



# Efectos del micofenolato mofetil en la insuficiencia renal aguda isquémica en ratas

M. Chávez-Velásquez\*, \*\*, H. Pons\*, \*\*, M. Medina\*\*, Y. Quiroz\*\*\*, G. Parra\*, \*\* y J. Herrera\*\*, \*\*\*

\*Centro de Medicina y Cirugía Experimental. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. \*\*Unidad de Diálisis y Trasplante Renal del Hospital Universitario de Maracaibo. \*\*\*Fundacite-Zulia.

## RESUMEN

El micofenolato mofetil (MMF) es un inhibidor de la síntesis de las purinas comúnmente usado como inmunosupresor. Previo al trasplante, el riñón es sometido a períodos variables de isquemia, resultando en daño tisular por isquemia-reperusión. Para determinar si la inhibición de infiltración celular temprana están implicados en la evolución de la IRA isquémica, esta se indujo en ratas Sprague Dawley por oclusión del pedículo renal izquierdo durante 40 minutos con nefrectomía derecha, se le administró MMF (20 mg/kg/día por gavaje) 2 días previos a la isquemia (MMF-pre, n = 15), post-isquemia (MMF-post, n = 15) o vehículo (control, n = 15). La creatinina sérica (CS) fue medida diariamente en todos los grupos. Al segundo día postisquemia la CS fue significativamente más baja en el grupo MMF-pre con respecto al grupo MMF-post y control. El análisis histológico reveló que el daño histológico fue (34 ± 22 en el MMF-pre vs 54 ± 28% MMF-post, p NS). Al quinto día las ratas pre-tratadas y post-tratadas con MMF presentaron mayor necrosis tubulointersticial que en el control (17 ± 20 vs 33 ± 27, en el control 4 ± 5%). La infiltración de linfocitos T y monocitos (CD5 y ED 1 respectivamente) fue menor en animales pre-tratados con MMF, mientras en el grupo post-tratado y control fue mayor al segundo y quinto día. Así, en el intersticio a los 2 días, las células T CD5 fueron 10 ± 4 cel/ mm<sup>2</sup> en el MMF-post vs 3 ± 3 en el MMF-pre (p < 0,01), en el control 10 ± 4. A los 5 días no hubo diferencias significativas entre los grupos. Las células ED1 fueron 55 ± 40 cel/ mm<sup>2</sup> en el MMF-post vs 10 ± 9 en e MMF-pre, en el grupo control 64 ± 46 (p < 0,05). A los 5 días se mantuvo menor infiltración en el MMF-pre (5 ± 5 cel/ mm<sup>2</sup> vs 24 ± 18 en el MMF-post, grupo control 31 ± 33). Estos resultados sugieren que el tratamiento con MMF previo a la inducción de isquemia-reperusión puede mejorar el daño renal temprano (2 días).

Palabras clave: **Insuficiencia renal aguda. Inmunosupresión. Sistema inmunitario. Linfocitos T. Micofenolato mofetil.**

## EFFECT OF MYCOPHENOLATE MOFETIL IN RENAL FAILURE ACUTE ISCHEMIA IN RATS

### SUMMARY

Mycophenolate mofetil (MMF) is a purine synthesis inhibitor commonly used as immunosuppressive agent in transplantation. Kidney grafts undergo more or less pro-

**Correspondencia:** Maribel Chávez-Velásquez  
Centro de Medicina y Cirugía Experimental  
Facultad de Medicina. Universidad del Zulia  
Unidad de Diálisis y Trasplante Renal  
Hospital Universitario de Maracaibo  
Venezuela  
E-mail: Mard18@hotmail.com

longed cold ischemia after harvesting which results in variable degrees of ischemia reperfusion injury. To determine whether the inhibition of early events of cellular infiltration may influence the severity of damage induced by ischemic acute renal failure, 45 Sprague Dawley rats were given MMF at a dose of 20 mg/kg/day (MMF-rats) by gavage 2 days before (pre-MMF group,  $n = 15$ ) or after (post-MMF group,  $n = 15$ ) clamping the left renal artery for 40 minutes followed by right-sided nephrectomy (control group,  $n = 15$ ) received vehicle. Serum Creatinine (Screat) was measured daily in all groups. On the 2<sup>nd</sup> post-ischemic day Screat was significantly lower ( $p = 0.001$ ) in pre-MMF group compared with post-MMF group and control group ( $4 \pm 2$  mg/dl post-MMF group vs  $1.7 \pm 1.2$  mg/dl pre-MMF group, control group  $5 \pm 2$ ,  $p < 0.05$ ). Kidney biopsies shown that the histologic damage was  $54 \pm 28\%$  in post-MMF group vs  $34 \pm 22\%$  in pre-MMF group and  $61 \pm 25\%$  in control group (pre-MMF vs post-MMF,  $p$  NS). On the 5<sup>th</sup> day post-ischemic, MMF-rats showed more severe tubulointerstitial necrosis (pre-MMF group:  $17 \pm 20\%$ , post-MMF group:  $33 \pm 27\%$ ) than controls ( $4 \pm 5\%$ ). The severity of ATN was significantly higher in post-MMF group compared with controls ( $p = 0.01$ ). Tubulointerstitial T-lymphocyte (T CD 5) and monocyte (ED 1) infiltration evaluated on the 2<sup>nd</sup> post-ischemic day was less intense in group I (T CD5:  $3 \pm 3$ , ED 1:  $10 \pm 9$ , cel/mm<sup>2</sup>) compared to post-MMF group (T CD 5:  $10 \pm 4$ , ED 1:  $55 \pm 40$ ) and to control group (T CD 5:  $10 \pm 4$ , ED 1:  $64 \pm 46$ ). However, on the 5<sup>th</sup> post-ischemia day, ED 1 infiltration was significantly higher in post-MMF group ( $24 \pm 18\%$ ) compared to pre-MMF group ( $5 \pm 5$ ,  $p$  NS) and also in pre-MMF group vs control group ( $31 \pm 33$ ,  $p < 0.05$ ). Our results suggest that MMF given before a renal ischemic insult may reduce the severity of histologic damage resulting from ischemia reperfusion injury.

