



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
Especialidad en Medicina (Nefrología)

Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán

**“EXPRESIÓN/FOSFORILACIÓN DE NCC EN PACIENTES
TRASPLANTADOS RENALES HIPERTENSOS”**

Tesis de Posgrado

Que para obtener el grado de :

Especialista en Nefrología

Presenta:

Dr. Aldo Rodrigo Jiménez Vega

Tutor de tesis:

Dr. Gerardo Gamba Ayala

Director de Investigación

Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán

México, Distrito Federal, Mayo 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

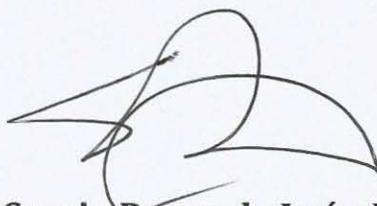


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



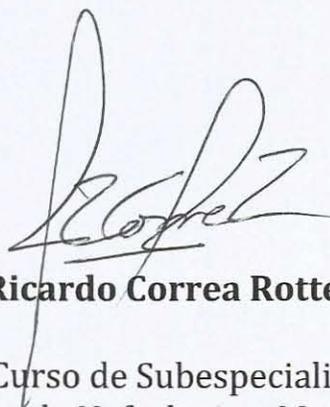
Dr. Sergio Ponce de León Rosales

Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dr. Gerardo Gamba Ayala

Director de Investigación
Director de Tesis
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán



Dr. Ricardo Correa Rotter

Profesor Titular del Curso de Subespecialidad en Nefrología
Jefe del Departamento de Nefrologia y Metabolismo Mineral

INDICE

1.-INTRODUCCIÓN	5
2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3.-JUSTIFICACIÓN	10
4.-HIPOTESIS	11
5.-OBJETIVOS	11
6.-MATERIAL Y METODOS	12
7.-RESULTADOS	15
8.-DISCUSIÓN	18
9.-CONCLUSIONES	21
10.-ANEXOS	22
11.-BIBLIOGRAFIA	26

Abreviaturas

Cr	Creatinina
CTS	Collaborative study
DM	Diabetes mellitus
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCT	Enfermedad renal crónica terminal
HTA	Hipertensión arterial
ICN	Inhibidores de calcineurina
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IMC	Índice de masa corporal
MAPA	Medición ambulatoria de presión arterial
MDRD	Modification of <i>Diet</i> in Renal Disease
NCC	Cotransportador NaCl
PAS	Tensión arterial sistólica
PAD	Tensión arterial diastólica
PHAI	Pseudohipoaldosteronismo familiar tipo II
PreTR	Pretrasplante renal
TFG	Tasa de filtrado glomerular
TFGe	Tasa de filtrado glomerular estimada
TS	Terapia sustitutiva

INTRODUCCION

La enfermedad renal crónica (ERC) se define como una tasa de filtrado glomerular (TFG) menor de 60ml/min/1.73m² y/o daño renal, determinado por proteinuria, hematuria, alteraciones estructurales en imagen o histológicas, por un periodo igual o mayor a 3 meses. La enfermedad renal crónica terminal (ERCT) representa el final del espectro de la ERC con repercusiones medicas, sociales y económicas para el paciente, la familia y la nación. (1,2)

Su creciente prevalencia y carga desproporcionada, va de la mano de un incremento en los factores de riesgo para ERC, como lo son la diabetes, hipertensión, obesidad y mayor longevidad de la población. Lo que la convierte en un problema sustancial de salud publica.

Los tratamientos de la ERCT involucran la sustitución de la función renal en menor o mayor medida con terapias dialíticas (hemodiálisis o diálisis peritoneal) y trasplante renal respectivamente. Esta ultima siendo la forma de sustituir la función renal con mejores desenlaces en términos de mortalidad y calidad de vida.

Debido a esto la demanda de pacientes con ERC que requieren trasplante renal continua sobrepasando la oferta.

Wolfe y colaboradores demostraron un mayor riesgo de muerte en los primeros 3 meses postrasplante comparado con pacientes en lista de espera de trasplante renal y una disminución de la mortalidad después de 8 meses postrasplante (3).

Sin embargo, la vida media del injerto es limitada. Situándose en 11.9 años para injertos de donador vivo y 8 años para injertos de donador cadavérico (4).

En la serie de los primeros mil trasplantes realizados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador de 1967 a 2011, de los cuales 201 fueron de donador fallecido y el resto de donador vivo, la mayor parte relacionado. En esta serie la sobrevida del injerto a cinco, diez, 15 y 20 años fue de 76.8, 62.5, 49.3 y 40.4%, respectivamente (5).

Los avances en los últimos años en lo que a trasplante renal se refiere, han sido primordialmente en el ámbito de la inmunosupresión. Disminuyendo las tasas de rechazo agudo y aumentando la sobrevida del injerto a un año de 80 a 15 y de 45 a 95%, respectivamente (6).

El hecho desafortunado es que la sobrevida del injerto renal a largo plazo no a seguido a la ganancia en la sobrevida de los injertos a corto plazo.

En la población trasplantada de Estados Unidos (EU) la vida media del injerto de donador fallecido fue de 6.6 años en 1989, 8.2 años en 2000 y 8.8 años en 2005.

En donador vivo los trasplantes no han tenido mayor sobrevida con 11.4 años en 1989 y 11.9 años en 2005 (4).

Las causas de perdida del injerto son la muerte del paciente con injerto funcionante, nefropatía crónica del injerto y recurrencia de la enfermedad de base. De estas, la nefropatía crónica del injerto es la causa mas frecuente de perdida del injerto. Las etiologias pueden ser inmunologicas (rechazo) o no inmunologicas (factores hemodinamicos) como la hipertensión. La enfermedad vascular aterosclerosa es la principal causa de muerte en pacientes trasplantados, por encima de las infecciones y el cáncer. (7)

La hipertensión arterial (HTA) contribuye tanto en la nefropatia cronica del injerto como a la morbilidad/mortalidad cardiovascular de pacientes trasplantados con injerto funcionante.

La HTA postrasplante ocurre con frecuencia reportada de un 75 a 90% en las diferentes series (8,9). Kasiske y colaboradores demostraron que solo 12.4% de 1,295 pacientes se documentaron normotensos al año postrasplante. De estos solo 28.1% se encontraban sin antihipertensivos; por lo tanto, solo 3.5% de los pacientes se encontraban normotensos y sin antihipertensivos (9).

