

**Sección: Artículos originales**

**PATRÓN GÉNICO DE FIBROSIS Y APOPTOSIS  
EN NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA EXPERIMENTAL:  
MODULACIÓN POR ROSUVASTATINA**

Mazzei L\*, García M<sup>\*,\*\*</sup>, Manucha W<sup>\*,\*\*</sup>.

\*Área Fisiopatología, Fac. Cs. Médicas, UN de Cuyo

\*\* IMBECU-CONICET, Mendoza-Argentina.

Contacto: [wmanucha@fcm.uncu.edu.ar](mailto:wmanucha@fcm.uncu.edu.ar)

## RESUMEN

La nefropatía obstructiva puede ser un desorden renal complejo de tratar debido al severo cuadro inflamatorio, desbalance oxidativo, apoptosis y fibrosis. Estudios previos sostienen que rosuvastatina (Ros) podría tener utilidad como una opción terapéutica en enfermedades renales que cursarían con apoptosis y fibrosis.

Objetivo: Evaluar los posibles efectos antiapoptóticos y antifibróticos de Ros durante la obstrucción ureteral unilateral en ratas neonatas.

Materiales y Métodos: Ratas Wistar neonatas de 48 hs. de vida fueron intervenidas quirúrgicamente (grupo experimental) o no (grupo control). Ambos grupos fueron subdivididos en tratadas o no tratadas con Ros (10mg / kg por día) vía oral durante 14 días. Posteriormente se procedió a nefrectomizar y procesar las cortezas renales para determinar por RT-PCR las expresiones de genes: óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*), factor promotor génico de chaperonas (*hsf1*), proteína de shock térmico (*hsp70*), *bax*, *bcl2*, *wt1*, *p53*, *snail*, proteína morfogénica del hueso (*bmp7*), *caderina E*, factor transformador de crecimiento (*tgf-β*) y factor de necrosis tumoral (*tnf-α*).

Resultados: La obstrucción ureteral unilateral neonatal indujo una marcada fibrosis y apoptosis, mientras que el tratamiento con Ros moduló el patrón de genes fibróticos y apoptóticos mediante disminución de la expresión de *bmp7*, *caderina E*, *wt1*, *p53* y *bcl2*; además indujo una caída en la expresión de los genes profibróticos y proapoptóticos (*bax*, *tnf-α* y *tgf-β*).

El análisis de los resultados presentados, permiten sugerir que la protección renal de rosuvastatina durante nefropatía obstructiva de ratas neonatas estaría asociado a la interacción entre *hsp70* y la biodisponibilidad del óxido nítrico con el concomitante descenso en genes pro-apoptóticos.

Palabras clave: fibrosis, apoptosis, obstrucción ureteral unilateral experimental, óxido nítrico, Hsp70, p53, wt1.

## ABSTRACT

Fibrosis and apoptosis gene pattern in experimental obstructive nephropathy:  
Rosuvastatin modulation

Obstructive nephropathy renal disorder can be complex to treat due to the severe apoptosis and fibrosis. Previous studies shown that rosuvastatin (Ros), may have potential utility as a therapeutic option in kidney diseases which lead to apoptosis and fibrosis.

Objective: to evaluate the possible antifibrotic and antiapoptotic effects of Ros during experimental neonatal rats unilateral ureteral obstruction (UUO).

Materials and Methods: Neonatal rats were surgically obstructed (experimental group) or not (control group), which were Ros treated or not (10 mg/kg per day) during 14 days. Subsequent nephrectomy and processing of the renal cortex to determinate by RT-PCR technique, genes expression of inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), heat shock factor 1 (*hsf1*), heat shock protein 70 (*hsp70*), *bax*, *bcl2*, *wt1*, *p53*, *snail*, bone morphogenetic protein (*bmp7*), *E-cadherin*, transforming growth factor (*tgf-β*) and tumor necrosis factor (*tnf-α*).

Results: neonatal UUO induced fibrosis and apoptosis, while Ros treatment modulated the fibrotic and apoptotic genes pattern and increased the *bmp7*, *E-cadherin*, *wt1*, *p53* and *bcl2* expression as well as decreased the profibrotic and proapoptotic genes expression (*bax*, *tnf-α* y *tgf-β*).

Our results allow us to suggest that Ros renal protection during UUO is linked to *hsp70* and nitric oxide bioavailability interaction, with concomitant decrease in pro apoptotic gene pattern.

Key words: fibrosis, apoptosis, experimental obstructive nephropathy, óxido nítrico, Hsp70, p53, wt1

## **Introducción**

La nefropatía obstructiva es uno de los desórdenes renales más complejos y puede contribuir a la enfermedad renal crónica, siendo ésta principalmente grave en pacientes pediátricos.

La integridad funcional del riñón depende del desarrollo normal así como del recambio celular. Por lo tanto, el mecanismo de apoptosis resulta esencial en tal circunstancia. No obstante, múltiples mecanismos se ponen en juego durante la nefropatía obstructiva, siendo la muerte celular programada uno de los más complejos y que conduce a la atrofia tubular renal y pérdida de la función renal [Manucha and Vallés 2008]. Además de apoptosis, durante la nefropatía obstructiva se produce un severo cuadro inflamatorio, desbalance oxidativo y fibrosis.

Esta enfermedad es frecuente en niños debido a fallas congénitas del tracto urinario sobre todo a nivel de la unión ureteropélvica e involucra respuestas hemodinámicas así como hidrodinámicas [Chevalier 2004]. Como consecuencia, se produce una reducción del flujo plasmático renal y del índice de filtración glomerular con significativos cambios en la función tubular renal. Estos eventos provocan alteraciones en la capacidad de concentrar la orina [Klahr et al 1988] así como pérdida de la capacidad de acidificarla [Vallés et al 1999].

Estudios básicos en animales de experimentación sugieren que el uso de estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi, 3-metil CoA reductasa), podrían contribuir a disminuir la fibrosis e inflamación [Gianella et al 2007]. Al respecto, se ha demostrado que rosuvastatina (Ros), una estatina de última generación, podría tener utilidad potencial como opción terapéutica en enfermedades renales que cursarían con inflamación y fibrosis.