Key words: **Renal failure acute. Immunosuppression. Immune system. Lymphocytes T. Mycophenolate mofetil.**

## INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal aguda (IRA) es una enfermedad frecuente con alta morbilidad y mortalidad que afecta cerca del 5% de los pacientes hospitalizados<sup>1</sup>. Las opciones de tratamiento para la IRA son limitadas y la mortalidad permanece entre 30 y 50%<sup>2</sup>. La injuria renal inducida por isquemia reperfusion (I-R) es una de las causas más comunes de IRA, está caracterizada por disminución de oxígeno local, alteraciones en el metabolismo celular con disminución en los niveles de sustrato metabólico de ATP y glucosa, inflamación, generación de radicales libres, *apoptosis* y necrosis que resultan en el deterioro de la célula tubular<sup>4-8</sup>. El daño renal ocasionado por I-R genera una respuesta inflamatoria que causa daño del tejido asociado con severo deterioro de la célula epitelial, con expresión de moléculas de adhesión, infiltración leucocitaria y producción de citocinas<sup>9-11</sup>. Dependiendo de la severidad de la isquemia y de la susceptibilidad del tejido, el daño isquémico puede resultar en un deterioro permanente de la función renal atribuible a

muerte celular; o compromiso transitorio de la función por daño subletal de la célula renal, con la subsecuente recuperación<sup>11-13</sup>. La isquemia renal conlleva a daño de la célula epitelial en el segmento S3 del túbulo proximal y el resultado después de la isquemia depende en gran parte de la regeneración de estas células específicas<sup>5,6,14,18</sup>. La porción externa de la médula renal es particularmente susceptible a la injuria isquémica y es primariamente responsable de la presentación clínica y fisiopatológica de la IRA<sup>6,18</sup>. Algunos investigadores ha sugerido que las células inflamatorias, particularmente linfocitos, macrófagos y neutrófilos tienen un rol importante en la IRA isquémica. Se ha observado la infiltración de linfocitos en riñones de humanos posterior a la isquemia, así como la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, relacionada también con la infiltración de neutrófilos en el tejido renal isquémico<sup>14,16,17,19,20</sup>.

Otros autores demostraron que la administración de anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 protege de la IRA isquémica<sup>21,22</sup>. Otra vía que contribuye a la injuria de I-R es el componente citotóxico de las cé-

lulas infiltrantes como macrófagos, linfocitos y neutrófilos que involucra las especies reactivas del oxígeno y el óxido nítrico, así la inhibición de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) con oligonucleotidos antisentido protege la célula tubular proximal del daño isquémico/hipóxico *in vivo*<sup>23,24</sup>. El trasplante renal involucra que los riñones son sometidos a isquemia por períodos variables, resultando en daño isquémico.

Diferentes protocolos de inmunosupresión han sido utilizados en trasplante renal con excelentes resultados, aunque la supervivencia del trasplante es imprecisa. Algunos de esos agentes inmunosupresores son también nefrotóxicos, tales como la ciclosporina A y el tacrolimus y pueden ocasionar injuria renal a través de mecanismos no inmunológicos como isquemia, hipertensión o hiperlipidemia. La respuesta a la injuria renal está caracterizada por infiltración de leucocitos, producción de citocinas inflamatorias y deterioro de la función renal<sup>25,26</sup>.

El micofenolato de mofetil (MMF), un agente inmunosupresor comúnmente usado en pacientes trasplantados; es un inhibidor reversible, no competitivo del inosín 5' monofosfato dehidrogenasa, el cual controla la síntesis de guanosín trifosfato; su mecanismo de acción es la depleción de la concentración intracelular de guanosín trifosfato (GTP) y desoxiguanosín trifosfato (dGTP), lo cual resulta en supresión de la síntesis de ADN de linfocitos T y B estimulados con antígenos o mitógenos. No inhibe los eventos tempranos de la activación de linfocitos incluyendo la producción de citocinas. También inhibe la formación de anticuerpos y la producción de moléculas de adhesión en la superficie de la célula. Ha sido utilizado para prolongar la supervivencia del trasplante en modelos animales y en humanos, y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como artritis reumatoidea, también en la nefrectomía 5/6 para reducir la infiltración celular en el tubulointersticio, observándose disminución del daño renal en la porción remanente de riñón<sup>27,34</sup>. Investigaciones recientes demostraron que el tratamiento con MMF disminuye la infiltración intersticial de macrófagos y linfocitos, así como también de miofibroblastos e inhibe la reparación y regeneración de células del túbulo proximal y agrava la disfunción renal<sup>34</sup>. Recientemente se reportó que el tratamiento con MMF daña significativamente la función renal y reduce la hipertrofia compensatoria en el riñón remanente, la proliferación celular, la infiltración de miofibroblastos y el depósito de colágeno III en la nefrectomía subtotal en ratas<sup>36</sup>.

La recuperación de la IRA requiere reemplazo o regeneración de la célula epitelial tubular. Este proceso es acompañado de cambios en la expresión de genes de factores que modulan el crecimiento<sup>37,38</sup>.

Convencionalmente se ha sugerido que el daño tisular es reparado por proliferación de células del parénquima que sobreviven<sup>39</sup>.

Dado que se demostró que ratas tratadas con MMF posterior a la inducción de I-R unilateral y nefrectomía contralateral tienen menor número de túbulos normales e incremento de túbulos con necrosis total, con reducción de linfocitos y monocitos, el propósito de este trabajo es determinar si la administración previa de MMF para inhibir eventos tempranos de infiltración celular pudieran estar implicados en la evolución de IRA isquémica. Con este fin se decidió usar MMF 2 días previos a la inducción de I-R para inhibir infiltración y proliferación celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley machos, de 320 a 400 g. Se trabajó con 3 grupos de ratas, 2 experimentales (n = 15 en cada grupo) y un grupo control (n = 15). Ambos grupos experimentales *MMF-pre* y *MMF-post* y control mantenidos a temperatura corporal dentro de rangos fisiológicos se les practicó bajo anestesia con ketamina (75 mg/kg im) y diazepam (5 mg/kg im)<sup>40</sup> laparotomía media, ambos pedículos renales fueron disecados. La isquemia fue inducida por oclusión del pedículo renal izquierdo por 40 minutos con un clam no traumático, seguido por nefrectomía derecha. Al grupo *MMF-pre* se le administró MMF (Roche. New York. USA) 48 horas antes de la inducción de la isquemia y al *MMF-post* aproximadamente 18 horas después, a dosis de 20 mg/kg/día, por gavaje, continuando hasta el final del experimento (5 días). Al grupo control se les administró agua. A todos los animales se les permitió acceso libre a comida y agua. Se les extrajo sangre diariamente por punción de la vena caudal, para la determinación de creatinina sérica. Se sacrificaron ratas de cada grupo a los 2 días y a los 5 días posteriores a la inducción de la I-R y se les extrajo el riñón para estudio histológico.

