckel GW, David RJ, Flavell RA, Aronson PS. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int* 84(5): 895-901. 2013
147. Prencipe G, Caiello I, Cherqui S, Whisenant T, Petrini S, Emma F, De Benedetti F. Inflammasome activation by cystine crystals: implications for the pathogenesis of cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 25(6): 1163-1169. 2014
148. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, Yan L, Clark SA, Tschopp J, Trpkov K, Hemmelgarn BR, Beck PL, Muruve DA. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol* 21(10): 1732-1744. 2010
149. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 29(1): 41-48. 2013
150. Lichtnekert J, Kulkarni OP, Mulay SR, Rupanagudi KV, Ryu M, Allam R, Vielhauer V, Muruve D, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Anders HJ. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One* 6(10): e26778. 2011



151. Faust J, Menke J, Kriegsmann J. Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Faslpr mice with autoimmune lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 46(11): 3083-3095. 2002
152. Franke EI, Vanderbrink BA, Hile KL, Zhang H, Cain A, Matsui F, Meldrum KK. Renal IL-18 production is macrophage independent during obstructive injury. *PLoS One* 7(10): e47417. 2012
153. Zhang C, Boini KM, Xia M, Abais JM, Li X, Liu Q, Li PL. Activation of Nod-like receptor protein 3 inflammasomes turns on podocyte injury and glomerular sclerosis in hyperhomocysteinemia. *Hypertension* 60(1): 154-162. 2012
154. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, Eisenbarth SC, Florquin S, Flavell RA, Leemans JC, Sutterwala FS. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48): 20388-20393. 2009
155. Darisipudi MN, Thomasova D, Mulay SR, Brech D, Noessner E, Liapis H, Anders HJ. Uromodulin triggers IL-1beta-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Am Soc Nephrol* 23(11): 1783-1789. 2012
156. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR Jr, Fedak PW, Beck PL, Muruve DA, Duff HJ. Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *J Biol Chem* 289(28): 19571-19584. 2014
157. Shigeoka AA, Mueller JL, Kambo A, Mathison JC, King AJ, Hall WF, Correia Jda S, Ulevitch RJ, Hoffman HM, McKay DB. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 185(10): 6277-6285. 2010
158. Lorenz G, Kulkarni O. The inflammasome-related molecules NLRP3 and ASC suppress lupus nephritis of C57Bl/6lpr/lpr mice. 28. 2013
159. Tao M, You C, Zhao R, Liu S, Zhang Z, Zhang C, Liu Y. Animal mitochondria: evolution, function, and disease. *Curr Mol Med* 14(1): 115-124. 2013
160. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327(5963): 296-300. 2010
161. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329): 221-225. 2010
162. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM.

- Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12(3): 222-230. 2011
163. Lanaspá MA, Sánchez-Lozada LG, Choi YJ, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jimenez CA, Ishimoto T, Li N, Marek G, Duranay M, Schreiner G, Rodríguez-Iturbe B, Nakagawa T, Kang DH, Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *J Biol Chem* 287(48): 40732-40744. 2012
164. Hong Q, Qi K, Feng Z, Huang Z, Cui S, Wang L, Fu B, Ding R, Yang J, Chen X, Wu D. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction via mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger-mediated mitochondrial calcium overload. *Cell Calcium* 51(5): 402-410. 2012
165. Sánchez-Lozada LG, Lanaspá MA, Cristóbal-García M, García-Arroyo F, Soto V, Cruz-Robles D, Nakagawa T, Yu MA, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid-induced endothelial dysfunction is associated with mitochondrial alterations and decreased intracellular ATP concentrations. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4): e71-e78. 2012
166. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7): 671-675. 2012
167. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354. 1979
168. Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86(1-2): 188-199. 2005
169. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153(1): 23-36. 1985
170. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228(1): 35-51. 1994

171. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54(3): 823-827. 1990
172. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328(2): 309-316. 1996
173. Strutz F, Muller GA. Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res* 22(1-2): 71-80. 1999
174. Yamada T, Fukatsu M, Suzuki S, Wada T, Joh T. Elevated serum uric acid predicts impaired fasting glucose and type 2 diabetes only among Japanese women undergoing health checkups. *Diabetes Metab* 37(3): 252-258. 2011
175. Siu YP, Leung KT, Tong MK, Kwan TH. Use of allopurinol in slowing the progression of renal disease through its ability to lower serum uric acid level. *Am J Kidney Dis* 47(1): 51-59. 2006
176. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* 121(2): 468-474. 2011
177. Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson DL, Silva FG. Tubular atrophy in the end-stage kidney: a lectin and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 25(1): 22-28. 1994
178. Galichon P, Hertig A. Epithelial to mesenchymal transition as a biomarker in renal fibrosis: are we ready for the bedside? *Fibrogenesis Tissue Repair* 4: 11.2011
179. Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* 143(7): 499-516. 2005
180. Jossa F, Farinaro E, Panico S, Krogh V, Celentano E, Galasso R, Mancini M, Trevisan M. Serum uric acid and hypertension: the Olivetti heart study. *J Hum Hypertens* 8(9): 677-681. 1994
181. Freedman DS, Williamson DF, Gunter EW, Byers T. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Epidemiol* 141(7): 637-644. 1995
182. Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke* 37(6): 1503-1507. 2006
183. Feig DI. Uric acid: a novel mediator and marker of risk in chronic kidney disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(6): 526-530. 2009

184. Cirillo P, Sato W, Reungjui S, Heinig M, Gersch M, Sautin Y, Nakagawa T, Johnson RJ. Uric acid, the metabolic syndrome, and renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(12 Suppl 3): S165-S168. 2006
185. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Kanellis J, Watanabe S, Sanchez-Lozada LG, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol* 23(1): 2-7. 2003
186. Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease. *QJM* 93(11): 707-713. 2000
187. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2): 199-210. 2008
188. Meireles CL, Price SR, Pereira AM, Carvalhaes JT, Mitch WE. Nutrition and chronic renal failure in rats: what is an optimal dietary protein? *J Am Soc Nephrol* 10(11): 2367-2373. 1999
189. Wang C1, Pan Y, Zhang QY, Wang FM, Kong LD. Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. *PLoS One* 7(6): e38285. 2012
190. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 40(10): 1365-1376. 2009
191. Xu XF, Dai HP. Type 2 epithelial mesenchymal transition in vivo: truth or pitfalls? *Chin Med J (Engl)* 125(18): 3312-3317. 2012
192. Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. Epithelial mesenchymal transition in human ocular chronic graft-versus-host disease. *Am J Pathol* 175(6): 2372-2381. 2009
193. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2): 131-142. 2006
194. D'Souza-Schorey C. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends Cell Biol* 15(1): 19-26. 2005
195. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 27(55): 6958-6969. 2008
196. Lomas NJ, Watts KL, Akram KM, Forsyth NR, Spiteri MA. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *Int J Clin Exp Pathol* 5(1): 58-71. 2012

197. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant* 5(6): 1367-1374. 2005
198. Goh Then Sin C, Hersch N, Rudland PS, Barraclough R, Hoffmann B, Gross SR. S100A4 downregulates filopodia formation through increased dynamic instability. *Cell Adh Migr* 5(5): 439-447. 2011
199. Miranda KJ, Loeser RF, Yammani RR. Sumoylation and nuclear translocation of S100A4 regulate IL-1beta-mediated production of matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* 285(41): 31517-31524. 2010
200. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 19(8): 1047-1053. 2013
201. Quan H, Peng X, Liu S, Bo F, Yang L, Huang Z, Li H, Chen X, Di W. Differentially expressed protein profile of renal tubule cell stimulated by elevated uric acid using SILAC coupled to LC-MS. *Cell Physiol Biochem* 27(1): 91-98. 2011
202. Han HJ, Lim MJ, Lee YJ, Lee JH, Yang IS, Taub M. Uric acid inhibits renal proximal tubule cell proliferation via at least two signaling pathways involving PKC, MAPK, cPLA2, and NF-kappaB. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1): F373-F381. 2007
203. Jennet J, Olson J, Schwartz M, Silva F. Heptinstall's Pathology of the Kidney, ed. S. Edición. Vol. 2. 2007.
204. Kitamura K. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Ann Rev Immunol* 7: 59-76. 1989
205. Ruger BM, Hasan Q, Greenhill NS, Davis PF, Dunbar PR, Neale TJ. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy. *Diabetologia* 39(10): 1215-1222. 1996
206. Morikawa T, Imanishi M, Suzuki H, Okada N, Okumura M, Konishi Y, Yoshioka K, Takai S, Miyazaki M. Mast cell chymase in the ischemic kidney of severe unilateral renovascular hypertension. *Am J Kidney Dis* 45(3): e45-e50. 2005
207. Solari V, Unemoto K, Piaseczna Piotrowska A, Puri P. Increased expression of mast cells in reflux nephropathy. *Pediatr Nephrol* 19(2): 157-163. 2004
208. Kumar V, Sharma A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol Immunol* 48(1-3): 14-25. 2010