Opelz en su cohorte de 29,751 pacientes, collaborative transplant study (CTS), observó que el aumento de la presión arterial se asocia significativamente con la tasa de deterioro de función del injerto, siendo otro factor determinante de la vida media del injerto a largo plazo. Por cada incremento de 10mmHg de la presión arterial sistolica, existe un aumento en el riesgo de perdida del injerto y muerte. De la misma forma el control de la HTA en pacientes postrasplantados se asocia a una mejor sobrevida del injerto en comparación con pacientes e HTA no controlada (10).

Los mecanismos involucrados para la génesis de la HTA postrasplante son variados. En el ambiente multifactorial, se desconocen los principales causales. Los factores mencionados ocurren pretrasplante (rigidez vascular, etiología de ERC, historia de hipertensión), postrasplante (función retardada injerto, calidad del órgano, daño crónico), intrínsecos (rechazo, recurrencia enfermedad de base) y extrínsecos (estenosis arterial renal y medicamentos) (11,12).

Uno de los factores importantes en el postrasplante renal como causantes de HTA son los inmunosupresores, particularmente los inhibidores de calcineurina (ICN), como la ciclosporina y el tacrolimus. Estos son utilizados hasta en el 94% de los esquemas de inmunosupresion. Otro importante son los esteroides, sin embargo, estos últimos generalmente se administran a dosis bajas en forma crónica. (12)

La introducción de los ICN en 1983, fue un parteaguas en cuanto a inmunosupresion se refiere. La prevalencia de HTA postrasplante previo a la introducción de ciclosporina era de 40-50%, elevandose hasta un 90% posterior a su inclusión.

Esto se vio reflejado en HTA postrasplante en otros órganos (corazón, hígado y médula ósea). (13,14)

Los inhibidores de calcineurina son inmunosupresores nefrotóxicos con efectos a corto y largo plazo, produciendo daño renal crónico en todos los pacientes a quienes se administre. (15) La capacidad nefrotóxica de la ciclosporina es superior a la del tacrolimus. (16) Por esta razón, en la última década ha disminuido progresivamente el uso de ciclosporina, mientras que ha aumentado el de tacrolimus. Aunque este último es menos nefrotóxico, también se considera como causante de HTA en el periodo postrasplante.

Los mecanismos propuestos por los cuales los ICN producen HTA son mecanismos vasculares por el desequilibrio de factores vasoactivos, mientras que otros favorecen la posibilidad de que exista alteración en la curva de natriuresis de presión, con la consecuente HTA sensible a sal.

Curtis y colaboradores estudiaron 30 sujetos hipertensos, con función renal normal, 12 meses postrasplante. Ambos incluyeron esteroide como parte del esquema inmunosupresor, 15 sujetos con azatioprina y 15 sujetos con ciclosporina. El grupo con el ICN no respondió a captopril, mejoró con dieta baja en sal y se encontró un balance positivo de sodio con disminución de su excreción renal, contrario a lo encontrado en el grupo con azatioprina. Concluyendo el autor, se trata de un tipo de HTA diferente en el postrasplante, involucrando la génesis de una hipertensión sensible a sal, similar a la HTA esencial, consistente con el modelo de Guyton. (17)

Modelos murinos han demostrado hipertensión posterior a la exposición de ICN, produciendo daño estructural renal (nefrotoxicidad) consistente con fibrosis intersticial y arteriopatía. Revirtiendo la hipertensión al retirar el ICN, sin embargo, desarrollando hipertensión ante la exposición a una dieta alta en sal. (15). Existen estudios contradictorios en roedores en relación al sitio afectado, causante de una mayor reabsorción o disminución de excreción de sal.

Los inhibidores de calcineurina inducen un cuadro de HTA que se acompaña con frecuencia de disfunción tubular renal manifestada por hiperkalemia, hipercalcemia y acidosis metabólica. Este cuadro es similar al del pseudohipoaldosteronismo tipo II (PHAI), también conocido como síndrome de Gordon o hipertensión hiperkalemia familiar(18), en el que se ha determinado que la activación del transportador renal de NaCl (NCC) está claramente implicada en la fisiopatología de la HTA y el resto de manifestaciones clínicas (19).

La actividad y/o expresión del NCC está claramente implicado en la regulación de la presión arterial. Mutaciones inactivantes del gen que codifica para el NCC son causa del síndrome de Gitelman, que cursa con hipotensión arterial, hipokalemia y acidosis metabólica (20). La función del NCC es específicamente inhibida por los diuréticos tipo tiazidas, lo que sigue siendo recomendado por los comités de expertos como la primera línea farmacológica para el manejo antihipertensivo. Por

otro lado, el PHAI es una imagen en espejo del síndrome de Gitleman y el aumento en la actividad del NCC es parte fundamental de la fisiopatología en esta enfermedad (21). Los genes causantes del PHAI son las cinasas conocidas como WNK1 y WNK4 (22) y el complejo de ligasas de ubiquitina tipo RING formado por las proteínas CUL3 y Kelch3 (23). En la última década hemos aprendido mucho sobre los mecanismos de regulación del NCC por las WNKs otra cinasa río debajo de las WNKs conocida como SPAK. En ese contexto, las WNKs modulan la fosforilación y activación de SPAK, que a su vez induce la fosforilación y activación del NCC (24-26). Las mutaciones en WNK1 y WNK4 resultan en mayor activación del complejo SPAK-NCC, con el consecuente aumento en la función de NCC (28). Este mecanismo ha sido corroborado en ratones transgénicos con mutaciones en WNK4 similares a las observadas en pacientes con PHAI (27;28). En forma preliminar sabemos que las proteínas CUL3 y Kelch3 también regulan al NCC, por lo que es probable que las mutaciones en estos genes también resulten en aumento de la actividad del NCC.

En los últimos años el intenso estudio del NCC ha generado herramientas que permiten estudiar la “actividad” del NCC in vivo. Fue inicialmente demostrado que la actividad de NCC aumenta al disminuir la concentración intracelular de cloruro y que este aumento se asocia con fosforilación del NCC de rata en las treoninas 53 y 58 (29). Posteriormente, se observó que en el NCC de humano sucede lo mismo y que la fosforilación de dichas treoninas es producto de la activación de la cinasa SPAK (24). Desde entonces, los fosfoanticuerpos que detectan al NCC cuando se fosforila en estas treoninas se han utilizado para determinar la “actividad” del NCC en modelos in vivo (30-32).