### Estudios histológicos

#### Preparación del tejido

Se tomaron muestras de 3 mm de tejido renal de los polos superior e inferior. Una parte fue fijado en formalina al 10% y Methyl Carnoy's para estudio de hematoxilina-eosina y PAS para luego ser incluidas en parafina, y otra en Tissue Freezing Medium como

preservador y fueron congeladas en una mezcla de hielo seco y acetona y conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para estudio inmunohistológico.

### Tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) para muestras en parafina

Las biopsias en parafina fueron sometidas a coloración con Ácido Periódico de Schiff o PAS<sup>41</sup>. Se examinaron bajo el microscopio de luz entre 200 y 250 túbulos en cada tejido, con aumento de 60 X y ocular 10X. Todos los túbulos en el área cortical y yuxtaglomerular en cada biopsia fueron examinados y clasificados en términos de porcentaje de área de las secciones que mostraban daño histológico<sup>42</sup>.

La severidad de la lesión tubular fue clasificada de acuerdo al siguiente criterio: *Normal o no injuria* = túbulos intactos con célula tubular normal y conservación del borde en cepillo. *Lesión o daño de la célula tubular* = pérdida del borde en cepillo. *Necrosis tubular focal* = pérdida del borde en cepillo con detritus intratubular y preservación de la membrana basal tubular. *Necrosis completa* = necrosis del túbulo y ruptura de la membrana basal tubular con salida de citoplasma<sup>6</sup>.

### Tinción por inmunofluorescencia indirecta con fluoresceína para muestras de biopsias congeladas

Los estudios inmunohistológicos se realizaron en secciones congeladas de 4 mm de espesor obtenido de los tejidos renales de las ratas en estudio. Con anticuerpos monoclonales apropiados para infiltración de linfocitos (ratón anti CD5 de rata) (Biosource. USA), el cual se une al antígeno CD5, expresado mayoritariamente en linfocitos T y minoritariamente en una subpoblación de linfocitos B. Un segundo anticuerpo monoclonal rata anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína es añadido para detectar la reacción anterior. (Accurate Chemical. USA.) La determinación de monocitos-macrófagos se fundamenta en la detección del antígeno de monocitos-macrófagos con anticuerpos monoclonales, donde el primero (ratón anti-ED-1 de rata) (Biosource. USA) se une al antígeno. Un segundo anticuerpo monoclonal rata anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína es añadido para detectar la reacción anterior. (Accurate Chemical. USA.)

### Determinación de creatinina

A cada una de las ratas en estudio se les extrajo 0,5 ml de sangre periférica sin anticoagulante, por

punción de la vena caudal. Se determinó los valores de creatinina sérica basal y diariamente durante los 5 días del experimento. La medición se realizó por el método de Jaffé<sup>43</sup>.

### Metodología estadística

Los resultados son expresados en promedios y desviación estándar de los grupos estudiados. Los resultados a los 2 y 5 días se determinaron por la prueba de anova con post-test de Turkey.

## RESULTADOS

### La administración de MMF previo a la isquemia-reperfusión aumenta ligeramente la creatinina

La inducción de I-R aumentó marcadamente la creatinina desde el primer día post-isquemia, siendo más acentuada al segundo día (fig. 1). La creatinina sérica en el segundo día fue significativamente menor en el grupo pre-tratado que en los otros dos grupos (fig. 1). A los 5 días la creatinina se normalizó en todos los grupos (fig. 1).

Es este estudio los cambios determinados por concentración de creatinina sérica, observamos que el pre-tratamiento con MMF resulta en protección funcional de la injuria de I-R donde el grupo pre-tratado con MMF mantuvo valores bajos de creatinina

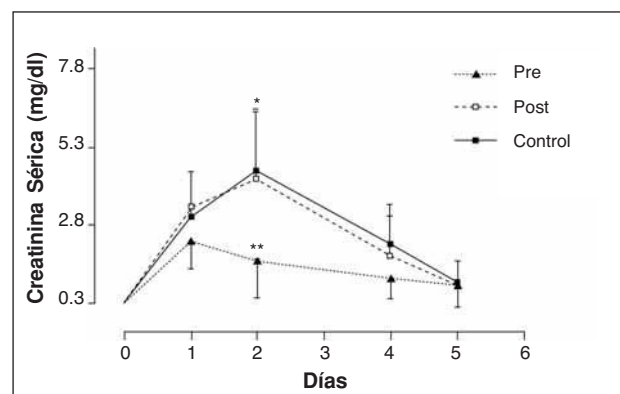


Fig. 1. — Niveles de creatinina sérica en ratas con IRA isquémica tratadas con MMF y controles. Ratas del grupo MMF-pre y MMF-post, recibieron MMF (20 mg/kg/d); 2 días previos a la inducción de isquemia-reperfusión y 1 día después respectivamente, las ratas del grupo control recibieron vehículo (agua destilada). Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar en cada día. \* $p < 0,01$  \*\* $p < 0,001$ . IRA: Insuficiencia renal aguda, MMF: Micofenolato mofetil.

desde el primer día post-isquemia en comparación con los grupos post-tratados y controles en los cuales la creatinina se elevó desde el inicio, con valores más altos al segundo día, alcanzando los 3 grupos valores normales al quinto día.

### Cambios histológicos en el tejido renal al segundo y quinto día posterior a la isquemia-reperusión

Un número de ratas en el grupo MMF-pre (n = 8), MMF-post (n = 5) y control (n = 3), fueron sacrificado para evaluar el tejido renal al segundo día, y al quinto día posterior a la isquemia-reperusión en el grupo MMF-pre (n = 7), MMF-post. y control (n = 9). El daño tubulointerstitial estuvo presente en los 3 grupos de animales siendo mayor en las ratas no tratadas con MMF a diferencia de las que recibieron MMF donde se observaron menos cambios histológicos y menos daño tubulointerstitial. A las biopsias tomadas al segundo y quinto día se les determinó infiltración de linfocitos y macrófagos.

### Cuantificación histológica del grado de necrosis (PAS) al segundo y quinto día

Se determinó el grado de daño histológico por tinción con (PAS). La extensión del daño fue evaluado en términos de porcentajes de área en las secciones de tejido que mostraban algún nivel de daño histológico. En la tabla I, se observan los hallazgos histológicos, al segundo día la necrosis tubular se observó con tendencia más acentuada en el grupo control, donde 61 ± 25% de los túbulos presentaban necrosis (fig. 2). Aunque la necrosis tubular estuvo presente en el grupo MMF-pre 34 ± 22 y en el MMF-post 54 ± 28%, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Al quinto día la necrosis tubular fue más acentuada en el grupo MMF-post, se observó que las ratas de este grupo presentaban necrosis de la célula epitelial tubular, con detritus intratubular y en algunos casos se observó membrana

basal conservada. Se determinó que la necrosis en el grupo MMF-post fue 33 ± 27 vs 4 ± 5% en el control, la diferencia fue estadísticamente significativa p < 0,05. En el grupo MMF-pre fue 17 ± 20%. Aun cuando mostró tendencia a disminuir no hubo diferencias significativas al compararlo con los grupos MMF-post y control.

