

## EFFECTOS PLEIOTRÓPICOS DE INHIBIDORES DE 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL-COA REDUCTASA EN NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA

*Autores: Fernando Kurbán Carosella y Walter Manucha*

### **Abstract**

The incidence of chronic renal diseases is increasing world-wide, and there is a great need to identify therapies capable of arresting or reducing disease progression. The current treatment of chronic nephropathies is limited to angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers, but there is growing clinical and experimental evidence that statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors) could play a therapeutic role.

### **Resumen**

La frecuencia de enfermedades renales crónicas se incrementa en todo el Mundo por lo que existe una gran necesidad de desarrollar terapias capaces de detener o reducir su progresión. Los tratamientos actuales de nefropatías crónicas emplean inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (IECA) así también como bloqueantes de receptores de Angiotensina II, no obstante existen crecientes evidencias clínicas y experimentales donde las estatinas (inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) podrían desempeñar un papel terapéutico muy relevante.

**Palabras claves:** estatinas, enfermedad renal crónica, obstrucción ureteral unilateral, fibrosis, apoptosis.

**Key words:** statins, chronic kidney disease, unilateral ureteral obstruction, fibrosis, apoptosis.

### **Introducción**

La enfermedad renal crónica tiene a nivel mundial una elevada incidencia ya que más de 20.000.000 de personas son las que padecen dicha patología solo en los Estados Unidos [Campese VM and Park J. 2007] y entre los desórdenes renales más complejos

se encuentra la nefropatía obstructiva. Por nefropatía y uropatía obstructiva se describen entidades patológicas que causan hidronefrosis por obstrucción del tracto urinario. Esta enfermedad es frecuente en niños debido a fallas congénitas del tracto urinario sobre todo a nivel de la unión ureteropélvica e involucra respuestas hemodinámicas así como hidrodinámicas, las que conducirían a cambios celulares en todos los compartimientos renales, fibrosis intersticial, apoptosis y atrofia tubular [Chevalier RL. 2004]. Como consecuencia, existiría una reducción del flujo plasmático renal y del índice de filtración glomerular con significativos cambios en la función tubular renal. Estos eventos provocan alteraciones en la capacidad de concentrar la orina [Klahr S. et al 1988] así como pérdida de la capacidad de acidificarla [Vallés P. et al 1999]. La obstrucción del tracto urinario a nivel ureteral resulta mucho más nociva en pacientes pediátricos que en adultos y es la principal responsable de insuficiencia renal crónica en la infancia representando el 16% de todos los trasplantes pediátricos.

La obstrucción ureteral unilateral (OUU) como modelo experimental de injuria renal fue originalmente desarrollado por el Dr. Saulo Klarh y reproduce fielmente las condiciones fisiopatológicas de la nefropatía obstructiva crónica induciendo entre las principales alteraciones respuesta inflamatoria (citoquinas), liberación de sustancias vasoactivas (angiotensina II, óxido nítrico, etc.) y aumento de los procesos apoptóticos y/o necróticos, lo que favorece la aparición temprana de signos de atrofia tubular así como fibrosis tubulointersticial [Manucha W. 2007]. Por lo tanto inflamación, estrés oxidativo y apoptosis son los principales mecanismos involucrados en la nefropatía obstructiva y permanecen en el centro de atención de muchos investigadores. Al respecto, nuestro laboratorio demostró recientemente en corteza renal de rata neonata sometida a OUU por 14 días, que la disminución de la expresión del intercambiador sodio/hidrógeno isoforma 1 (NHE<sub>1</sub>) sería un evento de señalización que participaría en la inducción de la apoptosis epitelial tubular a través de la regulación de la familia de genes Bcl<sub>2</sub> y la activación de caspasa 3 [Manucha W. et al 2007]. Se conoce que la disminución del pH intracelular es un factor que favorece la activación de las principales enzimas ejecutoras de la muerte celular programada (caspasas) y nuestros hallazgos contribuirían a intentar explicar esa acidificación mediante la reducción de la expresión del intercambiador que extrusaría H<sup>+</sup>.