Tomando ventaja de la posibilidad de estudiar la actividad del NCC en modelos in vivo, estudios recientes sugieren que la HTA inducida por los inhibidores de calcineurina se debe al efecto que tienen estos fármacos sobre la expresión de las cinasas WNKs y en consecuencia la activación del NCC, lo que resulta en retención de sal y la consecuente HTA. Ambos estudios fueron inspirados por el hecho de que los inhibidores de calcineurina inducen un cuadro similar al del PHAI (HTA, con hiperkalemia, acidosis metabólica) que es causado por mutaciones en WNKs. Hoorn et al (32) utilizaron ratones en los que demostraron que la administración de tacrolimus induce aumento en la expresión renal de WNK3, que sabemos regula positivamente al NCC (33), y de la fosforilación de NCC. En este mismo estudio mostraron que la administración de tiazidas previno la HTA inducida por tacrolimus. A favor de que la HTA asociada a la administración de tacrolimus es por activación del NCC los autores observaron que no ocurrió en ratones knockout de NCC tratados con tacrolimus, mientras que sucedió en forma exagerada en ratones que sobre expresan NCC y que fueron tratados con tacrolimus.

Exosomas urinarios

La orina contiene cientos de proteínas. Su estudio puede darnos información acerca del estado fisiológico/fisiopatológico de la función renal. Esta fuente de biomarcadores contiene proteínas transmembrana, encargadas del transporte de

sal, involucradas en el balance del sodio y la presión arterial. La identificación de estas proteínas y su expresión, se ha correlacionado con actividad/inactividad en diversos modelos, por ejemplo en Bartter (NKCC2), Gitelman y Gordon (NCC). La excreción de estos transportadores apicales de sodio es mediada principalmente por la liberación de exosomas. (34,35)

Los exosomas son vesículas de baja densidad liberadas a partir de la célula por descamación, gemación o fusión intracelular. Su formación es a partir de la endocitosis de proteínas de la membrana apical celular, siendo incorporadas en cuerpos multivesiculares, para ser posteriormente secretados en la orina. Estas vesículas están formadas por una capa bilipídica de 30-120nm de tamaño, que contienen proteínas y ácidos nucleicos. (36)

En el riñón, los dos principales transportadores de sodio activados por aldosterona son ENaC y NCC. En un modelo de hiperaldosteronismo en ratas y humanos con hiperaldosteronismo primario se documentó una mayor expresión/fosforilación de NCC en exosomas de orina. (37) Marcando el antecedente para el análisis futuro de exosomas y su uso como marcador funcional de NCC.

Medición de presión arterial ambulatoria

La medición de presión arterial tiene el problema de una alta variabilidad. Variaciones en relación a respiración, minuto a minuto, hora a hora, día o noche. Por lo tanto, una determinación aislada en el tiempo es un pobre estimado de la presión arterial usual del paciente y por consiguiente su relación con diferentes desenlaces. La respuesta ante esta variabilidad es determinar una presión arterial en relación al tiempo, mediante la toma de presión arterial ambulatoria. Con mediciones cada 15-30min y cada 30-60min durante la noche. Permitiendo identificar hipertensión de bata blanca, hipertensión enmascarada y determinando la presencia/ausencia del descenso normal de presión arterial durante la noche. La toma de presión arterial mediante MAPA en pacientes trasplantados renales es un método más sensible para diagnosticar hipertensión arterial en comparación con la toma de presión arterial en consultorio, así mismo es más útil para el control de la misma. (38)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hipertensión arterial en el postrasplante es común, siendo la principal causa no inmunológica de pérdida del injerto así como factor de riesgo cardiovascular. Desconocemos los mecanismos principales involucrados en la génesis de la hipertensión postrasplante. El determinar el papel de los ICN y su relación con HTA permitiría una estrategia diagnóstica sobre los mecanismos de HTA postrasplante renal. Esta sería mediante la determinación de la relación entre NCC fosforilado sobre NCC total en orina de pacientes trasplantados. Así mismo permitirá una terapia individualizada eficaz y costo efectiva.

JUSTIFICACION

Con la intensa actividad de trasplante renal que se lleva a cabo en México y en el mundo, la pérdida del injerto se ha convertido en una de las principales causas de ERCT. Por lo tanto, cualquier maniobra que alargue la vida media de los injertos renales tendrá un efecto positivo sobre la disminución de nuevos enfermos con ERCT que requieren sustitución de la función renal.

Aunque existen diversos fármacos antihipertensivos, a la fecha no hay forma de individualizar el tratamiento dado que son varios los potenciales mecanismos de la HTA y se conoce poco al respecto de estos. Mientras mejor aclaremos el o los mecanismos de HTA en cada paciente, podremos indicar terapias individualizadas que sean más efectivas en el manejo de la HTA y esto redundará en mejor supervivencia del injerto y del paciente.

Estos trabajos sugieren que la activación del NCC puede ser un mecanismo importante en la HTA inducida por inhibidores de calcineurina, por lo que el tratamiento óptimo en estos casos sería con diuréticos de tipo tiazida.

Con estos antecedentes nosotros hipotetizamos que la HTA en al menos algunos pacientes con trasplante renal tratados con tacrolimus como inmunosupresor podría ser por activación del NCC. Si este es el caso, en dichos pacientes el tratamiento antihipertensivo de elección podrían ser los diuréticos de tipo tiazida.

HIPOTESIS

La HTA postrasplante renal en pacientes tratados con tacrolimus como inmunosupresor se encuentra asociada a una mayor activación del NCC.

OBJETIVOS

Determinar la asociación de HTA y su relación con diversas variables demográficas, clínicas y bioquímicas.

Determinar la asociación de la expresión/fosforilación del NCC con la presencia de hipertensión en pacientes postrasplantados renales tratados con inhibidores de calcineurina.

MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio

Estudio prospectivo, longitudinal, observacional.

Selección de pacientes

Pacientes trasplantados renal en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ) desde Enero 2013.

Los cuales hayan aceptado ingresar al estudio con su consentimiento y contaran con un ICN dentro de su esquema inmunosupresor.

Definición de variables obtenidas

Variables clínicas

Del expediente clínico se recolectaron los siguientes datos: causa de enfermedad renal, tipo y tiempo de terapia sustitutiva renal, volumen urinario residual, así como medicamentos pretrasplante.

Se determino durante el reclutamiento y seguimiento, el tipo de trasplante, las características del donador, el tipo de inmunosupresión, el numero de haplotipos compartidos y los eventos de rechazo por medio de biopsias protocolizadas.