### Infiltración de linfocitos (CD5) al segundo y quinto día posterior a la isquemia-reperusión

La infiltración de linfocitos fue demostrada por la detección de la molécula CD5.

La presencia de células CD5 positivas de las ratas del grupo MMF-post al segundo día fue de 10 ± 4 vs 3 ± 3 cel/mm<sup>2</sup> en el grupo MMF-pre. El tratamiento previo con MMF redujo la infiltración. La diferencia fue estadísticamente significativa p < 0,01. En el grupo control fue de 10 ± 4 cel/mm<sup>2</sup>, al compararlo con el grupo MMF-pre hubo diferencias significativas p < 0,05, mientras que con el MMF-post no mostró diferencias estadísticamente significativas (figs. 3A y 4). La infiltración de linfocitos CD5 positivas al quinto día se observó aumentada en el grupo control en comparación al segundo día. En el MMF-pre, el número de células CD5 positivas aumentó ligeramente 6 ± 5 cel/mm<sup>2</sup> y en el MMF-post se observó levemente disminuido 8 ± 8 cel/mm<sup>2</sup> comparado con el segundo día. El grupo control aumento sustancialmente 19 ± 23 cel/mm<sup>2</sup>. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre ambos grupos experimentales y con respecto al grupo control (fig. 3B).

### Infiltración de monocitos (ED1) al segundo día y quinto día posterior a la isquemia-reperusión

La presencia de monocitos se demostró por la detección de la molécula ED1. Al segundo día en el grupo control hubo mayor número de células ED1 positivas 64 ± 46 cel/mm<sup>2</sup> que en las ratas MMF-

**Tabla I.** Hallazgos histológicos en la célula tubular renal

	MMF-pre		MMF-post		Control	
	2° día	5.° día	2.° día	5° día	2.° día	5.° día
No injuria %	65,6 ± 7,0	82,9 ± 20,1	46,0 ± 27,7	66,7 ± 26,8	40 ± 25	96,0 ± 5,3
Necrosis focal %	7,5 ± 2,6	7,8 ± 6,4	9,0 ± 6,9	16,2 ± 11,2	26,0 ± 2,0	3,3 ± 4,4
Necrosis completa	34,4 ± 22	17,2 ± 20,3	54,0 ± 27,7	33,3 ± 26,8*	61 ± 25,0	4,0 ± 5,3*

Los Valores expresan promedios ± desviación estándar, n = 3-9 biopsias por grupo, en cada sacrificio. La injuria tubular es expresada como porcentaje de área examinada. \* Corresponde a la significancia estadística entre grupos \*p < 0,05.

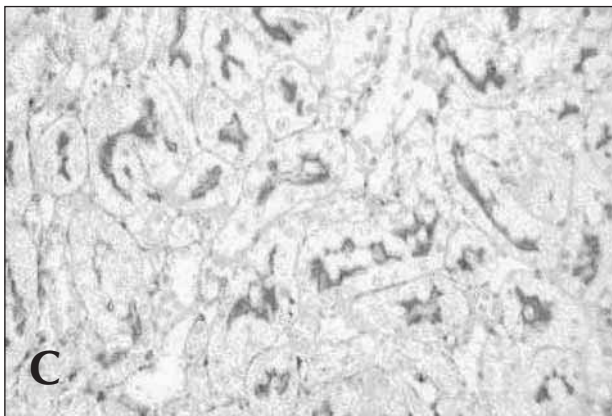
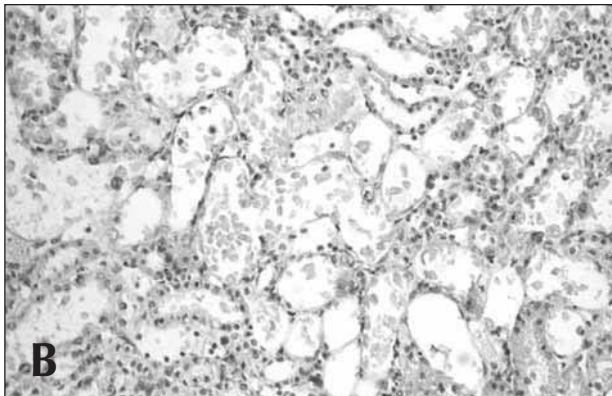
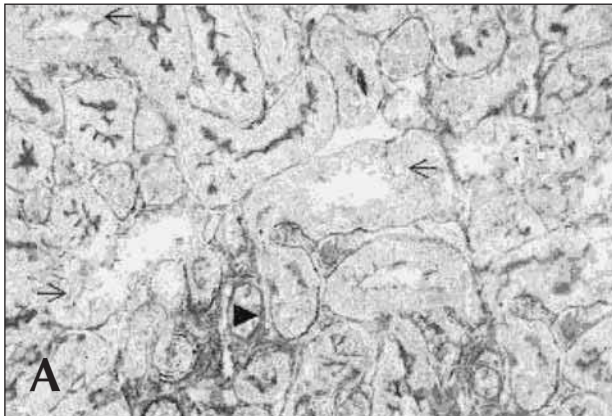


Fig. 2.—Cambios estructurales en el tubulointersticio renal al segundo y quinto día posterior a la isquemia-reperfusión. (A) La tinción con PAS demostró al segundo día en el grupo control necrosis tubulointersticial con dilatación tubular (flechas) y áreas de daño con esclerosis y dilatación (cabeza de flecha). (B) Al quinto día en el grupo MMF-post se demostró necrosis de la célula epitelial tubular con detritus intratubular. (C) Biopsia al quinto día en el grupo control muestra una apariencia normal. Magnificación: 400X. PAS: Ácido per-iodico de Schiff.