La relación entre el uso de estatinas y la expresión de Hsp70 (una de las principales proteínas de respuesta al shock térmico), podría ser útil para sugerir efectos

antioxidantes de estos fármacos (conocidos como pleiotrópicos). Ros restaura la biodisponibilidad del óxido nítrico mediante la expresión de la óxido nítrico sintasa isoforma endotelial (ONSe), entre otros mecanismos, previniendo el estrés oxidativo y la muerte celular durante la obstrucción.

Nuestro laboratorio propuso evaluar los posibles efectos antiapoptóticos y antifibróticos de Ros durante la OUU neonatal, a fin establecer mecanismos renoprotectivos relacionados a la modulación de la vía mitocondrial apoptótica.

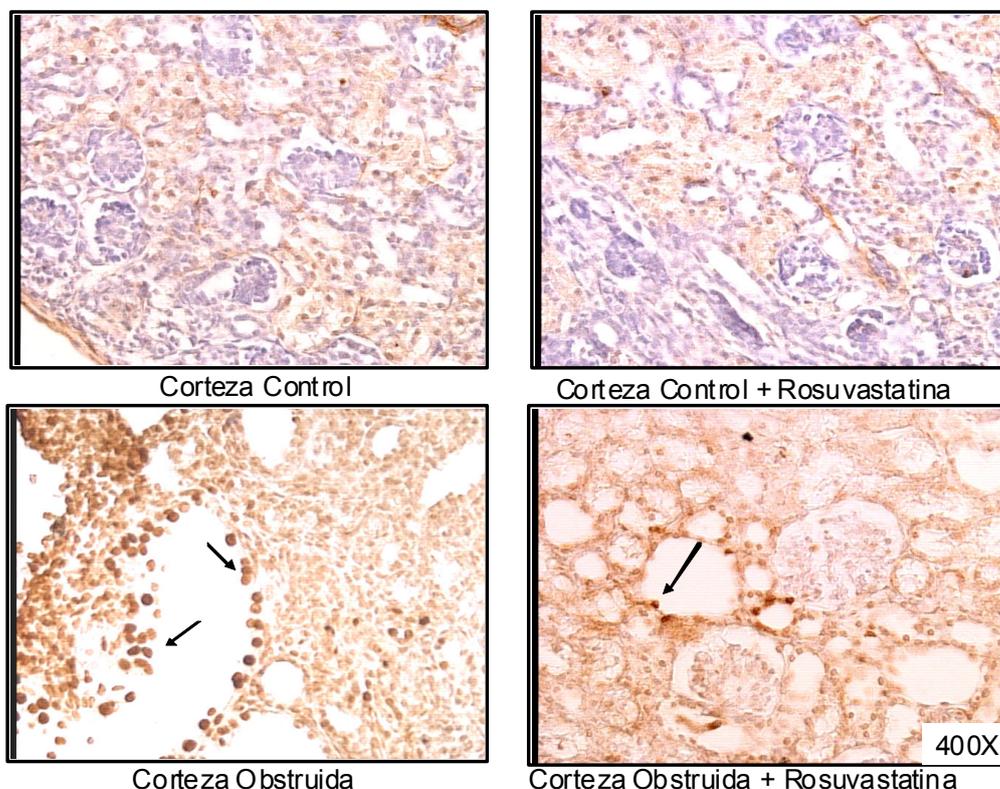
### **Materiales y Métodos**

Ratas Wistar neonatas de 48 hs. de vida fueron intervenidas quirúrgicamente a fin de practicarles obstrucción ureteral unilateral (grupo experimental). Además, se estableció un grupo control sin la obstrucción. Ambos grupos fueron subdivididos en tratadas o no tratadas con Ros (10mg / kg por día) vía oral durante 14 días. Estableciéndose 4 grupos de trabajo: controles, controles con Ros, obstruidas y obstruidas con Ros. Posteriormente se procedió a nefrectomizar y procesar las cortezas renales para determinar por RT-PCR las expresiones de genes como óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*), factor promotor génico de chaperonas (*hsf1*), proteína de shock térmico (*hsp70*), *bax*, *bcl<sub>2</sub>*, *wt<sub>1</sub>*, *p<sub>53</sub>*, *snail*, proteína morfogénica del hueso (*bmp<sub>7</sub>*), *caderina E*, factor transformador de crecimiento (*tgf-β*) y factor de necrosis tumoral (*tnf-α*).

### **Resultados**

El análisis de nuestro laboratorio demostró significativos resultados cuando analizamos mediante la técnica de TUNEL al segmento cortical sometido a obstrucción y posterior tratamiento con rosuvastatina. Determinamos en cortes de cortezas renales de ratas neonatas obstruidas de 14 días, un número elevado de células positivas con intensa marca molecular de apoptosis en células del epitelio

tubular. Por otro lado, animales obstruidos tratados oralmente con rosuvastatina, demostraron un significativo menor número de células positivas. Figura 1

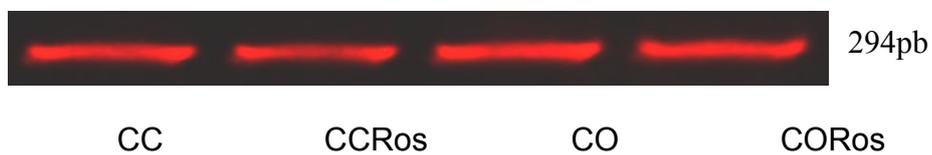


**Figura 1:** Determinación de apoptosis por técnica de TUNEL en corteza renal de ratas neonatas sometidas a obstrucción. Efecto de Ros. Las flechas indican células positivas.