Variables bioquímicas

Se registraron de forma basal y durante los meses 1,3,6 y 12. Biometría hemática completa, glucosa, nitrógeno ureico, creatinina, electrolitos séricos (sodio, potasio, cloro y CO2 total) y albúmina. Se tomaron niveles séricos de ICN el mismo día de la toma de muestra urinaria para extraer exosomas (ver mas adelante). En la muestra de orina se determinó sodio, potasio y creatinina urinaria.

Determinación de presión arterial y definición de hipertensión

En la etapa pretrasplante se considero el registro de la presión arterial en 3 consultas. Definiendo como hipertensión el presentar en al menos dos consultas presión mayor o igual a 140/90mmHg o uso de antihipertensivos.

En la etapa postrasplante se tomó presión arterial en consultorio y mediante MAPA. Para el diagnostico de hipertensión arterial se considero la toma de presión arterial en consultorio en al menos dos ocasiones con cifras mayores o iguales a 140/90 o prescripción de antihipertensivos por medico tratante, durante los meses 1,3,6 y 12.

Protocolo de MAPA

La medición de presión ambulatoria automatizada se realizo a los 6 meses y al año de seguimiento. Se colocó brazaletes en brazo no dominante o en el brazo con mayor presión arterial tomada de forma basal.

Se descartaba uso de anticoagulantes, mastectomía con disección ganglionar o alteraciones locales en brazo. Se indicaba evitar ejercicio extenuante, manejar automóvil, por lo demás se sugería realizar actividades de la vida diaria habituales. Se programaba dispositivo para tomar presión arterial durante el día cada 15 minutos y durante la noche cada 30 minutos, con una insuflación máxima de 20mmHg por encima de la presión arterial tomada de forma basal o 180mmHg. Se daban instrucciones para retiro del dispositivo en caso de dolor intenso o presencia de equimosis.

La definición operacional de hipertensión arterial por medio de MAPA en el presente estudio, se cumple con cualquiera de las siguientes:

Presión arterial igual o mayor a 135/85 en promedio de MAPA 24 horas (global).

Presión arterial igual o mayor a 140/90 en promedio de MAPA durante el día.

Presión arterial igual o mayor a 125/75 en promedio de MAPA durante la noche.

Así mismo se determino el descenso de la presión arterial durante la noche. Clasificándose como dippers aquellos con disminución de la presión arterial igual o mayor al 10% durante la noche. Los pacientes con ausencia de este descenso esperado de la presión arterial se clasificaron como no dippers.

Metodología aislamiento de exosomas

En todas las muestras de orina, se aplicó un inhibidor de proteasa previo a su almacenamiento en congelador a -80 °C. Los exosomas fueron aislados utilizando un proceso de centrifugación en 2 pasos. Primero, la orina fue centrifugada a 17,000g por 15 minutos a 37°C para remover membranas celulares y otras particulas de alta densidad. Se utilizó dihtiothreitol para inhibir las proteínas de Tamm-Horsfall.

Subsecuentemente, las muestras fueron sujetas a ultracentrifugación 200,000g por 120 minutos a 24 °C. El precipitado formado durante esta etapa es suspendido en una solución amortiguadora de aislamiento.

Finalmente, el precipitado suspendido que contiene los exosomas es solubilizado para ser cuantificados y corrido en geles de acrilamida.

La expresión/fosforilación de NCC en exosomas de orina es analizada mediante Western-blot con el método de aislamiento previamente descrito. La concentración de exosomas es normalizada con la concentración de creatinina en muestra aislada de orina.

Análisis estadístico

Se utilizó Chi cuadrada o Exacta de Fisher para comparación de variables categóricas. T-Student o U Mann Whitney para comparación de variables continuas (dependiendo distribución). Se realizó un análisis estratificado por género y para hipertensión. Se consideró estadísticamente significativo una $P < 0.05$.

RESULTADOS

Características de la población estudiada

De enero 2013 a julio 2014 se realizaron 44 trasplante renales. Se excluyó un paciente por no tener un ICN como parte de su esquema inmunosupresor. Se incluyeron 43 pacientes (N=43), 26 de los cuales fueron hombres (60%) y 17 mujeres. La edad promedio al momento del trasplante de la población estudiada fue de 36.7 ± 13.5 años y con un índice de masa corporal (IMC) de 22.8 ± 3.2 .

Características basales

La etiología de la enfermedad renal no fue posible establecerse en 20/43 (45.5%) pacientes. En los pacientes que se determinó la causa, la más común fue diabetes mellitus en 9/43 (20.9%). El resto de las causas identificadas fueron lupus eritematoso generalizado, glomerulopatías diversas, enfermedad renal poliquística del adulto y alteraciones urológicas.

El tipo de terapia sustitutiva previo al trasplante fue hemodiálisis en 22/43 (51%) y diálisis peritoneal 13/43 (30%). El resto, recibieron un trasplante renal de forma anticipado 8/43 (19%). La duración de la terapia sustitutiva renal promedio fue de 25 (0-120) meses. El volumen urinario residual previo al trasplante fue de 711 ml (0-3000). Los datos se muestran en la tabla 1.

El tipo de trasplante fue de donador fallecido en 19/43 (44.2%) y donador vivo en 24/43 (55.8%), la edad promedio de los donadores fue de 36.1 ± 11 años. El 90% de los pacientes trasplantados recibió un esquema de inducción, siendo timoglobulina y basiliximab en el 51% y 37% de los casos respectivamente. El 62.8% de los pacientes no compartían ningún haplotipo con el donador y 37.2% compartían 1 o 2 haplotipos.

Los niveles de creatinina promedio a los 6 meses de seguimiento fueron de 1.2 ± 0.3 mg/dl, con una TFGe por MDRD de 63.5 ± 21 ml/min y por CKD-EPI de 70.2 ± 21 ml/min. Los niveles de tacrolimus promedio fueron de 9 ± 3.1 ng/dl durante los primeros 6 meses postrasplante.

Los eventos inmunológicos reportados durante el seguimiento a 6 meses con biopsias protocolizadas, fueron en 14/43 (32.6%) pacientes, presentando rechazo de cualquier tipo. Se documentaron alteraciones limitrofes en 10/43 (23.3%) y rechazo celular o humoral en 8/43 pacientes (18.6%).