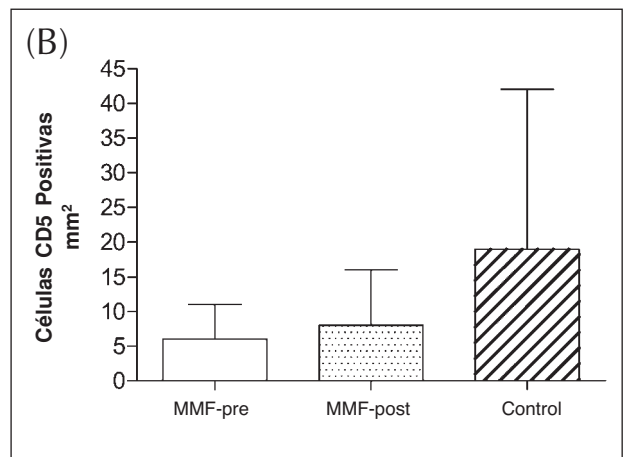
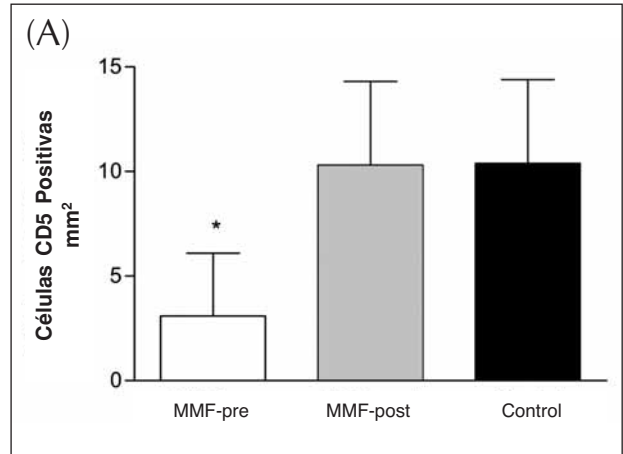


Fig. 3.—Linfocitos T CD5 positivos en tubulointersticio renal al segundo y quinto día posterior a la isquemia-reperfusión. Biopsias de ratas de los tres grupos que fueron sacrificadas al segundo día y quinto día, se trataron con anticuerpo monoclonal (ratón anti-CD5 de rata) y luego con un segundo anticuerpo rata anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína. Los valores representan el promedio + la desviación estándar de las ratas por grupo, se evaluó células positivas en no menos de 200 campos por rata. (A) Al segundo día, se estudiaron biopsias del grupo MMF-pre (n = 8), MMF-post (n = 5) y Control (n = 3), la diferencia entre los grupos MMF-pre y MMF-post, MMF-pre y Control fue estadísticamente significativa,  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente. (B) Al quinto día, se estudiaron biopsias de los grupos MMF-pre (n = 7), MMF-post (n = 9) y Control (n = 9), al compararlos no hubo diferencias significativas.

pre  $10 \pm 9$  cel/mm<sup>2</sup>. La diferencia fue estadísticamente significativa,  $p < 0,05$ . En el grupo MMF-post fue  $55 \pm 40$  cel/mm<sup>2</sup>. Al comparar los grupos MMF-pre y MMF-post se observó diferencias significativas,  $p < 0,05$  (figs. 5A y 6). Las diferencias entre el grupo control y el MMF-post no fueron significativas.

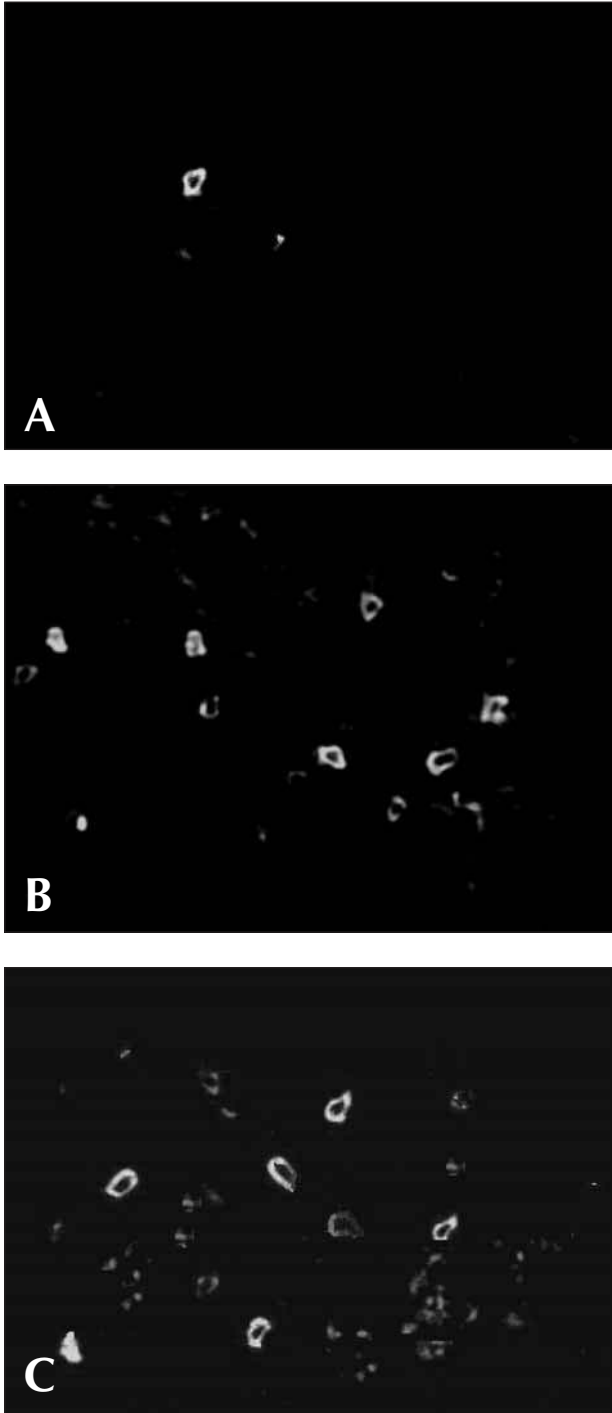


Fig. 4.—Infiltración de linfocitos T CD5 positivos al segundo día en los grupos MMF-pre y MMF-post y control. (A) Biopsias tratadas con anticuerpo monoclonal anti CD5 y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína demostró disminución de la infiltración de linfocitos al segundo día en el grupo pre-tratado con MMF. (B) Biopsia al segundo día en el grupo post-tratado con MMF y (C) Grupo control muestran mayor infiltración de linfocitos. Magnificación: 400X. MMF: Micofenolato mofetil.

A los 5 días, el número de células ED1 positivas se observó disminuido en comparación con el segundo día. La infiltración de células ED1 persistió más elevada en el grupo control  $31 \pm 33$  y en el grupo MMF-post  $24 \pm 18$  cel/mm<sup>2</sup>, en el MMF-pre  $5 \pm 5$  cel/mm<sup>2</sup>. Al compararlos no hubo diferencias entre los grupos (fig. 5B).