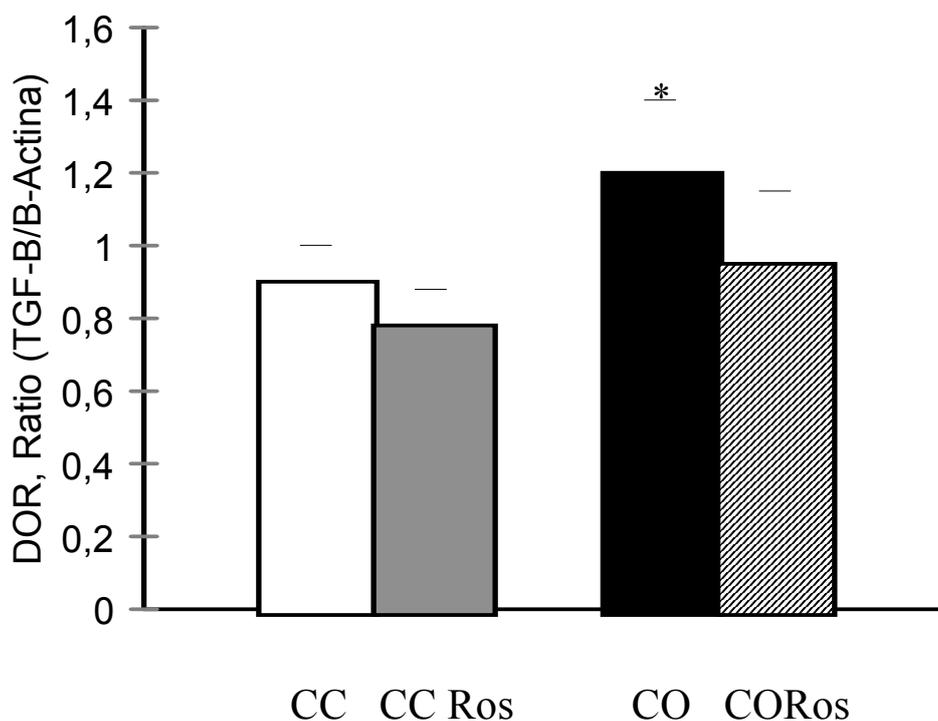
#### **Factor transformador de crecimiento TGF- $\beta$ .**

El análisis de la expresión del mensajero *tgf- $\beta$*  en relación al gen constitutivo  $\beta$ -actina para cada muestra, demostró un marcado incremento de la citocina profibrótica en las muestras de los animales sometidos a la injuria obstructiva en relación a los controles ( $1,2 \pm 0,2$  vs  $0,9 \pm 0,1$ ; corteza obstruida versus corteza control,  $n=5$ ,  $p<0.05$ ). Mientras que el uso de rosuvastatina durante los 14 días de experimentación logró revertir esta inducción ( $0,95 \pm 0,1$  vs  $1,2 \pm 0,2$ ; corteza obstruida con Ros versus corteza obstruida,  $n=5$ ,  $p<0.05$ ). Además, de interés fue el hecho de establecer un

descenso en la expresión basal de *tgf-β* en las muestras controles ( $0,9 \pm 0,1$  vs  $0,78 \pm 0,1$ ; corteza control versus corteza control con Ros, n=5). Figura 2 A y 2 B.



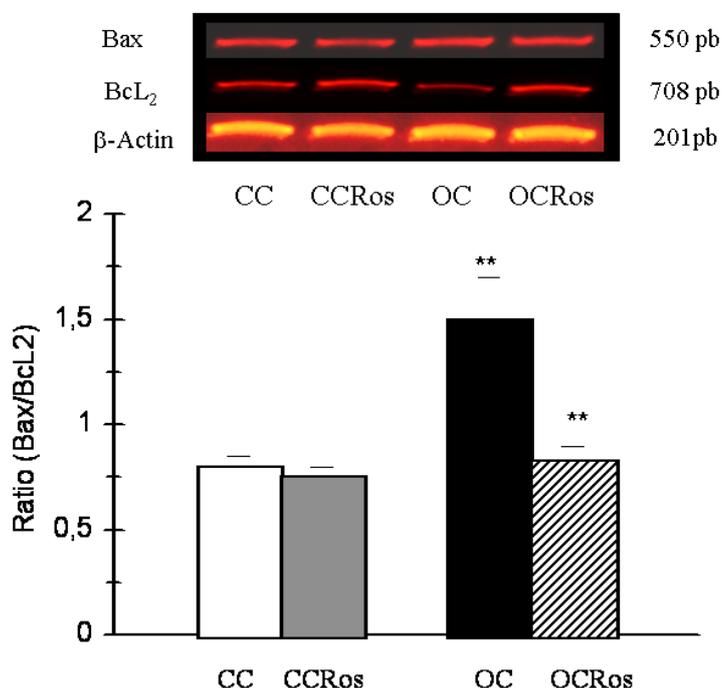
**Figura 2 A:** Expresión por RT-PCR de *tgf-β* en nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas. Efecto de Ros



**Figura 2 B:** Densidad óptica relativa de la expresión por RT-PCR de *tgf-β* en nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas. Efecto de Ros.

### Genes moduladores de apoptosis mitocondrial: *bax* y *bcl2*.

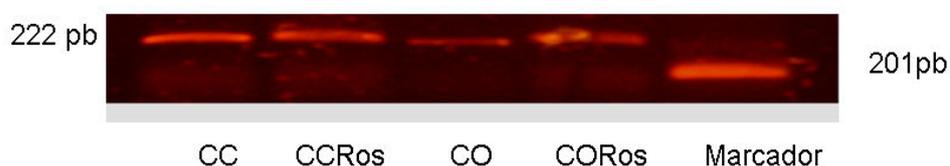
Los estudios de protooncogenes moduladores de apoptosis de la principal vía intracelular o mitocondrial, dieron cuenta que las cortezas de ratas neonatas sometidas a obstrucción ureteral unilateral, sufren una fuerte inducción de esta vía [Manucha et al 2007] puesto que el índice proapoptótico calculado como la relación *bax/bcl2* fue significativamente superior a los 14 días de experimentación ( $1,50 \pm 0.2$  vs.  $0.8 \pm 0.05$ ; corteza obstruida versus corteza control,  $p < 0.01$ ,  $n=5$ ). Sin embargo, rosuvastatina a razón de 10mg/kg por día, causó un significativo descenso en la relación ( $0,83 \pm 0,07$  vs.  $1,50 \pm 0,20$ ; corteza obstruida versus corteza obstruida con rosuvastatina,  $p < 0.01$ ,  $n=5$ ) Figura 3.