Hipertensión Pretrasplante

La prevalencia de hipertensión en el periodo pretrasplante fue del 76%. La presión arterial sistólica (PAS) media de 129 ± 15 mmHg y la presión arterial diastólica (PAD) de 79 ± 11 mmHg. Los pacientes hipertensos, en el pretrasplante utilizaban 1.0 antihipertensivos en promedio con un máximo de 3. Las clases más utilizadas de antihipertensivos fueron calcio antagonistas y betabloqueadores, ninguno de los pacientes contaba con un diurético tipo tiazida dentro de su esquema de tratamiento.

Hipertensión Postrasplante

La incidencia de hipertensión postrasplante a 6 meses de seguimiento fue del 42% (18/43). Ver figura 1.

En la fase postrasplante a los 6 meses de seguimiento, se documentó por medio de MAPA una presión arterial promedio de 24hrs de 120.7 ± 13.2 mmHg y diastólica de 71.1 ± 7.5 mmHg. La presión arterial promedio diurna fue de 121.4 ± 13.8 y diastólica 71.7 ± 8.2 mmHg. La presión arterial nocturna fue de 119.5 ± 15.9 y diastólica 68.4 ± 7.7 mmHg. La mayoría de los pacientes 19/21 (90%) no presentaron descenso normal de tensión arterial durante la noche (No-dippers).

El grupo de pacientes hipertensos presentó una PAS promedio de 24hrs de 127.9 ± 13.9 y diastólica 73.3 ± 7.9 , en comparación con los normotensos de 112.8 ± 6.2 y diastólica 67.4 ± 6.3 .

Las presiones arteriales diurnas fueron una PAS de 128.3 ± 15.8 mmHg, PAD 73.7 ± 7.9 mmHg y PAS 113.8 ± 6.8 mmHg, PAD 73.7 ± 7.9 mmHg, en los pacientes hipertensos y normotensos respectivamente.

Las presiones arteriales nocturnas fueron una PAS de 128.3 ± 15.8 mmHg, PAD 71.5 ± 7.8 mmHg y PAS 109.9 ± 9.4 mmHg, PAD 65 ± 6.2 mmHg, en los pacientes hipertensos y normotensos respectivamente. Se muestran en la tabla 2.

La frecuencia de hipertensión arterial fue significativamente diferente en hombres en comparación con mujeres. De 17 pacientes mujeres, solo 3 presentaron hipertensión (18%), en comparación con 15 de 26 hombres (58%). ($p < 0.009$) Estos datos se muestran en la figura 2.

Comparación hombres hipertensos vs normotensos

Debido a la disparidad de genero y la baja frecuencia de HTA en mujeres. Se realizo únicamente el análisis en la cohorte de los hombres.

Como puedo observarse en la tabla 2, los hombres hipertensos son de edad mayor comparados con los normotensos 45.5 ± 14.8 y 25.7 ± 5.9 años respectivamente, $p < 0.001$. Asi mismo la prevalencia de diabetes mellitus fue mayor en la población hipertensa $p < 0.001$. No se encontraron diferencias en relación a la hipertensión pretrasplante, rechazos, función renal, electrolitos sericos, niveles de tacrolimus o sodio urinario.

Expresión y fosforilación NCC

El análisis de los exosomas mediante Western blot de 14 sujetos masculinos, 9 hipertensos y 5 normotensos. Demostró una diferencia significativa en la expresion y fosforilacion de NCC en pacientes hipertensos comparado con normotensos como se puede ver en la figura 3.

DISCUSIÓN

Existen diversos hallazgos importantes de nuestro estudio. (1) La prevalencia de hipertensión arterial postrasplante fue menor a lo reportado en la literatura. (2) La hipertensión arterial es mas prevalente en hombres que en mujeres. (3) Los pacientes hipertensos son de edad mayor y con mayor frecuencia de diabetes mellitus en comparación con los normotensos. (4) La expresión/fosforilación de NCC en exosomas urinarios es significativamente mayor en hipertensos que en los normotensos.

De forma interesante la prevalencia es menor a lo reportado en la serie de 1984-1994 en nuestro instituto (39), siendo del 71%. La principal diferencia con el estudio previo, fue un estudio retrospectivo en el cual, el régimen inmunosupresor era basado en ciclosporina con un tiempo de trasplante y seguimiento mayor.

La relación de hipertensión arterial postrasplante y la inmunosupresión con ICN ha sido documentado en diversos estudios. La diferencia que existe entre tacrolimus y ciclosporina ha favorecido a este ultimo en cuanto a frecuencia de hipertensión arterial, grado hipertensión y numero de antihipertensivos. (16)

El tiempo de seguimiento de 6 meses en comparación con 56 meses con la serie previa del instituto puede marcar diferencias importantes. En el estudio de Campistol JM y cols. (16) la prevalencia de hipertensión mostró un incremento progresivo y significativo durante el seguimiento que fue de 3 meses a un año y posteriormente anualmente hasta completar 10 años. A diferencia de lo reportado por Kasiske BL y cols. (9) Quienes demostraron una disminución de la presión arterial en las primeras 12 semanas postrasplante, sin embargo en esta serie al año del seguimiento solo un 12.4% de los pacientes presentaban una presión arterial normal, teniendo una estabilidad en los subsecuentes 5 años de seguimiento con requerimientos progresivamente menores en el numero de antihipertensivos a lo largo de 5 años de seguimiento.

La hipertensión arterial postrasplante en el presente estudio fue mas prevalente en hombres (58%) que en mujeres (17%), diferente a lo documentado en otras series. Pudiendo ser explicado por nuestra muestra limitada de pacientes con una mayor proporción de hombres, debido a no encontrar diferencias entre la edad o causas de ERC en comparación con los hombres.

Los pacientes hipertensos son de edad mayor y con mayor frecuencia de diabetes mellitus en comparación con los normotensos. No se encontraron diferencias en relación al tipo de donador, hipertensión pretrasplante, eventos inmunológicos o función renal. La edad y la diabetes mellitus son factores de riesgo clásicos para el desarrollo de hipertensión arterial. Los mecanismos por los cuales causan

hipertensión son diversos, ambos se asocian a efectos en la vasculatura y disfunción endotelial, involucrando las resistencias vasculares periféricas. En el estudio de J. Curtis (17) de pacientes postrasplantados renales con hipertensión con un esquema inmunosupresor basado en ciclosporina comparando con azatioprina. Demostraron dos tipos de hipertensión con un genotipo diferente. En el grupo de ciclosporina se encontró un tipo de hipertensión sensible a sal con pobre respuesta a IECA, en comparación con el grupo de azatioprina, una tipo hipertensión sin retención de sal y con mejor respuesta a IECA como antihipertensivo.