Por otro lado, hemos establecido que durante la obstrucción crónica de ratas neonatas (14 días), existiría una fuerte inducción apoptótica modulada también por un serio déficit en la biodisponibilidad del óxido nítrico (conocido vasoactivo y actual citoquina) que condicionaría cambios en la expresión de una de las proteínas de golpe de calor (Hsp70) (Figura 1), aumento de la actividad de la principal enzima productora de radicales libres superóxido (NADPH oxidasa), decremento del protoncogen BcL<sub>2</sub> y aumento de la actividad de caspasa 3 [Manucha W and Vallés P. 2008]. Estos resultados apoyarían lo informado previamente por Miyajima A y col. [Miyajima A. et al 2001] quienes describieron el rol cito-protector del óxido nítrico (ON) durante la obstrucción. Mientras que en contraposición, Huwiler A. y col. [Huwiler A. et al 1999] demostraron que el ON exógeno causaría elevación de los niveles de ceramida en células mesangiales por activación de esfingomielinasas y concomitantemente inhibición de ceramidasa, lo cual en fases tardías justificaría la generación de señales proapoptóticas.

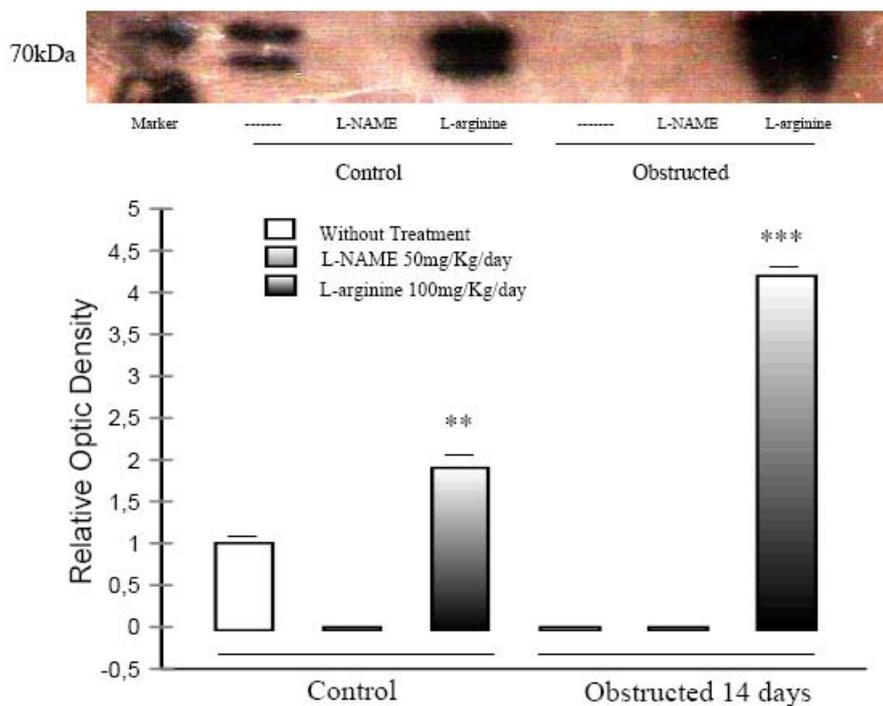


Figura 1: Expresión por Western Blot y semicuantificación de Hsp70 en ratas controles y obstruidas por 14 días, tratadas y no tratadas con L-arginina o L-NAME

En la actualidad y de acuerdo a los mecanismos puestos en juego durante la OUU, se postulan múltiples estrategias a fin de revertir o enlentecer la pérdida de la funcionalidad tubular. La administración de factores de crecimiento, anticuerpos contra citoquinas pro inflamatorias como TGF- $\beta_1$  [Miyajima A. et al 2000], reguladores de

ciclo celular, donantes de ON [Ito K. et al 2005] y bloqueantes de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II [Manucha W. et al 2005-1 and Manucha W. et al 2005-2], son algunos de los más evaluados. Además y con creciente interés en los últimos años, se han incluido a las estatinas en los protocolos empleados para el estudio de trastornos extra renales así también como los renales [Buemi M. et al 2006]. Los ensayos relacionados a la obstrucción del tracto urinario y el uso concomitante de estatinas se fundamentan en los hallazgos realizados oportunamente en el año 1983 por el Dr. Saulo Klahr [Tannenbaum J. et al 1983] y más recientemente por nuestro laboratorio [Manucha W. et al 2005-2], donde se logró demostrar un significativo desbalance del metabolismo lipídico durante la nefropatía obstructiva.

