



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PAPEL DE LA ALDOSTERONA EN LA INSUFICIENCIA RENAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. EN C. KATY ALEJANDRA SÁNCHEZ POZOS

DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA ROBLES, FACULTAD DE MEDICINA
DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. Enero, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAPEL DE LA ALDOSTERONA EN LA INSUFICIENCIA RENAL

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval en el en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias y Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Cristina Fernández Mejía	IIB, UNAM
Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval	IIB, UNAM

A la Q.F.B. Rosalba Pérez Villalva por su asesoría técnica y colaboración experimental.

Al Biól. Cristino Cruz Rivera por su asesoría técnica y colaboración experimental.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos por su asesoría técnica en las técnicas de biología molecular.

La realización de este proyecto fue apoyado por CONACYT (101030 y 112780) y por PAPIIT (IN-200909-3 e IN203412-3). Para la realización de la presente tesis de doctorado me fue otorgada una beca por CONACYT.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. León David Islas Suárez	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Mara Medeiros Domingo	Hospital Infantil de México, UNAM
Vocal	Dra. Carmen Aceves Velasco	INB, UNAM
Secretario	Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt	IIB, UNAM

A mis padres y a mi esposo

Agradecimientos

Agradezco a mis padres el apoyo que me han brindado todo este tiempo, porque me enseñaron a ser perseverante y a luchar por mis objetivos, me enseñaron a no rendirme. A mi madre siempre tan fuerte y a mi padre siempre constante.

Agradezco a mi esposo Dante Brito por estar a mi lado, y darme ánimo con sus palabras. Por su amor y cariño que me ayudaron a terminar este trabajo, porque fue mi empuje durante momentos difíciles.

Agradezco a mi hermano y a mi hermana, por todo su amor y sus consejos.

A la Dra. Bobadilla por la paciencia y lo aprendido en este tiempo, en realidad aprendí mucho, no sólo de ciencia sino de la vida.

Al Dr. Gamba por permitirme formar parte de su grupo y por lo aprendido también.

Por supuesto tengo que agradecer de manera especial al licenciado en Investigación Biomédica Jonatan Barrera Chímal, a la Q.F.B. Rosalba Pérez Villalva y la M. en C. Roxana Romo, ya que sin ellos esto no hubiera sido posible.

Al Biól. Cristino Cruz quien me brindó su ayuda y sus enseñanzas en el laboratorio desde mi entrada al laboratorio.

Al M. en C. José Luis Ventura quien no sólo me ayudó en las técnicas, sino que me dio buenos consejos de vida.

A todos los que forman parte del laboratorio de la Dra. Bobadilla y del Dr. Gamba, quienes me brindaron su apoyo durante esta trayectoria.

En especial a todos mis amigos que estuvieron ahí todo el tiempo jalándome las orejas y echándome porras: Consuelo Plata, César Cortés, Rafael Valdéz, Caro Ariza, Paty Juárez, Pedro San Cristóbal, Hebe Chagoya, Adriana Hernández, José Coria, Dr. Miguel Campomanes, Dra. Ana Calderón, Dr. Reynerio Fagundo, Luz Camacho, Edgar Medina, Bernardo Luna, Fátima García.

Índice

	Página
Resumen	I
1. Introducción	1
1.1 Anatomía y Fisiología del Riñón	1
1.1.1 La Nefrona	2
1.2 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)	4
1.2.1 Sistema Local Renina-Angiotensina	7
1.3 Aldosterona	10
1.3.1 Regulación de la Secreción de Aldosterona	11
1.3.2 Receptores a Mineralocorticoides	13
1.3.2.1 Antagonistas de los Receptores a Mineralocorticoides	14
1.3.3 Acciones No genómicas de la Aldosterona	16
1.3.4 Aldosterona en la regulación de factores vasoactivos	17
1.3.4.1 Óxido Nítrico	17
1.3.4.2 Endotelina-1	19
1.3.4.3 Cinasa Rho (Rock-1)	21
1.3.5 Aldosterona como mediadora de daño	22
1.3.6 La Aldosterona como mediadora de daño cardiovascular	24
1.3.7 La Aldosterona como mediadora del daño renal	25
1.3.7.1 Fisiopatología de la lesión renal aguda	26
1.3.7.2 La aldosterona y su papel en el daño por Isquemia/Reperusión (I/R)	28
2. Hipótesis	35
3. Objetivos	36
3.1 Objetivos específicos	36
4. Material y Métodos	37
4.1 Protocolo experimental	37

4.1.1 Inducción del daño por I/R	37
4.2 Estudios funcionales	38
4.3 Estudios fisiológicos y bioquímicos	39
4.3.1 Niveles de Hsp72	39
4.3.2 Lipoperoxidación renal	39
4.3.3 Peróxido de hidrógeno urinario	40
4.3.4 Niveles de endotelina-1 en tejido	40
4.4 Estudios histológicos	41
4.5 Estudios moleculares	41
4.5.1 Western blot	42
4.6 Análisis estadístico	42
5. Resultados	43
5.1 Parámetros fisiológicos	43
5.2 Estudios histológicos	45
5.3 Estudios bioquímicos	48
5.4 Estudios moleculares	49
6. Discusión	54
7. Conclusiones	60
8. Bibliografía	61

Abreviaturas

ACTH	Hormona corticotropa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Angio II	Angiotensina II
ANOVA	Análisis de varianza
ANP	Péptido natriurético auricular
ARTS	Estudio de Tolerabilidad a un Antagonista de los Receptores a Mineralocorticoides
BH4	Tetrahidrobiopterina
CLM	Cadena ligera de miosina
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CsA	Ciclosporina
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ECE	Enzima convertidora de endotelina
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
ERH	Elementos de respuesta a hormonas
ENaC	Canal epitelial de sodio
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK 1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ET	Endotelina
FCLM	Fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina
FSR	Flujo sanguíneo renal
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPR30	Receptor acoplado a proteínas G de 7 dominios transmembrana
Hsp72	Proteína de choque término 72 (Heat shock protein 72)
Hsp90	Proteína de choque término 90 (Heat shock protein 90)
ICAM-1	Molécula de adhesión celular intercelular
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IP ₃	Trifosfato inositol
I/R	Isquemia reperfusión
JNK	Cinasas c-Jun-NH ₂ terminal
LRA	Lesión renal aguda
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Quimiocina atrayente de monocitos-1
MDA	Malondialdehido
MYPT-1	Subunidad de la fosfatasa de miosina
NAG	N-acetil-beta glucosaminidasa
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal

NCC	Cotransportador sodio-cloro
NO	Óxido nítrico
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno-1
PAS	Tinción de ácido peryódico de Schiff
PCLM	Cadena ligera de miosina fosforilada
RANTES	Quimioquinas reguladas al activarse, expresadas y secretadas por células T normales
RM	Receptor a mineralocorticoide
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
ROMK	Canal de potasio de la porción externa de la médula renal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
Sp	Espironolactona
TAM	Presión arterial media
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TGF	Tasa de filtración glomerular
TGF- β 1	Factor transformante- β 1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular

Resumen

Antecedentes: La lesión renal aguda es un síndrome que se caracteriza por una caída transitoria del flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona disfunción renal y daño tubular severo. La morbilidad y mortalidad por daño renal agudo no se ha modificado en las últimas cuatro décadas. En un estudio realizado en nuestro laboratorio demostramos que la administración profiláctica de espironolactona (Sp) (antagonista de los receptores a mineralocorticoides) previene el daño renal inducido por isquemia/reperfusión (I/R), lo que sugiere que la aldosterona es un mediador clave en el daño funcional y estructural que se presenta durante el daño renal agudo. Diversos grupos han demostrado que el daño por lesión renal aguda se debe a una vasoconstricción sostenida, probablemente ocasionada por el aumento en la producción de moléculas vasoactivas como endotelina, angiotensina II y la cinasa Rho.

Hipótesis: El bloqueo de los receptores a mineralocorticoides con espironolactona después de haber producido el insulto por I/R puede prevenir el daño, y es posible que esta protección esté asociada con la disminución de la expresión de moléculas relacionadas con la producción vasoconstricción como endotelina, la cinasa Rho y angiotensina II.

Objetivo: Evaluar si el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides con espironolactona puede prevenir el daño renal una vez que se ha producido el insulto por I/R.

Material y métodos: Se estudiaron seis grupos de seis ratas Wistar cada uno. 1) Sham (S); 2) grupo al que se le produjo isquemia bilateral por 20 min; 4) grupo tratado con Sp inmediatamente después de la isquemia (20 mg/kg) (Sp0); 5) ratas que recibieron Sp 3 h después de producir la isquemia (Sp3); 6) animales tratados con Sp 6 h después de la isquemia (Sp6) y finalmente, 7) el grupo al que se le administró Sp 9 h después de haber producido el insulto. Después de 24 h de reperfusión se evaluaron la presión arterial media (TAM), el flujo sanguíneo renal (FSR), se determinó la tasa de filtración glomerular (TGF) y los niveles renales de malondialdehído (MDA). Se evaluó la excreción urinaria de proteínas (UProtV) y mediante tinción de PAS (tinción de ácido peryódico de Schiff) se cuantificó el número de cilindros por campo. Para los estudios moleculares se extrajo RNA a partir de uno de los riñones. Se realizó RT-PCR y PCR en tiempo real para determinar los niveles de RNAm de Kim-1, de la cinasa Rho, de preproendotelina, del receptor de endotelina-1 ETA,

de angiotensinógeno y del receptor tipo I de angiotensina II AT₁. Se llevó a cabo western blot para evaluar la expresión proteica de la cinasa Rho, de los receptores de endotelina-1 ETA y ETB y del receptor tipo I de angiotensina II AT₁, moléculas que pudieran estar involucradas en este tipo de daño.

Resultados: La administración de Sp inmediatamente después de haber producido el daño y a las 3 h previene el daño renal agudo por I/R, a las 6 h la protección es menor y a las 9 h ya no hay protección. Esto se refleja en la preservación de la TGF y del FSR en los animales tratados con Sp oportunamente. Asimismo, los animales que recibieron Sp inmediatamente después y a las 3 h de haberles inducido la isquemia presentaron niveles significativamente bajos de marcadores de daño tubular (proteinuria, Kim-1 y Hsp72) con respecto al grupo con I/R. La renoprotección conferida por Sp se atribuyó a que ésta fue capaz de disminuir los niveles de estrés oxidante de manera significativa en los animales que fueron tratados inmediatamente después y a las 3 h del insulto. El daño por I/R ocasionó también un aumento en la expresión de la cinasa Rho, de endotelina-1 y sus receptores, así como del receptor AT₁ de angiotensina II. Dicho aumento se previno con la administración de Sp inmediatamente después de haber producido la isquemia, a las 3 h y de manera parcial a las 6 h.

Conclusiones: Por lo tanto, la aldosterona pudiera estar ejerciendo sus acciones a través de la regulación de moléculas involucradas en la producción de vasoconstricción tales como endotelina-1, la cinasa Rho y el receptor AT₁ de angiotensina II. Lo anterior sugiere a la aldosterona como parte clave en la regulación del tono vascular. Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides es una estrategia útil para prevenir la lesión renal aguda, no sólo cuando se administra antes de inducir el daño renal, sino también después de que éste ha ocurrido.

1. Introducción

1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL RIÑÓN

Los riñones son órganos pares localizados en la pared posterior del abdomen fuera de la cavidad peritoneal, cada riñón pesa 150 g y cuentan con una longitud de 11 cm de largo y de 5 cm de ancho¹.

Al realizar un corte longitudinal del riñón se observan dos regiones, una exterior denominada corteza y una interior, conocida como médula; ésta última se encuentra subdividida en regiones estriadas cónicas que dan origen a las pirámides renales. La base de cada pirámide se encuentra localizada en el extremo corticomedular extendiéndose en la pelvis renal hacia la papila. El borde exterior de la pelvis se divide en los cálices mayores que se extienden y dividen en los cálices menores, los cuales colectan la orina de los túbulos de cada papila. Las paredes de los cálices, pelvis y uréteres, se contraen para impulsar la orina hacia la vejiga².

Los riñones reciben un flujo sanguíneo de aproximadamente 22% del gasto cardiaco (1100 mL/min). La irrigación de los riñones es a través de una compleja red de vasos sanguíneos, ésta empieza por la arteria renal que nace directamente de la aorta abdominal y se extiende hacia el riñón, entra a través del hilio renal y se ramifica para formar las arterias interlobares, las cuales a su vez se dividen en las arterias arcuatas, arteriolas interlobulares, arteriolas aferentes y finalmente éstas se bifurcan en los capilares glomerulares. Los extremos distales de los capilares de cada glomérulo convergen para formar la arteriola eferente, la cual se ramifica en una segunda red capilar, los capilares peritubulares que rodean a los túbulos renales. Los capilares peritubulares desembocan en los vasos sanguíneos venosos, que corren en paralelo con las arteriolas para formar las venas interlobulares, venas arcuatas, venas interlobares y finalmente convergen en la vena renal que se encuentra al lado de la arteria renal (Figura 1)³.

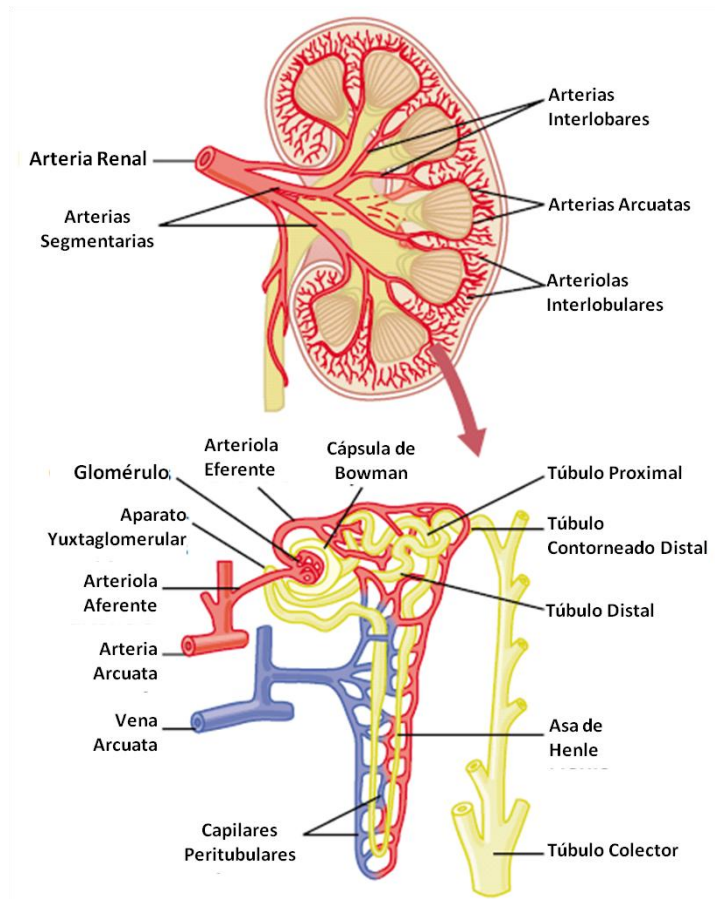


FIGURA 1. RED DE VASOS SANGUÍNEOS QUE IRRIGAN EL RIÑÓN Y PARTES QUE CONFORMAN A UNA NEFRONA³.

1.1.1 LA NEFRONA

La nefrona es la unidad morfo-funcional del riñón, cada riñón está formado por un millón de nefronas. Cada nefrona se encuentra formada por: el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal, el túbulo colector y un sistema colector. El glomérulo está constituido por los capilares glomerulares, por una región central de células mesangiales que sirve de soporte a éstos, por células viscerales epiteliales y por la cápsula de Bowman; y su conformación lo hace responsable del ultrafiltrado sanguíneo. El túbulo proximal comienza en el polo tubular del glomérulo, es el segmento más largo de la nefrona y en conjunto, ocupa la mayor parte de la corteza; se encuentra involucrado en la reabsorción de macromoléculas como glucosa, sodio, bicarbonato, cloruro, potasio, calcio, fosfato, agua, así como en el catabolismo de algunos aminoácidos. Aproximadamente el 65% del ultrafiltrado es reabsorbido en el túbulo proximal. El segmento siguiente al túbulo proximal es el asa de Henle, conformada por la porción delgada y la porción gruesa, cerca de la cual

se encuentra la mácula densa. El asa de Henle es permeable a agua, urea y cloruro de sodio, lo que permite que se mantenga la hipertonicidad del intersticio medular. El túbulo distal se encuentra próximo a este segmento y se extiende hasta el punto de la corteza en donde dos o más nefronas se juntan para formar el conducto colector donde se lleva a cabo la secreción de potasio junto con la reabsorción de sodio, proceso regulado por la aldosterona^{2,4}.

Una de las funciones más importantes de los riñones es la excreción de productos metabólicos y sustancias extrañas, que se lleva a cabo por medio de la filtración del flujo sanguíneo. El glomérulo es el responsable de la filtración, proceso que realiza a través de la barrera de filtración glomerular, la cual se encuentra conformada por el endotelio fenestrado, la membrana basal glomerular y los podocitos. La filtración glomerular depende de la interacción de diversos factores, los cuales incluyen las presiones hidrostática y oncótica, los mecanismos de retroalimentación del sistema renina-angiotensina y por supuesto la estructura de las paredes capilares y de la cápsula de Bowman. El control de la filtración se lleva a cabo por medio de cambios en la resistencia de la arteriola aferente y eferente, que son reguladas por la secreción de compuestos provenientes de diferentes estímulos, entre los que se encuentran estímulos nerviosos y estímulos provenientes de células epiteliales y de células endoteliales. Otro de los factores involucrados en la regulación de la filtración glomerular es la secreción de renina en la macula densa, la cual se lleva a cabo en presencia de hipoperfusión, hipovolemia o bajas concentraciones de sodio. La secreción de renina induce la producción de aldosterona y angiotensina II, ésta última es un potente vasoconstrictor^{5,6}. Asimismo, el óxido nítrico, parece estar involucrado en la retroalimentación túbuloglomerular y por lo tanto, en el mantenimiento del tono vascular y como consecuencia en la regulación de la filtración glomerular⁷.

Los riñones también se encargan de la regulación de la osmolalidad y volumen de los fluidos corporales mediante la reabsorción y excreción de sodio y agua en los túbulos renales. Los túbulos controlan el volumen, la osmolalidad, la composición y el pH de los fluidos extra e intracelulares. Para llevar a cabo esta función, el elemento clave es la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, por lo que la absorción de cada sustancia está ligada al funcionamiento de dicha bomba².

La regulación del equilibrio ácido-base también es realizada por los riñones contrarrestando el efecto de álcalis y ácidos producidos por el metabolismo de ciertos alimentos en el cuerpo, a través del sistema $\text{CO}_2/\text{HCO}^{3-}$, el cual también es regulado por los pulmones².

1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)

Los riñones cuentan con un sistema complejo conocido como el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) que les permite regular la presión arterial, el volumen extracelular y el equilibrio hidroelectrolítico (Figura 2). El SRAA lleva a cabo estas funciones a través de la regulación del tono vascular, de la transmisión simpática y de la respuesta a daño e inflamación³.

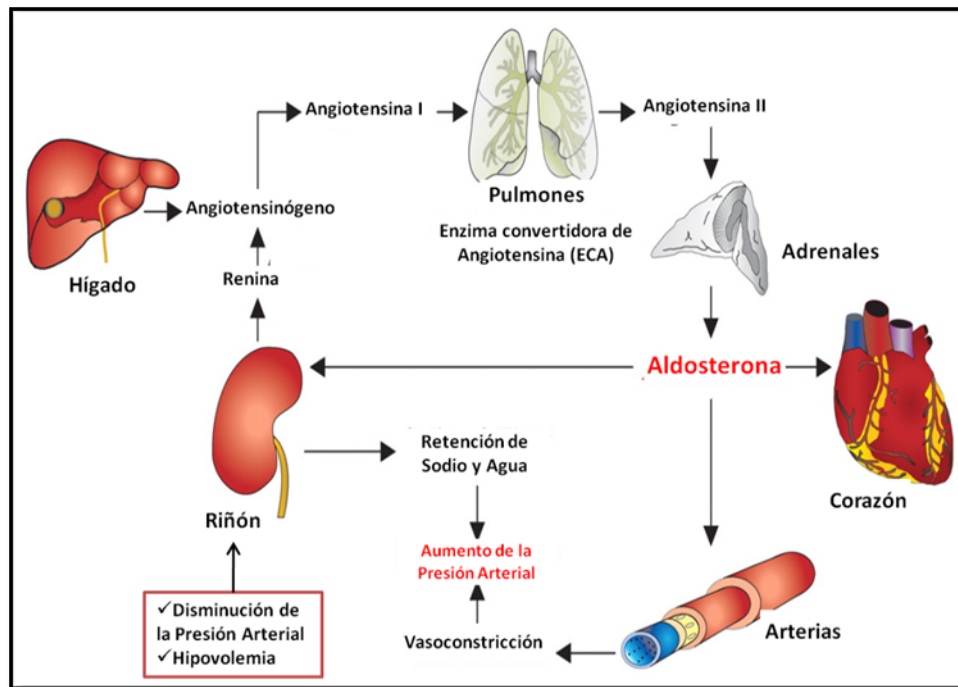


FIGURA 2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA CLÁSICO

Los principales estímulos fisiológicos que activan al SRAA son la reducción de la presión arterial, la hipovolemia y/o un aumento en los niveles de potasio sérico. La renina, enzima limitante para la activación del SRAA, es una aspartil proteasa que se sintetiza y almacena en las células yuxtaglomerulares del riñón (células de músculo liso que se encuentran en las arteriolas aferentes) y tiene funciones tanto de hormona como de proteasa⁸. La renina es

sintetizada inicialmente como pre-prorenina, ésta última es transportada al retículo endoplásmico, durante el transporte el péptido señal de la pre-prorenina es escindido, quedando como producto la prorenina, la cual es dirigida hacia el Aparato de Golgi. En este organelo, la prorenina es glicosilada y liberada en vesículas que contienen además de la prorenina, catepsinas y convertasas. Finalmente, la prorenina se convierte en renina por la acción de la catepsina B principalmente y es liberada a la circulación a través de un proceso de exocitosis⁹. En diversos estudios se ha demostrado que la prorenina también es una molécula activa, y que ésta podría ejercer las mismas acciones que la renina¹⁰⁻¹². De esta manera, la renina y la prorenina son liberadas a la circulación sistémica en respuesta a cuatro estímulos principalmente: 1) a una disminución en el flujo sanguíneo renal (hipoperfusión), ocasionado por ejemplo por hemorragias o diuréticos; 2) estimulación de los receptores adrenérgicos β_1 ; 3) disminución del Na^+ plasmático sentido por la mácula densa (parte del aparato yuxtglomerular); y 4) factores humorales como dopamina, óxido nítrico, angiotensina II, prostaciclina, endotelina 1 y vasopresina¹³. La renina tiene un periodo de vida media en la circulación de 30 min a 1 h, periodo de tiempo en el que escinde al angiotensinógeno, glicoproteína β_2 plasmática sintetizada en el hígado, para producir angiotensina I, péptido de 10 aminoácidos. El angiotensinógeno producido en el hígado es la mayor fuente para la producción de los péptidos de angiotensina, sin embargo también puede ser producido por otros tejidos como el corazón, la vasculatura, el riñón y el tejido adiposo¹⁴. Por su parte, el decapeptido angiotensina I tiene propiedades vasoconstrictoras moderadas, aunque no suficientes como para modificar la presión arterial en forma significativa. La angiotensina I llega a los pulmones a través de la circulación, en donde la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), una glicoproteína de 180 KDa, hidroliza a la angiotensina I inactiva, dando como resultado un octapéptido, la angiotensina II¹⁵. La ECA existe en dos formas, una forma soluble y una forma ligada a la membrana. La mayor parte de la ECA se encuentra ligada a la membrana y está localizada en la membrana plasmática de las células endoteliales vasculares, las células epiteliales de borde en cepillo (células de túbulo proximal) y las células neuroepiteliales. La ECA no sólo es capaz de escindir a la angiotensina I en angiotensina II, sino también a la bradicinina, un vasodilatador activo. Por lo tanto, la ECA produce angiotensina II, potente vasoconstrictor y también es capaz de degradar a un vasodilatador importante, la bradicinina^{16,17}. La angiotensina II tiene

una vida media de uno a dos minutos, debido a la presencia de peptidasas denominadas angiotensinasas en la circulación que la degradan rápidamente a: des-aspartil angiotensina (Ang III), angiotensina (1-7), angiotensina (3-8) y/o angiotensina IV, sin embargo este lapso es suficiente para que la angiotensina II ejerza sus acciones. En condiciones normales la concentración de angiotensina II en plasma es de 10-60 pM, y estos niveles pueden elevarse hasta varios cientos de picomoles después de una hemorragia¹⁸. La angiotensina II tiene la propiedad de inducir vasoconstricción que le da la capacidad de regular la presión arterial, efecto que realiza a través de dos mecanismos, el primero consiste en la producción de vasoconstricción en la arteriola eferente y el segundo, es indirecto y lo logra mediante la disminución de la excreción de agua y de sal, al estimular la secreción de aldosterona, la cual se encarga de la reabsorción de sodio en el túbulo distal y colector como se explicará más adelante³.