Sugiriendo en nuestro estudio una hipertensión en sujetos con mayores comorbilidades y afección vascular.

En este estudio, nos preguntamos si la hipertensión en pacientes postrasplantados renales se encontraba relacionada con la expresión y actividad de NCC.

Documentando que en pacientes masculinos con 6 de meses de seguimiento, la expresión y fosforilación de NCC en exosomas urinarios es significativamente mayor en hipertensos documentados por MAPA que en los normotensos. Debido a la disparidad de hipertensión en relación al género, el análisis se limitó al sexo masculino. Los cambios fueron más pronunciados en NCC total más que en NCC fosforilado, sin encontrar diferencias significativas en la relación NCC total/fosforilado. Sin embargo ambos presentaron un cambio significativo, NCC total aparentemente es un mejor biomarcador. Nuestros resultados son diferentes a lo reportado por Nils van der Lubbe y cols. (37) en sujetos con hiperaldosteronismo primario en donde reportaron cambios tanto en NCC total como NCC fosforilado, siendo mayores los cambios en este último.

La dinámica de la expresión de NCC total y fosforilado merece discusión. Estas son proteínas de membrana las cuales analizamos como biomarcadores en exosomas urinarios, siendo difícil discernir y traducir estos resultados con su expresión y actividad in vivo. El efecto de los ICN en relación a sus niveles terapéuticos no se encontró asociación, debido a no encontrar diferencia de niveles terapéuticos en pacientes normotensos o hipertensos. La excreción de sodio y potasio urinario al azar, no fue diferente en los sujetos hipertensos en comparación con los normotensos. Se documentó una mayor elevación de CO₂T en pacientes hipertensos, no explicable en relación al mecanismo fisiopatológico, pudiendo ser un confusor debido al tamaño de la muestra.

En el estudio de Hoorn et al. (32) en roedores se observó hipertensión con una menor excreción de sal y de potasio con hiperkalemia y tendencia a la acidosis metabólica. En el mismo estudio, en pacientes seleccionados con un fenotipo extremo de hipertensión resistente, hiperkalemia y acidosis se documentó un aumento del volumen extracelular, disminución niveles de aldosterona y mayor excreción de cloro con un reto de diurético tipo tiazida, todo esto en comparación con un grupo control. Sin reportar excreciones de sodio o potasio urinario. En nuestro estudio no documentamos hiperkalemia o acidosis, sugiriendo alteraciones sutiles con menor expresión fenotípica debido a la tendencia actual de niveles terapéuticos menores para evitar riesgo de toxicidad de los ICN a nivel renal.

Debilidades y fortalezas

Es el primer estudio de este tipo realizado en humanos de este tipo. Su principal fortaleza es el combinar la experimentación básica mediante exosomas urinarios en humanos en el contexto clínico en un estudio prospectivo con seguimiento estrecho en pacientes incidentes de trasplante renal. La posibilidad de determinar simultáneamente variables bioquímicas, clínicas y el muestreo para extracción de exosomas urinarios, permitiendo una mejor asociación entre estas variables. Así como la inclusión de biopsias renales como parte del seguimiento protocolizado.

Uno de los principales aciertos es el método para montar la técnica para extracción de exosomas en orina y normalizar con creatinina urinaria su cuantificación. Permitiendo caracterizar la asociación de los ICN en el paciente postrasplantados con su acción a nivel del tubulo distal a travez del análisis de los exosomas.

El método de detección de presión arterial mediante MAPA, siendo el estándar de oro para su detección. Permitiendo a su vez una mejor predicción de daño a órgano blanco, riesgo cardiovascular, progresión de daño renal. Siendo capaz de distinguir hipertensión por bata blanca e hipertensión enmascarada. Así como la detección del paciente con hipertensión de predominio nocturno con la perdida del descenso normal de la presión arterial por la noche (non-dipper).

Las principales debilidades del estudio son el tamaño de la muestra y la disparidad del genero, limitando su análisis en el sexo masculino. La perdida de seguimiento de los pacientes por cuestiones sociales y económicas. La ausencia de un grupo control de sujetos sanos o postrasplantados renales sin un ICN como esquema base inmunosupresor. Siendo difícil esto ultimo debido a que es el esquema de inmunosupresion estándar en la actualidad.

Otra debilidad es el tiempo corto de seguimiento, limitando a buscar otros desenlaces mas duros como deterioro de función renal o mortalidad, sin embargo estos no eran el objetivo del estudio.

CONCLUSIONES

1.- La prevalencia de hipertensión arterial a 6 meses postrasplante renal en nuestro estudio es del 42%, menor a lo reportado en la literatura.

2.- La hipertensión es mas prevalente en hombres (57%) que en mujeres (17%) en nuestro estudio.

3.- Los pacientes hipertensos son de mayor edad y con mayor frecuencia de diabetes mellitus.

4.- En pacientes postrasplantados renales a 6 meses de seguimiento, se encuentra una mayor expresión y fosforilacion de NCC en exosomas urinarios.

Este hallazgo sugiere que la activación de NCC puede estar involucrada en la génesis de la hipertensión postrasplante.

Los resultados deben considerarse aun preliminares.

ANEXOS

Tabla 1. Características generales	N=43
Genero masculino - No. pacientes (%)	26 (60)
Edad - años	36.7 ±13.5
IMC - kg/m2	22.8 ± 3.2
Terapia sustitutiva - No. pacientes (%)	
Hemodiálisis	22 (51)
Diálisis peritoneal	13 (30)
Tiempo TS - meses (min-max)	25.2 (0-120)
Causa ERC - No. pacientes (%)	
Desconocida	20 (45.5)
Diabetes Mellitus	9 (20.9)
Donador fallecido - No. pacientes (%)	19 (44.2)
Donador vivo - No. pacientes (%)	24 (55.8)
Rechazo - No. pacientes (%)	8 (18.6)
Creatinina - mg/dl	1.27 ± 0.36
MDRD/CKDEPI - ml/min	63.5 ± 21 / 70.2 ± 21.6
Niveles Tacrolimus ng/ml	9.0 ± 3.1