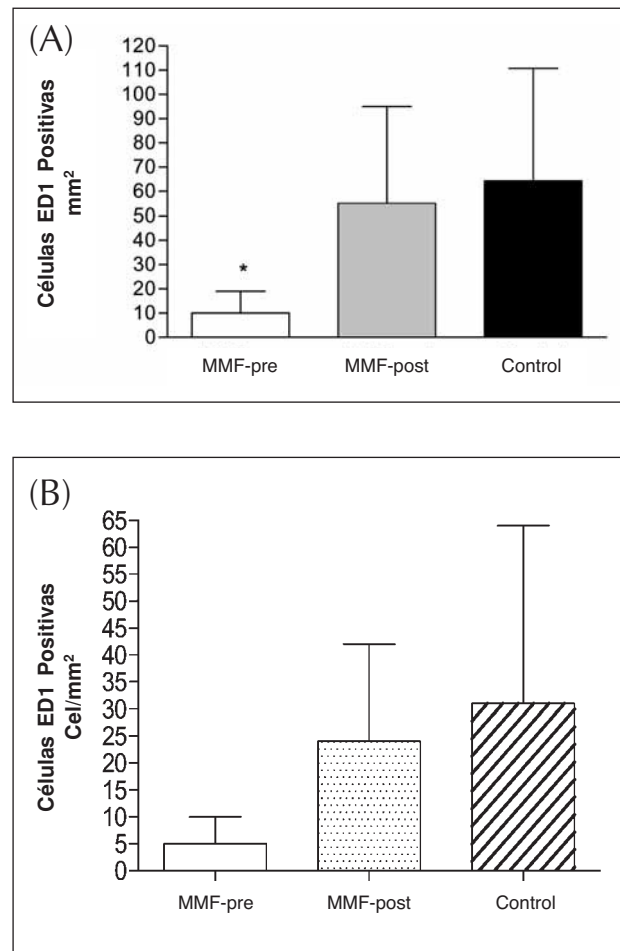


Fig. 5.—Monocitos ED1 positivos en tubulointersticio renal al segundo día posterior a la isquemia-reperfusion. Biopsias de ratas de los tres grupos que fueron sacrificadas al segundo día y quinto día, se trataron con anticuerpo monoclonal (ratón anti-CD5 de rata) y luego con un segundo anticuerpo rata anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína. Los valores representan el promedio + la desviación estándar de las ratas por grupo, se evaluó células positivas en no menos de 200 campos por rata. (A) Al segundo día, se estudiaron biopsias del grupo MMF-pre (n = 8), MMF-post (n = 5) y Control (n = 3), la diferencia entre los grupos MMF-pre y MMF-post, MMF-pre y Control fue estadísticamente significativa,  $p < 0,05$ . (B) Al quinto día, se estudiaron biopsias de los tres grupos MMF-pre, (n = 7) MMF-post y Control (n = 9) en cada grupo. Al compararlos no hubo diferencias significativas.

## DISCUSIÓN

La injuria por isquemia-reperfusión es causa común de disfunción renal en pacientes trasplantados y representa un factor de riesgo adicional para el desarrollo de insuficiencia renal aguda<sup>25,44</sup>. Los riñones, que normalmente son muy perfundidos, son particularmente vulnerables al deterioro por hipoperfusión o isquemia<sup>45</sup>. La injuria de isquemia-reperfusión genera una respuesta inflamatoria que causa daño al tejido renal, asociado con severo deterioro de la célula epitelial, activación del endotelio, activación de proteasas, producción de citoquinas y expresión de moléculas de adhesión con subsecuente infiltración de leucocitos en el riñón<sup>3,9,11</sup>. La recuperación celular después de la IRA es la única vía para mejorar el daño, siendo los mecanismos que median esta recuperación, complejos y aun poco entendidos<sup>35</sup>. El modelo de IRA inducido en ratas por injuria de I-R ha sido recientemente usado para evaluar sus efectos sobre riñón, demostrándose que está asociado a daño renal<sup>3,46</sup>. Existe evidencia del retardo en la recuperación funcional y estructural de la isquemia renal pos-trasplante, en comparación con la insuficiencia renal aguda de etiología diferente, lo cual ha sido relacionado con el uso de drogas inmunosupresoras<sup>3,46,47</sup>. Las drogas inmunosupresoras más frecuentemente usados en trasplante renal son los inhibidores de la calcineurina entre los cuales están la ciclosporina A y el tacrolimus, los cuales están asociados con efectos adversos, especialmente nefrotoxicidad<sup>48</sup>. También el MMF, un inhibidor reversible, no competitivo de la síntesis de novo de las purinas, con mínima nefrotoxicidad, suprime la proliferación de linfocitos T, linfocitos B y monocitos<sup>32,49,50</sup>. El MMF ha sido usado en modelos de IRA isquémico inducido en ratas para evaluar sus efectos sobre riñón, demostrándose que disminuye la proliferación de la célula tubular<sup>3</sup>. Previamente hemos reportado que el MMF administrado posterior a la inducción de I-R agrava el daño renal, sin embargo, existen diferencias entre ambos modelos, en el primero, la inducción de isquemia fue en ambos riñones durante 45 minutos, en el presente trabajo, la isquemia renal fue durante 40 minutos y solo en el riñón izquierdo, posteriormente se realizó nefrectomía contralateral, probablemente la inducción de isquemia durante mayor período de tiempo, podrían explicar mayor daño en el grupo post-tratado con MMF reportado previamente<sup>51</sup>. En el presente estudio se planteó la administración previa de MMF para inhibir los efectos tempranos de infiltración celular y evaluar su implicación en la evolución de la IRA isquémica.