La angiotensina II ejerce sus efectos a través de sus receptores AT₁ y AT₂. Ambos, son receptores transmembranales acoplados a proteínas G. Los receptores AT₁ se encuentran en tejido cardiovascular, neuronal, hepático, renal y adrenal y median todas las acciones fisiológicas de la angiotensina II. La unión de angiotensina II a los receptores AT₁ produce un cambio conformacional en el receptor, lo cual induce su unión a las proteínas G, lo que a su vez activa vías de señalización a través de sistemas efectores en la membrana plasmática como enzimas (fosfolipasa C, fosfolipasa D, fosfolipasa A₂, adenilato ciclasa) y canales iónicos (canales de calcio tipo L y tipo T)¹⁹. Las respuestas celulares desencadenadas a través de la activación de los receptores AT₁ involucran contracción muscular, esteroidogénesis adrenal, activación neuronal, neurosecreción, transporte iónico, proliferación y crecimiento celular. En el riñón particularmente, los receptores AT₁, están implicados en producir vasoconstricción de la arteriola aferente, incrementar la reabsorción de sodio tubular e inhibir la liberación de renina^{20,21}. La activación de los receptores AT₁ en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal estimula la biosíntesis y secreción de aldosterona, como se explicará más adelante con detalle. La estimulación de los receptores AT₁ en condiciones fisiopatológicas promueve hipertrofia vascular y cardíaca, vasoconstricción, aumento de la presión sanguínea y aumento de la contractilidad cardíaca; también se les ha

asociado con enfermedad crónica renal. Además, los receptores AT₁ median proliferación celular, procesos de inflamación y estrés oxidativo²²⁻²⁴.

Los receptores AT₂ se encuentran en páncreas, tejido cardiovascular, renal, adrenales, miometrio, ovarios, cerebro y vasculatura; su expresión es alta en tejidos fetales y disminuye de manera drástica después del nacimiento, sin embargo en el caso de que ocurra daño cardíaco, vascular u obstrucción renal la expresión de los receptores AT₂ aumenta²⁵. Las funciones de estos receptores no se conocen muy bien, pero se ha sugerido que podrían antagonizar las acciones de los receptores AT₁, inhibiendo el crecimiento celular e induciendo apoptosis y vasodilatación^{26,27}. Otros estudios sugieren su participación en inflamación e hipertrofia cardíaca, a través de la activación de proteínas fosfatasa y defosforilación de proteínas, regulación del sistema óxido nítrico-GMPc, estimulación de fosfolipasa A₂ y ceramidas derivadas de esfingolípidos^{28,29}.

1.2.1 SISTEMA LOCAL RENINA-ANGIOTENSINA

Recientemente se ha demostrado la presencia de los componentes del SRAA en otros tejidos, por lo que se ha sugerido que el SRAA pudiera ejercer acciones locales y paracrinas³⁰⁻³². Para poder afirmar que un tejido cuenta con un sistema renina angiotensina local, es necesario que en el tejido se encuentren todos los componentes necesarios para la biosíntesis de angiotensina, además de que la síntesis de ésta se lleve a cabo de manera local también³³.

Los primeros experimentos que demostraron la presencia de sistemas locales de renina angiotensina, fueron realizados en riñón, en estos estudios se demostró que el RNAm de la renina, el angiotensinógeno, la ECA, así como de los receptores de angiotensina se encontraban en sitios específicos en el riñón. De esta manera, se demostró que los receptores de angiotensina se encuentran en arteriolas renales, células mesangiales glomerulares y en las membranas apicales y basolaterales de las células tubulares proximales. El RNAm y la proteína de angiotensinógeno se han localizado en los túbulos proximales, sugiriendo que el angiotensinógeno es sustrato para la formación de la angiotensina I y II intersticial e intratubular³⁴⁻³⁶. De hecho existen estudios en donde se demuestra que el angiotensinógeno es secretado al lumen donde es escindido por la renina producida en los

túbulos proximales³⁷. Una vez que se produjo la angiotensina I, ésta es convertida a angiotensina II por la ECA localizada en el borde en cepillo de los túbulos proximales³⁸. Dado que los niveles de angiotensina II intrarenal son del orden de nanomoles, y debido a que los niveles de angiotensina II en el intersticio son 1,000 veces más altos que los presentes en plasma, se cree que la mayoría de la angiotensina II es formada en el riñón³⁹.

Inicialmente se pensaba que la renina sólo era producida por las células yuxtaglomerulares en el riñón, sin embargo ahora se sabe que la prorenina también es producida en glándulas adrenales, ovarios, testículos y en la retina de los ojos^{40,41}. El descubrimiento de un receptor para prorenina, hizo pensar que ésta pudiera tener un papel biológico, por lo que diversos grupos se dieron a la tarea de dilucidar las acciones de prorenina. Se demostró que prorenina y renina activan a las MAPK cinasas, a la cinasa p38 MAP, a TGF- β 1, PAI-1, COX-2, a la cinasa IP₃ y a fibronectina⁴²⁻⁴⁴.

Otro componente descubierto es la enzima ECA2, la cual es una de las responsables de la generación de angiotensina (1-7), además de la neprilisina y de la prolil-endopeptidasa. La ECA2 es una monocarboxipeptidasa que escinde un residuo o aminoácido del carboxi terminal de la angiotensina I para formar angiotensina (1-9), asimismo degrada a angiotensina II en angiotensina (1-7)⁴⁵⁻⁴⁷. De manera interesante, la angiotensina (1-9) es degradada por otras peptidasas incluyendo a la ECA para formar angiotensina (1-7) (Figura 3). Por lo tanto, la angiotensina (1-7) es producida por dos vías, y los niveles de ésta en plasma pueden ser tan altos y comparables con los niveles de angiotensina II. En la vasculatura no renal la angiotensina (1-7) ejerce efectos vasodilatadores a través del aumento en la producción de óxido nítrico, prostaglandinas o del factor hiperpolarizante endotelio-dependiente^{47, 48}. La expresión del péptido en miocardio está asociada con remodelación cardíaca, y se ha observado que en falla cardíaca los niveles de la angiotensina (1-7) están elevados al igual que los de la ECA⁴⁹. El receptor principal a través del cual la angiotensina (1-7) ejerce sus acciones es el receptor conocido como Mas, un receptor transmembranal acoplado a proteínas G, aunque también es capaz de unirse a los receptores de la angiotensina II, AT₁ y AT₂. El receptor Mas se ha encontrado en células mesangiales y en células de túbulo proximal^{50,51}.

En riñón el sistema ECA2/angiotensina (1-7)/Mas se ha asociado con la disminución en la presión arterial, dilatación de los vasos sanguíneos intrarrenales, aumento del flujo sanguíneo renal y de la filtración glomerular, inhibición del transporte tubular proximal e inducción de diuresis^{47,51}. Todo esto sugiere que las acciones de ECA2/angiotensina (1-7)/Mas se contraponen a las acciones de ECA/angiotensina II/AT₁. En apoyo a esto, estudios recientes han demostrado que la inhibición de la vía ECA2/angiotensina (1-7)/Mas produce un aumento en la presión arterial y daño renal agudo^{52,53}.

No cabe duda que muchos de estos hallazgos nos han esclarecido que la angiotensina II es capaz de ejercer tanto acciones vasoconstrictoras como vasodilatadoras, así como también es capaz de participar en la activación de proliferación celular e incluso regular la función del túbulo proximal cuando la angiotensina II es internalizada. Pero sobre todo, estos estudios nos revelan la importancia del SRAA tanto en las funciones fisiológicas como en las fisiopatológicas.

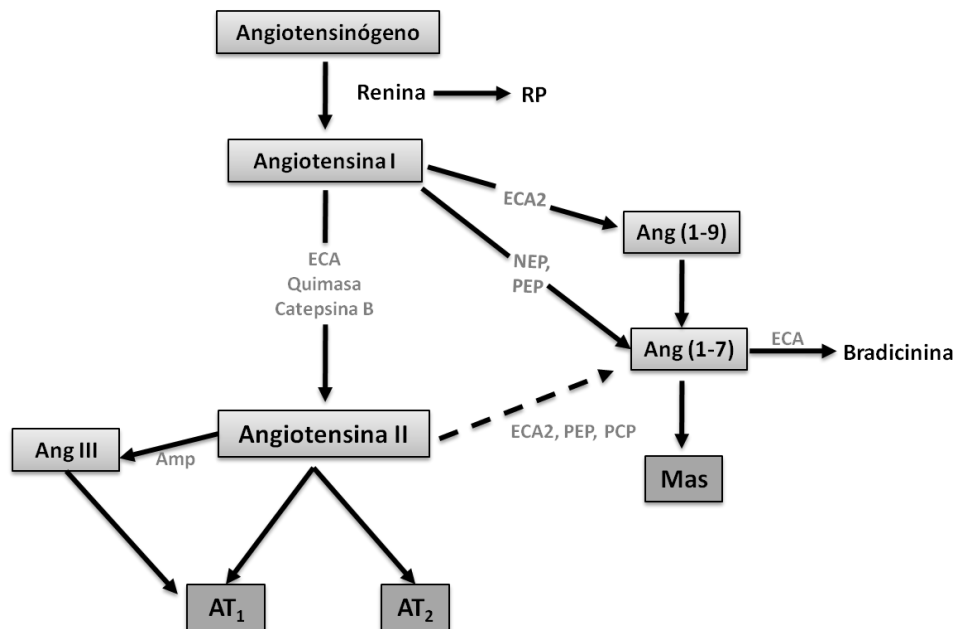


FIGURA 3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ACTUAL. ABBREVIACIONES: ECA, ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA; ANG, ANGIOTENSINA; NEP, NEPRISILINA; AMP, AMINOPEPTIDASA; PEP, PROLIL-ENDOPEPTIDASA; PCP, PROLIL-CARBOXIPEPTIDASA. MODIFICADO DE SANTOS RAS ET AL⁵⁴.

1.3 ALDOSTERONA

La aldosterona es una hormona esteroidea secretada en la corteza de la glándula adrenal. Su acción clásica es la regulación de electrolitos y el control de la presión sanguínea, mediante la absorción de sodio y la excreción de potasio en el riñón, acción que lleva a cabo a través de su unión a los receptores a mineralocorticoides (RM) que se encuentran en el túbulo distal y colector de la nefrona. Los RM son de tipo intracelular, y normalmente se encuentran en el citoplasma unidos a proteínas chaperonas entre las que se encuentran: la proteína de choque término 90 (hsp90) e indirectamente hsp70, así como las proteínas p23, p48, las inmunofilinas FKBP-51 y las ciclofilinas CYP40⁵⁵⁻⁵⁷. La naturaleza liposoluble de la aldosterona permite que ésta difunda libremente a través de la membrana celular, una vez en el citoplasma, la aldosterona produce la disociación del complejo formado por los RM y las proteínas de choque térmico, lo que produce la liberación del complejo RM-Hsp90. Una vez libre el complejo RM-Hsp90, la aldosterona se une a éste y el nuevo complejo (Aldosterona-RM-Hsp90) se transloca al núcleo para activar la transcripción de sus genes blanco (Figura 4). La especificidad de la aldosterona por su receptor es tejido-específica, y depende de la presencia de la enzima 11 β -HSD2, ya que dicha enzima es la responsable de la conversión de glucocorticoides a productos con menor afinidad por los RM, lo que evita que los glucocorticoides se unan a los RM. Los efectores finales de la acción de la aldosterona son el canal epitelial de sodio (ENaC), el cotransportador de Na⁺-Cl⁻ (NCC), la bomba Na⁺-K⁺ ATPasa y el canal de K⁺ (ROMK). Recientemente se ha demostrado que la aldosterona también actúa regulando la actividad del intercambiador Na⁺-H⁺ (NH3), así como a la cinasa inducible por glucocorticoides (Sgk-1) y al gen que codifica para endotelina-1 (end1)⁵⁸⁻⁶¹. La respuesta fisiológica que desencadena la aldosterona es efectiva varias horas después, sin embargo existen mecanismos celulares en la nefrona distal más inmediatos como se verá más adelante con detalle.

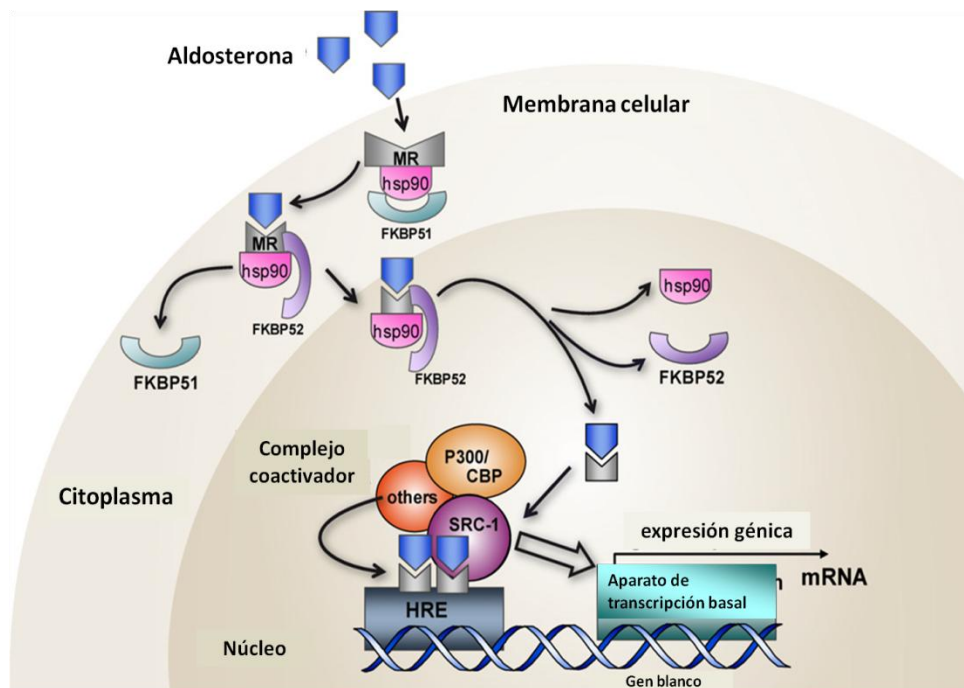


FIGURA 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ALDOSTERONA. HRE, ELEMENTOS DE RESPUESTA A HORMONAS⁷⁴.

1.3.1 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE ALDOSTERONA

La secreción de aldosterona aumenta durante un fenómeno de depleción crónico o agudo de sodio o pérdida de fluidos, postura y niveles de potasio en la dieta. Se han reportado una gran variedad de factores que estimulan la producción de aldosterona, sin embargo bajo condiciones fisiológicas la secreción de aldosterona se encuentra regulada principalmente por la angiotensina II, la hormona corticotropa (ACTH), la concentración plasmática de K^+ y el péptido natriurético auricular (ANP). Dentro de los estímulos reconocidos para la secreción de aldosterona se encuentran: la disminución de la presión de perfusión renal, el aumento en la concentración plasmática de K^+ y la disminución del volumen circulante efectivo (hipovolemia)^{62,63}.

La aldosterona es producida en la zona glomerulosa de la cápsula suprarrenal. La producción de esta hormona implica dos procesos: síntesis y secreción. La síntesis involucra a hidroxilasas y oxidasas que se encuentran distribuidas en el citoplasma, retículo endoplásmico y mitocondrias de la célula; es dependiente de Ca^{2+} , de cationes inorgánicos así como de Ca^{2+} orgánico. La secreción por su parte es dependiente de la síntesis de la hormona a partir de su molécula precursora el colesterol y de Ca^{2+} ^{64,65}.

Las acciones de Ca^{2+} en la esteroidogénesis son muchas, entre las principales se encuentran:

- a) produce un aumento en la actividad de la hidrolasa de éster de colesterol (enzima que desesterifica al colesterol para que éste sea liberado),
- b) estimula la liberación de colesterol del citoesqueleto a la membrana externa mitocondrial,
- c) incrementa la transferencia intramitocondrial de colesterol a la membrana interna,
- d) produce un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial y en la formación de NADPH dependiente de Ca^{2+} y,
- e) estimula la transcripción de CYP11B2, gen que codifica para la sintasa de aldosterona.

Dada la importancia de Ca^{2+} en la esteroideogénesis es lógico que la entrada de este ión a las células de la zona glomerulosa sea ideal para el control en la producción de aldosterona como a continuación se detallará⁶⁶⁻⁶⁸.

La angiotensina II estimula el aumento de la concentración de Ca^{2+} a través de su unión a los receptores AT_1 que se encuentran en células de la zona glomerulosa, produciendo un aumento en la frecuencia de oscilaciones del potencial de membrana que da como resultado un aumento en la internalización de Ca^{2+} . La respuesta eléctrica de las células de la zona glomerulosa al estímulo de angiotensina II está mediada por una serie de actividades coordinadas de conductancias de múltiples canales. Entre las principales actividades de las conductancias están la inhibición transitoria del canal de K^+ vía la activación de los receptores AT_1 , que produce una despolarización de la membrana y como consecuencia la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Las siguientes actividades involucran la restauración del potencial de membrana y el cierre de los canales de Ca^{2+} ⁶⁹. Otro mecanismo por el cual la angiotensina II produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} , es a través de estimular la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares sensibles a IP_3 , lo cual es acompañado también por la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular. Estas

acciones son ejercidas por la angiotensina II y están implicados en la formación de IP₃, en la inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto, estimulan la producción de aldosterona⁷⁰.

El K⁺ estimula la secreción de aldosterona a través de canales sensibles a potasio y de canales de voltaje dependiente de Ca²⁺^{69,71}. Aunque la angiotensina II y el K⁺ regulan la secreción de aldosterona de manera independiente, se conoce que actúan de manera sinérgica y las acciones de K⁺ no se ejercen si la angiotensina II no se encuentra presente. Una concentración reducida de angiotensina II evita una respuesta exagerada de la aldosterona por K⁺, así como una baja concentración de K⁺ evita una respuesta exagerada de la aldosterona por la angiotensina II⁶⁹.

1.3.2 RECEPTORES A MINERALOCORTICOIDES

Los RM son miembros de los receptores de hormonas esteroideas, subgrupo de la súper familia de receptores nucleares, que incluye a los receptores de glucocorticoides, de estrógenos, de progesterona y de andrógenos⁷². Los RM son los únicos receptores de hormonas esteroideas que pueden unirse a diferentes esteroides como los mineralocorticoides, los glucocorticoides y a progesterona⁷³. Aunque la aldosterona es el principal ligando de los RM, éstos también tienen gran afinidad por el cortisol, sin embargo la presencia de la enzima 11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que convierte el cortisol a cortisona, evita una sobre activación de los RM⁷⁴.

Los RM están conformados por una estructura que posee tres dominios, un dominio amino terminal que es importante para la transactivación a través del reclutamiento de coactivadores; un dominio central de unión al DNA, con capacidad de reclutar co-represores; y un dominio carboxilo terminal que determina la unión al ligando, el cual interactúa con proteínas chaperonas en ausencia de ligando y contiene residuos importantes para el reconocimiento y unión al DNA, así como para la homo y hetero-dimerización del receptor⁷⁵⁻⁷⁷.

La unión de los RM a proteínas chaperonas, los mantiene en una conformación de alta afinidad por su ligando y evita la activación no específica de estos receptores⁷⁸. Recientemente se demostró que se requiere la presencia de la proteína chaperona Hsp90

para la translocación del complejo aldosterona-RM, ya que en ausencia de Hsp90, el complejo es incapaz de translocarse al núcleo⁷⁹.

Una vez en el núcleo, los RM ejercen funciones de factores de transcripción, pues mediante sus dominios de unión al DNA se unen a los elementos de respuesta a hormonas (ERH) y es a través de este proceso que son capaces de regular genes como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), al gen de endotelina-1, además de los extensamente estudiados y mencionados anteriormente, como la sgk-1, ENaC, NCC y ROMK⁸⁰. Los RM se unen a los ERH en forma de homodímeros, sin embargo también pueden formar heterodímeros con los receptores a glucocorticoides, aunque no se sabe con exactitud el papel de dichos heterodímeros y los estudios realizados no han sido concluyentes debido a las discrepancias halladas.

La respuesta transcripcional de los RM es mediada por co-reguladores que implican tanto a co-represores como a co-activadores. Se han descrito 16 co-reguladores que interactúan con los RM, entre estos co-reguladores se encuentran: reguladores de la apoptosis, factores de elongación de la RNA polimerasa II, estimuladores de transactivación, por mencionar algunos. Asimismo, se ha demostrado en diversos estudios que las modificaciones post-transcripcionales pueden regular la señalización de los RM, mediante la alteración de las interacciones proteína-proteína⁷⁴.

Muchos grupos se han dado a la tarea de explorar los mecanismos y factores involucrados en las acciones de los RM cuando son activados por la aldosterona, pero a pesar de estos avances faltan muchas preguntas por esclarecer y esto puede ser debido a que la regulación de los RM es muy compleja.

1.3.2.1 ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES A MINERALOCORTICOIDES

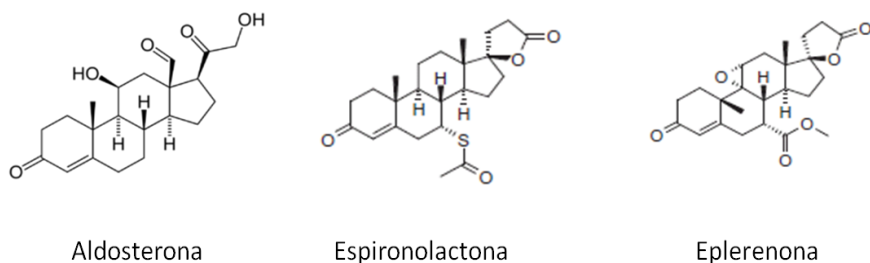
Los antagonistas de los RM se dividen en: los compuestos esteroideos y los compuestos no esteroideos. En la práctica clínica sólo se utilizan los compuestos esteroideos, ya que, los no esteroideos se encuentran en la fase preclínica o en desarrollo. Entre los compuestos esteroideos más estudiados se encuentran: la espironolactona, la eplerenona y la canrenona; mientras que entre los compuestos no esteroideos se encuentran: el BR-4628, PF-3882845 y el BAY 94-8862⁸¹. Este último compuesto ha pasado a la fase clínica II en pacientes con falla cardíaca y con enfermedad crónica renal, en un estudio denominado ARTS (Estudio de

tolerabilidad a un antagonista de los receptores a mineralocorticoides) y del cual se tienen grandes expectativas⁸².