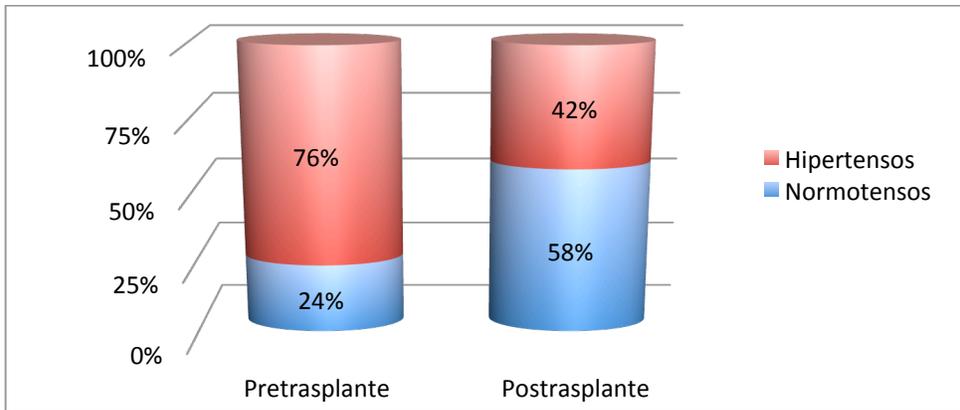


Figura 1. Comparativa de la frecuencia de hipertensión pretrasplante y postrasplante.

Tabla 2. Presiones arteriales determinar por MAPA en los grupos de pacientes hipertensos y normotensos.

	Global		Dia		Noche	
	PAS	PAD	PAS	PAD	PAS	PAD
Hipertensos	127.9±13.9	73.3±7.9	128.3±15.8	73.7±7.9	128.3±15.8	71.5 ± 7.8
Normotensos	112.8±6.2	67.4±6.3	113.8±6.8	73.7±7.9	109.9±9.4	65 ± 6.2

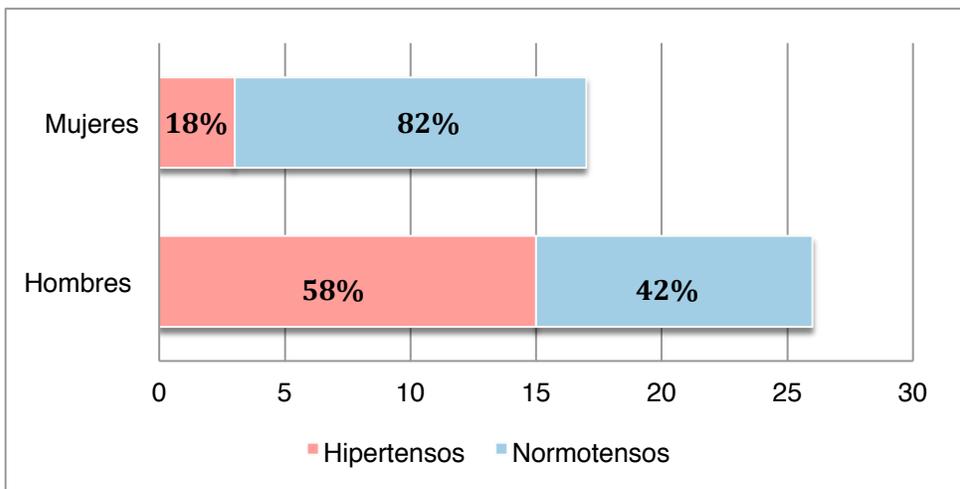


Figura 2. Comparativa de la frecuencia de hipertensión en relación al genero.

Tabla 3. Comparación hombres hipertensos vs normotensos

	Hipertensos	Normotensos	p
Edad - años	45.5 ± 14.8	25.7 ± 5.9	<0.001
ERC causa DM- n (%)	6 (40)	0	<0.001
Donador fallecido - n (%)	7 (46.7)	2 (18.2)	0.131
Donador vivo - n (%)	8 (53.3)	9 (81.8)	0.412
Edad donador - años	38.3 ± 11	34.4 ± 9.6	0.385
IMC - kg/m2	23.6 ± 3	21.2 ± 2.9	0.698
HTA preTR - n (%)	13 (86.7)	7 (63.6)	0.169
Rechazo - n (%)	4 (26.7)	3 (27.3)	0.444
Tacrolimus ng/ml	9.5 ± 4.3	9.4 ± 1.3	0.914
Creatinina mg/dl	1.39 ± 0.33	1.4 ± 0.3	0.937
CKD-EPI ml/min	65.1 ± 20	74.2 ± 19	0.257
Na+ mEq/L	141 ± 3	139.4 ± 1.6	0.078
K+ mEq/L	4.4 ± 0.5	4.5 ± 0.3	0.474
CO2T mEq/L	25 ± 1.9	23.5 ± 1.5	0.041
Na+ urinario mEq/L	71.8 ± 54.1	81.5 ± 60	0.810

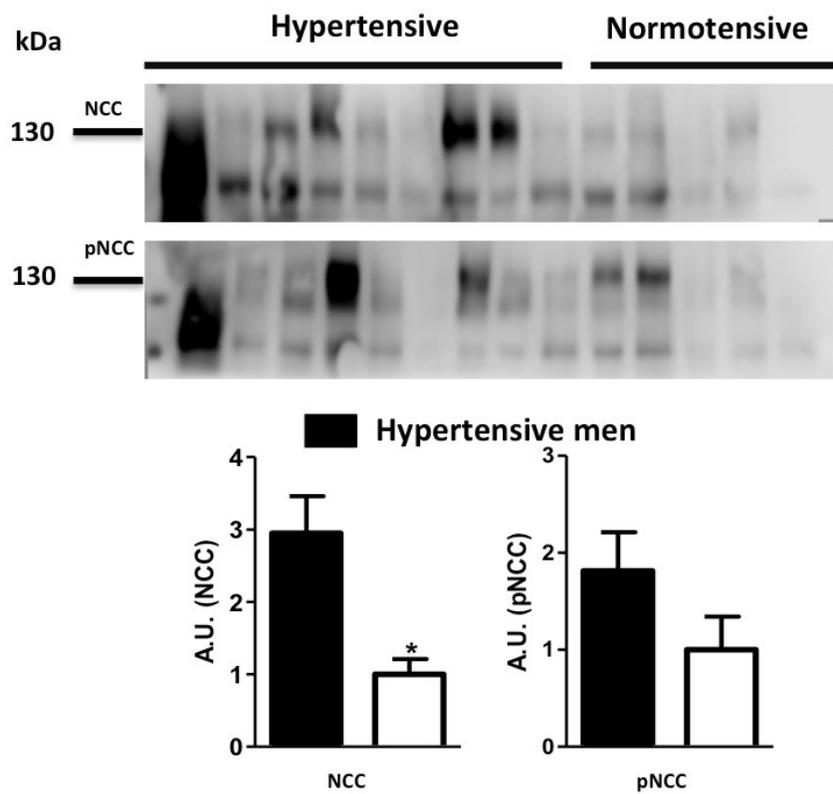


Figura 3. Western blot de exosomas urinarios en hombres hipertensos (n=9) comparados con normotensos (n=5).