209. Craig, SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 58(6): 682-691. 1988
210. Greenberg G, Burnstock G. A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. *Exp Cell Res* 147(1): 1-13. 1983
211. Meng H, Marchese MJ, Garlick JA, Jelaska A, Korn JH, Gailit J, Clark RA, Gruber BL. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 105(6): 789-796. 1995
212. Trautmann A, Krohne G, Brocker EB, Klein CE. Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. *J Immunol* 160(10): 5053-5057. 1998
213. Gibbs BF, Wierecky J, Welker P, Henz BM, Wolff HH, Grabbe J. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol* 10(5): 312-320. 2001
214. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18(7): 1028-1040. 2012
215. Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. *Hypertension* 53(6): 1041-1047. 2009
216. Galichon P, Finianos S, Hertig A. EMT-MET in renal disease: should we curb our enthusiasm? *Cancer Lett* 341(1): 24-29. 2013
217. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425(6957): 516-521. 2003
218. Anders HJ. Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 21(8): 1270-1274. 2010
219. Anders HJ, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22(6): 1007-1018. 2011
220. Gobe G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 56(4): 1299-1304. 1999
221. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 140(6): 821-832. 2010

222. Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti EH, Anders, HJ. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int Immunol* 22(9): 717-728. 2010
223. Wang Y, Yang C, Mao K, Chen S, Meng G, Sun B. Cellular localization of NLRP3 inflammasome. *Protein Cell* 4(6): 425-431. 2013
224. Lawlor KE, Vince JE. Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? *Biochim Biophys Acta* 1840(4): 1433-1440. 2014
225. Shiomura Y, Hirokawa N. Colocalization of microtubule-associated protein 1A and microtubule-associated protein 2 on neuronal microtubules in situ revealed with double-label immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 104(6): 1575-1578. 1987
226. Hagiwara H1, Aoki T, Suzuki T, Takata K. Double-label immunoelectron microscopy for studying the colocalization of proteins in cultured cells. *Methods Mol Biol* 657: 249-257. 2010
227. Granata S, Zaza G, Simone S, Villani G, Latorre D, Pontrelli P, Carella M, Schena FP, Grandaliano G, Pertosa G. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics* 10: 388. 2009
228. Zhuang Y, Ding G, Zhao M, Bai M, Yang L, Ni J, Wang R, Jia Z, Huang S, Zhang A. NLRP3 inflammasome mediates albumin-induced renal tubular injury through impaired mitochondrial function. *J Biol Chem* 289(36): 25101-25111. 2014
229. Zhuang Y, Feng Q, Ding G, Zhao M, Che R, Bai M, Bao H, Zhang A, Huang S. Activation of ERK1/2 by NADPH oxidase-originated reactive oxygen species mediates uric acid-induced mesangial cell proliferation. *Am J Physiol Renal Physiol* 307(4): F396-F406. 2014
230. Abais JM, Xia M, Li G, Chen Y, Conley SM, Gehr TW, Boini KM, Li PL. Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasome Activation and Podocyte Injury via Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) during Hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 289(39): 27159-27168. 2014

## **APÉNDICE**



Los resultados del presente trabajo de investigación han sido presentados en diversos eventos científicos de carácter internacional, nacional y local.