**Figura 3:** Expresión por RT-PCR y semi-cuantificación de genes *bax* y *bcl2* en obstrucción ureteral unilateral neonatal. Efecto de Ros

### Óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*).

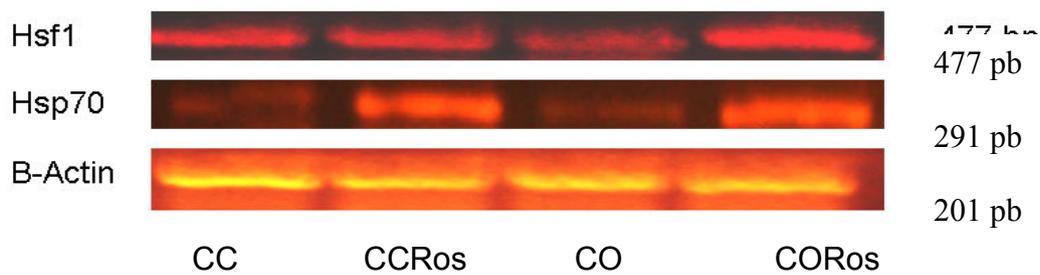
En la figura se puede observar una disminución importante del mensajero de *iNOS* en el riñón obstruido con respecto a los controles ( $0,3 \pm 0,05$  vs.  $1,0 \pm 0,06$ ;  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ). Por otro lado, también pudo establecerse un incremento significativo de la expresión del mensajero *iNOS* en los animales obstruidos tratados con Ros respecto a los obstruidos no tratados ( $0,87 \pm 0,1$  vs  $0,3 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ). Las bandas de *iNOS* se corresponden con un peso molecular de 222 pb y en la figura 4, se observan por encima de la banda de  $\beta$ -actina (201 pb) utilizada como marcador de peso molecular.



**Figura 4:** Expresión RT-PCR de *iNOS* en el modelo de obstrucción ureteral unilateral neonatal. Efecto de Ros.

### Correlación *hsf1-hsp70*.

La inducción de respuesta a estrés ha sido largamente caracterizada en células injuriadas en una gran variedad de patologías renales. Hsf1 es un mediador de la expresión de *hsp70* en respuesta a estímulos como hipoxia entre otros. Aquí, caracterizamos la significativa pérdida en la respuesta adaptativa que sufren las células corticales renales de animales sometidos crónicamente a la injuria obstructiva oxidativa, puesto que las cortezas obstruidas expresaron mínimos niveles de los mensajeros hsf1 ( $0,35 \pm 0,05$  vs.  $0,89 \pm 0,04$ ; corteza obstruida versus corteza control,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ), así también como *hsp70* ( $0,20 \pm 0,01$  vs.  $0,3 \pm 0,01$ ; corteza obstruida versus corteza control,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). Figura 5

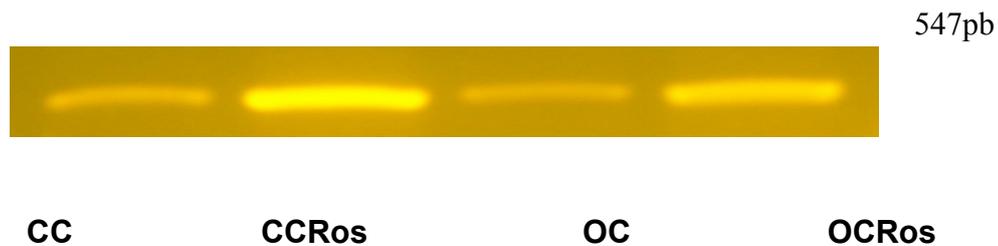


**Figura 5:** Expresión RT-PCR de genes de respuesta a estrés *hsf1* y *hsp70* en nefropatía obstructiva. Efecto de Ros.

Mientras que el tratamiento con rosuvastatina indujo muy significativamente a los mediadores citados: *hsf1* ( $1,02 \pm 0,1$  vs.  $0,35 \pm 0,05$ ; corteza obstruida tratada con rosuvastatina versus corteza obstruida,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ) y *hsp70* ( $1,12 \pm 0,1$  vs.  $0,20 \pm 0,01$ ; corteza obstruida tratada con rosuvastatina versus corteza obstruida,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ). De interés para nuestro conocimiento resultó la fuerte inducción de *hsp70* en la corteza control cuando esta fue tratada con rosuvastatina respecto al control.

#### **Estudio de la expresión de $p_{53}$**

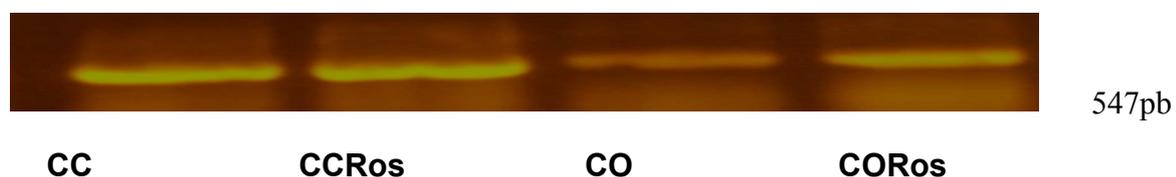
El análisis de los resultados demostró un marcado descenso en la expresión de  $p_{53}$  durante la injuria por nefropatía obstructiva ( $0,5 \pm 0,1$  vs.  $0,8 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ , corteza obstruida versus corteza control,  $n=5$ ). Por otro lado y similar al caso de *hsp70*,  $p_{53}$  experimentó un significativo incremento en su expresión con el uso de rosuvastatina, tanto en corteza control como en la obstruida ( $1,5 \pm 0,2$  vs.  $0,8 \pm 0,05$  y  $1,3 \pm 0,15$  vs.  $0,8 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ) respectivamente. Figura 6