Endo y col. (1976), originalmente aislaron de cultivos de *Penicillium* la denominada compactina (mevastatina), siendo este el primer inhibidor de la 3-hidroxi 3-metilglutaril Co A reductasa (HMG Co A reductasa). En adelante muchas y variadas estatinas han contribuido con distintos aportes de interés a la clínica del paciente dislipémico. Todos estos productos químicos comparten la acción farmacológica de ser hipolipemiantes por excelencia ya que al inhibir a la HMG Co A reductasa disminuyen la producción de colesterol atenuando la biosíntesis hepática del mismo, agotando los fondos comunes intracelulares de esteroides y aumentando la transcripción de receptores de lipoproteínas de baja densidad. Esto último conduce a elevar la eliminación de esas lipoproteínas y precursores del plasma. Por lo tanto, el tratamiento de las hiperlipemias se ha modificado sustancialmente con el uso de las estatinas. Siendo eficaces y seguras en adultos por lo que podría ser también beneficioso para niños con hipercolesterolemias.

Hasta el momento seis estatinas han sido estudiadas en la infancia: lovastatina, fluvastatina, pravastatina, simvastatina, atorvastatina y más recientemente rosuvastatina. El seguimiento de hasta tres años concluyó que a la vez de seguras son muy útiles para reducir colesterol total como LDL colesterol (Tapia Ceballos L. et al 2008).

Además de sus efectos hipolipemiantes, las estatinas manifiestan otros no relacionados directamente al metabolismo lipídico y que podrían referirse en términos generales como efectos pleiotrópicos (Tabla). Estos efectos fueron demostrados inicialmente por Panini SR. [Panini SR. et al 1989].

## Efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de los inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa

Efectos Anti-inflamatorios	Efectos Inmuno-moduladores
 <p>Moléculas de adhesión                      Proteínas quimio-atractivas                      Factores de transcripción proinflamatorios                      Enzimas proinflamatorias                      Marcadores séricos de inflamación                      Endotelina 1, Interleukina 6, Factores de crecimiento, NF<sub>κ</sub>B, Proteína C reactiva,</p>	 <p>Interferón gamma                      Proliferación de células linfoides                      Actividad de células Natural Killer                      Antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II                      Rechazo de órgano</p>

Kidney Int. Vol. 63 (2003) pp. 12-23.  
 Kidney Int. Vol. 71 (2007) pp. 1215-1222.

En relación a la injuria renal propia de la nefropatía obstructiva, son escasos los estudios que se han desarrollado, no obstante justifican el protagonismo significativo de ciertas estatinas disminuyendo la fibrosis así como la inflamación. Tal es el caso de atorvastatina que demostró disminución de la fibrosis y de la inflamación intersticial [Tian S. et al 2006; Mizuguchi Y. et al 2004] al igual que simvastatina [Vieira JM Jr. et al 2005], previniendo la activación y transdiferenciación tubular propia de la fibrosis renal del modelo de OUU. Además, fluvastatina a razón de 40 mg/Kg/día demostró actividad antioxidante, disminución de la fibrosis y del estrés oxidativo [Moriyama T. et al 2001]. Por su parte, Gianella A. y col. [Gianella A. et al 2007] demostraron que rosuvastatina, una estatina de última generación, podría tener utilidad potencial como opción terapéutica en enfermedades renales que cursarían con inflamación y fibrosis.

En general, las estatinas y a dosis elevadas se las clasifica dentro de la categoría de riesgo en el embarazo. La rosuvastatina atraviesa la placenta y se ha encontrado en el líquido amniótico y en los tejidos fetales en concentraciones del 20 y 30%, respectivamente, con respecto a las concentraciones plasmáticas de la madre después de una dosis oral de 25 mg/kg en las ratas preñadas, y en concentraciones todavía más altas en las conejas. El colesterol y otros productos intermedios son importantes para el desarrollo fetal y el mantenimiento de los tejidos adultos. No obstante, estudios recientes “*in vivo*” e “*in vitro*” revelan que la rosuvastatina es captada eficiente y

selectivamente por las células hepáticas, mientras que en los fibroblastos y otras células no hepáticas, la captación es mucho menor. En particular, en los cultivos de miocitos humanos, la rosuvastatina es menos activa que la atorvastatina y la simvastatina como inhibidor de la síntesis del colesterol. Esta menor actividad puede ser importante en la reducción de la toxicidad de las estatinas sobre las células musculares, toxicidad que se traduce como es sabido en rhabdomiólisis, mialgias y aumentos de la creatina fosfoquinasa (CPK).

Con relación a los efectos tóxicos, un reciente reporte informa sobre la seguridad y tolerancia del uso de rosuvastatina, donde se emplearon los datos de 12.400 pacientes que recibieron entre 5 y 40 mg. de rosuvastatina en forma continuada durante un programa multinacional fase II/III. Ningún paciente presentó rhabdomiólisis. Rosuvastatina fue bien tolerada por pacientes con dislipemia y su perfil de seguridad fue similar a otras estatinas del estudio [Shepherd J. et al 2004].