Respecto a la espironolactona, éste es un antagonista de los RM conocido desde 1960, utilizado hoy en día principalmente como diurético en el manejo de edemas, en el tratamiento de aldosteronismo primario e hipertensión esencial. La espironolactona es un compuesto con mucha potencia para bloquear a los RM, sin embargo su selectividad no es exclusiva, pues posee también afinidad por los receptores de progesterona y de andrógenos, lo que ocasiona que tenga efectos adversos importantes como ginecomastia e hipercalcemia, entre los más importantes⁸³. La espironolactona tiene una vida media muy corta (1.3 a 1.4 h), no obstante es metabolizada en tres metabolitos activos, lo cuales poseen la actividad antagonista de los RM y que poseen una vida media mayor (entre 13 y 22 h). Entre estos metabolitos se encuentra la canrenona, que es el metabolito con mayor potencia. Los metabolitos activos son excretados por el riñón, aunque un porcentaje considerable también es excretado en las heces (35-41%)⁸⁴.

La eplerenona es un compuesto esteroideo, cuya estructura es muy similar al de espironolactona, la única diferencia es la sustitución del grupo α -tioacetilo por un grupo metoxi en el carbono 17. Ha sido clasificada como antagonista de los RM de segunda generación. Su selectividad por los RM es alta comparada con la de la espironolactona, ya que la modificación en su estructura evita que la eplerenona se una a receptores de progesterona o andrógenos, por lo cual no produce los efectos adversos observados en el tratamiento con espironolactona⁸⁵. La inconveniencia con eplerenona es que su potencia es baja, aunado a esto la vida media de los metabolitos activos es de 4 a 6 h. La eplerenona se metaboliza en el hígado y es eliminada a través del riñón (67%) y de las heces en menor proporción (32%)⁸⁶.

Ambos compuestos han sido extensamente estudiados y utilizados en diversas fisiopatologías, sin embargo, la espironolactona ha resultado tener mayores efectos benéficos comparados con eplerenona, además su bajo costo y su disponibilidad, la mantienen como el antagonista de RM más eficaz y costo/efectivo.



	Espironolactona	Eplerenona
Conversión a metabolitos	Si	No
Biodisponibilidad	80-90 %	67 %
Unión a proteínas plasmáticas	Albumina	α_1 -glicoproteína ácida
Excreción	Bilis, riñón	Riñón, tracto gastrointestinal
Vida media	Espironolactona: 1.4 h 7 α -metilespironolactona: 13.8 h Canrenona: 16.5 h	4 a 6 h
Dosis	Hipertensión: 50-100 mg/d Enfermedad crónica del corazón: 25-200 mg/d	Hipertensión: 50-100 mg/d Enfermedad crónica del corazón: 25-50 mg/d
Efectos secundarios	Hipercalemia, ginecomastia	Hipercalemia, intolerancia gastrointestinal

FIGURA 5. ESTRUCTURA DE ESPIRONOLACTONA Y EPLERENONA, CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS⁸⁷.

1.3.3 ACCIONES NO GENÓMICAS DE LA ALDOSTERONA

En la última década se ha demostrado que la aldosterona es capaz de ejercer acciones rápidas, denominadas acciones no genómicas ya que son independientes de la transcripción y de la traducción⁸⁸⁻⁹⁰. Estas acciones no genómicas de la aldosterona se producen en un lapso de segundos a minutos y se manifiestan por el aumento inmediato de los niveles de trifosfato inositol (IP₃) y del calcio intracelular. Estos efectos no son revertidos por los antagonistas de los RM⁹¹⁻⁹⁵. En este contexto, se ha observado que la adición de aldosterona a arterias mesentéricas y cerebrales induce una respuesta vasodilatadora rápida⁹⁶, mientras que, una respuesta opuesta se produce (vasoconstricción) cuando el endotelio es removido. Dentro de estas acciones rápidas mediadas por la aldosterona, se ha observado la activación de la vía de señalización de las cinasas reguladas por estímulos extracelulares (ERK1/2) en células de embrión humano y en células de músculo liso vascular^{88,97}. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales la aldosterona ejerce estas acciones, algunos autores han sugerido que se encuentran involucrados receptores de membrana como el receptor GPR30 (receptor acoplado a proteínas G de 7 dominios transmembrana)⁹⁷, mientras que otros sugieren que estas acciones también dependen de los RM^{91,98}. A este

respecto, Grossman *et al.*⁹⁸ mostraron que las acciones no genómicas son en parte mediadas por la unión de la aldosterona al dominio carboxilo del RM (dominio EF). Esta interacción produce una transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la membrana celular lo que a su vez induce la fosforilación y activación de ERK1/2. De acuerdo con esta observación, Min *et al.*⁹⁹, mostraron que la adición de la aldosterona a células de músculo liso vascular aumenta la proliferación celular y la actividad del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Los efectos no genómicos de la aldosterona también se han documentado en humanos. Schmidt *et al.*¹⁰⁰ reportaron que la infusión de aldosterona a 48 individuos sanos produjo un aumento significativo del flujo sanguíneo del antebrazo antes de que hubieran pasado 10 minutos del inicio de la infusión. Estos resultados no fueron reproducidos por Nietlispach *et al.*¹⁰¹, ya que la infusión de aldosterona no modificó el flujo sanguíneo del antebrazo en los ocho sujetos sanos que incluyeron, aunque sí observaron que la aldosterona aumentó la respuesta vasodilatadora a acetilcolina, la cual es dependiente de una mayor generación de óxido nítrico. En forma similar, se ha documentado que la infusión de aldosterona a 13 hombres sanos produjo un aumento del flujo sanguíneo renal y redujo la resistencia vascular renal, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas¹⁰². En estos estudios se demuestra que en condiciones normales, la aldosterona puede ejercer acciones rápidas que dependen de la integridad del endotelio y sugieren que en condiciones fisiopatológicas en donde exista daño endotelial, la aldosterona pueda ejercer efectos deletéreos a través de su acciones tanto genómicas como, no genómicas.

1.3.4 ALDOSTERONA EN LA REGULACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS

1.3.4.1 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un potente vasodilatador, sin embargo, no es el único responsable de la vasodilatación del músculo liso vascular, ya que existen otros factores vasodilatadores como la prostaciclina y la bradicinina. El NO es producido cuando L-arginina es transformada a L-citrulina por medio de la catálisis de la sintasa de NO (NOS)^{103,104}. Existen tres isoformas de la NOS, la NOS endotelial (eNOS), de expresión constitutiva principalmente en células endoteliales; la segunda isoforma es la NOS de tipo neuronal (nNOS), la cual es una enzima que se expresa en cerebro nervios periféricos y

riones; la tercera se refiere a la isoforma inducible (iNOS), cuya expresión es inducida principalmente en macrófagos en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos y citocinas¹⁰⁵.

Existen varios mecanismos a través de los cuales se regula la producción de NO, el primer mecanismo descrito tiene que ver con la biodisponibilidad de L-arginina, el precursor de NO. En varios estudios se ha demostrado que la suplementación con L-arginina mejora la disfunción endotelial en pacientes con hipercolesterolemia y en varios modelos animales^{106,107}. La biodisponibilidad de tetrahidrobiopterina (BH4), un cofactor en la síntesis de NO, también influye en la producción de NO, de tal manera que, cuando los niveles de éste cofactor son bajos, no se lleva a cabo el acoplamiento adecuado entre eNOS y L-arginina, produciéndose el anión superóxido (O_2^-)¹⁰⁸. Otro mecanismo importante es la interacción que ejerce con la proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) y con la caveolina, la primera ayuda a la activación de eNOS, mientras que la segunda propicia su inactivación¹⁰⁹. La actividad de eNOS es también regulada por su estado de fosforilación. A este respecto, se ha reportado que eNOS tiene al menos cinco sitios potenciales de fosforilación. La fosforilación en la serina 1177 y la serina 633 inducen la activación de la enzima, mientras que, la fosforilación de la treonina 495 disminuye la actividad de eNOS y disminuye por lo tanto la síntesis de NO¹¹⁰⁻¹¹².

Al respecto se han realizado estudios con células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano, en los que se demuestra que la exposición a aldosterona no solo disminuye de manera significativa la fosforilación de la serina 1177, sino que también produce un aumento en la producción de radicales libres, lo que trae como consecuencia una reducción en la biodisponibilidad de NO¹¹³. Asimismo, en otro estudio realizado en ratones transgénicos que expresan una forma fosfomimética de eNOS (S1179D) se observó que al producirles oclusión cerebral, estos ratones presentaban un mayor flujo sanguíneo cerebral comparado con los ratones silvestres, por lo que la modulación de la fosforilación de eNOS es un factor crucial en la función vascular y en el flujo sanguíneo en animales con isquemia cerebral¹¹⁴. En ratones knockout para eNOS a los que se les indujo diabetes por medio de la administración de estreptozotocina se observó un aumento en la presión sanguínea que se mejoró en forma transitoria con la administración de telmisartán (inhibidor del receptor AT_1 de angiotensina II) y enalapril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina). De

forma muy interesante también se encontró que el tratamiento con espironolactona, restableció la presión sanguínea y previno el daño renal¹¹⁵. En un estudio reciente en células del músculo liso de aorta, se demostró que la infusión de aldosterona inhibe a iNOS, lo que sugiere una acción directa de aldosterona en la síntesis de NO¹¹⁶. Todo esto apoya, a la participación de la aldosterona en el control del tono vascular a través de la regulación de la actividad de eNOS, sin embargo ahora también se conocen otros mecanismos involucrados, como lo son el incremento en endotelina-1, el estrés oxidante y la cinasa Rho.

1.3.4.2 ENDOTELINA-1

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoconstrictor de 21 aminoácidos que se encuentra en la circulación. Sus acciones son ejercidas prácticamente en toda la vasculatura y también en el riñón donde se encuentran los receptores para este péptido. Existen dos formas adicionales de endotelina, ET-2 y ET-3, no obstante, la isoforma sintetizada de manera predominante por la vasculatura es la ET-1^{107, 117}.

La ET-1 es liberada constitutivamente por las células endoteliales y ejerce su acción a través de la unión a sus receptores presentes en el músculo liso vascular¹¹⁸⁻¹²⁰. Además, la síntesis de ET-1 es regulada a nivel génico por factores pro-inflamatorios como el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las interleucinas, la insulina y la angiotensina II, el NO, la hipoxia y el "shear stress"^{118, 121, 122}. La ET-1 es sintetizada en su forma inactiva pre-pro ET-1, que es escindida a pro ET-1 y posteriormente a ET-1 por las enzimas convertidoras de endotelina (ECE-1 y ECE-2, respectivamente). Las acciones de ET-1 son ejercidas a través de sus receptores acoplados a proteínas G: el receptor ETA, que se encuentra en células del músculo liso, la vasculatura glomerular y la médula renal; y el receptor ETB presente en endotelio vascular y tejidos epiteliales como, los túbulos renales y colectores¹²³.

La función principal de la ET-1 a través de su receptor ETA, es el control del tono vascular por medio de la generación de vasoconstricción y la retención de sodio. También se conoce que la activación del receptor ETA produce una elevación de la presión sanguínea. La función del receptor ETB es más compleja, ya que puede tener papeles duales en el control del tono vascular dependiendo de su localización, de tal manera que si su activación se lleva a cabo en las células del músculo liso, producirá vasoconstricción, mientras que si se

activa el receptor ETB localizado en endotelio se produce vasodilatación que es mediada por la liberación de NO¹²⁴⁻¹²⁶.

Como se mencionó anteriormente, el efecto vasoconstrictor de la ET-1 también lo ejerce regulando la síntesis de NO, ya que se ha observado que la ET-1 inhibe la producción de NO y viceversa^{127,128}. La infusión de ET-1 de manera intravenosa produce al inicio hipotensión, como resultado de una disminución de la resistencia vascular, seguida de una fase de elevación prolongada de la presión sanguínea, acompañada de un aumento en la resistencia vascular y de una disminución en la producción de NO¹²⁹. Asimismo, la ET-1 es capaz de inhibir el efecto vasodilatador inducido por los receptores β -adrenérgicos y por la activación de la proteína cinasa C¹³⁰. La ET-1 también es capaz de estimular a otros vasoconstrictores como, la norepinefrina o la serotonina, contribuyendo así a una mayor vasoconstricción^{120,131}. Es interesante mencionar que aún falta por dilucidar el papel específico de cada uno de los receptores de la ET-1, tarea que no ha sido fácil, debido a que diversos estudios han sugerido que ciertas patologías, como hipertensión pulmonar y enfermedad renal se asocian con cambios en la expresión de los receptores de endotelina¹³². No obstante, es a través de sus receptores que la ET-1 participa en el control y mantenimiento del tono vascular y que la regulación de los efectos de ET-1 puede ser tejido específica y dependiente de la integridad del endotelio.

Debido a que la ET-1 es capaz de inhibir el transporte de sodio en el epitelio de túbulos colectores¹³³, varios investigadores han inferido una posible relación entre la aldosterona y la ET-1. Stow *et al.*¹³⁴ demostraron de manera contundente que la aldosterona regula al gen que codifica para la ET-1. En este estudio se observó que la exposición de células aisladas del túbulo colector a la aldosterona produjo un aumento en la síntesis de endotelina, acción que fue mediada a través de los RM. Un estudio realizado por Nguyen *et al.*¹³⁵ apoya esta observación, ya que demostraron que los ratones que sobre-expresan el RM exclusivamente en las células endoteliales en forma condicional, presentan una respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores aumentada, lo que además se acompañó de un incremento en la presión sanguínea y en los niveles sanguíneos de endotelina, independientemente de la homeostasis Na⁺/K⁺ y de la activación del sistema-renina-angiotensina. Este efecto se previno con la administración de canrenoato, inhibidor de los RM. Todos estos estudios señalan que la

aldosterona puede contribuir al control del tono vascular, mediante la regulación de la expresión y la liberación de endotelina-1.

1.3.4.3 CINASA RHO (ROCK-1)

La cinasa Rho es una proteína que se encuentra implicada en procesos de generación de contractilidad y motilidad celular que conducen a la adhesión focal y a la formación de los miofilamentos celulares del citoesqueleto. Existen dos isoformas de la cinasa Rho, ROCK-I y ROCK-II también conocidas como cinasas rho β y α , respectivamente¹³⁶. La cinasa Rho ejerce su función cuando es activada por una proteína G pequeña, denominada Rho A, proceso mediado por los receptores de proteínas G. Una de las funciones de la cinasa Rho es mediar contracción del músculo liso. Esta acción la efectúa por dos mecanismos: 1) por su capacidad de fosforilar a la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (p-PCLM), lo que resulta en la desactivación de esta fosfatasa, manteniendo así a las cadenas ligeras de miosina fosforiladas y unidas a la actina y 2) por medio de la fosforilación directa de la cadena ligera de miosina, aumentando así la contracción del músculo liso vascular^{137,138}. La cinasa Rho también se ha involucrado en mediar los efectos vasculares de ciertos factores vasoactivos como la angiotensina II, la serotonina, la trombina, la endotelina-1 y la norepinefrina^{139,140}.

De forma interesante, se ha observado que la inhibición de la cinasa Rho con fasudil reduce el daño renal (proteinuria, glomeruloesclerosis y fibrosis túbulo-intersticial) en modelos de enfermedad renal como: hipertensión, isquemia/reperfusión y por la infusión de aldosterona¹⁴¹⁻¹⁴⁴. También se ha descrito, que la cinasa Rho fosforila a eNOS en la treonina 495, lo que da como resultado, que eNOS se encuentre en su forma inactiva con la consecuente menor producción de NO, efecto que es revertido por el tratamiento con fasudil¹⁴³. En este sentido, hemos mostrado que el daño renal inducido por isquemia/reperfusión se asocia con un incremento de los niveles de la cinasa Rho, efecto que es revertido cuando los animales son adrenalectomizados¹⁴⁵. Esto sugiere que la aldosterona también regula la expresión de la cinasa Rho. En apoyo a esta hipótesis, se ha documentado que la exposición de cultivos de células de músculo liso vascular a aldosterona aumenta la fosforilación de la subunidad de la fosfatasa de miosina (MYPT-1), que es un indicador de la actividad de cinasa Rho¹⁴⁴. Lo que además se acompañó con mayor migración celular y remodelación del citoesqueleto. Además, en cardiomiocitos de rata se observó que la

estimulación con aldosterona producía un aumento en los niveles de endotelina-1 y una mayor fosforilación y actividad de la cinasa Rho¹⁴⁶. También se ha demostrado en pacientes con hipertensión arterial sistémica la participación de la aldosterona en la regulación de la actividad de la cinasa Rho. A este respecto, Fujimura *et al.*¹⁴⁷ recientemente mostraron que el tratamiento con eplerenona durante cuatro años produjo una reducción de la presión arterial de los individuos hipertensos, lo que se asoció con una menor actividad de la cinasa Rho, de forma interesante se encontró que estos dos efectos no se observaron cuando se utilizaron otros tratamientos anti-hipertensivos. En otros estudios se ha reportado que el bloqueo de los RM en pacientes con enfermedad renal crónica produce un efecto renoprotector adicional al disminuir la proteinuria con respecto a los pacientes que están recibiendo otros fármacos anti-hipertensivos¹⁴⁸⁻¹⁵¹, solo quedaría por investigar si este efecto benéfico se asocia con una menor actividad de la cinasa Rho. Estos estudios en conjunto sugieren, la posible interrelación entre la cinasa Rho y la aldosterona en un contexto fisiopatológico.

1.3.5 ALDOSTERONA COMO MEDIADORA DE DAÑO

No se conocen completamente los mecanismos por medio de los cuales la aldosterona ejerce sus acciones deletéreas, pero se ha sugerido la participación de citocinas proinflamatorias como osteopontina y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), una mayor producción de estrés oxidante mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de MAPK cinasas, de la cinasa Rho, de TGF- β 1, del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y del factor inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1)¹⁵²⁻¹⁵⁷.

En un estudio realizado en ratas a las que se le infundió aldosterona de manera crónica se observó un incremento en el estrés oxidante renal determinado mediante TBARS, así como un aumento de la actividad de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), de las c-Jun-NH2 terminal cinasas (JNK) y de las grandes MAPK-1(BMK1). La administración de eplerenona previno el desarrollo de hipertensión y de la proteinuria, asimismo evitó el incremento del estrés oxidante y el aumento de la actividad de ERK1/2, de JNK y de BMK1. Este estudio sugiere que la aldosterona podría ejercer sus efectos deletéreos a través de la generación de ROS y de la activación de MAPK cinasas¹⁵³.

Se ha propuesto a la aldosterona como una hormona profibrótica, esto es debido a sus acciones en la regulación de la fibrosis renal. Uno de los mecanismos involucrados en este proceso es a través del aumento del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1). Huang *et al.*¹⁵⁷ demostraron en cultivos de células mesangiales y de fibroblastos que la adición de aldosterona aumentó la producción de PAI-1 e inhibió la degradación de la matriz extracelular. La presencia de TGF- β 1 en el medio de cultivo produjo un efecto aditivo al ejercido por la aldosterona que se caracterizó por una mayor acumulación de matriz extracelular. El bloqueo de los RM con espironolactona evitó por completo el aumento de PAI-1 y de la acumulación de matriz extracelular. En cambio, la adición de un anticuerpo contra TGF- β 1, solo disminuyó en forma parcial la acumulación de matriz extracelular. Esto sugiere que la aldosterona podría estar ejerciendo sus funciones a través de un aumento en la producción de PAI-1 y posiblemente a través de la inhibición de metaloproteasas, con lo cual contribuye al desarrollo y progresión de la fibrosis renal.

Leopold *et al.*¹⁵⁸ demostraron *in vitro* e *in vivo* que uno de los mecanismos mediante los cuales la aldosterona ejerce acciones deletéreas es a través de la disminución de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual es una enzima clave en la generación de NADPH reducido, el cual a su vez mantiene los niveles de glutatión reducido, y el balance en el estrés oxidante. Este balance es de gran importancia en la preservación de la biodisponibilidad de los niveles de óxido nítrico y por lo tanto de la función vascular. En este estudio Leopold *et al.* demostraron que la aldosterona disminuye la actividad y la expresión de la G6PDH en ratones a los que se les infundió aldosterona por medio de bombas miniosmóticas. Estos efectos se previnieron con el bloqueo de los RM con espironolactona, por lo que ellos sugieren que la aldosterona juega un papel importante en el equilibrio redox y en la función vascular.

En un estudio realizado en ratas uninefrectomizadas a las que se les infundió aldosterona por medio de bombas miniosmóticas, se observó que la administración de fasudil, un inhibidor de la cinasa Rho, disminuía la proteinuria, la fibrosis túbulo-intersticial, así como la expresión de TGF- β , efectos adversos producidos por aldosterona, por lo que, se sugirió la participación de esta cinasa en el daño mediado por aldosterona¹⁴¹.

1.3.6 LA ALDOSTERONA COMO MEDIADORA DE DAÑO CARDIOVASCULAR

El primer estudio que demuestra la participación de la aldosterona en el desarrollo de daño, fue realizado por Selye¹⁵⁹ hace más de 50 años. En dicho estudio Selye demostró que la administración exógena de mineralocorticoides junto con dieta alta en sal provocaba hipertensión e inflamación vascular en el corazón, el riñón, el cerebro, el páncreas y en las arterias mesentéricas de ratas. Se ha sugerido tanto en humanos como en modelos animales que la aldosterona podría estar implicada en la progresión del daño cardiovascular a través de efectos pro-inflamatorios y pro-fibróticos^{160,161}. Basados en estas evidencias Pitt *et al.*^{162,163} llevaron a cabo dos estudios clínicos de gran importancia: el estudio RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study) y el estudio EPHEsus (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study); en donde se demostró que la administración de espironolactona y eplerenona, respectivamente, reducía la incidencia de infarto, mortalidad y la morbilidad de pacientes con insuficiencia cardíaca severa, lo que sugería un papel importante de la aldosterona en el desarrollo y progresión del daño cardiovascular. En apoyo a estos hallazgos en un estudio publicado por Beiguy *et al.*¹⁶⁴ se demostró una correlación positiva entre la elevación de los niveles plasmáticos de aldosterona con la insuficiencia cardíaca, así como con fibrilación ventricular en pacientes con infarto agudo al miocardio. Lo cual corrobora una vez más el papel de la aldosterona como posible mediadora del daño cardiovascular.