Joint Meeting ESH-ISH, Hypertension, Athens, June 13-16, 2014

Abstracts: *Journal of Hypertension* Volume 32, Suppl.1

e630 *Journal of Hypertension* Volume 32, e-Supplement 1, 2014

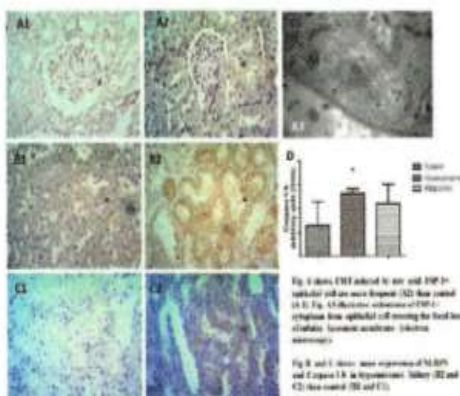
**PP.40.23 URIC ACID INDUCES KIDNEY EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION: ROLE OF NLRP3 INFLAMMASOME**

C. Romero, A. Torres, J. Mukdsi. *Electron Microscopy Center, School of Medicine, National University of Córdoba, ARGENTINA*

**Objective:** Recently it has been demonstrated that hyperuricemia induces kidney epithelial-mesenchymal transition (EMT), an early state of renal fibrosis. NLRP3 inflammasome is part of the innate immune response that senses danger cellular signals and mediates an inflammatory response, activating caspase-1 and finally increasing IL-1b and IL-18. Uric acid activates NLRP3 in vitro. The role of NLRP3 inflammasome in EMT in hyperuricemic model is unknown.

**Design and method:** Male 200- to 250-g wistar rats during 49 days were fed ad libitum with standard normosodium diet (C group) (n=4), a second group (n=4) received the same normosodium diet with 2% oxonic acid and 2% uric acid supplements (OXUR group), and finally a third group (AL) received the supplemented hyperuricemic diet, plus allopurinol in drinking water (150 mg/L). At day 49 serum uric acid and blood urea were measured. Kidney material was taken and frozen for western blot (WB), a section was processed for transmission electron microscopy (EM) and finally fixation (4% paraformaldehyde) and paraffin inclusion was performed for immunohistochemistry (IHC) technique with peroxidase, using FSP-1 antibody (Abcam) to detect EMT on epithelial cells, NLRP3 (Santa Cruz) to evaluate the expression of inflammasome, and caspase-1 to measure the activity of inflammasome; we analyzed 10 randomized areas at 400x from each animal. Caspase-1 was measured on WB from total kidney tissue.

**Results:** OXUR group achieved higher plasma levels of uric acid (2,2±0,5 vs. 0,9±0,7 and 1,4±0,8 mg/dl; p<0,02) and urea (58,7±6 vs. 42±3 and 28,5±1,7; p<0,001) than C and AL group. EMT was confirmed on EM (figure) and on IHC showing more epithelial cell FSP-1+ in the OXUR group than CT (15,4±17 vs 2,6±4 cell/100 tubules; p<0,001). 69% of tubules (n=493) from OXUR group expressed NLRP3 on IHC, while 11% and 16% in the C and AL groups (p<0,001). Caspase-1 in OXUR group was expressed in 32% of tubules (n=628) while 2% and 3% in the C and AL groups, respectively (p<0,001). This difference was confirmed on WB analysis (figure).



**Conclusions:** NLRP3 inflammasome, via caspase-1 activation, would participate in kidney epithelial-mesenchymal transition induced by uric acid.

level of uric acid in serum of patients with essential arterial hypertension and preserved kidney function; and index of sodium sensitivity, as the main parameter of salt-sensitive hypertension existence.

**Design and method:** The study included 178 patients of both sexes, aged averagely 59±18.2 years, with at least 5 years of hypertension history. Uric acid serum values were measured spectrophotometrically, using ERBA XL 600 automated analyser.

Sodium sensitivity index has been calculated from differences in 24 hours sodium excretion between period of sodium rich diet (250 mmol/24 hours) and sodium lean diet (100 mmol/24 hours), divided by mean arterial pressure, determined in the first and second measurement respectively. The results were processed using Student's t-test and Pearson's Correlation in Microsoft Excel 2010.