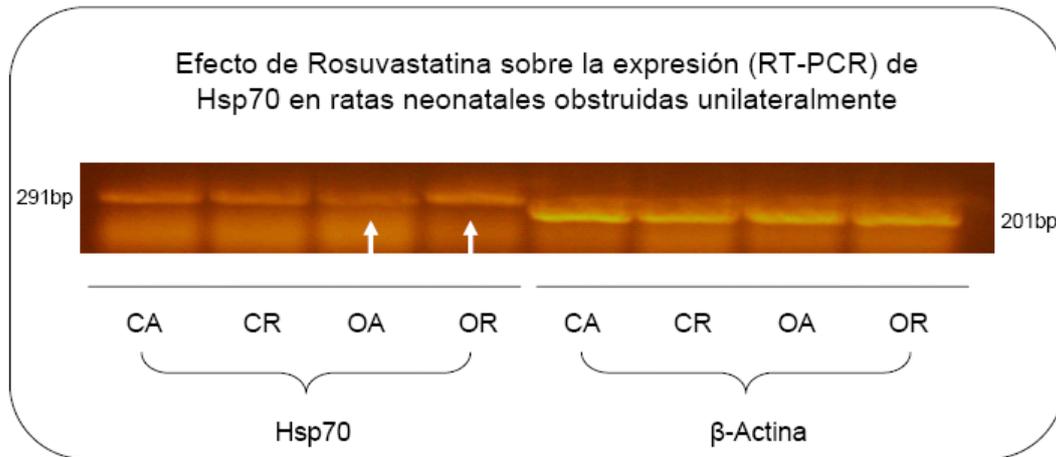
Los trabajos de nuestro laboratorio [Manucha W. et al 2005-1 y Manucha W. et al 2005-2] y de otros investigadores [Saborio P. et al 2000 y Modi KS. et al 1990], han demostrado que la concentración de colesterol plasmática así como los niveles de malondialdehído (MDA) renal (peroxidación lipídica) y otros marcadores del metabolismo lipídico, fueron todos considerablemente aumentados en los animales sometidos a OUU. Por lo tanto, el estrés oxidativo es una constante en la injuria renal obstructiva y siendo la actividad de la enzima NADPH oxidasa la principal responsable de niveles elevados del anión superóxido, resulta de especial interés y en relación al uso de rosuvastatina a razón de 20 mg/Kg, que dicho tratamiento revierte la pérdida de la integridad en la barrera de filtración de podocitos en un modelo de ratas transgénicas Ren2 con un transgen de renina de ratón que se caracteriza por incrementar los niveles de estrés oxidativo renal así como albuminuria (Whaley-Connell A et al 2008).

Un novedoso reporte concluye, que el uso concomitante de rosuvastatina y un bloqueante de receptores de angiotensina II (candesartán) en el modelo de glomeruloesclerosis mesangioproliferativa experimental, detiene significativamente el avance hacia la fibrosis renal crónica y la insuficiencia. La acción aditiva de ambos tratamientos incluiría acciones separadas e independientes sobre la fibrogénesis renal,

infiltración celular e inflamación (factores claves en la progresión de la enfermedad renal crónica) (Krämer S. et al 2008).

La inducción a la apoptosis es esencial para mantener la integridad funcional del riñón (desarrollo normal así como recambio celular fisiológico). Por lo tanto, la interpretación de los acontecimientos reguladores de la misma durante la nefropatía obstructiva, contribuirán a incrementar nuestro conocimiento sobre el tema en virtud del cual podrán establecerse nuevos y mejores criterios para el desarrollo de terapias más convenientes. Con relación a esto, en un reciente trabajo de nuestro laboratorio demostramos disminución en la expresión de Hsp70 durante la obstrucción ureteral unilateral neonatal como factor clave en el desarrollo injurioso renal y que el óxido nítrico induciría la expresión de Hsp70, lo cual contribuiría protegiendo del daño apoptótico y oxidativo (Manucha W and Vallés P. 2008). Resultados que apoyarían los hallazgos previos descritos por el grupo del Dr. T. Uchiyama, donde mostraron que el uso de estatinas induciría la expresión de un factor (HSF1) que a su vez incrementaría la expresión de Hsp70 favoreciéndose la función endotelial y orgánica (Uchiyama T. et al 2007). La relación entre la expresión de Hsp70 y el uso de estatinas podría ser útil para intentar justificar sus efectos antioxidantes ya que este y otros factores asociados son la respuesta más temprana a la injuria oxidativa celular.