En otro trabajo Rocha *et al.*¹⁶⁵ demostraron que la infusión continua de aldosterona por medio de bombas miniosmóticas en ratas uninefrectomizadas producía inicialmente inflamación que progresaba a daño vascular y daño al miocardio. En este mismo estudio, el bloqueo de las acciones de aldosterona por medio de eplerenona disminuyó la inflamación y mejoró el daño vascular y miocárdico. Siguiendo la misma línea, Rocha *et al.*¹⁶⁶ publicaron otro estudio realizado en ratas Wistar a las que administraron angiotensina II por medio de bombas miniosmóticas. Rocha *et al.*¹⁶⁶ observaron, como era de esperarse, que la infusión de angiotensina II produjo elevación de la presión arterial, hipertrofia cardíaca y daño vascular; de manera interesante estos efectos se previnieron cuando los animales fueron adrenalectomizados (ausencia de aldosterona). El efecto cardioprotector de la adrenalectomía se revirtió cuando se infundió aldosterona por medio de bombas

miniosmóticas. Estos dos estudios arrojan resultados muy interesantes, que confirman la participación de aldosterona en el daño cardiovascular, principalmente a través de efectos pro-inflamatorios y pro-fibróticos.

El bloqueo de los RM después de haber inducido daño cardiovascular también previene los efectos deletéreos de la aldosterona. Este hecho se demostró en un modelo animal de infarto agudo al miocardio, en el que a ratas después de realizarles ligación transitoria de la arteria se les administró eplerenona. En este estudio se observó que la administración de eplerenona mejoró la disfunción endotelial, que se asoció con una reducción del estrés oxidante, lo que sugiere que la acción de la aldosterona en el daño cardiovascular está mediada por sus RM¹⁶⁷.

1.3.7 LA ALDOSTERONA COMO MEDIADORA DEL DAÑO RENAL

El estudio pionero que demostró que la aldosterona participa en la fisiopatología de la enfermedad renal, fue realizado en 1996 por el grupo de Thomas Hostetter, quienes al utilizar el modelo clásico de progresión de daño renal, el de nefrectomía de 5/6 en la rata, demostraron que el uso combinado de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (enalapril) y el bloqueo de los receptores AT₁ de angiotensina (losartan) reducía, la proteinuria y el porcentaje de glomeruloesclerosis¹⁶⁸. Este efecto renoprotector del enalapril y losartan, no se observaba cuando se restablecían los niveles de aldosterona al mismo nivel que el grupo no tratado. Estos resultados demostraron claramente que el daño renal en este modelo era mediado en gran parte por aldosterona y no por angiotensina II¹⁶⁸.

En otro estudio realizado por Rocha *et al.*¹⁶⁹ en ratas espontáneamente hipertensas a las que se les administró captopril junto con una infusión de aldosterona de manera crónica, se observó que el grupo de animales no tratados desarrolló proteinuria acompañada de lesiones en arteriolas y en glomérulo (nefroesclerosis), estas lesiones se evitaron con la administración de captopril. Al igual que en el estudio de Greene *et al.*¹⁶⁸, la infusión crónica de aldosterona revirtió los efectos protectores de captopril, produciendo daño y proteinuria similares a los observados en las ratas hipertensas sin tratamiento. Lo cual alude a la aldosterona como mediadora del daño por nefroesclerosis independiente de los efectos en la presión arterial.

En un estudio más reciente realizado en ratas uninefrectomizadas con dieta alta en sal se demostró que la infusión crónica de aldosterona indujo hipertensión acompañada de proteinuria severa y daño a podocitos. En cambio, el tratamiento con eplerenona disminuyó el estrés oxidante, la proteinuria y el daño podocitario¹⁷⁰. Esto también se ha demostrado también en modelos de glomerulosclerosis debida a hipertensión^{171,172}. Lo anterior sugiere que la aldosterona juega un papel importante en el desarrollo y progresión del daño podocitario, el cual es mediado a través de sus RM.

Varios estudios han relacionado también a la aldosterona con el daño observado en nefropatía diabética. A este respecto en un estudio realizado en pacientes con nefropatía diabética, se observó que la administración de espironolactona disminuyó de manera significativa la proteinuria, lo cual además de proporcionar una herramienta terapéutica útil, sugiere una participación importante de la aldosterona en el daño observado por nefropatía diabética¹⁷³. También Guo *et al.*¹⁷⁴ evaluaron el efecto del bloqueo a RM en dos modelos de diabetes, el tipo 1 y el tipo 2, el primero inducido por la administración de estreptozotocina a ratas Wistar uninefrectomizadas y el segundo por el uso de ratones db/db. En ambos modelos se observó el desarrollo de albuminuria y el desarrollo de hipertrofia glomerular, expansión mesangial y daño tubulointersticial, cambios que se asociaron con un aumento en la expresión de los RM y de TGF- β 1. En cambio la administración de eplerenona, redujo de manera significativa el daño renal observado en estos modelos de nefropatía diabética.

1.3.7.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN RENAL AGUDA

La lesión renal aguda (LRA) es un síndrome que se desarrolla después de una caída transitoria en el flujo sanguíneo renal, lo que ocasiona disfunción renal y daño tubular severo, siendo éste último proporcional al periodo de isquemia¹⁷⁵.

Los mecanismos involucrados en la progresión del daño en la LRA incluyen efectos vasculares y tubulares¹⁷⁶. Las anomalías vasculares se atribuyen a daño en el endotelio, el cual responde de manera diferente que en condiciones normales. Se ha demostrado que una vez producido el daño en el endotelio renal las pequeñas arteriolas producen mayor vasoconstricción en respuesta a un aumento de sustancias vasoconstrictoras como son endotelina-1, angiotensina II, tromboxano A2 prostaglandina H2, leucotrienos C4 y D4 y adenosina¹⁷⁷⁻¹⁸⁰, que son generadas como resultado de un aumento en la adhesión de

leucocitos al endotelio y de la activación de dichos leucocitos. También se sabe que la vasoconstricción se exagera debido a una disminución en la producción de NO y otras sustancias vasodilatadoras, a lo cual debe sumársele la presencia de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32, todo esto trae como consecuencia que los efectos sean más aumentados en las arteriolas, dando como resultado una pérdida en el balance de sustancias vasoactivas que ocasiona una vasoconstricción e hipoxia medular persistentes, lo que compromete la microcirculación y la circulación renal, sobre todo en la médula externa^{181,182}.

La disfunción tubular se da cuando se ha establecido el daño por LRA y ésta implica la activación del sistema de retroalimentación túbuloglomerular, cambios estructurales, la obstrucción tubular y el escape del ultrafiltrado (difusión del filtrado glomerular al intersticio renal)^{175,183}. Cabe mencionar que especialmente el segmento S3 del túbulo proximal, es el más susceptible al daño por isquemia debido a su limitada capacidad de tener metabolismo anaeróbico en condiciones de tensión baja de oxígeno¹⁸⁴.

La activación en el sistema de retroalimentación túbulo-glomerular se da debido a una disminución en la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, esto ocasiona un aumento en la liberación de cloruro de sodio, lo que da como resultado que la mácula densa sense más soluto liberado a la nefrona distal, que produce mayor vasoconstricción en las arteriolas preglomerulares y por lo tanto una disminución en las fuerzas glomerulares para la filtración¹⁸⁵.

Los cambios estructurales incluyen pérdida de la polaridad celular, pérdida del borde en cepillo, formación de cilindros, obstrucción tubular y ruptura de las uniones intercelulares. La pérdida de la polaridad se da como resultado de la translocación de la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa y de las β -integrinas de la membrana basolateral a la membrana apical. La translocación de la bomba también podría explicar la disminución en la reabsorción tubular^{186,187}.

Debido a la morfología de los capilares en la médula externa, éstos se pueden obstruir fácilmente, lo que trae como consecuencia una disminución en la liberación de oxígeno y nutrientes a las células epiteliales. La pérdida de vasos y microvasos debida a la hipoxia

crónica da como resultado un aumento en el daño tubular, lo cual se manifiesta por cambios estructurales como pérdida del borde en cepillo y desprendimiento de células epiteliales¹⁷⁵.

La muerte celular por apoptosis y necrosis, así como la obstrucción tubular da como resultado el desprendimiento de células de los túbulos y la formación de cilindros. Los cilindros se forman a partir de la proteína de Tamm-Horsfall, que en presencia de una elevada concentración de sodio luminal forman un polímero, el cual es capaz de combinarse con células tubulares epiteliales viables, de borde en cepillo, apoptóticas y necróticas, así como de matriz extracelular en la nefrona distal^{188,189}. También hay evidencia de que durante un fenómeno de isquemia, las células epiteliales viables liberadas al lumen se pueden depositar en otras células epiteliales y en la matriz extracelular ocasionando obstrucción intraluminal tubular, este fenómeno comprende moléculas de adhesión mediadas por integrinas¹⁹⁰.

La LRA va acompañada también de inflamación, después de que ha ocurrido el daño renal, las interacciones entre leucocitos y células endoteliales juegan un papel importante en la progresión de inflamación en esta etiología. Se ha demostrado que los leucocitos potencian el daño e inflamación mediante la generación de ROS y la síntesis de fosfolipasas. La infiltración de leucocitos es resultado del aumento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM. Asimismo, el epitelio tubular contribuye a la progresión de inflamación mediante la generación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 β , TGF- β , RANTES¹⁹¹.

1.3.7.2 LA ALDOSTERONA Y SU PAPEL EN EL DAÑO POR ISQUEMIA/ REPERFUSIÓN (I/R)

La mayor causa de LRA en riñones nativos y trasplantados es el daño renal por isquemia-reperfusión (I/R)^{192,193}. Aunque la perfusión es esencial para que sobreviva el tejido isquémico, hay evidencia de que la perfusión por si misma causa daño celular adicional^{193,194}. A pesar de los avances en estrategias preventivas, la morbilidad y mortalidad por esta enfermedad no se han modificado en las últimas cuatro décadas^{193,195}, siendo su incidencia entre el 20 y 40% en los pacientes en terapia intensiva y alrededor del 20% de estos pacientes fallece por esta causa^{193,196}. La LRA también es frecuente en los pacientes

que son sometidos a cirugía cardíaca mayor (30%), pacientes sometidos a trasplante renal o bien aquellos que reciben fármacos nefrotóxicos como antibióticos, anti-inflamatorios o cisplatino¹⁹⁷⁻²⁰⁰. Por tanto, la LRA constituye un problema de salud pública, por su creciente frecuencia, su asociación con graves complicaciones y altos costos, así como, elevada mortalidad a corto y a largo plazo.

El daño por isquemia se manifiesta por disfunción tubular, glomerular y vascular, acompañadas de una depleción de ATP, lo que ocasiona necrosis y apoptosis celular²⁰¹⁻²⁰⁴. Las alteraciones hemodinámicas observadas son atribuidas a la vasoconstricción de la arteriola aferente y del mesangio, así como al extensivo daño tubular. En diversos estudios en modelos animales y en humanos, se ha demostrado que la vasoconstricción que se observa en la LRA se debe a un desequilibrio en la producción de sustancias vasoactivas, en donde predominan sustancias vasoconstrictoras, lo que trae como consecuencia hipoxia celular. La hipoxia persistente por lo tanto, produce daño tubular severo que exagera aún más la disfunción renal. Así mismo, la reperfusión está asociada con un aumento de radicales libres y un aumento de la muerte celular por apoptosis²⁰¹⁻²⁰⁴.

En nuestro laboratorio demostramos que la aldosterona juega un papel importante en el desarrollo de daño renal inducido por procesos isquémicos como lo son: la nefrotoxicidad crónica y aguda por ciclosporina (CsA), así como la LRA inducida por isquemia renal²⁰⁵⁻²⁰⁷. Aunque los beneficios de la inmunosupresión con CsA han sido evidentes, su uso a largo plazo se encuentra limitado por sus efectos secundarios dentro de los que destaca la nefrotoxicidad que produce²⁰⁸. Se han descrito dos formas de nefrotoxicidad: la nefrotoxicidad aguda o moderada y la nefrotoxicidad crónica o severa. La nefrotoxicidad aguda se caracteriza por vasoconstricción renal, lo que produce una reducción en la tasa de filtración glomerular. En cambio, la nefrotoxicidad crónica se caracteriza por disfunción renal y por la presencia de lesiones estructurales como arteriopatía y fibrosis túbulo intersticial, siendo esta última lesión irreversible²⁰⁹⁻²¹¹. En los roedores se pueden reproducir los dos tipos de nefrotoxicidad que se observan en el humano. El modelo de nefrotoxicidad aguda por CsA se induce al administrar dosis repetidas de CsA²¹². Mientras que el modelo de nefrotoxicidad crónica se obtiene con la administración de dosis repetidas de CsA en conjunto con dieta baja en sodio²¹³, la ingesta baja en sodio activa al sistema renina

angiotensina aldosterona, lo que aumenta en los roedores la susceptibilidad a la CsA y la aparición de lesiones estructurales características que se observan en el humano. Debido a que la fibrosis observada en la nefropatía crónica es en parte mediada por un incremento en la expresión del TGF- β , conjeturamos que la aldosterona podría estar involucrada en las acciones deletéreas que produce la CsA en el riñón. En un primer estudio en donde utilizamos el modelo de nefropatía crónica por CsA, demostramos que la administración de espironolactona evitó la mortalidad que se observa después de 21 días de tratamiento con este inmunosupresor y estos animales presentaron un menor porcentaje de arteriopatía y del área afectada por fibrosis túbulo-intersticial. Este efecto renoprotector se asoció con una reducción en los niveles de RNAm de TGF- β , fibronectina, colágena I y colágena IV. Otro hallazgo particularmente interesante de éste estudio fue el efecto que ejerció la espironolactona sobre la función renal. Como era de esperarse, la administración crónica de CsA produjo una disminución significativa de la depuración de creatinina y la inhibición de los receptores de aldosterona con espironolactona previno la disminución de la función renal en las ratas tratadas simultáneamente con CsA²⁰⁵. En un estudio posterior encontramos que el bloqueo de los RM también previene la nefrotoxicidad aguda por CsA que solo se caracteriza por vasoconstricción renal. De tal forma que la espironolactona restableció la tasa de filtración glomerular a valores normales, efecto que fue acompañado por la normalización del flujo sanguíneo renal²¹⁴. En un tercer estudio también mostramos que la administración de la espironolactona evitó la progresión de la disfunción renal y la fibrosis, así como también redujo la muerte celular por apoptosis en las ratas con nefrotoxicidad crónica por CsA pre-existente. Estos efectos renoprotectores se asociaron con una reducción en el engrosamiento arteriolar y en la contracción glomerular, lo que sugiere que la inhibición de las acciones de aldosterona reduce la hipoperfusión glomerular en este modelo²⁰⁶. Por lo tanto, nuestros resultados previos sugerían que la aldosterona participa en la fisiopatología renal inducida por CsA y que esta hormona además de ejercer efectos profibróticos también es capaz de producir vasoconstricción renal. En apoyo a nuestros hallazgos, Arima *et al.*²¹⁵ observaron que la aldosterona induce vasoconstricción dosis y tiempo dependiente en arteriolas aferentes y eferentes aisladas de conejo. Tres años después, Gross *et al.*²¹⁶ encontraron que la exposición a aldosterona induce contracción de las células de músculo liso vascular de humano, a través del aumento en la fosforilación de la cadena

ligera de miosina, efecto que fue prevenido con el uso de espironolactona. Así mismo, existe evidencia de que esta hormona es capaz de aumentar los niveles de fosfato inositol y de los receptores de angiotensina II, así como también de alterar la respuesta vasodilatadora a acetilcolina^{217,218}.

Por todo lo anterior, inferimos que si la aldosterona jugaba un papel importante en la inducción de la vasoconstricción renal, entonces el bloqueo de los RM podría ser un agente protector contra el daño renal inducido por I/R.

La LRA se puede reproducir en el laboratorio mediante el modelo de isquemia bilateral y reperfusión. En un estudio que publicamos muy recientemente evaluamos el efecto del bloqueo de los RM sobre el daño renal inducido por I/R²⁰⁷. Primero nos dimos a la tarea de investigar si el tratamiento profiláctico con espironolactona prevenía el daño funcional y estructural inducido por un proceso de I/R bilateral renal. Después de 24 h de reperfusión, las ratas sometidas a isquemia desarrollaron disfunción renal, que se caracterizó por un aumento en los niveles de creatinina sérica, como consecuencia de la reducción de la tasa de filtración glomerular. La caída de la depuración de creatinina observada se asoció con una reducción significativa en el flujo sanguíneo renal en un 33%, sin cambio en los valores de presión arterial. En contraste, en los tres grupos que recibieron tratamiento profiláctico con el bloqueador de los RM por uno, dos o tres días antes de inducir isquemia, se previno completamente la elevación de la creatinina sérica debido a que la espironolactona restableció la función renal y el flujo sanguíneo renal a valores normales.

Los estudios histopatológicos con microscopía de luz revelaron que la I/R renal produjo daño tubular severo caracterizado por pérdida del borde en cepillo, dilatación tubular y desprendimiento de la membrana basal tubular. Todas estas lesiones estuvieron prácticamente ausentes en las ratas que recibieron tratamiento con el antagonista de los receptores a mineralocorticoides. Los ensayos de los marcadores de daño tubular clásicos apoyaron estas observaciones. En el grupo con I/R, la excreción urinaria de proteínas y de N-acetil-beta glucosaminidasa (NAG) marcadores de daño renal, aumentó cinco veces y tres veces respectivamente. De acuerdo con los hallazgos histopatológicos, en las ratas que recibieron pre-tratamiento con espironolactona, los niveles de estos marcadores de daño tubular fueron similares al grupo de ratas control que fueron operadas en forma simulada.

De tal forma que, nuestros resultados demostraron que el pre-tratamiento con espironolactona previene el daño renal inducido por I/R, sugiriendo que la aldosterona juega un papel determinante como mediador del deterioro de la función y de la estructura a través de un mecanismo genómico.

Como se detalló anteriormente, la disminución del flujo sanguíneo renal es de importancia particular ya que es el responsable de iniciar y exacerbar la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. El tono vascular es regulado de manera particular por el óxido nítrico (NO) derivado de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Aunque el NO derivado de iNOS contribuye al daño tubular durante la isquemia, se ha propuesto que el NO derivado de eNOS en las arteriolas glomerulares protege contra el daño inducido por la I/R¹⁷³. De acuerdo con esto, se ha descrito que la disminución de la actividad de eNOS es una de las características de la disfunción endotelial asociada con lesión renal aguda²¹⁹. En este estudio confirmamos una reducción significativa en la cantidad excretada de los metabolitos estables de la síntesis de NO, los nitritos y nitratos (NO₂/NO₃), después de inducir I/R renal. Interesantemente, el bloqueo de los RM previno la reducción de estos metabolitos de NO en la orina. Con el fin de conocer el mecanismo por el cual la espironolactona mejoró la generación de NO, se evaluó la cantidad de eNOS y su estado de fosforilación, ya que se ha descrito previamente que la eNOS se encuentra activa cuando está fosforilada en la serina 1177 e inactiva cuando está fosforilada en la treonina 497, ésta última fosforilación además produce que eNOS genere el radical superóxido en lugar de NO. Cuando se compararon las ratas que fueron pre-tratadas con espironolactona con el grupo de I/R sin tratamiento, se observó un aumento en la expresión de eNOS en el riñón y en la cantidad de eNOS fosforilada en el residuo de S1177, junto con una reducción en la fosforilación del residuo T497 de eNOS. Por lo tanto, el aumento en la expresión de eNOS y de la forma activa de eNOS pueden ser los responsables de aumento en la excreción urinaria de NO₂/NO₃ y del restablecimiento del flujo sanguíneo renal en los animales con isquemia / reperfusión tratados con espironolactona.

La hipoxia que resulta de la disminución del flujo sanguíneo renal y la subsecuente reperfusión parece ser la responsable de activar procesos en los que se generan especies reactivas de oxígeno y muerte celular del epitelio tubular por necrosis y apoptosis. Por lo que especulamos que el bloqueo de los RM, además de mejorar el flujo sanguíneo renal, también

podría prevenir la generación de radicales libres y la muerte celular por apoptosis se determinaron los niveles de lipoperoxidación en el riñón y los niveles de RNAm de enzimas antioxidantes. El daño tubular inducido por I/R, se asoció con un aumento de tres veces en la lipoperoxidación renal, lo cual se previno con el pre-tratamiento con espironolactona desde un día antes de inducir I/R. La reducción en la lipoperoxidación renal promovida por la espironolactona se acompañó de un aumento significativo en los niveles de RNAm de dos enzimas antioxidantes la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. En apoyo a estos hallazgos, se ha demostrado que la aldosterona induce la generación de ROS en células mesangiales y miocitos en cultivo celular^{220,221}. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la aldosterona también induce la generación de ROS durante la I/R, lo que es evitado por el antagonismo de los RM, lo cual además previno la hipoperfusión renal, y aumentó los niveles de RNAm de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx), lo que resultó en la preservación de la estructura tubular renal como se evidenció por los hallazgos histopatológicos y la normalización de los marcadores de daño tubular.

El daño renal inducido por isquemia se ha asociado tradicionalmente a muerte celular del epitelio tubular por necrosis. Sin embargo recientemente se ha demostrado, que la apoptosis es una forma importante de muerte celular y del daño asociado a lesión renal aguda²²². En efecto, en este estudio también observamos un aumento significativo en la tinción in situ de los núcleos celulares por el método de TUNEL en los riñones de los animales con I/R no tratados. El pre-tratamiento con espironolactona previno la muerte celular por apoptosis. De acuerdo con estas observaciones, el daño renal inducido por I/R produjo un aumento significativo en los niveles de RNAm de pro-caspasa 3, enzima efectora de la muerte celular por apoptosis, efecto que fue revertido por el pre-tratamiento con espironolactona. Recientemente se ha puesto de manifiesto que la interferencia del programa apoptótico se traduce en un efecto renoprotector durante la isquemia renal^{223,224}. De hecho, el efecto renoprotector conferido por espironolactona también se asoció con la prevención de apoptosis en el tejido renal. Debido a que la hipoxia y la formación de radicales libres son dos factores que inducen muerte celular por apoptosis, es muy probable que la reducción de apoptosis en los animales pre-tratados con espironolactona resulte del restablecimiento del flujo sanguíneo renal y de la disminución de la lipoperoxidación renal.

De esta forma, nuestros resultados sugieren que además de sus efectos pro-fibróticos, la aldosterona participa en la vasoconstricción renal que se observa durante la I/R, efecto que se revirtió con la administración de espironolactona, lo que implica que la aldosterona induce vasoconstricción renal a través de un mecanismo genómico.

Debido a que el tratamiento profiláctico con espironolactona protege al riñón del daño por I/R, en el laboratorio nos dimos a la tarea de determinar el papel de los RM en la protección conferida por espironolactona. Para ello, se utilizaron ratas Wistar a las que se les realizó adrenalectomía (extracción de las glándulas adrenales) y se les indujo daño renal por I/R después de la adrenalectomía. Como se esperaba el grupo con I/R presentó disfunción renal acompañada de daño tubular severo. En contraste, observamos que los animales que no tenían glándulas adrenales no presentaban caída de la función renal ni del flujo sanguíneo renal, ni daño tubular. Estos efectos se asociaron con el restablecimiento en la producción de óxido nítrico, un aumento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial, así como la normalización de los niveles de RNAm de la cinasa Rho y de los receptores de endotelina tipo ETA. Estos datos confirman el papel medular de la aldosterona en la producción del daño en I/R mediado por sus receptores intracelulares¹⁴⁵.

Los estudios anteriores confirman el papel central de la aldosterona en la producción del daño renal por I/R. Como podemos ver los estudios realizados hasta el momento proponen la prevención del daño por LRA en el modelo de I/R con el bloqueo de las acciones de aldosterona de manera profiláctica. En la práctica clínica sin embargo, la LRA no se puede anticipar, por lo que es necesario buscar terapias que eviten la progresión del daño una vez establecido éste, es por esto que en el presente trabajo se plantea la posibilidad del bloqueo de los RM con espironolactona una vez que se produjo el daño por I/R.