**Results:** Based on uric acid serum values, patients were divided into 2 groups: I group - 95 patients, with normal uric acid serum values (256±35 µmol/l); II group - 83 patients, with statistically significant increase of uric acid serum values (572±49 µmol/l; p<0.01). Sodium sensitivity index in I group had normal values (0.026±0.005), while in II group it was significantly higher (0.078±0.02; p<0.01). This implies that in II group patients salt-sensitive hypertension was present. Comparison of uric acid serum level increase and salt-sensitivity index showed high positive correlation (r=0.721).

**Conclusions:** In patients with essential arterial hypertension and preserved kidney function, hyperuricemia and salt-sensitivity index correlate highly. This indicates that salt-sensitive arterial hypertension can be induced by prolonged hyperuricemia.

**PP.40.25 SERUM URIC ACID IS ASSOCIATED WITH NON-DIPPING CIRCADIAN PATTERN IN YOUNG PATIENTS (30-40 YEARS OLD) WITH NEWLY DIAGNOSED ESSENTIAL HYPERTENSION**

P. Prodotti<sup>1</sup>, R. Citro<sup>1</sup>, L. Maresca<sup>2</sup>, A. Vitelli<sup>2</sup>, G. Albano<sup>3</sup>, M. Ciardo<sup>3</sup>, F. Giallauria<sup>1,2</sup>. *A.O. University S. Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona Hypertension Care Unit, Salerno, ITALY; <sup>2</sup>University of Naples Federico II, Department of Translational Medical Sciences, Naples, ITALY; <sup>3</sup>General Hospital Ignazio Veris Delli Ponti Critical Care Unit, Scorrano, ITALY*

**Objective:** Uric acid (UA) is independently associated with newly diagnosed hypertension. Nocturnal non-dipping pattern evaluated by the 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (ABPM) is associated with a greater risk of cardiovascular, renal, and cerebrovascular complications than dippers. We aimed at evaluating the relationship between the circadian blood pressure rhythm and UA level in young patients (30-40 years old) with newly diagnosed essential hypertension.

**Design and method:** The study included 62 essential hypertensive patients and 29 healthy controls. The hypertensive patients were divided into two groups according to the results of 24-hour ABPM, including 30 dippers (20 men, 10 women, mean age 34±2 years) and 32 non-dippers (18 men, 14 women, mean age = 33±3 years).

**Results:** Compared to the dippers and to healthy controls, non-dippers had significantly higher serum UA levels (6.1±0.7, 5.2±0.9 and 4.1±0.9 mg/dl, respectively; P<.001). After adjusting for age, gender, body mass index, and comorbidity (history of cardiovascular disease, diabetes, hypercholesterolemia), multivariate logistic regression analysis revealed an independent association between serum UA levels and non-dipper pattern (odds ratio = 2.44; 95% confidence interval = 1.4-4.1; P = .002).

**Conclusions:** Serum UA is independently associated with non-dipper circadian pattern in young patients with newly diagnosed essential hypertension.

**PP.40.24 RELATIONSHIP BETWEEN URIC ACID LEVELS AND SODIUM SENSITIVITY INDEX IN PATIENTS WITH ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSION**

**PP.40.26 THE ASSOCIATION OF URIC ACID WITH RISK OF HYPERTENSION IS MODULATED BY PHYSICAL ACTIVITY**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
 FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
 SECRETARÍA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA



UNC

Universidad  
 Nacional  
 de Córdoba

# XIV JIC

## XIV Jornada de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas R.D. 730/13

Por cuanto: **ROMERO CA\*, TORRES AJ y MUKOSI JH**

ha/n participado como autores del trabajo: **"ESTADOS DE HIPERURICEMIA INDUCEN CAMBIOS EN LA ESTRUCTURAS DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESENEQUIMÁTICA A NIVEL DEL EPITELIO TUBULAR RENAL"**

En las XIV Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Se expide el presente

### Certificado

Córdoba, a los 24 días del mes de octubre de 2013

Prof. Dr. Mauricio de Caceres  
 Secretario de Ciencia y Tecnología  
 Facultad de Ciencias Médicas UNC

Prof. Dr. Gustavo I. Insa  
 Decano  
 Facultad de Ciencias Médicas UNC

Estados de hiperuricemia inducen cambios ultraestructurales de transición epitelio-mesenquimática a nivel del epitelio tubular renal.