Actualmente nuestro laboratorio lleva adelante experimentos con ratas neonatas sometidas a cirugía obstructiva unilateral y luego de 2 semanas de tratamiento con rosuvastatina a razón de 10mg/Kg/día por vía oral. Resultados preliminares demuestran reversión de parámetros de estrés oxidativo así también como disminución de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, incremento en los niveles corticales de óxido nítrico endógeno y balance de los principales moduladores de la vía mitocondrial apoptótica (resultados preliminares aún no publicados). Además, los ensayos tanto de western blot como así también RT-PCR, justifican en corteza renal una disminución de la expresión de Hsp70 durante la obstrucción; mientras que los animales tratados con la rosuvastatina, incrementaron su expresión por encima del control (Figura 2).



Dichas modificaciones podrían justificar un rol citoprotector de la estatina a expensas principalmente de la modulación del estrés oxidativo propio del modelo así también como de la apoptosis.

Finalmente, si bien la frecuencia de enfermedades renales crónicas se incrementa en todo el mundo lo cual demanda una gran necesidad de desarrollar terapias capaces de detener o reducir la progresión de la enfermedad y no obstante, son muchas las evidencias básicas y clínicas que informan sobre posibles beneficios de las estatinas en alteraciones funcionales del riñón, aún se requieren de múltiples estudios para confirmar su inocuidad y justificar su uso sobre todo en niños.

### ***Bibliografía***

- Buemi M, Nostro L, Crascì E, Barillà A, Cosentini V, Aloisi C, Sofi T, Campo S, Frisina N. Statins in nephrotic syndrome: a new weapon against tissue injury. *Med Res Rev.* 2005 Nov;25(6):587-609. Review. Erratum in: *Med Res Rev.* 2006 Mar;26(2):269-70.
- Blanco-Colio LM, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Egido J. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int.* Vol. 63 (2003), pp. 112-23.
- Campese VM and Park J. HMG-CoA reductase inhibitors and the kidney. *Kidney Int.*, 71 (2007): 1215-1222.
- Chevalier RL. Promise for gene therapy in obstructive nephropathy. *Kidney Int.*, 66 (2004): 1709-1710.

- Gianella A, Nobili E, Abbate M, Zoja C, Gelosa P, Mussoni L, Bellosta S, Canavesi M, Rottoli D, Guerrini U, Brioschi M, Banfi C, Tremoli E, Remuzzi G, Sironi L. Rosuvastatin treatment prevents progressive kidney inflammation and fibrosis in stroke-prone rats. *Am J Pathol.* 2007 Apr; 170 (4): 1165-77.
- Huwiler A, Pfeilschifter J, van den Bosch H. Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem.* 274 (1999): 7190-7195.
- Ito K, Chen J, Seshan SV, Khodadadian JJ, Gallagher R, El Chaar M, Vaughan ED Jr, Poppas DP, Felsen D. Dietary arginine supplementation attenuates renal damage after relief of unilateral ureteral obstruction in rats. *Kidney Int.* 68 (2005): 515-528.
- Klahr S, Harris KPG, Purkerson ML. Effects of obstruction on renal function. *Pediatric Nephrol.* 2 (1988): 34-42.
- Krämer S, Kron S, Wang-Rosenke Y, Loof T, Khadzhyonov D, Morgera S, Kawachi H, Shimizu F, Martini S, Neumayer H, Peters H. Rosuvastatin is additive to high-dose candesartan in slowing progression of experimental mesangioproliferative glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F801-F811, 2008.
- Manucha W and Vallés P. Cytoprotective role of nitric oxide associated with HSP70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* vol 18 (3): 204-215, 2008.
- Manucha W, Carrizo L, Alvarez S, Valles P, Oliveros L. Effect of losartan pretreatment on kidney lipid content after unilateral obstruction in rats. *Cell Mol Biol.* 51 (2005-2): 539-545.
- Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Molina H, Vallés P. Angiotensin II type I antagonist on oxidative stress and heat shock protein 70 (Hsp70) expression in obstructive nephropathy. *Cell Mol Biol.* 51 (2005-1): 547-555.
- Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Vallés P. Apoptosis induction is associated with decreased NHE<sub>1</sub> expression in neonatal unilateral ureteric obstruction. *BJU Int.* 100 (2007): 191-8.
- Manucha W. Biochemical-molecular markers in unilateral ureteral obstruction. *Biocell.* 31 (2007): 1-12. Review
- Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED, Felsen D. Antibody to transforming

- growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 58 (2000):2301-2313.
- Miyajima A, Chen J, Poppas DP, Vaughan ED Jr, Felsen D. Role of nitric oxide in renal tubular apoptosis of unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 59 (2001): 1290-303.
- Mizuguchi Y, Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Asano T, Hayakawa M. Atorvastatin ameliorates renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction. *J Urol.* 2004 Dec; 172(6 Pt 1): 2456-9.
- Modi KS, Morrissey J, Shah SV, Schreiner GF, Klahr S. Effects of probucol on renal function in rats with bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 1990 Nov; 38 (5): 843-50.
- Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K, Takeji M, Horio M, Ando A, Imai E, Hori M. Fluvastatin suppresses oxidative stress and fibrosis in the interstitium of mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2001 Jun; 59 (6): 2095-103.
- Panini SR, Schnitzer-Polokoff R, Spencer TA, Sinensky M. Sterol-independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by mevalonate in Chinese hamster ovary cells. Magnitude and specificity. *J Biol Chem.* 1989 Jul 5;264 (19): 11044-52.
- Saborio P, Krieg RJ Jr, Kuemmerle NB, Norkus EP, Schwartz CC, Chan JC. Alpha-tocopherol modulates lipoprotein cytotoxicity in obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2000 Aug; 14 (8-9): 740-6.
- Shepherd J, Hunninghake DB, Stein EA, Kastelein JJ, Harris S, Pears J, Hutchinson HG. Safety of rosuvastatin. *Am J Cardiol.* 2004 Oct 1; 94 (7): 882-8.
- Tannenbaum J, Purkerson ML, Klahr S. Effect of unilateral ureteral obstruction on metabolism of renal lipids in the rat. *Am J Physiol.* 1983 Aug;245(2):F254-62.
- Tapia Ceballos L, Picazo Angelín B, Ruíz García C. Uso de estatinas durante la infancia. *An Pediatr (Barc).* 2008; 68(4):385-392.
- Tian S, Ding G, Jia R, Chu G. Tubulointerstitial macrophage accumulation is regulated by sequentially expressed osteopontin and macrophage colony-stimulating factor: implication for the role of atorvastatin. *Mediators Inflamm.* 2006; 2006 (2):12919.
- Uchiyama T, Atsuta H, Utsugi T, Oguri M, Hasegawa A, Nakamura T, Nakai A, Nakata M, Maruyama I, Tomura H, Okajima F, Tomono S, Kawazu S, Nagai R,

- Kurabayashi M. HSF1 and constitutively active HSF1 improve vascular endothelial function (heat shock proteins improve vascular endothelial function). *Atherosclerosis*. 2007 Feb;190(2):321-329.
- Vallés P, Merlo V, Berón W, Manucha W. Recovery of distal nephron enzyme activity after release of unilateral ureteral obstruction. *J. Urol*. 161 (1999): 641-648.
- Vieira JM Jr, Mantovani E, Rodrigues LT, Dellê H, Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Aug; 20(8): 1582-91. Epub 2005 Apr 26.
- Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, Cooper SA, Karuparthi PR, Hayden MR, Rehmer N, DeMarco VC, Andresen BT, Wei Y, Ferrario C, Sowers JR. Attenuation of NADPH oxidase activation and glomerular filtration barrier remodeling with statin treatment. *Hypertension* 2008; 51: 474-480.

## **Referencias de Tabla y Figuras**

### **Tabla**

*Efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de los inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa*

### **Figura 1**

*Efecto "in vivo" de L-arginina y L-NAME sobre la expresión de Hsp70*

Se estudió la expresión de Hsp70 por Western blot en homogenatos de cortezas obstruidas y controles de ratas de 14 días tratadas con L-arginina o L-NAME. Después de 14 días de tratamiento con L-arginina, se registró un significativo incremento en los niveles de la isoforma inducible de la proteína Hsp70 en cortezas de riñones obstruidos, así como en homogenatos controles de animales tratados con L-arginina en relación a los no tratados, \*\*\* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  respectively. Se demostró ausencia de la expresión de Hsp70 con el tratamiento de L-NAME.

### **Figura 2**

*Efecto de Rosuvastatina sobre la expresión (RT-PCR) de Hsp70 en ratas neonatales obstruidas unilateralmente.*