Bibliografía

1. Ayodele O, Alebiosu C. Burden of Chronic Kidney Disease: An International Perspective. *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2010;17(3):215-224.
2. Amato D, Alvarez-Aguilar C, Castaneda-Limones R, Rodriguez E, Avila-Diaz M, Arreola F et al. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int Suppl* 2005;(97):S11-S17.
3. Wolfe R, Ashby V, Milford E, Ojo A, Ettenger R, Agodoa L et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(23):1725-1730.
4. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011; 11(3):450-462.
5. Marino-Vazquez LA, Sanchez-Ugarte R, Morales-Buenrostro LE. Trasplante renal: primeros mil trasplantes en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, en la Ciudad de Mexico. *Rev Invest Clin* 2011; 63 (Supl 1):6-13.
6. Marcén R, Fernández-Rodríguez A, Rodríguez-Mendiola N, Ponte B, Galeano C, Villafruela J et al. Evolution of Rejection Rates and Kidney Graft Survival: A Historical Analysis. *Transplantation Proceedings*. 2009;41(6):2357-2359.
7. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi A. Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(8):580-590.
8. Ojo A. Cardiovascular Complications After Renal Transplantation and Their Prevention. *Transplantation*. 2006;82(5):603-611.
9. Kasiske B, Anjum S, Shah R, Skogen J, Kandaswamy C, Danielson B et al. Hypertension after kidney transplantation. *American Journal of Kidney Diseases*. 2004;43(6):1071-1081.

10. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney International*. 1998;53(1):217-222.
11. Wadei HM, Textor SC. Hypertension in the kidney transplant recipient. *Transplant Rev (Orlando)* 2010; 24(3):105-120.
12. Mangray M, Vella J. Hypertension After Kidney Transplant. *American Journal of Kidney Diseases*. 2011;57(2):331-341.
13. First M, et al. Hypertension after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4(8):S30-S36.
14. Textor S, Canzanello V, et al. Cyclosporine-Induced Hypertension After Transplantation. *Mayo Clinic Proceedings*. 1994;69(12):1182-1193.
15. Johnson R, Herrera-Acosta J, Schreiner G, Rodríguez-Iturbe B. Subtle Acquired Renal Injury as a Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(12):913-923.
16. Campistol J. Epidemiology of arterial hypertension in renal transplant patients: changes over the last decade. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004;19(suppl_3):iii62-iii66.
17. Curtis J, Luke R, Jones P, Diethelm A. Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium dependent. *The American Journal of Medicine*. 1988;85(2):134-138.
18. Mayan H, Vered I, Mouallem M, Tzadok-Witkon M, Pauzner R, Farfel Z. Pseudohypoaldosteronism type II: marked sensitivity to thiazides, hypercalciuria, normomagnesemia, and low bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7):3248-3254.
19. Gamba G. The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(4):F838-F848.
20. San Cristobal P, De Los HP, Ponce-Coria J, Moreno E, Gamba G. WNK Kinases, Renal Ion Transport and Hypertension. *Am J Nephrol* 2008; 28(5):860-870.

21. Gamba G. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(2):F245-F252.
22. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001; 293(5532):1107-1112.
23. Boyden LM, Choi M, Choate KA, Nelson-Williams CJ, Farhi A, Toka HR et al. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 2012; 482(7383):98-102.
24. Richardson C, Rafiqi FH, Karlsson HK, Moleleki N, Vandewalle A, Campbell DG et al. Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 5):675-684.
25. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome, phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 2005; 391:17-24.
26. Gamba G. WNK lies upstream of kinases involved in regulation of ion transporters. *Biochem J* 2005; 391(Pt 1):e1-e3.
27. Lalioti MD, Zhang J, Volkman HM, Kahle KT, Hoffmann KE, Toka HR et al. Wnk4 controls blood pressure and potassium homeostasis via regulation of mass and activity of the distal convoluted tubule. *Nat Genet* 2006; 38(2):1124-1132.
28. Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M et al. Molecular Pathogenesis of Pseudohypoaldosteronism Type II: Generation and Analysis of a Wnk4(D561A/+) Knockin Mouse Model. *Cell Metab* 2007; 5(5):331-344.
29. Pacheco-Alvarez D, San Cristobal P, Meade P, Moreno E, Vazquez N, Munoz E et al. The Na-Cl cotransporter is activated and phosphorylated at the amino terminal domain upon intracellular chloride depletion. *J Biol Chem* 2006; 281(39):28755-28763.
30. Pedersen NB, Hofmeister MV, Rosenbaek LL, Nielsen J, Fenton RA. Vasopressin induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter in the distal convoluted tubule. *Kidney Int* 2010; 78(2):160-169.

31. Van der LN, Lim CH, Fenton RA, Meima ME, Jan Danser AH, Zietse R et al. Angiotensin II induces phosphorylation of the thiazide-sensitive sodium chloride cotransporter independent of aldosterone. *Kidney Int* 2011; 79(1):66-76.
32. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg A, Yang CL, Roeschel T et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med* 2011; 17(10):1304-1309.
33. Rinehart J, Kahle KT, De Los HP, Vazquez N, Meade P, Wilson FH et al. WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl⁻ cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(46):16777-16782.
34. Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10(3):283-290.
35. Zhou H, Yuen PS, Pisitkun T, Gonzales PA, Yasuda H, Dear JW et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int* 2006; 69(8):1471-1476.
36. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(36):13368-13373.
37. van der Lubbe N, Jansen P, Salih M, Fenton R, van den Meiracker A, Danser A et al. The Phosphorylated Sodium Chloride Cotransporter in Urinary Exosomes Is Superior to Proxalin as a Marker for Aldosteronism. *Hypertension*. 2012;60(3):741-748.
38. Kooman J, Christiaans M, Boots J, van der Sande F, Leunissen K, van Hooff J. A comparison between office and ambulatory blood pressure measurements in renal transplant patients with chronic transplant nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2001;37(6):1170-1176.
39. Chew-Wong A, Correa-Rotter R. Hipertensión arterial postrasplante renal: factores de riesgo asociados e influencia en la supervivencia del injerto renal. *Gaceta médica de México*. 2015;141(6):461-467.