**Figura 6:** Blot de típica expresión del mensajero de  $p_{53}$  durante la nefropatía obstructiva neonatal. Efecto de Ros

**Evaluación del promotor génico  $wt_1$  en obstrucción ureteral unilateral. Efecto de rosuvastatina**

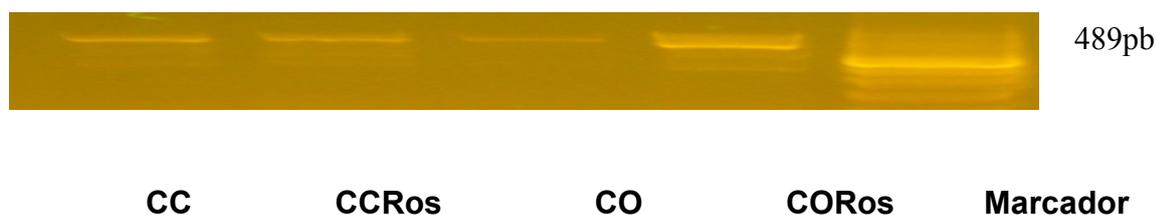
El normal desarrollo renal requiere la conversión de células del mesénquima mesodérmico en células epiteliales polarizadas, proceso modulado por  $wt_1$ . Resultados previos describen alteraciones del mismo asociadas a tumores, desórdenes metabólicos, inmunitarios, hipertensión y la propia obstrucción renal. Así, nuestros resultados actuales confirman un significativo descenso en la expresión del mensajero durante la nefropatía obstructiva respecto a los valores de corteza control neonatal ( $0,4 \pm 0,05$  vs.  $1,1 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ) respectivamente. Inéditamente, el tratamiento con rosuvastatina indujo de modo significativo su expresión en cortezas obstruidas ( $0,8 \pm 0,1$  vs.  $0,4 \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ , cortezas obstruidas tratadas versus cortezas obstruidas no tratadas con rosuvastatina,  $n=5$ ). Figura 7



**Figura 7:** Expresión de  $wt_1$  en nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas. Efecto de Ros

### Reguladores de fibrosis: *tnf-α* y *snail*

En la figura 8, se puede observar una sensible disminución en la expresión del mensajero de *snail* durante la obstrucción respecto a la corteza control ( $0,4 \pm 0,05$  vs.  $0,8 \pm 0,1$ ,  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). Por el contrario, las cortezas tratadas con rosuvastatina manifestaron un importante incremento en la expresión de *snail* en relación a las obstruidas no tratadas ( $1,2 \pm 0,1$  vs.  $0,4 \pm 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ) respectivamente.

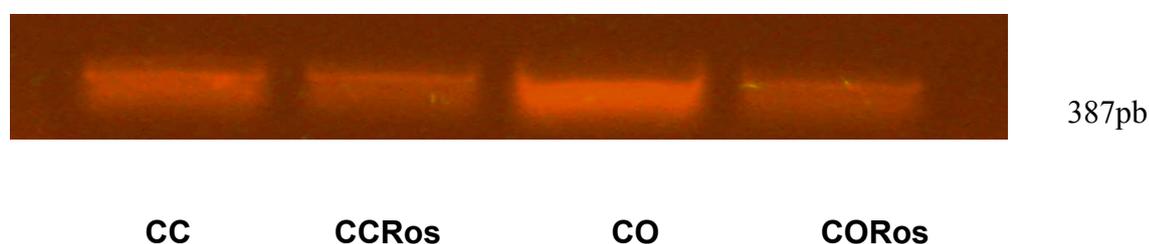


**Figura 8:** Expresión RT-PCR de *snail* durante La nefropatía obstructiva neonatal.

Efecto de Ros

Además, se describió una clara inducción de *tnf-α* en cortezas de ratas obstruidas en relación a los controles ( $1,34 \pm 0,15$  vs.  $0,7 \pm 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ) respectivamente. Sin embargo, una muy sensible disminución en la expresión de cortezas obstruidas, fue obtenida luego de recibir la rosuvastatina ( $0,5 \pm 0,1$  vs.  $1,34 \pm 0,15$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ).

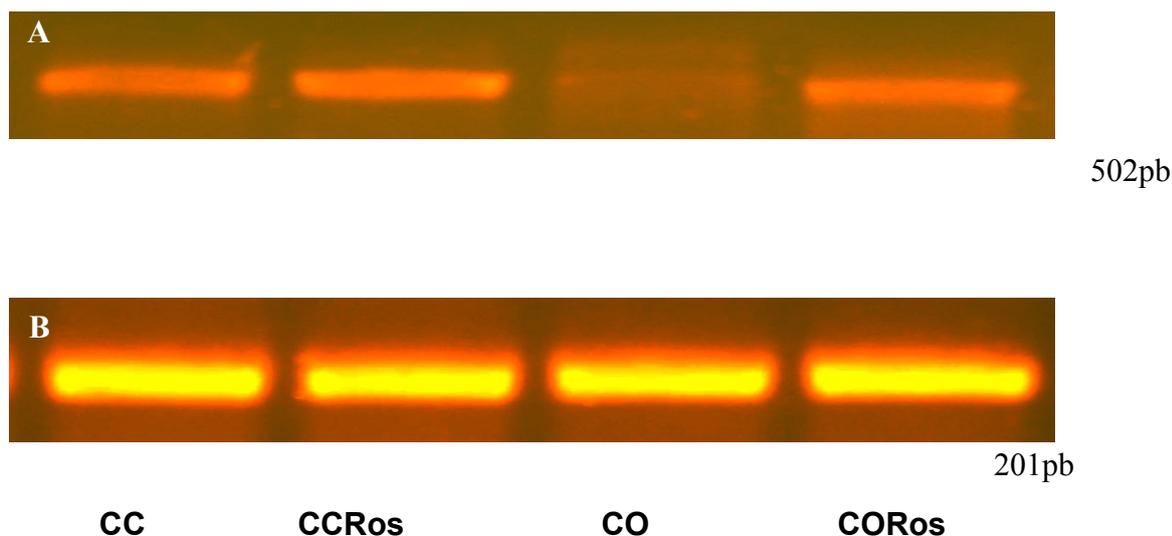
Figura 9



**Figura 9:** Típica expresión por RT-PCR de *tnf-α* en corteza de ratas neonatas sometidas a obstrucción ureteral unilateral. Efecto de Ros