Romero CA, Torres AI y Mukdsi JH. Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC.

Diversas investigaciones han establecido que la hiperuricemia es una causa de hipertensión arterial y marcador de progresión de enfermedad renal terminal, habiéndose demostrado que la hiperuricemia per se podría conducir a mayor deterioro renal con cambios en la expresión de marcadores epiteliales/mesenquimáticos tubulares. Sin embargo, hasta el presente no se han reportado cambios morfológicos subcelulares de transición epitelio-mesenquimática (TEM) a nivel renal en estados de hiperuricemia. Nuestro objetivo es analizar los cambios ultraestructurales renales inducidos en un estado de hiperuricemia.

Se utilizaron ratas Wistar machos adultas: Grupo I (n=4): dieta estándar normosódica con suplemento de ácido oxónico 2% (bloqueante de la uricasa hepática) y ácido úrico al 2% (7 semanas). Grupo II, control (n=4): dieta normosódica. Fragmentos de tejido renal fueron fijados y procesados para microscopía electrónica de transmisión. Los niveles de ácido úrico aumentaron de manera progresiva y significativa ( $p < 0,01$ ) generándose un estado de hiperuricemia (Grupo I:  $2,22 \pm 0,15 \text{ mg\%}$ ; Grupo II:  $0,93 \pm 0,2 \text{ mg\%}$ ;). Este estado cursó con niveles elevados de urea en sangre ( $p < 0,01$ ). A nivel ultraestructural se demostró la presencia de interrupciones micro-focales en membranas basales de túbulos corticales asociadas a un claro incremento del componente de matriz extracelular e infiltrado inflamatorio mononuclear en la región del laberinto cortical ( $p < 0,01$ ).

Además, se identificaron extensiones de citoplasmas epiteliales en esas áreas como evidencias morfológicas TEM. No se apreciaron cambios morfológicos de significación a nivel de túbulos medulares renales.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
 FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
 SECRETARÍA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Universidad  
 Nacional  
 de Córdoba



**XIII Jornada de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas R.D. 247/12**  
 En el marco de los 400 años de la UNC

Por cuanto: **RÓMERO C., TORRES A., MUKDSI J.**, - Centro de Microscopía Electrónica-FCM-UNC-INICSA-  
**CONICET**

han participado como autores del trabajo: **LA HIPERURICEMIA LEVE INDUCE ENFERMEDAD RENAL  
 CRÓNICA Y CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PSP-1**

**Certificado**

Córdoba, a los 26 días del mes de septiembre de 2012

Dr. JUAN CARLOS DE CARRIÓ  
 Secretario de Ciencia y Tecnología  
 Facultad de Ciencias Médicas UNC

Prof. Dr. Gabriel L. Rillo  
 Director  
 Facultad de Ciencias Médicas UNC



## **Revista de la Facultad de Ciencias Medicas 69 (2): 69. 2012**

La hiperuricemia leve induce enfermedad renal crónica y cambios en la expresión de fsp-1  
Romero C, Torres A, Mukdsi J. Centro de Microscopía Electrónica-FCM-UNC-INICSA-  
CONICET

Introducción: Diversas investigaciones han relacionado a la hiperuricemia con el daño renal a través de la HTA. Sin embargo, hay estudios que demuestran que la hiperuricemia per se podría conducir a mayor deterioro renal sin conocerse, al presente, los eventos moleculares que iniciarían y permitirían la progresión del daño túbulointersticial

asociado a la hiperuricemia hacia un estado de enfermedad renal crónica. Objetivo: Analizar los cambios histopatológicos y ultraestructurales renales inducidos por la hiperuricemia leve; relacionándolos con la expresión tubular de la proteína FSP-1 como indicadora de transición epitelio-mesenquimática. Población, Materiales y Métodos: Se utilizaron ratas Wistar machos adultas: Grupo I (n=4): dieta normosódica e inyección SC de ácido oxónico (bloqueante de la uricasa hepática) + ácido úrico (7 semanas). Grupo II, control (n=4): dieta normosódica e inyección de vehículo.