2. Hipótesis

El bloqueo de los receptores a mineralocorticoides con espironolactona después de haber producido el insulto por I/R puede prevenir el daño, y es posible que esta protección esté asociada con la disminución de la expresión de moléculas que relacionadas con la producción de vasoconstricción como endotelina, la cinasa Rho y angiotensina.

3. Objetivos

- ▶ Evaluar si el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides previene el daño renal una vez que se produjo la isquemia/reperfusión.
- ▶ Determinar los mecanismos por los cuales la aldosterona contribuye a la reducción del flujo sanguíneo renal después de un episodio de isquemia/reperfusión (I/R).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar si la administración de espironolactona a diferentes intervalos después de haber producido el daño por I/R previene la caída de la función renal.
- ✓ Evaluar si la administración de espironolactona después de haber producido el daño por I/R previene el estrés oxidante.
- ✓ Determinar el papel de endotelina-1, la cinasa Rho y de angiotensina II como mediadoras de la hipoperfusión que se observa después de un episodio de I/R.
- ✓ Estudiar si el efecto renoprotector con el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides previene o reduce la inducción de factores vasoconstrictores.

4. Material y Métodos

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se incluyeron setenta y dos ratas Wistar macho con un peso de 270-320 g. Los animales se dividieron en 6 grupos: 1) ratas operadas en forma simulada (S); 2) ratas a las que se les produjo isquemia renal bilateral por 20 min y 24 h de reperusión; 3-6) y cuatro grupos que recibieron espironolactona (Sp) (20 mg/Kg) inmediatamente después de la isquemia, a las 3 h, a las 6 h ó a las 9 h de haber producido el daño (Sp0, Sp3, Sp6 y Sp9 respectivamente). Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar la orina, a 22°C con ciclos de 12:12 h día/noche, con agua *ad libitum*. Seis animales por grupo se utilizaron para estudios funcionales y bioquímicos, y seis animales más por grupo se utilizaron para realizar los estudios moleculares. Todos los animales se estudiaron después de 24 h de reperusión.

TABLA 1. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE ANIMALES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.

Grupo	Descripción
Sham	Ratas operadas en forma simulada en forma simulada (n=12).
I/R	Ratas sin tratamiento a las que se les indujo el daño por I/R (n=12).
Sp0	Ratas a las que se les administró espironolactona inmediatamente después de haberles producido la isquemia (n=12).
Sp3	Ratas a las que se les administró espironolactona a las 3 h de haberles producido la isquemia (n=12).
Sp6	Ratas a las que se les administró espironolactona a las 6 h de haberles producido la isquemia (n=12).
Sp9	Ratas a las que se les administró espironolactona a las 9 h de haberles producido la isquemia (n=12).

4.1.1 INDUCCIÓN DEL DAÑO POR I/R

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (30 mg/Kg), se les realizó una incisión abdominal media y se disecaron los pedículos renales. La isquemia renal se indujo por medio de la colocación de clips vasculares bilateral en cada pedículo durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo de isquemia se retiraron los clips y se suturó a los animales. A los animales del grupo sham se les anestesió y únicamente se realizó la disección de los pedículos.

4.2 ESTUDIOS FUNCIONALES

Después de 24 h de reperfusión los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/Kg de peso corporal i.p.) y se les adicionaron dosis suplementarias en el peritoneo conforme se requirió. La preparación quirúrgica se realizó por medio de microcirugía de la siguiente forma: se colocó a la rata en la mesa termoregulada a 37°C, se cateterizó la tráquea, las venas yugulares, la arteria femoral y la vejiga con tubos de polietileno PE-240, PE-50 y PE-90, respectivamente. Una vez cateterizadas las venas y las arterias, se tomó una primera muestra de sangre de la arteria femoral y el volumen se repuso con la sangre de una rata donadora. Las ratas se mantuvieron en condiciones de euvolemia por la infusión de 10 ml/kg de plasma durante la cirugía a una velocidad de 7 ml/h, seguida de una infusión de azúcar BC (baja en calorías, METCO, México) al 5% a una velocidad de 1.6 ml/h como marcador de la filtración glomerular como fue determinado previamente por nuestro laboratorio²²⁵. Después de un periodo de equilibrio de aproximadamente 45 min se recolectó la orina durante 30 min; al inicio y al final de ésta se tomaron muestras de sangre. Se realizó una segunda recolección de orina de 30 min y se tomó una cuarta muestra de sangre. El volumen de sangre que se recolectó, se reemplazó con sangre de una rata donadora por la vena yugular. Se midió la presión arterial media (TAM) durante todo el experimento con un transductor de presión (modelo p23 db, Gould) y se registró en un polígrafo (Grass Instruments, Quincy, MA). Para registrar el flujo sanguíneo renal (FSR), se realizó una incisión media abdominal, se disecó la arteria renal izquierda, se ungió con gel conductor ultrasónico (HR Gel Lubricante, Carter-Wallace, New York, NY) y se colocó una sonda, la cual se conectó al flujómetro (1RB, Transonic, Ithaca, NY) en donde se registró en forma continua el FSR. Finalmente se determinó la tasa de filtración glomerular por medio del método de Davidson y Sackner²²⁶ como se explica a continuación.

La determinación de azúcar BC se realizó en plasma y orina por el método de Davidson para llevar a cabo los cálculos de la tasa de filtración glomerular (TFG). Los plasmas se desproteinizaron mediante la adición de 250 µl de ácido tricloroacético 1 N y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. Las orinas se diluyeron, dependiendo de la concentración de la muestra. La reacción se llevó a cabo utilizando antrona la cual es utilizada para determinar la concentración de carbohidratos, por medio de la cuantificación espectrofotométrica del complejo colorido formado. De esta manera, se colocaron 200 µl de

cada muestra en un tubo y se les adicionó 1 ml de la solución de antrona, se agitaron y se incubaron a 45°C durante 50 min. Finalmente se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Se preparó una curva estándar con un rango de concentración de 20-100 µg/ml. La filtración glomerular se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Filtración glomerular} = \frac{\text{Flujo plasmático} * [\text{Conc. de azúcar BC en orina}]}{[\text{Conc. de azúcar BC en suero}]}$$

4.3 ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS

Después de 24 h de reperfusión se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) intra-renal, de excreción de proteínas y de la proteína de choque térmico de 72 kDa (Hsp72) como marcadores de estrés oxidante y daño tubular, respectivamente. En las muestras de orina se evaluó la excreción urinaria de proteínas por turbidimetría (método de ácido tricloro-acético, TCA²²⁷). También se determinó el potasio sérico por el método ión-selectivo utilizando el aparato analizador de electrolitos Nova-4.

4.3.1 NIVELES DE HSP72

Los niveles de Hsp72 como un biomarcador sensible y temprano de daño tubular²²⁸ se determinaron mediante un ensayo de ELISA, con kit comercial (Assay Designs EKS-715, MI, USA). Las muestras y los estándares se colocaron en una placa recubierta con un anticuerpo monoclonal para Hsp72. La proteína Hsp72 es capturada de la muestra y se detecta mediante un anticuerpo policlonal de conejo. Finalmente se adicionó peroxidasa de rábano para el desarrollo del color, y se adicionó como sustrato tetrametilbencidina, la reacción se detuvo con una solución de HCl 1N. La densidad óptica de las muestras fue leída a 450 nm, y las lecturas de las muestras se extrapolaron en una curva estándar obtenida de concentraciones conocidas de Hsp72 recombinante (0.1-7.5 ng/ml).

4.3.2 LIPOPEROXIDACIÓN RENAL

Para determinar los niveles de MDA renal, se homogenizó tejido renal, y con el homogenado se llevó a cabo una reacción en N-metil-2-fenilindol a 15.4 mM en ácido clorhídrico al 15%, a una temperatura de 45°C por 40 min. Los tubos se centrifugaron a

3,000 g por 15 min y se leyó la absorbancia a 536 nm. El MDA se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción ($1.1 \times 10^5 \text{M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) y se expresó en nanomoles de MDA por miligramo de proteína²⁰⁷. La proteína en el tejido homogenizado se determinó por el método de Lowry.

4.3.3 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO URINARIO

Esta determinación se llevó a cabo con el kit de Amplex Red Hydrogen Peroxide /Peroxidase Assay (Invitrogen, Eugene, OR) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó una curva de peróxido de hidrógeno (1-10 μM). Se tomó una muestra de orina de cada animal (50 μl), así como de cada estándar, y se colocaron en una placa de ELISA, posteriormente se agregó reactivo Amplex Red/HRP (50 μl) y las reacciones se incubaron por 30 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. En presencia de peroxidasa el reactivo Amplex reacciona con peróxido de hidrógeno produciendo resorufina, un producto rojo fluorescente. Al final de la incubación se lee la absorbancia a 560 nm y la concentración de las muestras se expresa en nanomoles por 24 h, tiempo en que se llevó a cabo la recolección de orina.

4.3.4 NIVELES DE ENDOTELINA-1 EN TEJIDO

Los niveles de endotelina-1 se determinaron por medio de un kit comercial de ELISA (Endothelin-1 (1-31) Assay kit, Immuno-Biological Laboratories Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los homogenados de tejido renal y los estándares se agregaron a una placa recubierta con un anticuerpo para endotelina-1 y se incubaron toda la noche a 4°C. La endotelina-1 reaccionó con el anticuerpo y se detectó por medio de la adición de un anticuerpo conjugado y un cromógeno (tetrametilbencidina). La densidad óptica de las muestras se obtuvo a 450 nm, y los valores obtenidos por medio de la interpolación de los datos a partir de la curva estándar (1.56-200 pg/ml). La concentración de endotelina-1 se normalizó por la cantidad de proteína agregada en cada pozo (determinada por el método de Lowry).

4.4 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Al finalizar el experimento, la aorta se ligó por arriba de las arterias renales y uno de los riñones se perfundió con amortiguador de fosfatos por la arteria femoral a una presión constante y similar a la tensión arterial que tenía previamente la rata. El riñón se fijó con formaldehído al 4%. Una vez perfundido y fijado se extrajo, se incluyó en parafina y se hicieron cortes de tres micras, para posteriormente teñirlos con PAS y hematoxilina. Para los estudios de microscopía de luz se utilizó un microscopio Nikon eclipse conectado a una cámara digital, las imágenes digitalizadas se evaluaron en el programa eclipse net®. Para determinar el número de túbulo con formación de cilindros se digitalizaron diez campos subcorticales y yuxtamedulares de cada laminilla de riñón, el análisis se llevó a cabo de manera doble ciega y se contaron al menos 100 túbulo en cada laminilla por animal. Los resultados se expresan como el porcentaje de túbulo con formación de cilindros.

4.5 ESTUDIOS MOLECULARES

Para los estudios moleculares se utilizaron seis grupos de seis ratas cada uno. Se indujo el daño por I/R y se dio el tratamiento según el grupo. A las 24 h de reperusión los animales se anestesiaron, se extrajeron los riñones y el tejido se congeló y se almacenó a -80°C. Del tejido renal almacenado se extrajo RNA total por medio del método de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se aseguró su integridad por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para evitar la contaminación por DNA, las muestras de RNA total se trataron con DNAsa (DNase I, Invitrogen). Para la reacción de transcripción reversa se utilizaron 200 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia en el mono (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV, Stratagene) y 1.0 µg de RNA. A partir del RNA tratado se determinaron los niveles de RNAm de la molécula de daño renal (kidney injury molecule-1, KIM-1) como marcador de daño tubular; de la cinasa Rho, de angiotensinógeno, de los receptores AT₁ y AT₂, así como de prepro- endotelina, mediante PCR en tiempo real en el equipo ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Taqman, ABI, Foster City, CA). Las sondas se adquirieron como reactivo diseñado para ensayos (ABI), y se eligieron marcadas con el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína), los número de sondas fueron: Rn00597703_m1 para KIM-1, Mm00485745_m1 para la cinasa Rho, Rn00593114_m1 para

angiotensinógeno, Rn00578456_m1 para el receptor AT₁, Rn00560677_s1 para el receptor AT₂ y Rn00561129_m1 para prepro-endotelina. Como control endógeno se utilizó RNAr eucariótico 18S (reactivo prediseñado para ensayos, ABI). La expresión de cada gen se cuantificó en forma relativa usando el método comparativo de Ct²²⁹.

4.5.1 WESTERN BLOT

Para realizar los análisis por Western blot, se aislaron las proteínas de cuatro cortezas de cuatro ratas de cada grupo por medio de una homogenización con amortiguador de lisis. Las proteínas de los homogenados se desnaturalizaron y se separaron por medio de electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida, una vez separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilidina (PVDF, Millipore). Se bloquearon las membranas y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo de cabra para la cinasa Rho (1:2500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), con el anticuerpo de conejo para los receptores A y B de endotelina (1:5000; Abcam Inc. Cambridge, MA) o con el anticuerpo de cabra para el receptor tipo 1 de angiotensina II (1:500; Abcam Inc. Cambridge, MA). Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario burro anti-cabra IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) o de rata anti-conejo IgG-HRP (Alpha Diagnostics, San Antonio, Tx). Para el control de cargado y transferencia de proteínas se utilizó un anticuerpo de actina (1:5000) y un anticuerpo secundario burro anti-cabra IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas obtenidas se escanearon y se analizaron por densitometría.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron por ANOVA utilizando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Los datos se presentan como el promedio ± el error estándar. La significancia estadística se definió como $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

A las 24 h de reperfusion después de inducir la isquemia se determinó la filtración glomerular, durante la cual se monitoreó la tensión arterial media y el flujo sanguíneo renal. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

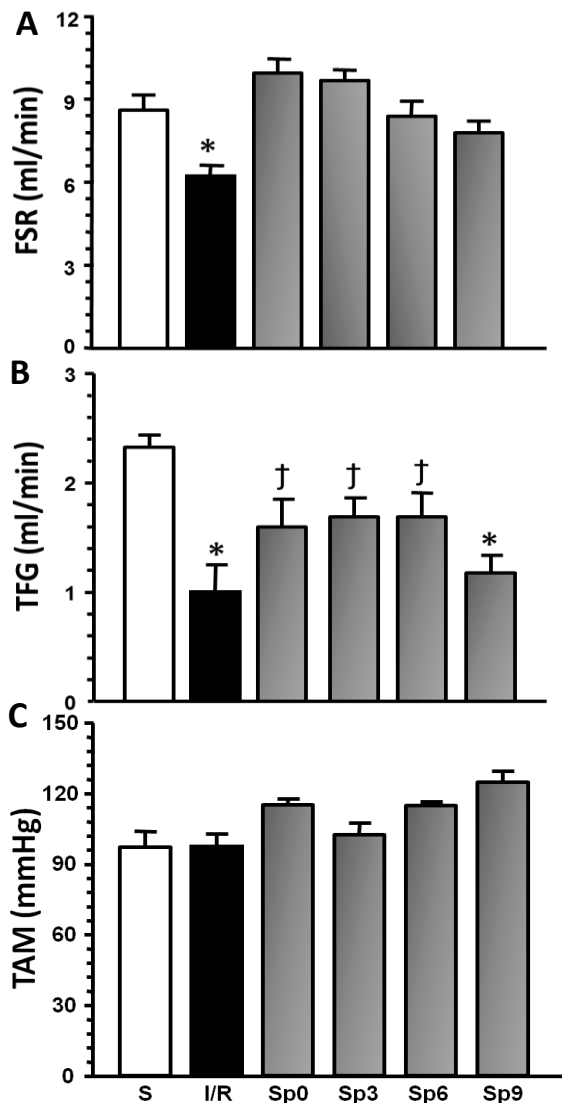


FIGURA 6. FLUJO SANGUÍNEO RENAL (FSR). TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR (TFG) Y TENSIÓN ARTERIAL MEDIA (TAM). * $p < 0.05$ vs. S, † $p < 0.05$ vs. I/R

En la Figura 6A se puede observar que el grupo sometido a I/R presentó una caída del flujo sanguíneo renal, manifestación característica de este síndrome. La espironolactona evitó la hipoperfusión inmediatamente después de la isquemia y a las 3 h y a las 6 h. No así cuando se administró 9 h después de haber producido el daño. Un patrón similar se observó en la filtración glomerular (Figura 6B), pues el grupo con I/R presentó hipofiltración, es decir una caída significativa en la tasa de filtrado glomerular, en cambio el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides impidió la presencia de disfunción renal, aunque la administración de espironolactona a las 9 h no tuvo efecto sobre este parámetro. Finalmente, es importante mencionar que el efecto renoprotector de espironolactona no se asoció con cambios en la tensión arterial media (TAM), ya que todos los grupos presentaron valores similares (Figura 6C).

Debido a que uno de los efectos secundarios de espironolactona es la hipercalcemia²³⁰, nos dimos a la tarea de determinar los niveles de potasio sérico en todos los grupos estudiados (Figura 7A). Como se puede observar no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los grupos a los que se les administró espironolactona. Por lo que el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides en este estudio no se asoció con niveles elevados de potasio sérico, es decir los niveles de potasio no se modificaron por el tratamiento de espironolactona.

Los niveles de aldosterona en suero aumentaron de manera significativa en los grupos sometidos a I/R con y sin tratamiento con espironolactona (Figura 7B). Este es un efecto que se esperaba, como previamente hemos reportado, dado que la hipoperfusión es uno de los mecanismos más potentes por los que se activa el sistema renina angiotensina aldosterona^{145,207}.

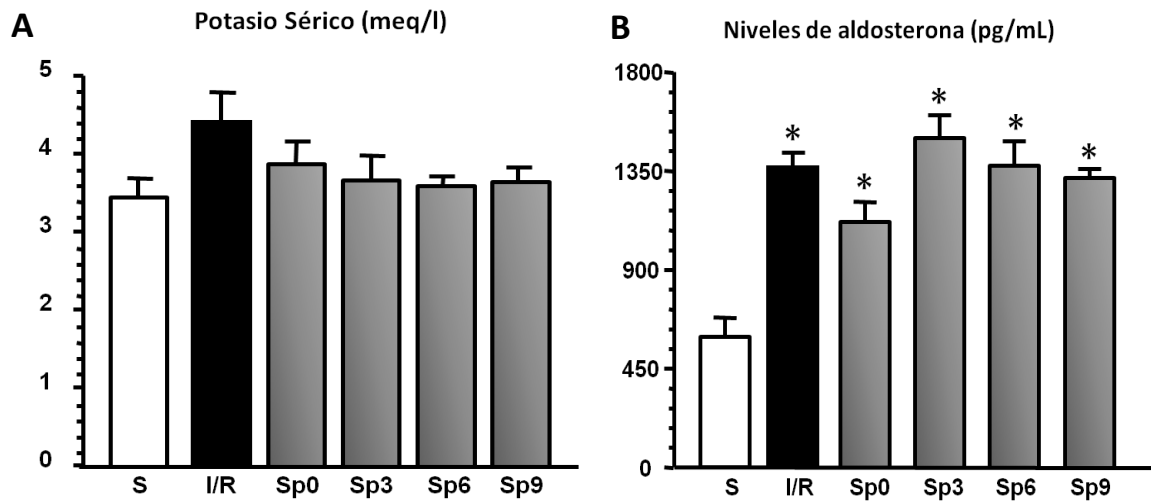


FIGURA 7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE POTASIO SÉRICO Y ALDOSTERONA EN PLASMA.

* $p < 0.05$ vs. S.

5.2 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Los estudios histológicos se llevaron a cabo por medio de microscopía de luz, en cortes de riñón teñidos con tinción de PAS. Como se puede apreciar en la Figura 8A y B, los animales que fueron sometidos a I/R presentaron daño tubular severo caracterizado por dilatación tubular, pérdida del borde en cepillo, desprendimiento celular de la membrana basal glomerular y formación de cilindros. El bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona previno estas lesiones en los grupos Sp0, Sp3 y Sp6, pero la administración de espironolactona 9 h después de la isquemia no confirió renoprotección alguna (Figura 8I, J). Se cuantificó el número de cilindros por campo, y se observó que el grupo con I/R presentó un $34.3\% \pm 11.2\%$ túbulos con cilindros. De manera interesante, la administración de espironolactona evitó la formación de cilindros de forma tiempo-dependiente, obteniéndose $2.4\% \pm 1.3\%$, $14.6\% \pm 8.3\%$, $11.4\% \pm 3.7\%$ y $10.4\% \pm 6.0\%$ túbulos con formación de cilindros en los grupos tratados con espironolactona, 0, 3, 6 y 9 h después de la isquemia, respectivamente (Figura 8K). La proteinuria es una medida del daño tubular producido por I/R, en este caso se observó que ésta aumentó de manera significativa en los animales con I/R sin tratamiento, como era de esperarse, la administración de espironolactona a las 0 h y 3 h evitó este aumento^{145,207}. En el caso de los grupos que recibieron la espironolactona 6 h y 9 h después, se observó una reducción de los niveles de proteinuria, pero la diferencia no fue significativa cuando se comparó con el grupo de I/R (Figura 8L). También se determinaron los niveles de RNAm de Kim-1, como marcador de daño tubular. Como se puede observar en la Figura 8M, el grupo con el daño por I/R presentó un aumento de aproximadamente 150 veces en los niveles de RNAm de Kim-1. La administración de espironolactona por su parte previno el aumento de Kim-1 cuando se administró inmediatamente después de la isquemia y 3 h después, en cambio la reducción fue menor a las 6 h, mientras que después de 9 h los niveles de RNAm de Kim-1 fueron similares al grupo con I/R sin tratamiento. Estos hallazgos son consistentes a lo que se observó histológicamente y con los niveles de proteinuria.

En estudios recientes en nuestro laboratorio se ha demostrado que la proteína Hsp72 es un biomarcador temprano de la lesión renal aguda inducida por isquemia renal²²⁸. De acuerdo a esto, determinamos la excreción urinaria de la proteína Hsp72 en los grupos estudiados. Como se puede observar en la Figura 8N, el grupo con I/R sin tratamiento

presentó niveles significativamente elevados de la proteína Hsp72, este aumento fue prevenido con la administración de espironolactona inmediatamente después del insulto y de manera parcial a las 3 h y a las 6 h. El tratamiento con espironolactona a las 9 h no evitó el aumento de Hsp72. Estos resultados sugieren que Hsp72 es un biomarcador sensible para estratificar los diferentes grados de renoprotección conferidos en los diferentes intervalos de tiempo a los que se administró la espironolactona.