### **Caderina E en nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas**

El riñón obstruido no expresó *caderina E*, mientras que se recupera la expresión en el tratado. Por su parte los controles también presentan aumento de la expresión con el uso de rosuvastatina ( $1,2 \pm 0,1$  vs.  $1 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ , corteza control tratada versus corteza control sin tratar,  $n=5$ ). Figura 10

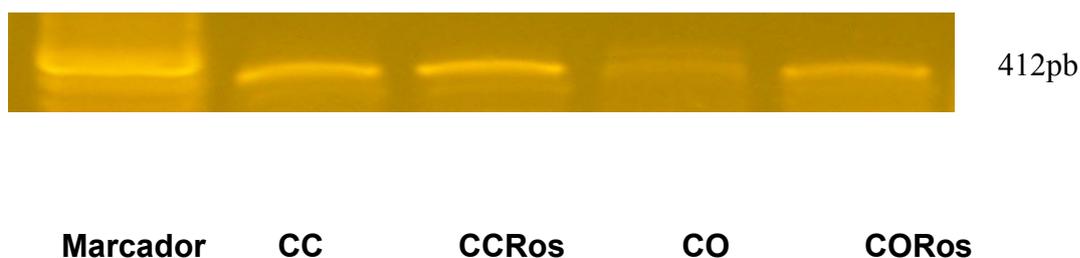


**Figura 10:** Expresión de *caderina E* en nefropatía obstructiva. Efecto de Ros

A: expresión del mensajero de *caderina E*, B: expresión de  $\beta$ -actina.

### **Expresión de *bmp7***

Finalmente, en la figura 11 se observa una significativa disminución en la expresión de *bmp7* en corteza renal de ratas neonatas obstruidas versus las controles ( $0,1 \pm 0,05$  vs.  $1 \pm 0,1$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=5$ ). Por el contrario, significativos incrementos fueron establecidos tanto en obstruidas como controles tratadas con rosuvastatina ( $0,5 \pm 0,1$  vs  $0,1 \pm 0,05$ ,  $p < 0,01$ , corteza obstruida tratada vs. corteza obstruida no tratada,  $n=5$ ).



**Figura 11:** Expresión de *bmp7* en nefropatía obstructiva. Efecto de Ros

### Discusión

Fibrosis intersticial y apoptosis son el común denominador de la enfermedad renal por nefropatía obstructiva. En donde, la fisiopatogenia involucra a la proliferación de fibroblastos, infiltrado de macrófagos, presencia de citocinas como TGF- $\beta$  y otros mediadores de inflamación. Las isoformas de TGF- $\beta$  son citocinas multifuncionales que juegan un rol central en la reparación de tejidos. La liberación y activación de TGF- $\beta$  estimula la producción de proteínas de matriz extracelular e inhibe su degradación. Estas acciones contribuyen a la reparación de tejidos, que en condiciones normales conducen a la restauración de la arquitectura normal del tejido y puede además involucrar un componente de fibrosis tisular. En muchos procesos patológicos, el exceso de TGF- $\beta$  conlleva a fibrosis tisular, lo que compromete la función normal del órgano [Branton and Kopp 1999].

Recientes estudios fueron realizados en ratas tratadas con rosuvastatina luego de haber sido uni-nefrectomizadas, utilizando a TGF- $\beta$  como marcador de progresión de la enfermedad, tomándolo como un mediador clave de la fibrosis [Kramer S. et al 2008]. Los resultados de nuestro trabajo contribuyen con estos antecedentes puesto que, rosuvastatina disminuyó la expresión de *tgf- $\beta$* . Por otro lado, TGF- $\beta$  tiene un rol complementario con TNF- $\alpha$  en la fibrogenesis [Yoshifumi et al 2008].

El TNF- $\alpha$  es uno de los denominados receptores de muerte celular que mediarían la vía extrínseca de muerte celular y cuya función es participar en la defensa del organismo ante infecciones y agresiones externas. Por lo tanto, participa en los procesos normales relacionados con la inflamación. El mecanismo de acción de los fármacos que intentan frenar la inflamación se basa en el bloqueo de dicha sustancia inflamatoria para que se atenúe este proceso y disminuya el daño. En tal sentido, nuestros resultados demuestran claramente el incremento de *tnf- $\alpha$*  durante la nefropatía obstructiva neonatal como consecuencia del proceso nefrogénico. En tanto que rosuvastatina disminuyó su expresión.

Por otro lado, la activación patológica en ratas adultas del gen *snail*, necesario durante el desarrollo embrionario del riñón, es suficiente para producir fibrosis. La expresión de *snail* aparece concomitante con la transición epitelio mesenquimal sufrida en el riñón tras la obstrucción ureteral unilateral que causa fibrosis renal [Sato y col., 2003]. TGF- $\beta$  es un inductor de fibrosis renal y conocido inductor de *snail*, que a su vez resulta ser inhibido por la proteína formadora de hueso 7 (BMP7), atribuyéndosele a esta última cierta capacidad de reversión de fibrosis renal. Es interesante el hallazgo de nuestros resultados en ratas neonatas relacionados a *snail* donde describimos una sensible disminución durante la nefropatía lo que podría intentar explicar alteraciones en el desarrollo funcional normal del órgano. Por otro lado, rosuvastatina contribuyó a incrementar esta expresión lo que podría contribuir con la función de Snail hacia el final del desarrollo renal.

BMP<sub>7</sub> es también requerida durante la embriogénesis para el desarrollo normal del esqueleto, ojos y riñones. La expresión de *bmp<sub>7</sub>* continúa en el riñón adulto y se discute que se requiere en el mesénquima metanéfrico para el desarrollo continuo del túbulo epitelial, y que además decrece en respuesta a la injuria [revisado en Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005; United States Patent Application 20020173453, Method of

treating renal injury]. Nuestros resultados establecen que *bmp7* sufrió una muy significativa disminución en su expresión durante la injuria obstructiva haciéndose casi indetectable. Por su parte y apoyando el rol citoprotector de rosuvastatina en obstrucción durante la nefrogénesis, *bmp7* recuperó su nivel de expresión.