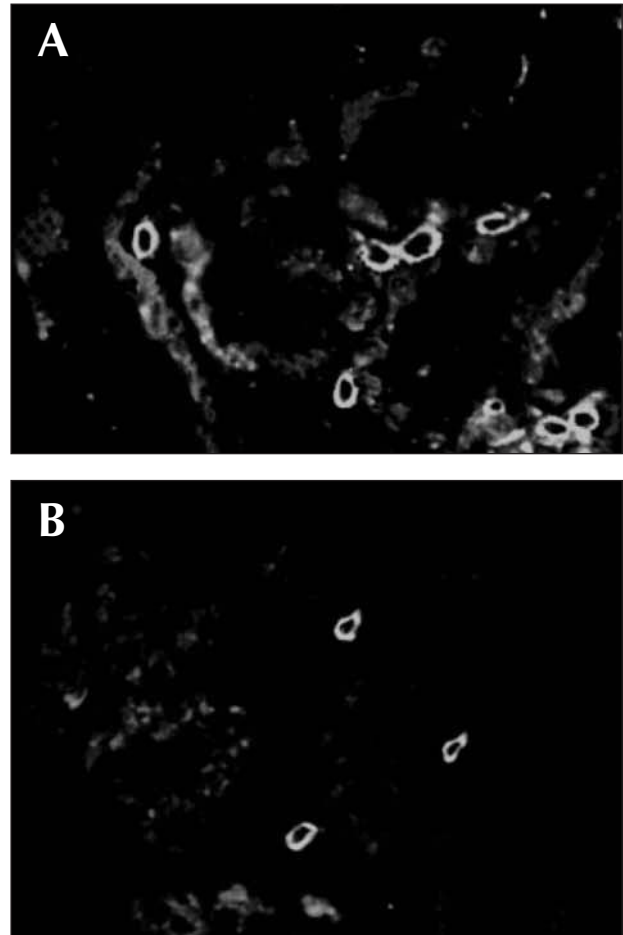


Fig. 6. —Infiltración de monocitos ED1 positivos al segundo día en el grupo control y pretratado con MMF. (A) Biopsias tratadas con anticuerpo monoclonal anti ED1 y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína demostró mayor infiltración de monocitos al segundo día en el grupo control. (B) Al segundo día en el grupo pretratado con MMF se observa disminución de la infiltración de monocitos. Magnificación: 400X. MMF: micofenolato mofetil.

Recientemente algunos investigadores reportaron en un modelo de I-R en ratas con nefrectomía contralateral, tratadas con MMF posterior a la isquemia, que la recuperación funcional de la isquemia no se vio afectada por el MMF<sup>3</sup>. Esta característica coincide con lo observado en este estudio, donde a los 2 días posteriores a la I-R la creatinina en el grupo post-tratado y control son similares, llegando a niveles normales a los 5 días. La diferencia con nuestro modelo está dada por la administración previa de MMF 48 horas antes de la inducción de la I-R, en este grupo la creatinina se observó significativamente disminuida a los 2 días en comparación con el post-tratado y control. Similares resultados fueron



reportados en estudios previos donde en isquemia bilateral en ratas pre-tratadas con MMF 2 días previos a la isquemia, observaron protección funcional de la injuria de I-R renal a los 2 días, lo que apoya el efecto citoprotector del MMF por disminución de los cambios hemodinámicos y de la función tubular<sup>46</sup>. Estudios en modelos de I-R sugieren que la infiltración de leucocitos en el riñón está relacionada con el daño en el tejido, muchos de los cuales señalan a los neutrófilos, linfocitos y macrófagos como mediadores importantes de este proceso reportándose cambios significativos en el infiltrado celular en esta patología<sup>10,41,52</sup>. Se ha comunicado que los leucocitos mononucleares comienzan a aparecer en el intersticio renal tan pronto como ocurre la IRA isquémica<sup>19</sup>. Previamente se ha sugerido que el MMF no protege directamente contra la injuria isquémica en modelos de ratas, pero interfiere a través de la reducción en la expresión de genes de RANTES, importante en la quimiotaxis de macrófagos y células T, y de un factor inflamatorio asociado a macrófagos, por lo cual hay reducción en el daño renal, enfatizando la contribución de la infiltración de leucocitos en el daño renal en el modelo de I-R<sup>35</sup>. Esto podría explicar los resultados de nuestro estudio donde la mayor infiltración de macrófagos a los 2 días se observó en el grupo control, coincidiendo con mayor daño histológico traducido en necrosis. Los 2 grupos tratados con MMF, presentaron menor infiltración de macrófagos con menor necrosis, siendo el grupo pre-tratado con MMF donde se evidenció menor grado de lesión tubular asociado a menor infiltración de macrófagos. Previamente se ha reportado que el MMF disminuye la proliferación inicial de la célula tubular y consecuentemente disminuye la regeneración tubular<sup>3</sup>. Otros autores reportaron observaciones similares de efectos adversos del MMF sobre el crecimiento celular y la liberación de citocinas de la célula epitelial tubular<sup>53</sup>. Lo que podría estar relacionado con los resultados de nuestro modelo a los 5 días posterior a la isquemia donde observamos mínima necrosis tubular en el grupo control a diferencia de los grupos tratados con MMF que mostraron mayor necrosis, siendo más elevada en el grupo post-tratado. Las diferencias observadas en el grado de necrosis a los 5 días entre ambos grupos tratados con MMF, donde el grupo pre-tratado presenta menor daño histológico, hace suponer que el MMF administrado previo a la inducción de I-R, además de inhibir la proliferación inicial de la célula tubular y por lo tanto su regeneración, inhibe la infiltración temprana de células, ya que el MMF bloquea la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, necesarias para iniciar la migración de las células

inflamatorias, lo que explica también la menor infiltración de macrófagos y linfocitos en este grupo, mientras que en grupo post-tratado la administración de MMF no fue antes de las 18 horas posterior a la isquemia, lo cual puede explicar el mayor daño tisular y mayor número de macrófagos y linfocitos infiltrantes en este grupo. Es decir, el MMF afecta en forma diferente la IRA y la lesión de I-R según el tiempo en el cual evaluemos la función renal. Podríamos explicarlo de la siguiente manera: El MMF inhibe la migración de células al riñón así como la proliferación de las mismas e incluso de las propias células renales, estas células pueden ser, tanto las nocivas que migran en etapa inicial y causan daño como neutrófilos, o las que migran y proliferan posterior al daño y tienen funciones regenerativas, es por eso, que los animales tratados con MMF tienen menos daño al inicio (menor infiltración de agresores) pero igualmente menos regeneración a los 5 días post-isquemia (menor infiltración de regeneradoras), ocurriendo exactamente lo opuesto en el grupo control. Investigaciones previas han sugerido que el tejido dañado es reparado por proliferación de las células del parénquima que sobreviven<sup>39</sup>. En el riñón, el origen de la regeneración celular que aparece después de la injuria renal no está bien establecido. No se conoce si en el riñón adulto existen células pluripotenciales stem cell que tienen el potencial de diferenciarse en células epiteliales renales<sup>54</sup>. Resulta interesante la observación del efecto adverso del MMF sobre el crecimiento de la célula epitelial<sup>53</sup> asumiendo el hecho que el MMF es considerado un agente antiproliferativo selectivo de linfocitos, debido a la potente inhibición de la síntesis de novo de 5'guanotri-fosfato deshidrogena necesaria para su síntesis<sup>55</sup>. Aparentemente existe la posibilidad que el MMF afecte células con alta actividad y capacidad proliferativa semejante a la observada en la célula epitelial tubular y en células del músculo liso en ratas con aloinjerto de aorta, inhibida por MMF<sup>56</sup>. Estos hallazgos corroboran la no exclusividad de la acción antiproliferativa del MMF sobre los linfocitos. Estudios previos demostraron que el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (HSC) o stem cell pueden contribuir a la regeneración tubular renal después de la injuria de isquemia-reperusión. Estas investigaciones demostraron que HSC de ratón pueden integrarse dentro de riñones en regeneración y que esta integración aumenta después de la injuria de isquemia-reperusión, observándose disminución en la expresión del marcador común leucocitario CD 45,2 y aumentando la expresión de marcadores de células renales, demostrando que las HSC pueden diferenciarse en células tubular renal durante la regeneración posterior a la injuria de isquemia-reper-