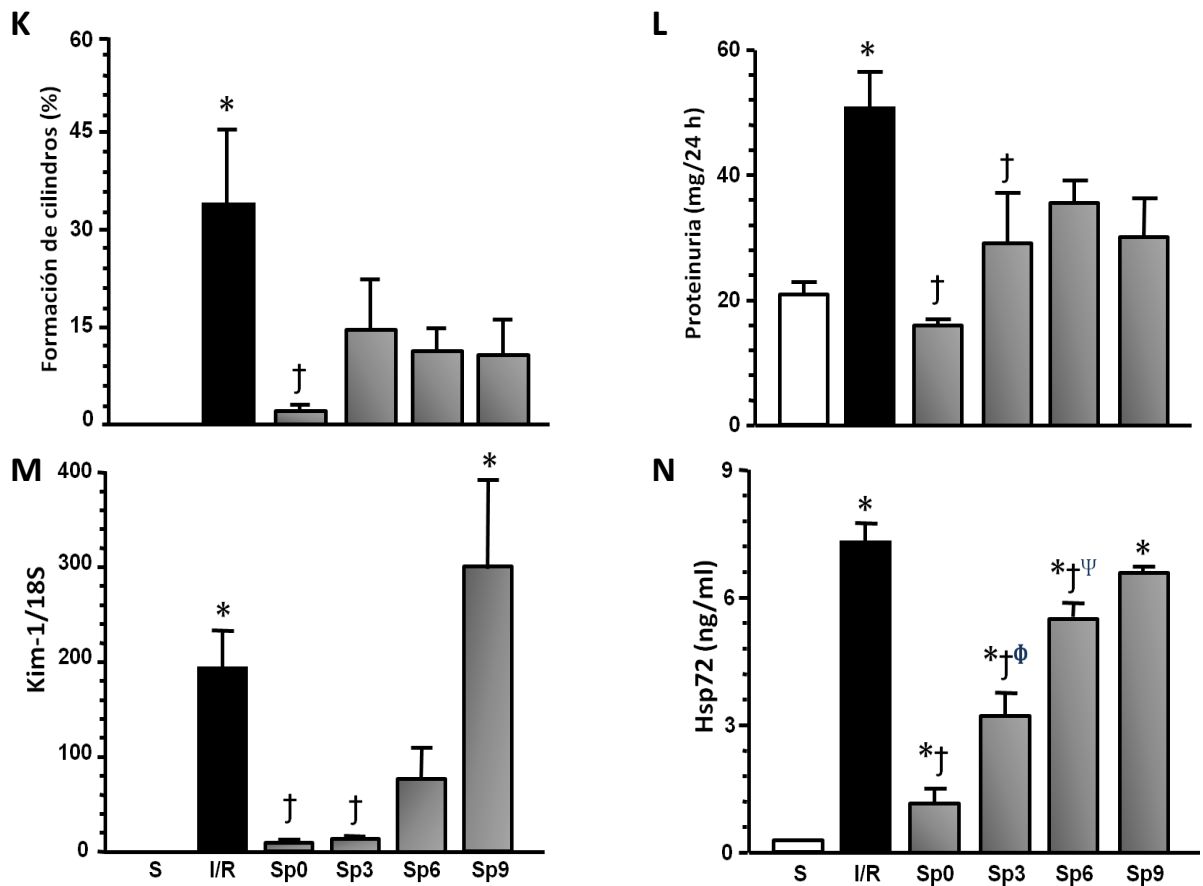
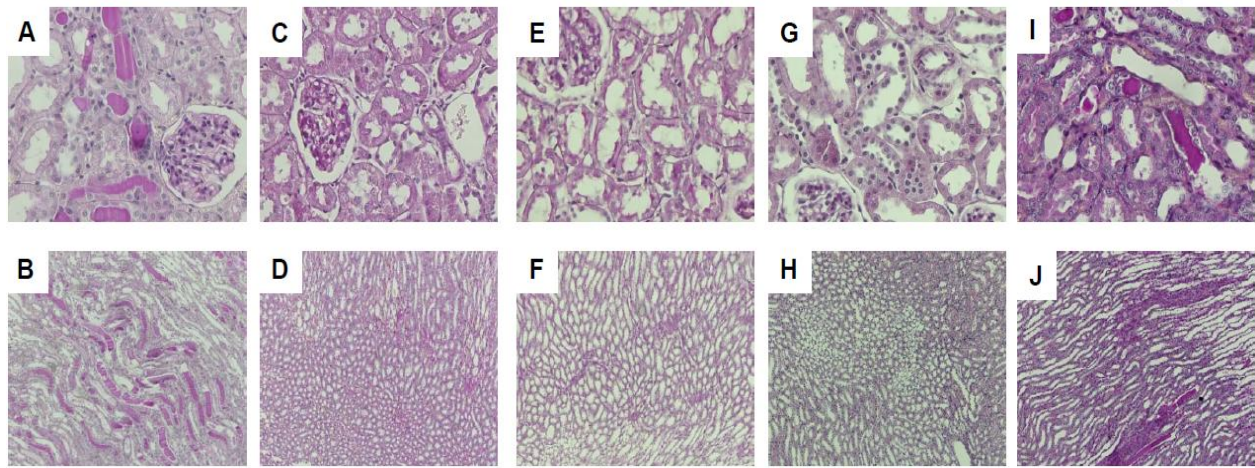


FIGURA 8. DETERMINACIÓN DEL DAÑO TUBULAR. A, B) MICROFOTOGRAFÍAS DE UN CORTE DE RIÑÓN DE RATA REPERESANTATIVO CON I/R SIN TRATAMIENTO (AMPLIFICACIÓN 400X Y 100X RESPECTIVAMENTE). C, D) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE SECCIONES DE LA CORTEZA Y MÉDULA DE UNA RATA TRATADA CON ESPIRONOLACTONA INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE HABERLE PRODUCIDO EL DAÑO (AMPLIFICACIÓN 400X Y 100X RESPECTIVAMENTE). E, F) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE SECCIONES DE LA CORTEZA Y MÉDULA DE UNA RATA TRATADA CON ESPIRONOLACTONA 3H DESPUÉS DE HABERLE PRODUCIDO EL DAÑO (AMPLIFICACIÓN 400X Y 100X RESPECTIVAMENTE). G, H) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE SECCIONES DE LA CORTEZA Y MÉDULA DE UNA RATA TRATADA CON ESPIRONOLACTONA 6H DESPUÉS DE HABERLE PRODUCIDO EL DAÑO (AMPLIFICACIÓN 400X Y 100X RESPECTIVAMENTE). I, J) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE SECCIONES DE LA CORTEZA Y MÉDULA DE UNA RATA TRATADA CON ESPIRONOLACTONA 9H DESPUÉS DE HABERLE PRODUCIDO EL DAÑO (AMPLIFICACIÓN 400X Y 100X RESPECTIVAMENTE). K) PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE CILINDROS. L) NIVELES DE PROTEINURIA. M) NIVELES DE RNAM DE KIM-1. N) NIVELES DE EXCRECIÓN URINARIA DE LA PROTEÍNA Hsp72. * $p < 0.05$ vs. S, † $p < 0.05$ vs. I/R, φ $p < 0.05$ vs. Sp0, ψ $p < 0.05$ vs. Sp3.

5.3 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Se ha reportado que la reperfusión está asociada con un aumento en la producción de radicales libres^{231,232} por lo que, se determinó la cantidad de peróxido de hidrógeno en la orina de 24 h, la cual es una medida de la generación de estrés oxidante. Asimismo, se determinó la lipoperoxidación renal, por medio de la cuantificación de los niveles de malondialdehído (MDA) en homogenados de riñón total. En la Figura 9A se presentan los valores de MDA en los grupos de ratas estudiados. Como era de esperarse, el grupo con I/R presentó un aumento significativo en los niveles de MDA, efecto que se evitó con la administración de espironolactona inmediatamente y 3 h después de la isquemia y en menor medida a las 6 h, sin embargo, la administración después de 9 h no evitó el estrés oxidante. Un patrón muy similar se observó con la excreción urinaria de peróxido de hidrógeno (Figura 9B), dado que el grupo con I/R presentó niveles mayores estadísticamente significativos y la administración de espironolactona fue capaz de prevenir el aumento de este marcador de estrés oxidante. Aunque el tratamiento a las 9 h no tuvo la efectividad que cuando la espironolactona se administró entre las primeras seis horas después de la isquemia, ya que los animales presentaron niveles tanto de peróxido de hidrógeno como de MDA similares a los observados en los animales sin tratamiento.

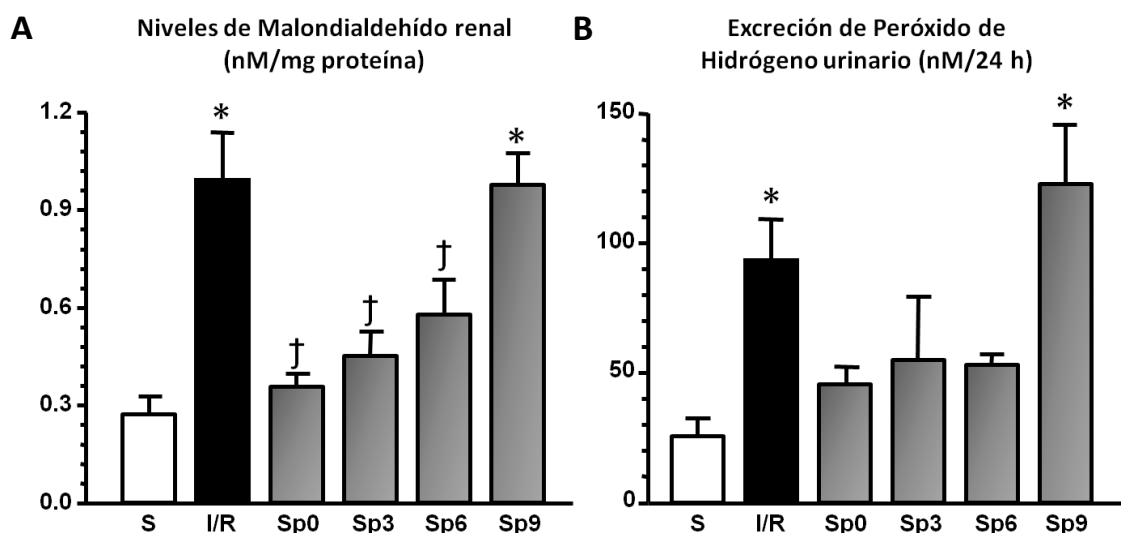


FIGURA 9. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDANTE. LIPOPEROXIDACIÓN RENAL MEDIANTE MDA Y MEDICIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN ORINA. * $p < 0.05$ vs. S, † $p < 0.05$ vs. I/R

5.4 ESTUDIOS MOLECULARES

Se ha sugerido recientemente la participación de la cinasa Rho en la producción de vasoconstricción y del daño renal inducido por I/R^{233,234}, por lo tanto nos dimos a la tarea de estudiar la expresión de la cinasa Rho. En nuestros resultados observamos una tendencia de incremento en la expresión de la cinasa Rho debida al daño por I/R, este efecto se previno con el tratamiento de espironolactona. En general, los animales sometidos a I/R presentaron niveles elevados aunque no de manera significativa, tanto de RNAm como de proteína de la cinasa Rho (Figura 10), en cambio el tratamiento con espironolactona disminuyó parcialmente la expresión de la cinasa Rho, efecto que se observó más claramente en los grupos a los que se les administró la espironolactona a las 0 h y 3 h después de la isquemia, ya que en los grupos tratados a las 6 h y 9 h, la espironolactona no fue capaz de evitar el aumento en la expresión de esta cinasa. Estas observaciones sugieren que uno de los mecanismos involucrados en la producción del daño implica la activación de la cinasa Rho, acción que pudiera ejercer la aldosterona a través de sus receptores.

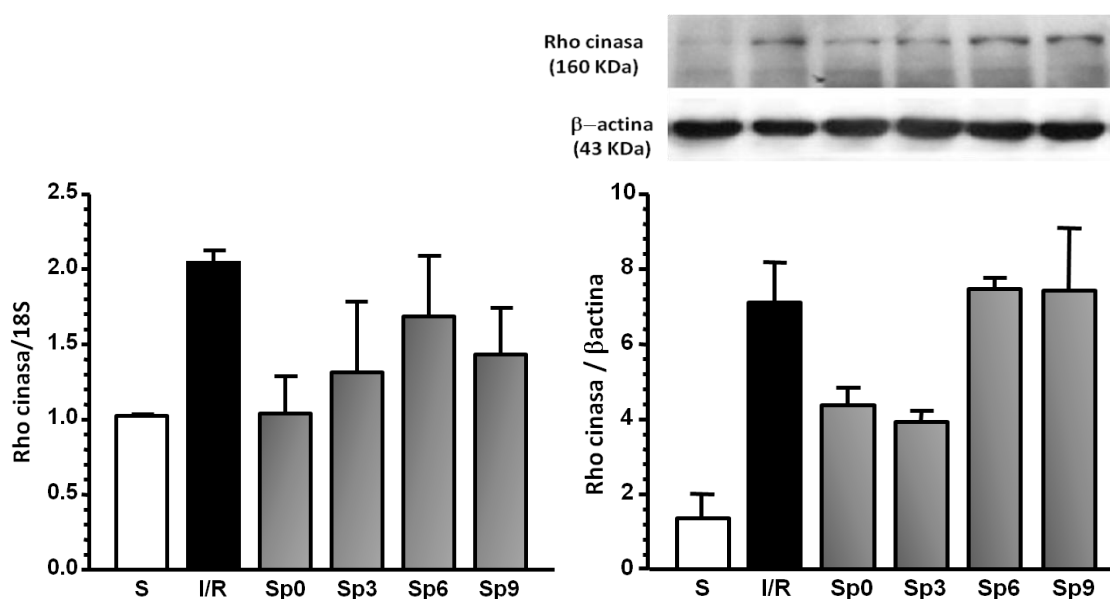


FIGURA 10. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNAm Y DE PROTEÍNA DE LA CINASA RHO.

También se determinaron los niveles de RNAm de preproendotelina, precursor de endotelina-1 y de sus receptores, pues se sabe que la síntesis de endotelina es estimulada por la hipoxia, la isquemia o la lesión endotelial principalmente^{118,122}. Como se detalla en la figura 11A, el grupo con I/R presentó un aumento significativo de los niveles de RNAm de preproendotelina, en cambio, la administración de espironolactona evitó dicho aumento en los grupos tratados, sin embargo este efecto no se observó en el grupo que recibió espironolactona 9 h después. Este hallazgo también se confirmó con el contenido de endotelina-1 en el tejido renal, como se presenta en la Figura 11B, el grupo al que se le indujo I/R presentó niveles elevados de endotelina-1 aunque no de manera significativa, este efecto no se observó en las ratas tratadas con espironolactona, ya que presentaron niveles menores de endotelina comparados con los del grupo I/R. Cabe mencionar que la diferencia no alcanzó significancia cuando se evaluaron los datos por ANOVA y comparaciones múltiples.

También se analizaron los niveles de RNAm del receptor ET_A, ya que es el receptor involucrado en la producción de vasoconstricción. Como se puede observar en la Figura 11C, el grupo al que se indujo I/R presentó niveles significativamente elevados de RNAm del receptor ET_A. Interesantemente este aumento se evitó con la administración de espironolactona en todos los grupos que recibieron espironolactona. Se evaluó también la expresión proteica de los receptores ET_A y ET_B (Figuras 11D y E respectivamente). Como se puede apreciar, el grupo con I/R presentó un aumento no significativo en la expresión de ET_A, y el tratamiento con espironolactona en los grupos de Sp0, Sp3, Sp6 y Sp9 redujo este aumento de manera parcial. En contraste, la expresión de ET_B presentó una disminución, aunque no significativa en el grupo de I/R (Figura 11E). El tratamiento con espironolactona aumentó los niveles de este receptor en el grupo de Sp0 y Sp6, no así con el grupo de 9 h, en el que se observan niveles de expresión similares a los del grupo de I/R.

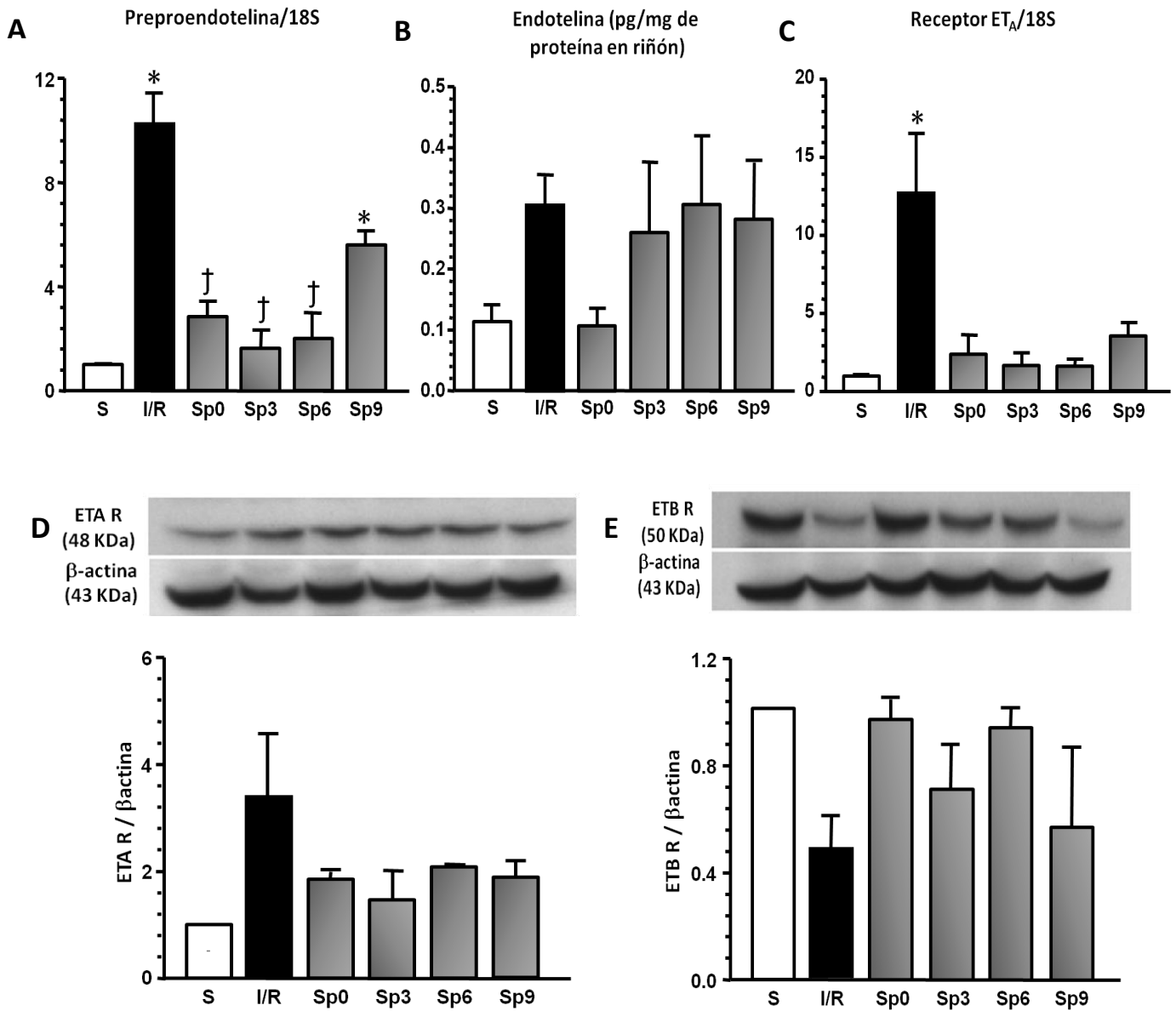


FIGURA 11. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNAM DE A) ANGIOTENSINÓGENO, B) NIVELES DE ENDOTELINA EN TEJIDO RENAL, C) NIVELES DE RNAM DEL RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II Y D) DE LA PROTEÍNA DEL RECEPTOR ETA Y E) DEL RECEPTOR ETB.

* $P < 0.05$ vs S, † $P < 0.05$ vs. I/R.

Se evaluó la participación de Angiotensina II, a través de la determinación de los niveles de RNAm de angiotensinógeno y de sus receptores AT₁ y AT₂. Como podemos observar en la Figura 12A no hubo diferencias significativas en los niveles de RNAm de angiotensinógeno en ninguno de los grupos. Con respecto a los niveles de RNAm del receptor AT₁, observamos que el grupo con I/R presentó un aumento significativo con respecto al grupo control. De forma interesante, los niveles de RNAm del receptor AT₁ en los animales que recibieron tratamiento con espironolactona después de la isquemia fueron similares al grupo control (Figura 12B). Los niveles de proteína del receptor AT₁, correspondieron con los niveles de RNAm, pues el daño por I/R produjo un aumento en la proteína del receptor, el cual se previno con la administración del antagonista de los receptores a mineralocorticoides en todos los grupos tratados (Figura 12C).

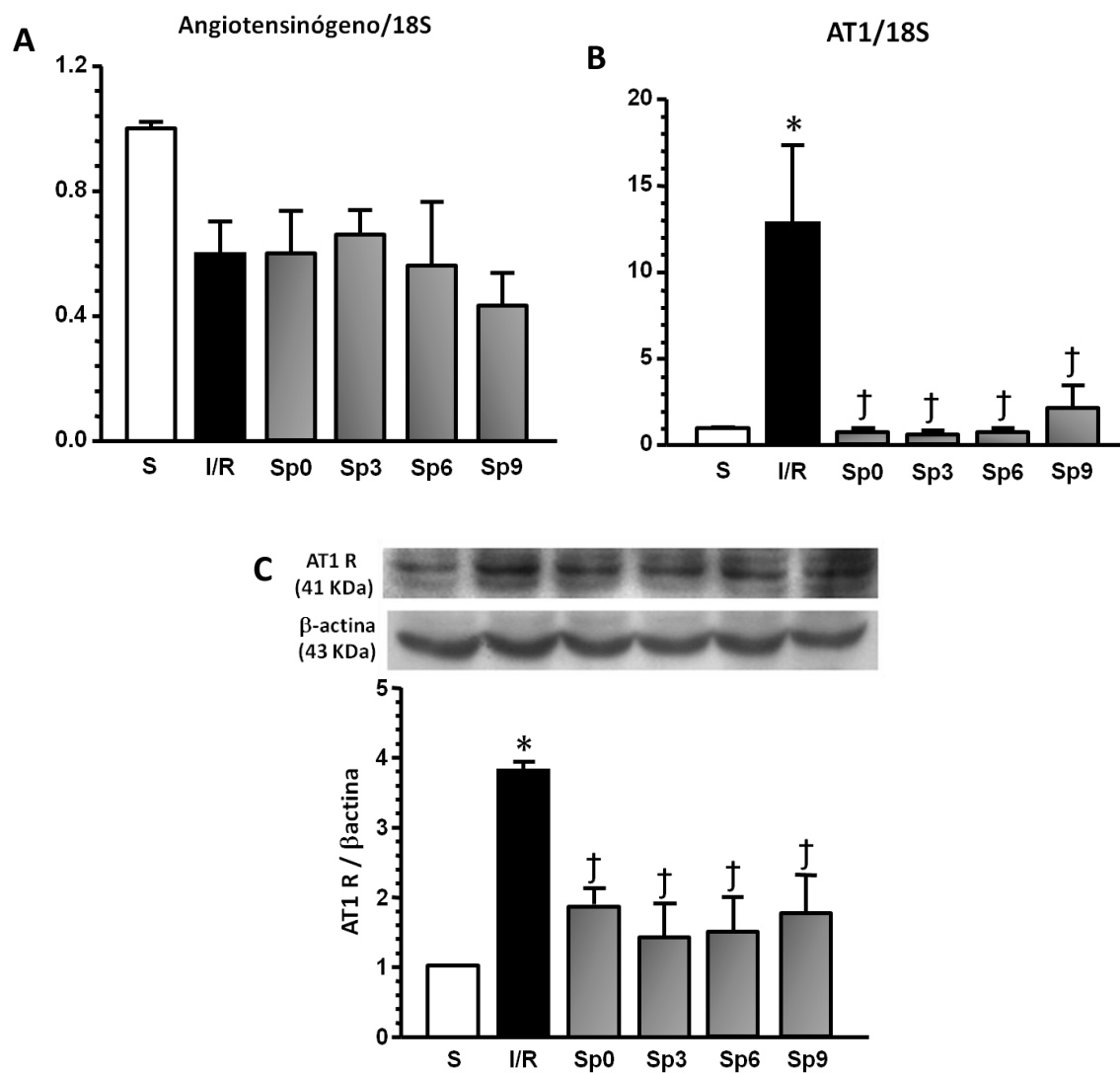


FIGURA 12. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RNAM DE A) ANGIOTENSINÓGENO, B) DEL RECEPTOR AT1 Y C) NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR AT1. * $P < 0.05$ vs S, † $P < 0.05$ vs. I/R

6. Discusión

En el presente estudio demostramos que el bloqueo de las acciones de aldosterona por medio de espironolactona después de haber inducido el insulto, protegió al riñón del daño por I/R.