Por otro lado y en relación al modelo de obstrucción, se ha demostrado la importancia del óxido nítrico en la circulación cortical manteniendo un adecuado flujo plasmático renal en animales tratados con angiotensina II [Chin y col., 1998]. El óxido nítrico (ON) es sintetizado desde tres isoformas enzimáticas siendo la inducible (ONSi) la que contribuye con mayores niveles.

La formación de grandes cantidades de ON por tiempo prolongado, le confiere al gas actividad citotóxica. No obstante, la elevada producción de ON inicialmente es orientada a la protección contra la infección, por otro lado, el efecto supresor en la producción de linfocitos y el daño a la célula huésped confieren al ON una función dual protectora / destructiva [Kin et al, 1999].

Los resultados de este trabajo establecieron una significativa disminución en la expresión del mensajero de la enzima ONSi en el riñón obstruido, lo que podría condicionar una menor disponibilidad de ON en el sistema. Además, previamente ha sido demostrado que el ON desempeña un rol antiapoptótico y antifibrótico en la OUU [Hegarty et al. 2001]. Al respecto, resultados publicados en nuestro laboratorio demostraron que el ON endógeno y la expresión de ONSi estaban disminuidas durante la obstrucción ureteral unilateral neonatal, y fue asociado a la vía de señalización mitocondrial a través del incremento en el ratio *bax* / *bcl-2* y la subsecuente actividad de la caspasa 3 [Manucha and Vallés 2008]. La inactivación de las caspasas directa o indirectamente mediada por el ON, lograría reducir la degradación de  $Bcl_2$  incrementando la concentración de su proteína. Por lo tanto, y a

través de un mecanismo indirecto, el ON podría prevenir la liberación del citocromo c, frenando la peligrosa activación de las caspasas por esta vía [Manucha W. 2008].

El ON puede oxidar el glutatión intracelular y modificar los niveles de antioxidantes dentro de la célula, resultando en estrés oxidativo. Esta acción estimula la inducción de las proteínas de shock térmico Hsp<sub>32</sub> y Hsp<sub>70</sub>. La Hsp<sub>70</sub> juega roles esenciales como chaperonas moleculares bajo condiciones normales o de estrés, facilitando el plegamiento de proteínas nacientes, resolubilizando agregados de proteínas que han sido formados y asistiendo en el reensamblaje de proteínas desnaturalizadas [Xu Q. et al 1997].

La acumulación de proteínas mal ensambladas produce la movilización de las Hsp<sub>70</sub>s resultando en un pool libre de Hsp<sub>70</sub> y consecuentemente el cese de la regulación negativa sobre el Hsf que se hallaba unido a Hsps tanto constitutivas como inducibles. El Hsf<sub>1</sub> liberado es fosforilado y se ensambla en trímeros adquiriendo actividad de unión al ADN y aumentando la cantidad de ARNm de Hsp<sub>70</sub> [Xu Q. et al 1997]. En nuestro trabajo, la expresión incrementada de ONSi con el uso de rosuvastatina que condicionaría una mayor biodisponibilidad de ON, se correspondió con el incremento de *hsf*<sub>1</sub>, cuyo producto proteico actuaría como factor de transcripción modulando la expresión de *hsp*<sub>70</sub>.

Recientemente, ha sido identificado un gen que parece ser el principal determinante del inicio en la secuencia de transformación mesenquimal a epitelial. Se trata de un gen que se identificó ausente o mutado en el cáncer de células embrionarias renales [tumor de Wilms o *wt*<sub>1</sub>]. Existe evidencia de que WT-1 puede estar directamente implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular.

El gen *wt*<sub>1</sub> codifica un producto génico supresor de tumores que es expresado en el riñón en desarrollo y en el sistema urogenital adulto.

La expresión de *wt<sub>1</sub>* ocurre relativamente temprano en el tumor de Wilms. Además, ha sido postulado que es requerido para promover la transcripción de genes que proveen ventajas de supervivencia a las células tumorales. Wt1 estimula positivamente al promotor de *bcl-2* por medio de una interacción directa [Mayo M. et al 1999].

Bcl-2 es una familia de proteínas anti-apoptóticas formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular.

Los resultados del presente trabajo confirman en nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas una sensible disminución en la expresión por RT-PCR de *wt<sub>1</sub>*, siendo la relación *bax / bcl-2* significativamente superior en el caso del riñón obstruido. Interesantemente, rosuvastatina incrementó la expresión de *wt1* condicionando un decremento del ratio *bax / bcl-2*, lo que permitiría sugerir desde la probable regulación de *wt1* su rol citoprotector. Esto nos permitiría postular además, que el uso de rosuvastatina en nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas podría inducir a la conversión de células del mesénquima mesodérmico en células epiteliales polarizadas, revirtiendo en cierta medida la fibrosis producida por la obstrucción. Futuros experimentos deberían ser conducidos a fin de investigar esta hipótesis.

Además se ha sugerido que WT1 estabiliza P<sub>53</sub> y modula la muerte celular interactuando en forma directa con P<sub>53</sub> e inhibiendo la muerte celular mediada por P<sub>53</sub>, pero no afecta el arresto celular [Maheswaran et al. 1995].

Hsf<sub>1</sub> permite el ingreso de P<sub>53</sub> al núcleo, de modo tal que una disminución en la expresión de Hsf<sub>1</sub> podría regular negativamente la función de P<sub>53</sub>. Así, los efectos que producen WT1 y Hsf<sub>1</sub> sobre P<sub>53</sub> serían opuestos y/o complementarios.