Los riñones fueron procesados para microscopía óptica y electrónica de transmisión. La inflamación intersticial se clasificó en bajo y alto grado. Se determinó la expresión de la proteína FSP-1 por inmunohistoquímica, evaluando el número de túbulos positivos por superficie cortical (superficie por grupo:  $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ). Además, se analizaron

los cambios en la celularidad y ultraestructura glomerulares. Estadística: prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. Test T para variables cuantitativas y Chi cuadrado para las cualitativas. Resultados: Los niveles de ácido úrico aumentaron de manera progresiva y significativa: ( $p < 0,01$ ) generándose un estado de leve hiperuricemia (Grupo I:  $1,02 \pm 0,15 \text{mg}\%$ ; Grupo II:  $0,33 \pm 0,2 \text{mg}\%$ ). Este estado cursó con niveles elevados de urea en sangre ( $p < 0,01$ ), leve fibrosis intersticial multifocal con infiltrado inflamatorio de alto grado en la región del laberinto cortical ( $p < 0,01$ ), aumento de la celularidad a nivel glomerular ( $p < 0,01$ ) y expansión edematosa del espacio subendotelial de los capilares glomerulares. El grupo hiperuricémico evidenció mayor número de túbulos con expresión de FSP-1, pero sin alcanzar significancia estadística ( $p = 0,057$ ). Conclusión: Los hallazgos descriptos indicarían que estados de hiperuricemia leve inducen eventos fibrogénicos-inflamatorios a nivel renal con cambios glomerulares y variaciones en la expresión de FSP-1, contribuyendo así a la progresión del daño renal.

Palabras clave: hiperuricemia, fsp-1

2011

# medicina

BUENOS AIRES VOL. 71 SUPL. III- 2011

MEDICINA

Volumen 71, Supl. III, págs. 1-272



**Medicina (Buenos Aires) (71): 63-251. 2011**

**Resúmenes de las Comunicaciones- Página 155**

319. (463) Alteraciones hisptopatológicas y ultraestructurales renales en un modelo experimental de hiperuricemia leve: análisis de la expresión de la proteína FSP1. Romero C; Leimgruber C; Torres A; Mukdsi J. Centro de Microscopía Electrónica FCM UNC.

La hiperuricemia se asocia a enfermedad renal progresiva e hipertensión arterial. El objetivo de este estudio fue analizar los cambios histopatológicos y ultraestructurales renales inducidos por la hiperuricemia leve; relacionándolos con la expresión tubular de la proteína FSP-1 como indicadora de transición epiteliomesenquimática. Se utilizaron ratas Wistar machos adultas: Grupo I (n=4): dieta normosódica e inyección SC de ácido oxónico (bloqueante de la uricasa hepática) + ácido úrico (7 semanas). Grupo II, control (n=4): dieta normosódica e inyección de vehículo. Los riñones fueron procesados para microscopía óptica y electrónica de transmisión. La inflamación intersticial se clasificó en bajo y alto grado. Se determinó la expresión de la proteína FSP-1 por inmunohistoquímica, evaluando el número de túbulos positivos por superficie cortical (superficie por grupo:  $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ). Además, se analizaron los cambios en la celularidad y ultraestructura glomerulares. Estadística: prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. Test T para variables cuantitativas y Chi cuadrado para las cualitativas. Los niveles de ácido úrico aumentaron de manera progresiva y significativa: ( $p < 0,01$ ) generándose un estado de leve hiperuricemia (Grupo I:  $1,02 \pm 0,15 \text{mg}\%$ ; Grupo II:  $0,33 \pm 0,2 \text{mg}\%$ ). Este estado cursó con niveles elevados de urea en sangre ( $p < 0,01$ ), leve fibrosis intersticial multifocal con infiltrado inflamatorio de alto grado en la región del laberinto cortical ( $p < 0,01$ ), aumento de la celularidad a nivel glomerular ( $p < 0,01$ ) y expansión edematosa del espacio subendotelial de los capilares glomerulares. El grupo hiperuricémico evidenció mayor número de túbulos con expresión de FSP-1, pero sin alcanzar