En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio observamos que la administración de espironolactona de manera profiláctica protegió al riñón del daño por I/R²⁰⁷. Sin embargo, en la práctica clínica, la realidad es muy diferente, ya que no es posible prever el daño renal agudo, pues éste se presenta de manera inesperada. En el presente estudio observamos que el bloqueo de las acciones de aldosterona con espironolactona sí protege al riñón después de haber inducido el insulto y la renoprotección conferida se reflejó en la mejoría de la disfunción renal y en la disminución del daño tubular, manifestaciones características del daño inducido por I/R. Durante el daño renal inducido por I/R se presenta una caída importante del flujo sanguíneo renal posterior a la isquemia, el cual da como resultado que se produzca una reducción de la filtración glomerular^{145,207}. Nuestros resultados muestran en efecto, que los animales a los cuales se les produjo el daño por I/R, presentaron hipoperfusión e hipofiltración. De forma interesante, la administración de espironolactona evitó la caída del flujo sanguíneo renal y de la filtración glomerular. Este efecto renoprotector fue tiempo dependiente, pues el tratamiento con espironolactona inmediatamente después y a las 3 h de haber producido el insulto, fue más efectivo para evitar por completo el daño funcional por I/R, en cambio a las 6 h y 9 h el efecto renoprotector de espironolactona fue parcial. Estos hallazgos y los previamente reportados por nuestro laboratorio en este modelo de daño renal muestran que la aldosterona puede tener un papel importante en este modelo de daño renal agudo y que estas acciones son mediadas a través de los receptores a mineralocorticoides^{145,207}.

El bloqueo de las acciones de aldosterona puede producir hipercalcemia, debido a que impide la excreción de potasio, acción clásica de esta hormona, lo cual ocasiona una acumulación de potasio en el torrente sanguíneo. Este efecto indeseable, siempre ha preocupado a los clínicos, pero cuando determinamos el potasio en el suero de los animales estudiados, no encontramos diferencia entre los grupos de estudio. De hecho, diversos estudios han revelado que los sujetos que han recibido tratamiento con espironolactona y

han sido cuidadosamente monitoreados presentan una incidencia de hipercalemia baja^{235,236}. Estos estudios sugieren que la hipercalemia asociada al uso de espironolactona puede ser un evento no tan frecuente como se piensa.

Como era de esperarse la isquemia y por lo tanto la hipoperfusión que es el estímulo mas importante para aumentar la liberación de aldosterona, indujo un aumento significativo en los niveles séricos de aldosterona, lo que indica la activación del sistema renina angiotensina aldosterona en estos animales y por lo tanto concentraciones no fisiológicas de aldosterona.

El daño tubular producido por I/R se caracteriza por la formación de cilindros, pérdida del borde en cepillo, pérdida de la polaridad, descamación celular, apoptosis y necrosis de las células tubulares del segmento S3 del túbulo proximal. Para evaluar el daño por I/R, se determinó el porcentaje de cilindros como medida del daño tubular ocasionado. En este caso, observamos que el grupo de I/R presentó un incremento significativo en la formación de cilindros en la luz tubular, situación que no se observó en las ratas controles. En cambio, la administración de espironolactona evitó este aumento en todos los grupos que recibieron el tratamiento. Se determinaron los niveles de proteinuria, como un marcador de daño tubular y de acuerdo con nuestras observaciones previas^{145,207}, el grupo con I/R sin tratamiento presentó niveles elevados de este parámetro, los cuales disminuyeron con la administración de espironolactona de manera significativa cuando se administró a las 0 h y 3 h después de la isquemia, siendo este efecto menor cuando se administró a las 6 h y 9 h. También se utilizaron marcadores de daño tubular más específicos como lo son los niveles de RNAm de Kim-1 y la excreción urinaria de Hsp72. Los niveles de RNAm de Kim-1 fueron significativamente aumentados en el grupo con I/R como era de esperarse, pues en estudios anteriores se ha demostrado que esta molécula que no se expresa en condiciones normales, aumenta después de que se ha producido daño del epitelio tubular. De acuerdo a los hallazgos histopatológicos, la administración de espironolactona revirtió este efecto cuando se administró inmediatamente y a las 3 h de haber producido el insulto, de manera parcial a las 6 h y no se observó su efecto a las 9 h. En cuanto a Hsp72, decidimos evaluar su concentración urinaria debido a que un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio reveló que esta proteína es un biomarcador sensible y temprano para detectar el daño por I/R, además de tener la capacidad de estratificar el daño resultante²²⁸. En el presente estudio, Hsp72 no fue la excepción, ya que encontramos que los niveles de esta proteína en la orina

de los animales por I/R se encontraban significativamente elevados y que la renoprotección conferida por espirolactona se reflejó en la disminución de Hsp72. De forma interesante, la concentración de Hsp72 en la orina y de acuerdo con nuestros hallazgos histopatológicos, reflejó el grado de protección conferido por los diferentes intervalos en la administración de la espirolactona.

Al analizar el estrés oxidante por medio de los niveles de malondialdehído en tejido renal y el peróxido urinario, encontramos que estos coinciden con los niveles de daño tubular observado, de tal manera que hay una asociación entre el daño y el estrés oxidante. Así, el grupo con I/R presentó los niveles más altos, mientras que el tratamiento con espirolactona evitó el aumento de este marcador de estrés oxidante. En apoyo a esto, en el estudio de Leopold y *et al.*¹⁵⁸ demostraron que la infusión de aldosterona a través de bombas miniosmóticas produce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y un desequilibrio en el estado redox. Este desequilibrio se debe a una disminución de los niveles de NADP⁺ reducido (NADPH) y de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima limitante en la vía de las pentosas, a través de la cual semantiene al glutatión reducido, importante antioxidante. En otro estudio realizado en ratas sensibles a sal a las que se les administró dieta alta en sal, se observó un aumento en el estrés oxidante, el cual produjo la activación de los receptores mineralocorticoides, esta activación exacerbó el daño renal y la hipertensión como se demostró en otro estudio realizado en ratas Spague-Dawley con dieta alta en sal también^{237,238}. Estos estudios sugieren que aldosterona es capaz de incrementar la producción de las especies reactivas de oxígeno, a través de la activación de los receptores mineralocorticoides, y el bloqueo de los receptores evita el aumento del estrés oxidante como se encontró en el presente estudio.

También observamos un aumento aunque no significativo en los niveles de expresión de la cinasa Rho en el grupo al que se le indujo el daño por I/R. Este efecto que fue revertido con la administración de espirolactona. Se ha descrito que la cinasa Rho es capaz de inducir vasconstricción a través de al menos dos mecanismos: el primero es por medio de la fosforilación directa de la cadena ligera de miosina y el segundo es debido a que esta cinasa aumenta la fosforilación de treonina 495 de eNOS, la cual es una fosforilación inactivante para esta enzima lo que lleva a una reducción en la síntesis de NO y el consecuente aumento de la resistencia vascular. De acuerdo con esto, se informó

previamente que la inhibición de la cinasa Rho con fasudil en ratas con infusión crónica de aldosterona disminuyó el daño renal en estos animales¹⁴¹. Adicionalmente, en un estudio realizado por Ming *et al.*²³⁹ en células endoteliales aisladas de cordón umbilical humano se demostró que la cinasa Rho disminuye la expresión de la eNOS a través de la disminución de la fosforilación de Ser1177 (fosforilación activante), vía la inhibición de la proteína cinasa B/Akt. Estos hallazgos nos sugieren que parte de las acciones deletéreas de aldosterona podrían estar mediadas por la cinasa Rho, sin embargo no se conoce el mecanismo a través del cual la aldosterona la activa.

Recientemente se ha demostrado de manera categórica que la aldosterona regula la producción de endotelina-1 de manera transcripcional a través de su unión en el promotor del gen de endotelina-1⁶¹. Los resultados del presente estudio confirman la participación de aldosterona en la regulación de endotelina-1 y por consiguiente en la generación de vasoconstricción a través de este péptido, ya que el bloqueo de los receptores mineralocorticoides con espironolactona no sólo evitó el aumento de la expresión de endotelina, sino también evitó la caída del flujo sanguíneo renal. Este efecto, también repercutió en la expresión de sus receptores, ya que los niveles del receptor ETA asociado con la generación de vasoconstricción aumentaron en los animales no tratados, mientras que disminuyeron los niveles del receptor ETB relacionado con la producción de vasodilatación. De forma interesante, el tratamiento con espironolactona revirtió estos efectos, aunque los cambios no fueron significativos.

Finalmente, analizamos los receptores de angiotensina II, un octapéptido vasoconstrictor muy potente. Encontramos una elevación de los niveles de RNAm y de proteína en los receptores AT₁ implicados en la vasoconstricción, éste aumento en la expresión de AT₁, no se observó en los animales que recibieron espironolactona. Lo anterior sugiere que la aldosterona está ejerciendo acciones de vasoconstricción también a través de los receptores de angiotensina II. En apoyo a esto, en un estudio realizado en arteriolas mesentéricas aisladas de ratones knockout para los receptores AT₁, se demostró que la aldosterona produce vasoconstricción independiente del endotelio y que al parecer este efecto está mediado por la activación de los receptores AT₁ de angiotensina II²⁴⁰.

Por lo tanto, nuestro estudio sugiere que aldosterona podría estar causando vasoconstricción a través de la activación de moléculas que median vasoconstricción como

son la cinasa Rho, endotelina y angiotensina, lo cual se reflejó en disfunción renal e hipoperfusión y todos estos efectos fueron mediados por los receptores mineralocorticoides, dado que su bloqueo con espironolactona previno los cambios observados en estos factores vasoconstrictores.

Con todos los hallazgos previamente descritos sobre la disminución de la enzima G6PDH¹⁵⁸ y con los resultados obtenidos en este trabajo, diseñamos un esquema que se presenta a continuación, en el que proponemos algunos de los mecanismos que pudieran estar participando en el daño renal inducido por un fenómeno de I/R.

En resumen el aumento de aldosterona ocasiona un aumento en la expresión de endotelina-1 y de angiotensina II, las cuales al actuar a través de sus receptores ETA y AT₁ respectivamente, producen vasoconstricción. Por otro lado la aldosterona es capaz de aumentar la producción de radicales libres que a su vez también producen vasoconstricción, dicha producción de radicales libres la atribuimos a una posible disminución en la expresión de la enzima G6PDH y por consiguiente niveles reducidos de NADPH, esto de acuerdo a los estudios realizados por Leopold *et al.*¹⁵⁸. Asimismo, la aldosterona aumenta la expresión de la cinasa Rho, lo cual ocasiona un incremento en la producción de vasoconstricción, lo que creemos lleva a cabo a través de las cadenas ligeras de miosina.

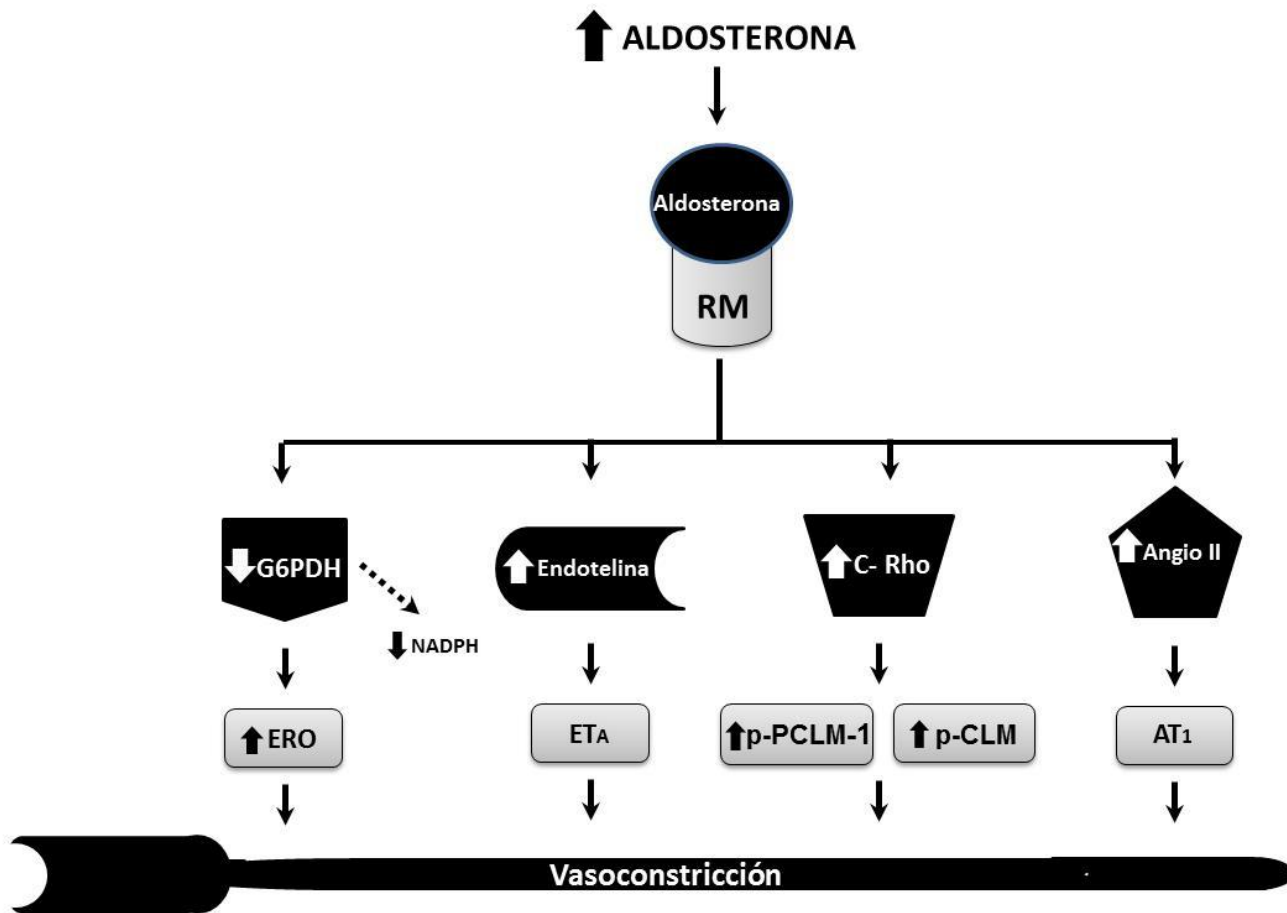


FIGURA 13. MECANISMOS SUGERIDOS MEDIANTE LOS CUALES LA ALDOSTERONA PODRÍA MEDIAR VASOCONSTRICCIÓN. SIGNIFICADO DE ABREVIATURAS: RM, RECEPTOR A MINERALOCORTICOIDE; G6PDH, ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA; RHO, CINASA RHO; ANGIO II, ANGIOTENSINA II; p-PCLM-1, FOSFATASA DE LA CADENA LIGERA DE MIOSINA FOSFORILADA; p-CLM, CADENA LIGERA DE MIOSINA FOSFORILADA; ETA, RECEPTOR A DE ENDOTELINA-1; AT₁, RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO I.

7. Conclusiones

- ▶ La aldosterona juega un papel central en la fisiopatología del daño renal inducido por I/R, ya que:
 - El bloqueo de sus receptores en forma inmediata, y hasta por 6 horas posteriores previno la lesión renal aguda.
 - el estrés oxidante y la vasoconstricción son parte esencial del mecanismo del daño renal inducido por Aldosterona
 - La cinasa Rho, la endotelina-1 y angiotensina II, son importantes factores mediadores de la vasoconstricción mediada por aldosterona.

- ▶ Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el bloqueo de los receptores a mineralocorticoides es una estrategia útil para prevenir la lesión renal aguda, no sólo cuando se administra antes de inducir el daño renal, sino también después de que éste ha ocurrido.

8. Bibliografía

1. Hernando L, Aljama P, Arias M, Caramelo C, Egido J, Lamas S. Nefrología Clínica. 2a edición. Editorial Panamericana. 2003.
2. Koeppen BM, Stanton BA. Renal Physiology. 2a edición. Mosby. 1997.
3. Guyton AC, Hall JE. Medical Physiology. 11va. Edición USA. Capítulos 19, 26. Págs. 223-231, 307-311.
4. Brenner BM, Rector FC. The Kidney. Volumen I. 4a edición. WB Saunders Company. 1991.
5. Navar LG. Aldosterone and the vasculature: mechanisms mediating resistant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 274:433-444, 1998.
6. Conger, JD, SA Falk. KCl and angiotensin responses in isolated rat renal arterioles: effects of diltiazem and low calcium medium. *Am J Physiol* 264 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 33): F134-F140, 1993.
7. Vallon V, Traynor T, Barajas L, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 12: 1599-606, 2001.
8. Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PBL, Svenningsen P, Bie P, Skøtt O, Jensen BL. Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch Epub ahead of print* 2012.
9. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skøtt O, Kurtz A. Renin release. *Physiology* 22:310-319, 2007.
10. Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, Mullins JJ. Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest* 98:1966-1970, 1996.
11. Prescott G, Silversides DW, Reudelhuber TL. Tissue activity of circulating prorenin. *Am J Hypertens* 15:280-285, 2002.
12. Stankovic AR, Fisher NDL, Hollenberg NK. Prorenin and angiotensin-dependent renal vasoconstriction in type 1 and type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 17:3293-3299, 2006.
13. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of Kidney Renin. *Physiol Rev* 90: 607-673, 2010.
14. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endoc Rev* 24: 261-271, 2003.

15. Hubert C, Gasc JM, Berger S, Schütz G, Corvol P. Effects of mineralocorticoid receptor gene disruption on the components of the renin-angiotensin system in 8-day-old mice. *Mol Endocrinol* 13:294-306, 1999.
16. Muller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragnun D, Costerousse O, Menard J, Luft FC. Vascular angiotensin converting enzyme expression regulates local angiotensin II. *Hypertension* 29:98-104, 1997.
17. Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signal and effects. *Hypertension* 45:163-169, 2005.
18. Semple PF. The effects of hemorrhage and sodium depletion on plasma concentrations of angiotensin II and [des-Asp¹]angiotensin II in the rat. *Endocrinology* 107:771-773, 1980.
19. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472, 2000.
20. Whitebread S, Mele M, Kamber B, De Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163:284-291, 1989.
21. Douglas JG. Potassium ion as a regulator of adrenal angiotensin II receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 239:E317-E321, 1980.
22. Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 111:2509-2517, 2005.
23. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease—therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7:3-14, 2006.
24. Lara LS, McCormack M, Semprum-Prieto LC, Shenouda S, Majid DS, Kobori H, Navar LG, Prieto MC. AT1 receptor-mediated augmentation of angiotensinogen, oxidative stress, and inflammation in ANG II-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 302:F85-F94, 2012.
25. Nahmias C, Strosberg D. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal -transduction pathways and physiological function. *Trends in Pharmacological Sciences* 16:223-225, 1995.
26. Touyz RM, Endemann D, He G, Li J-S, Schiffrin EL. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. *Hypertension* 33:366-373., 1999.
27. Qi Y, Li H, Shenoy V, Li Q, Wong F, Zhang L, Raizada MK, Sumners C, Katovich MJ. Moderate cardiac-selective overexpression of angiotensin II type 2 receptor protects cardiac functions from ischaemic injury. *Exp Physiol* 97:89-101, 2012.

28. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Ichiki T, Gaffney A & Inagami T. Ang II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy fibrosis in chronic Ang II-induced hypertension. *Circulation*, 104:346-351, 2001.
29. Horiuchi M, Akishiita M & Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 33:613-621, 1999.
30. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35:1270-1277, 2000.
31. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 39:316-322, 2002.
32. Hayden MR, Sowers KM, Pulakat L, Joginpally T, Krueger B, Whaley-Connell A, Sowers JR. Possible mechanisms of local tissue renin-angiotensin system activation in the cardiorenal metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Cardiorenal Med* 1:193-210, 2011.
33. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24:261-71, 2003.
34. Gomez RA, Lynch KR, Chevalier RL, Wilfong N, Everett A, Carey RM, Peach MJ Renin and angiotensinogen gene expression in the maturing rat kidney. *Am J Physiol* 254:F582-F587, 1988.
35. Ingelfinger J, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. *J Clin Invest* 85:417-423, 1990.
36. Reinhold SW, Krüger B, Barner C, Zoicas F, Kammerl MC, Hoffmann U, Bergler T, Banas B, Krämer BK. Nephron-specific expression of components of the renin-angiotensin-aldosterone system in the mouse kidney. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 13:46-55, 2012.
37. Darby IA, Sernia C. In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res* 281:197-206, 1995.
38. Pohl M, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. *J Biol Chem* 31:285:41935-41946, 2010.
39. Nishiyama A, Seth DM, Navar LG. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension* 39:129-134, 2002.
40. Campbell DJ. Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension* 51:1259-1264, 2008.
41. Wilkinson-Berka JL, Miller AG, Binger KJ. Prorenin and the (pro)renin receptor: recent advances and implications for retinal development and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20:69-76, 2011.

42. Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nabi AH, Uddin MN, Nakagawa T, Nishiyama A, Suzuki F, Inagami T, Itoh H. Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* 18:1789-1795, 2007.
43. Huang J, Siragy HM. Glucose promotes the production of interleukine-1beta and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (Pro)renin receptor expression. *Endocrinology* 150:5557-5565, 2009.
44. Zhang J, Wu J, Gu C, Noble NA, Border WA, Huang Y. Receptor-mediated nonproteolytic activation of prorenin and induction of TGF- β 1 and PAI-1 expression in renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 303:F11-20, 2012.
45. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275:33238-33243, 2000.
46. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87:E1-E9, 2000.
47. Ferrario CM, Varagic J. The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F1297-F1305, 2010.
48. Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin (1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 284:388-398, 1998.
49. Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 14:1019-1031, 2005.
50. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8258-8263, 2003.
51. Chappell MC. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* 50:596-599, 2007.
52. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM. Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest* 116:2218-2225, 2006.

53. Burgelova M, Vanourkova Z, Thumova M, Dvorak P, Opocensky M, Kramer HJ, Zelizko M, Maly J, Bader M, Cervenka L. Impairment of the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis contributes to the acceleration of two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension. *J Hypertens* 27:1988-2000, 2009.
54. Santos RA, Ferreira AJ, Simões E Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93:519-527, 2008.
55. Binart N, Lombès M, Baulieu EE. Distinct functions of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem J* 311:797-804, 1995.
56. Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Litwack G. The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* 7:85-98, 1997.
57. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360, 1997.
58. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14552-14557, 1998.
59. Cho JH, Musch MW, Bookstein CM, McSwine RL, Rabenau K, Chang EB. Aldosterone stimulates intestinal Na-absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C586-C594, 1998.
60. Náráy-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G. The sgk an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int* 57: 1290-1294, 2000.
61. Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Rudin A, Cain BD, Wingo CS. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J Biol Chem* 284:30087-30096, 2009.
62. Müller J, Lauber M. Regulation of aldosterone biosynthesis: a continual challenge. *Am J Hypertens* 4:280-282, 1991.
63. Muller J. Regulation of aldosterone biosynthesis: the end of the road? *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 25:S79-S85, 1998.
64. Kojima K, Kojima I, Rasmussen H. Dihydropyridine calcium agonist and antagonist effects on aldosterone secretion. *AmJ Physiol* 247:E645-E650, 1984.
65. Barrett PQ, Bollag WB, Isales CM, McCarthy RT, Rasmussen H. Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocr Rev* 10:496-518, 1989.