La apoptosis modulada por el ON puede ser resultado de daño en el ADN. P<sub>53</sub> detecta este tipo de daño y actúa como factor de transcripción de p<sub>21</sub> y media el arresto

celular en respuesta a genotóxicos, si el daño en el ADN persiste, P<sub>53</sub> conduce a la célula hacia la apoptosis [Li et al 2007]. Sin embargo, P<sub>53</sub> puede ayudar en la reparación de células dañadas mediante la inducción de p<sub>27</sub>, con el subsecuente descenso en la fosforilación de pRb [Freedman and Folkman 2004].

Por otro lado, existe evidencia de que P<sub>53</sub> inhibe la acetilación de las histonas del promotor de *caderina E* disminuyendo así su expresión [Fan et al 2005].

La activación de las RhoGTPasas es un paso clave en TEM de las células tubulares renales, lo cuál contribuye con la fibrosis intersticial. Ha sido postulado que las estatinas inhiben la síntesis de isoprenoides que son esenciales para la actividad biológica de las proteínas de señalización, RhoGTPasas (RhoA y Rac1). Así las estatinas resultan en una reducción de la activación de Rho y Rac1, de los marcadores de fibroblastos y en la preservación de la expresión de los marcadores de células epiteliales, *caderina E* y citoqueratina 19.

Finalmente y a pesar de que farmacológicamente las estatinas funcionan como drogas hipolipemiantes, no obstante, el uso de rosuvastatina a razón de 10 mg/Kg por día no produjo una reducción lipídica significativa en ratas neonatas, sugiriendo que la reducción en la injuria vascular y tubulointersticial se asociaría a un mecanismo diferente al de la inhibición de la síntesis de colesterol [Patel S. et al 2006]. Al respecto, nuestro laboratorio demostró que durante la obstrucción disminuye la expresión de *caderina E* con respecto a los controles, lo cual puede asociarse a una pérdida en la adhesión celular y consecuente transición epitelio mesenquimal. Con el tratamiento de rosuvastatina se observó una reversión de la inhibición de *caderina E*, incluso colocando su nivel de expresión por encima de los controles.

## **Conclusión**

Rosuvastatina modularía la respuesta apoptótica y oxidativa propia de la nefropatía obstructiva contribuyendo a la protección del túbulo intersticio renal durante la OUU

experimental en ratas neonatas. El análisis de los resultados de nuestro laboratorio y las consideraciones de otras investigaciones nos permiten sugerir que la protección renal que ejerce rosuvastatina durante nefropatía obstructiva experimental en ratas neonatas estaría asociada a la interacción entre la respuesta al shock térmico y la biodisponibilidad de ON con el concomitante descenso en genes pro-apoptóticos.

Este trabajo ha sido realizado por la Licenciada Luciana Mazzei, como Tesina Final para la Licenciatura en Genética de la Universidad Nacional de Misiones. Fue dirigido por el Dr. Walter Manucha y realizado en la Universidad Nacional de Cuyo.

## Referencias bibliográficas

- 1- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 132 (2005): 3151-61
- 2- Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes infect* 1(1999):1349-65.
- 3- Chevalier RL. Obstructive nephropathy and the developing kidney: Too little or too much angiotensin? *Kidney Int.* , 65 (2004): 1517–1518
- 4- Chin SY, Wang CT, Majid DSA, Navar LG. Renoprotective effects of nitric oxide in angiotensin II-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol*. 274 (1998): 876-882.
- 5- Fan H, Harrell JR, Dipp S, Saifudeen Z, El-Dahr SS. A novel pathological role of p53 in kidney development revealed by gene-environment interactions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288 (2005): F98-107.
- 6- Freedman DA, Folkman J. Maintenance of G1 checkpoint controls in telomerase-immortalized endothelial cells. *Cell Cycle*. 3 (2004):811-6.
- 7- Gianella A, Nobili E, Abbate M, Zoja C, Gelosa P, Mussoni L, Bellosa S, Canavesi M, Rottoli D, Guerrini U, Brioschi M, Banfi C, Tremoli E, Remuzzi G, Sironi L. Rosuvastatin treatment prevents progressive kidney inflammation and fibrosis in stroke-prone rats. *Am J Pathol*. 170 (2007): 1165-77.
- 8- Hegarty NJ, Young LS, Kirwan CN, O'Neill AJ, Bouchier-Hayes DM, Sweeney P, Watson RW, Fitzpatrick JM. Nitric oxide in unilateral ureteral obstruction: effect on regional renal blood flow. *Kidney Int*. 59(2001):1059-65
- 9- Kin Y, Bombeck Ch, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research*, 84 (1999):253-256.
- 10- Klahr S, Harris KPG, Purkerson ML. Effects of obstruction on renal function. *Pediatric Nephrol*. 2 (1988): 34-42.

- 11- Li KL, Du XL, Song RH, Zhao L, He YN, Zhang JG, Chen L. Effect of p53 on the variation of renal tubular epithelial cells after kidney ischemia/reperfusion injury. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 23 (2007):6-10
- 12- Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev*. 9(1995):2143-56.
- 13- Manucha W., Vallés P. Cytoprotective role of nitric oxide associated with HSP70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 18 (2008): 204-215.
- 14- Mayo Marty W, Wang Cun-Yu, Scott S. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl2 proto-oncogene. *The EMBO journal*. 18 (1999): 3990-4003
- 15- Patel S, Mason RM, Suzuki J, Imaizumi A, Kamimura T, Zhang Z. Inhibitory effect of statins on renal epithelial-to-mesenchymal transition. *Am J Nephrol*. 26 (2006):381-7.
- 16- Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest*. 112 (2003): 1486-94
- 17- Vallés P, Merlo V, Berón W, Manucha W. Recovery of distal nephron enzyme activity after release of unilateral ureteral obstruction. *J. Urol*. 161 (1999): 641-648.
- 18- Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest*. 100(1997): 1089-97
- 19- Yoshifumi Morimoto, Zhibo Gai, Hiroyuki Tanishima, Motohisa Kawakatsu, Shunji Itoh, Ikuji Hatamura and Yasuteru Muragaki. TNF- $\alpha$  deficiency accelerates renal

tubular interstitial fibrosis in the late stage of ureteral obstruction. *Exp Mol Pathol.* 85  
(2008): 207-13