66. Cherradi N, Pardo B, Greenberg AS, Kraemer FB, Capponi AM. Angiotensin II activates cholesterol ester hydrolase in bovine adrenal glomerulosa cells through phosphorylation mediated by p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 144:4905–4915, 2003.
67. Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly J, Wang XJ, StoccoDM, CapponiAM. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3_β-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 272:7899–7907, 1997.
68. Wiederkehr A, Szanda G, Akhmedov D, Matakı C, Heizmann CW, Schoonjans K, Pozzan T, Spät A, WollheimCB. Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab* 13:601–611, 2011.
69. Guagliardo NA, Yao J, Hu C, Barrett PQ. Minireview: aldosterone biosynthesis: electrically gated for our protection. *Endocrinology* 153:3579-86, 2012.
70. Fellner SK, Arendshorst WJ. Angiotensin II Ca²⁺ signaling in rat afferent arterioles: stimulation of cyclic ADP ribose and IP₃ pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F785-F791, 2005.
71. Uebele VN, Nuss CE, Renger JJ, Connolly TM. Role of voltage-gated calcium channels in potassium-stimulated aldosterone secretion from rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92:209-18, 2004.
72. Griekspoor A, Zwart W, Neefjes J, Michalides R. Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nucl Recept Signal* 5: e003, 2007.
73. Sutanto W, de Kloet ER. Mineralocorticoid receptor ligands: biochemical, pharmacological, and clinical aspects. *Medicinal Research Reviews* 11:617–639, 1991.
74. Yang J, Fuller PJ. Interactions of the mineralocorticoid receptor – Within and without. *Mol Cell Endocrinol* 350:196-205, 2012.
75. Fuse H, Kitagawa H, Kato S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol Endoc* 14:889–899, 2000.
76. Fischer K, Kelly SM, Watt K, Price NC, McEwan IJ. Conformation of the mineralocorticoid receptor N-terminal domain: evidence for induced and stable structure. *Molecular Endocrinology* 24:1935–1948, 2010.
77. Yang J, Chang C, Safi R, Morgan J, McDonnell DP, Fuller PJ, Clyne CD, Young MJ. Identification of ligand-selective peptide antagonists of the mineralocorticoid receptor using phage display. *Molecular Endocrinology* 25:32–43, 2010.

78. Faresse N, Ruffieux-Daidie D, Salamin MI, Gomez-Sanchez CE, Staub O. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 299:F1462-F1472, 2010.
79. Grossman C, Ruhs S, Langenbruch L, Mildenerger S, Strätz N, Schumann K, Gekle M. Nuclear Shuttling Precedes Dimerization in Mineralocorticoid Receptor Signaling. *Chem Biol* 19:742-51, 2012.
80. Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 292: E1790-E1800, 2007.
81. Kolkhof P, Borden SA. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: Prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol* 350: 310-7, 2012.
82. Pitt B, Filippatos G, Gheorghiadu M, Kober L, Krum H, Ponikowski P, Nowack C, Kolkhof P, Kim SY, Zannad F. Rationale and design of ARTS: a randomized, double-blind study of BAY 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease. *Eur J Heart Fail* 14:668-75, 2012.
83. Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 345:1689-1697, 2001.
84. Gardiner P, Schrode K, Quinlan D, et al. Spironolactone metabolism: Steady-state serum levels of sulfur-containing metabolites. *J Clin Pharmacol* 29:342-347, 1989.
85. Brown NJ. Eplerenone: Cardiovascular protection. *Circulation*. 107:2512-2518, 2003.
86. Ravis WR, Reid S, Sica DA, Tolbert DS. Pharmacokinetics of eplerenone after single and multiple dosing in subjects with and without renal impairment. *J Clin Pharmacol* 45: 810-821, 2005.
87. Maron BA, Leopold JA. Mineralocorticoid receptor antagonists and endothelial function. *Curr Opin Investig Drugs* 9:963-969, 2008.
88. Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B, Gekle M. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 19:1697-1710, 2005.
89. Alzamora R, Brown LR; Harvey BJ. Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17beta-estradiol. *Mol Endocrinol* 21:2637-2650, 2007.
90. Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park JK, Shagdarsuren E, Lindschau C, Dechend R, Viedt C, Pilz B, Haller H, Luft FC. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109: 2792-800, 2004.
91. Wehling M. Nongenomic aldosterone effects: the cell membrane as a specific target of mineralocorticoid action. *Steroids* 60:153-6, 1995.

92. Ngarmukos C, Grekin RJ. Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1122-E1127, 2001.
93. Christ M, Wehling M. Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Steroids* 64: 35-41, 1999.
94. Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K, Wehling M. Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25:117-23, 1995.
95. Grossmann C, Gekle M. Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *Steroids* 73:973-8, 2008.
96. Heylen E, Huang A, Sun D, Kaley G. Nitric oxide-mediated dilation of arterioles to intraluminal administration of aldosterone. *J Cardiovasc Pharmacol* 54(6): 535-542, 2009.
97. Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, Feldman RS. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* 57: 442-51, 2011.
98. Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Husse B, Gekle M. EF Domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *J Biol Chem* 283: 7109-16, 2008.
99. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2; 97: 434-42, 2005.
100. Schmidt BM, Oehmer S, Delles C, Bratke R, Schneider MP, Klingbeil A, Fleischmann EH, Schmieder RE. Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature. *Hypertension* 42: 156-60, 2003.
101. Nietlispach F, Julius B, Schindler R, Bernheim A, Binkert C, Kiowski W, Brunner-La Rocca HP. Influence of acute and chronic mineralocorticoid excess on endothelial function in healthy men. *Hypertension* 50:82-8, 2007.
102. Schmidt BM, Sammer U, Fleischmann I, Schlaich M, Delles C, Schmieder RE. Rapid nongenomic effects of aldosterone on the renal vasculature in humans. *Hypertension* 47:650-655, 2006.
103. Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 678-85, 1989.
104. Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158:348-52, 1989.

105. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411: 217-30, 1999.
106. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 90: 1168-72, 1992.
107. Martin ER, Marsden PA, Brenner BM, Ballermann BJ. Identification and characterization of endothelin binding sites in rat renal papillary and glomerular membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 162:130-7, 1989.
108. Stroes E, Hijmering M, van ZM, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 438(3):161-4, 1998.
109. Cortes-Gonzalez CC, Ramirez-Gonzalez V, Ariza AC, Bobadilla NA. [Functional significance of heat shock protein 90]. *Rev Invest Clin* 60:311-20, 2008.
110. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C499-C508, 2003.
111. Lee DL, Sasser JM, Hobbs JL, Boriskie A, Pollock DM, Carmines PK, Pollock JS. Posttranslational regulation of NO synthase activity in the renal medulla of diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F82-F90, 2005.
112. Mount PF, Fraser SA, Watanabe Y et al. Phosphorylation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in the kidney with high and low salt diets. *Nephron Physiol* 102:36-50, 2006.
113. Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, Hirata Y, Naruse M. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension* 48:165-71, 2006.
114. Atochin DN, Wang A, Liu VW, Critchlow JD, Dantas AP, Looft-Wilson R, Murata T, Salomone S, Shin HK, Ayata C, Moskowitz MA, Michel T, Sessa WC, Huang PL. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J Clin Invest* 117:1961-7, 2007.
115. Kosugi T, Heinig M, Nakayama T, Matsuo S, Nakagawa T. eNOS knockout mice with advanced diabetic nephropathy have less benefit from renin-angiotensin blockade than from aldosterone receptor antagonists. *Am J Pathol* 176:619-29, 2010.
116. Godfrey V, Martin AL, Struthers AD, Lyles GA. Effects of aldosterone and related steroids on LPS-induced increased expression of inducible NOS in rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 164:2003-14, 2011.
117. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-5, 1988.
118. Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 126:391-8, 1999.

119. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111:508-31, 2006.
120. Nguyen TD, Vequaud P, Thorin E. Effects of endothelin receptor antagonists and nitric oxide on myogenic tone and alpha-adrenergic-dependent contractions of rabbit resistance arteries. *Cardiovasc Res* 43:755-61, 1999.
121. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46:325-415, 1994.
122. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:851-76, 2001.
123. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:235-55, 1995.
124. Lehrke I, Waldherr R, Ritz E, Wagner J. Renal endothelin-1 and endothelin receptor type B expression in glomerular diseases with proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 12:2321-9, 2001.
125. Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch* 459:951-8, 2010.
126. Strachan FE, Spratt JC, Wilkinson IB, Johnston NR, Gray GA, Webb DJ. Systemic blockade of the endothelin-B receptor increases peripheral vascular resistance in healthy men. *Hypertension* 33:581-5, 1999.
127. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 2001 September 104:1114-8.
128. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85:587-590, 1990.
129. King AJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Brenner BM. Systemic hemodynamic effects of endothelin in rats. *Am J Physiol* 258:H787-H792, 1990.
130. Gilbert P, Thorin E. Endothelin-1 limits vascular smooth muscle beta-adrenergic receptor sensitivity by a PKC-dependent pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:534-8, 2003.
131. Okajima M, Parent R, Thorin E, Lavalée M. Pathophysiological plasma ET-1 levels antagonize beta-adrenergic dilation of coronary resistance vessels in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1476-H1483, 2004.
132. Sauvageau S, Thorin E, Villeneuve L, Dupuis J. Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: role of ETB-receptor expression levels. *Pulm Pharmacol Ther* 22:311-7, 2009.
133. Herrera M, Garvin JL. A high-salt diet stimulates thick ascending limb eNOS expression by raising medullary osmolality and increasing release of endothelin-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F58-F64, 2005.

134. Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ et al. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J Biol Chem* 284:30087-96, 2009.
135. Nguyen Dinh CA, Griol-Charhbili V, Loufrani L, Labat C, Benjamin L, Farman N, Lacolley P, Henrion D, Jaisser F. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J* 24:2454-63, 2010.
136. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16:5313-27, 1996.
137. Amano M, Ito M, Kimura K et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271:20246-9, 1996.
138. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N et al. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 147:1023-38, 1999.
139. van Nieuw Amerongen GP, van DS, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* 87:335-40, 2000.
140. Martinez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P et al. Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases, and Rho kinase in Ca(2+) handling of human small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1228-H1238, 2000.
141. Sun GP, Kohno M, Guo, Nagai Y, Miyata K, Fan YY, Kimura S, Kiyomoto H, Ohmori K, Li DT, Abe Y, Nishiyama A. Involvements of rho-kinase and tgf-Beta pathways in aldosterone-induced renal injury. *J Am Soc Nephrol* 17:2193-201, 2006.
142. Nishikimi T, Matsuoka H. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effect of rho-kinase inhibitor in hypertensive glomerulosclerosis. *J Pharmacol Sci* 100:22-8, 2006.
143. Versteilen AM, Korstjens IJ, Musters RJ, Groeneveld AB, Sipkema P. Rho kinase regulates renal blood flow by modulating eNOS activity in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F606-F611, 2006.
144. Miyata K, Hitomi H, Guo P et al. Possible involvement of Rho-kinase in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell remodeling. *Hypertens Res* 31:1407-13, 2008.
145. Ramírez V, Trujillo J, Valdes R, Uribe N, Cruz C, Gamba G, Bobadilla NA. Adrenalectomy prevents renal ischemia-perfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:F932-F942, 2009.
146. Doi T, Sakoda T, Akagami T et al. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/Rho-kinase, and PPARs in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1279-H1287, 2008.

147. Fujimura N, Noma K, Hata T, Soga J, Hidaka T, Idei N, Fujii Y, Mikami S, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kihara Y, Chayama K, Kato H, Liao JK, Higashi Y; ROCK study group. Mineralocorticoid receptor blocker eplerenone improves endothelial function and inhibits Rho-associated kinase activity in patients with hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 91: 289-297, 2012.
148. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis* 46:45-51, 2005.
149. Bertocchio JP, Jaisser F. [Aldosterone and kidney diseases: an emergent paradigm with important clinical implications]. *Nephrol Ther* 7:139-47, 2011.
150. Chrysostomou A, Pedagogos E, MacGregor L, Becker GJ. Double-Blind, Placebo-Controlled Study on the Effect of the Aldosterone Receptor Antagonist spironolactone in Patients Who Have Persistent Proteinuria and Are on Long-Term Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy, with or without an Angiotensin II Receptor Blocker. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:256-62, 2006.
151. Nielsen SE, Persson F, Frandsen E, Sugaya T, Hess G, Zdunek D, Shjoedt KJ, Parving HH, Rossing P. Spironolactone diminishes urinary albumin excretion in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria: a randomized placebo-controlled crossover study. *Diabet Med* 29:e184-e189, 2012.
152. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 63: 1791-1800, 2003.
153. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, Kondo S, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt induced hypertensive rats. *Hypertension* 43: 841-848, 2004.
154. Ma J, Weisberg A, Griffin JP, Vaughan DE, Fogo AB, Brown NJ. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against aldosterone-induced glomerular injury. *Kidney Int* 69: 1064-1072, 2006.
155. Yuan J, Jia R, Bao Y. Aldosterone up-regulates production of plasminogen activator inhibitor-1 by renal mesangial cells. *J Biochem Mol Biol* 40:180-188, 2007.
156. Chun TY, Chander PN, Kim JW, Pratt JH, Stier CT Jr. Aldosterone, but not angiotensinII, increased profibrotic factors in the kidney of adrenalectomized stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E305-E312, 2008.

157. Huang W, Xu C, Kahng KW, Noble NA, Border WA, Huang Y. Aldosterone and TGF β 1 synergistically increase PAI-1 and decrease matrix degradation in rat renal mesangial and fibroblast cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1287-F1295, 2008.
158. Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med* 13:189-197, 2007.
159. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Practitioner* 163: 393-405, 1949.
160. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H176-H184, 2003.
161. Stehr CB, Mellado R, Ocaranza MP, Carvajal CA, Mosso L, Becerra E, Solis M, García L, Lavandero S, Jalil J, Fardella CE. Increased levels of oxidative stress, subclinical inflammation, and myocardial fibrosis markers in primary aldosteronism patients. *J Hypertens* 28:2120-6, 2010.
162. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341: 709-717, 1999.
163. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleiman J. The EPHESUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther* 15:79-87, 2001.
164. Beiguy F, Collet JP, Benoliel JJ, Vignolles N, Dumaine R, Barthélémy O, Montalescot G. High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 114: 2604-2610, 2006.
165. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1802-H1810, 2002.
166. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology* 143:4822-4836, 2002.

167. Sartorio CL, Fraccarollo D, Galuppo P, Leutke M, Ertl G, Stefanon I, Bauersachs J. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 50:919-925, 2007.
168. Greene EL, Krene S, Hostetter TH. Role of Aldosterone in the Remnant Kidney Model in the Rat. *J Clin Invest* 98:1063-1068, 1996.
169. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT Jr. Role of Aldosterone in Renal Vascular Injury in Stroke-Prone Hypertensive Rats. *Hypertension* 33:232-237, 1999.
170. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* 49:355-364, 2007.
171. Nagase M, Yoshida S, Shibata S, Nagase T, Gotoda T, Ando K, Fujita T. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol* 17: 3438-3446, 2006.
172. Nagase M, Matsui H, Shibata S, Gotoda T, Fujita T. Salt induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. *Hypertension* 50: 877-883, 2007.
173. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 41: 64-68, 2003.
174. Guo C, Martinez-Vasquez D, Mendez GP, Toniolo MF, Yao TM, Oestreicher EM, Kikuchi T, Lapointe N, Pojoga L, Williams GH, Ricchiuti V, Adler GK. Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus. *Endocrinology* 147: 5363-5373, 2006.
175. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114:5-14, 2004.
176. Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol* 12:S142-S151, 1999.
177. Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther* 4:25-37, 1997.
178. Brooks DP. Role of endothelin in renal function and dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:345-348, 1996.
179. Kurata H, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol* 517(3):232-239, 2005.
180. da Silveira KD, et al. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond)* 119:385-394, 2010.

181. Kwon O, Hong SM, Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F25-F33, 2009.
182. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 66:480-485, 2004.
183. Schrier RW, Berl T, Bonventre. Atlas of diseases of the kidney. Volumen 1. 1a. edición. Wiley-Blackwell 1999. Capítulo 14 Pág. 14.2.
184. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:427-434, 2000.
185. Blantz RC, Deng A, Miracle CM, Thomson SC. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 118:23-43, 2007.
186. Gailit J, Colflesh Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol* 264:F149-F157, 1993.
187. Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol* 275(3 pt 1):C711-C731, 1998.
188. Wangsiripaisan A, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW. Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int* 59:932-940, 2001.
189. Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F1037-F1053, 2001.
190. Goligorsky, MS, DiBona GF Pathogenetic role of Arg-Gly-Asp-recognizing integrins in acute renal failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5700-5704, 1993.
191. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 66:480-5, 2004.
192. Kelly KJ, Molitoris BA. Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* 20:4-19, 2000.
193. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66:486-91, 2004.
194. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 83:162-70, 1996.
195. Wu I, Parikh CR. Screening for kidney diseases: older measures versus novel biomarkers. *Clin J Am Soc Nephrol* 3:1895-901, 2008.

196. Kelly KJ. Acute renal failure: much more than a kidney disease. *Semin Nephrol* 26:105-13, 2006.
197. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 110(6):835-42, 2002.
198. Safdar A, Ma J, Saliba F et al. Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 89:236-44, 2010.
199. John R, Herzenberg AM. Renal toxicity of therapeutic drugs. *J Clin Pathol* 62:505-15, 2009.
200. Taber SS, Pasko DA. The epidemiology of drug-induced disorders: the kidney. *Expert Opin Drug Saf* 7:679-690, 2008.
201. Daemen MA, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 73: 1693-1700, 2002.
202. Qiao X, Chen X, Wu D, Ding R, Wang J, Hong Q, Shi S, Li J, Xie Y, Lu Y, Wang Z. Mitochondrial pathway is responsible for aging-related increase of tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 830-839, 2005.
203. Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contribution of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F608-F627, 2003.
204. Versteilen AM, Di Maggio F, Leemreis JR, Groeneveld AB, Musters RJ, Sipkema P. Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia-reperfusion. *Int J Artif Organs* 27: 1019-1029, 2004.
205. Feria I, Pichardo I, Juárez P, Ramírez V, González MA, Uribe N, García-Torres R, López-Casillas F, Gamba G, Bobadilla NA. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63: 43-52, 2003.
206. Pérez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, Trujillo J, Vaidya VS, Uribe N, Bonventre JV, Gamba G, Bobadilla NA. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F131-F139, 2006.
207. Mejía-Villet JM, Ramírez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F78-F86, 2007.
208. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1:162-79, 1990.
209. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 35:333-46, 2000.

210. Mihatsch MJ, Morozumi K, Strøm EH, Ryffel B, Gudat F, Thiel G. Renal transplant morphology after long-term therapy with cyclosporine. *Transplant Proc* 27(1):39-42, 1995.
211. Li C, Yang CW, Kim WY, Jung JY, Cha JH, Kim YS, Kim J, Bennett WM, Bang BK. Reversibility of chronic cyclosporine nephropathy in rats after withdrawal of cyclosporine. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F389-98, 2003.
212. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, Piccinelli A, Remuzzi G. Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin Nephrol* 25:S83-S88, 1986.
213. Rosen S, Greenfeld Z, Brezis M. Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury. *Transplantation* 49:445-52, 1990.
214. Pérez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martínez de la Maza L, Gamba G, Bobadilla NA. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F1020-30, 2005.
215. Arima S, Kohagura K, Xu HL, Sugawara A, Abe T, Satoh F, Takeuchi K, Ito S. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 14:2255-63, 2003.
216. Gros R, Ding Q, Armstrong S, O'Neil C, Pickering JG, Feldman RD. Rapid effects of aldosterone on clonal human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C788-94, 2007.
217. Schiffrin EL, Thomé FS, Genest J. Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension* 6:682-8, 1984.
218. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*. 33:981-6, 1999.
219. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology. *Semin Nephrol* 24:316-23, 2004.
220. Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang GX, Sun GP, Kimura S, Yukimura T, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Nishiyama A. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 16:2906-12, 2005.
221. Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, Judge S, Heo J, Colucci WS, Siwik DA, Sam F. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 46:555-61, 2005.

222. Kaushal GP, Basnakian AG, Shah SV. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66(2):500-6, 2004.
223. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 17:3115-23, 2006.
224. Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenameele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 104:541-9, 1999.
225. Perez-Rojas JM, Blanco JA, Gamba G, Bobadilla NA. Low calorie commercial sugar is a sensitive marker of glomerular filtration rate. *Kidney Int* 68:1888-1893, 2005.
226. Davidson DW, Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62:351-356, 1963.
227. Henry RJ, Segalove M, Sobel C. Turbidimetric determination of proteins with sulfoasalicic and trichloroacetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:748-751, 1956.
228. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Cortés-González C, Ojeda-Cervantes M, Gamba G, Morales-Buenrostro LE, Bobadilla NA. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol Med* 3:5-20, 2011.
229. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408, 2001.
230. Tamirisa KP, Aaronson KD, Koelling TM. Spironolactone-induced renal insufficiency and hyperkalemia in patients with heart failure. *Am Heart J* 148:971-978, 2004.
231. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 307(4):284-292, 1994.
232. Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z. Postischemic reperfusion injury. Biochemical and methodological principles. *Urologe A* 41(2):159-63, 2002.
233. Dong M, Liao JK, Fang F, Lee AP, Yan BP, Liu M, Yu CM. Increased Rho kinase activity in congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 14(9):965-73, 2012.
234. Prakash J, de Borst MH, Lacombe M, Opdam F, Klok PA, van Goor H, Meijer DK, Moolenaar F, Poelstra K, Kok RJ. Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion-induced injury. *J Am Soc Nephrol* 19:2086-97, 2008.
235. Wei L, Struthers AD, Fahey T, Watson AD, Macdonald TM. Spironolactone use and renal toxicity: population based longitudinal analysis. *BMJ* 18:340:c1768, 2010.
236. Baker WL, White WB. Safety of mineralocorticoid receptor antagonists in patients receiving hemodialysis. *Ann Pharmacother* 46:889-94, 2012.

237. Kawarazaki H, Ando K, Nagae A, Fujita M, Matsui H, Fujita T. Mineralocorticoid receptor activation contributes to salt-induced hypertension and renal injury in prepubertal Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant* 25:2879-2889, 2010.
238. Wang H, Shimosawa T, Matsui H, Kaneko T, Ogura S, Uetake Y, Takenaka K, Yatomi Y, Fujita T. Paradoxical mineralocorticoid receptor activation and left ventricular diastolic dysfunction under high oxidative stress conditions. *J Hypertens* 26:1453-1462, 2008.
239. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 22: 8467-8477, 2002.
240. Yamada M, Kushibiki M, Osanai T, Tomita H, Okumura K. Vasoconstrictor effect of aldosterone via angiotensin II type 1 (AT1) receptor: possible role of AT1 receptor dimerization. *Cardiovasc Res* 79:169-78, 2008.