fusión en un modelo múrido<sup>57</sup>. Resulta interesante suponer la posibilidad de un mecanismo de daño mediado por el MMF al actuar sobre la integración de estas células progenitoras al tejido renal e inhibiendo su proliferación y diferenciación en células epitelial tubular renal.

En conclusión, en este trabajo se corrobora que el MMF dado después de la inducción de isquemia-reperfusión, no modifica el daño renal y que el tratamiento previo con MMF mejora el daño renal temprano (dos días).

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos el financiamiento de este trabajo a la Asociación de Amigos del Riñón y al Centro de Medicina y Cirugía Experimental. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alkhunazi AM, Schrier RW: Management of acute renal failure: New perspective. *Am J Kidney Dis* 315-28, 1996.
- Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME: Identification and kinetics of leucocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 1562-74, 2000.
- Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Verhulst A, Kockx M, Verpooten GA, De Broe ME: Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury. *Kidney Int* 864-73, 2003.
- Bonventre JV: Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1160-78, 1993.
- Eickelberg O, Seebach F, Riordan M, Thulin G, Mann A, Reidy KH, Van why SK, Kashgarian M, Siegel N: Functional activation of heat shock factor and hypoxia inducible factor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2094-101, 2002.
- Gobe G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z: Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 1299-1304, 1999.
- Morimoto RI: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 3788-96, 1998.
- Safirstein R: Gene expression in nephrotoxic and ischemic acute renal failure. *Am J Soc Nephrol* 1387-95, 1994.
- Ashworth SL, Molitoris BA: Pathophysiology and functional significance of apical membrane disruption during ischemia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 449-58, 1999.
- Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, Tang WW: Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* F525-F531, 2000.
- Sutton TA, Molitoris BA: Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 490-97, 1998.
- Lieberthal W, Levine JS: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* F477-F488, 1996.
- Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 3341-49, 1998.
- Goes N, Urmson J, Ramasar V, Holloran PF: Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response. Evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation* 565-72, 1995.
- Jennische E, Andersson G: Selective damage to S3-segments in post-ischemic kidney as demonstrated by a simple histochemical method. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (A)* 167-68, 1986.
- Lemay S, Rabb H, Postler G, Singh AK: Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1056-1063, 2000.
- Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 425-34, 1990.
- Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG: Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int* 31-49, 1978.
- Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL: The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 2682-90, 1997.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *N Engl J Med* 1448-60, 1996.
- Kelly JK, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV: Antibody to intracellular adhesion molecule-1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 812-16, 1994.
- Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV: Interleukin adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1056-63, 1996.
- Lieberthal W: Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 289-95, 1998.
- Noiri E, Pereslenti T, Miller F, Goligorsky MS: *In vivo* targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J Clin Invest* 2377-83, 1996.
- Shoskes DA, Halloran PF: Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1831-40, 1996.
- Shoskes DA, Parfrey NA, Halloran PF: Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation* 201-08, 1990.
- Allison A, Eugui E: Mycophenolate mofetil a rationally designed immunosuppressive drug. *Clinic Transplantation* 96-112, 1993.
- Allison A, Eugui E: Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clinic Transplantation* 77-84, 1996.
- Danoff T: Chemokines in interstitial injury. *Kidney Int* 1807-08, 1998.
- Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha ID: Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 1510-19, 1998.
- Kopp U, Dibona G: Neural control of renal function. En: Seldin D, Giesbisch G. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, Raven Press (New York). USA. pp. 1187-92. 1992.
- Romero F, Rodríguez-Isturbe B, Parra G, González L, Herrera J, Tapia E: Mycophenolate mofetil prevents the progressive

- renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int* 945-55, 1999.
33. Schiller B, Moran J: Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model –an inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrology Dialysis Transplantation* 430-37, 1997.
  34. Sigmon D, Beierwaltes W: Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension* 649-56, 1998.
  35. Di Fein S, Yoshihide F, Taiki F, Tetsu G, Katsuhiko Y, Akira H: Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response. *American Journal Pathology* 217-27, 2002.
  36. Badid C, Vincent M, McGregor B, Melin M, Hadj-Aissa A, Veyseyre C, Hartmann DJ, Desmouliere A, Laville M: Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. *Kidney Int* 51-61, 2000.
  37. Nigam S, Lieberthal W: Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* F3-F11, 2000.
  38. Safirstein R: Gene expression in nephrotoxic and ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1387-95, 1994.
  39. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL: Can stem cell cross lineage boundaries? *Nat Med* 393-95, 2001.
  40. Cruzado JM, Torras J, Riera M, Herrero I, Hueso M, Espinosa L, Condom E, Lloberas N, Bover J, Alsina J, Grinyó JM: Influence of nephron mass in development of chronic renal failure after prolonged warm renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* F259-F269, 2000.
  41. Forbes JM, Hewitson TD, Becker GJ, Jones CL: Ischemic acute renal failure: long-term histology of cell and matrix changes in the rat. *Kidney Int* 2375-85, 2000.
  42. Nava M, Romero F, Quiroz Y, Parra G, Bonet L, Rodríguez-Iturbe B: Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* F910-F918, 2000.
  43. Kaplan-Pesce: Química Clínica. Teoría Análisis y Correlación. Editorial Panamericana. pp. 32-56, 1992.
  44. Land W, Messmer K: The impact of ischemia/reperfusion injury on specific and nonspecific, early and late chronic events after organ transplantation. *Transplant Rev* 93-103, 1996.
  45. Sanfilippo F, Vaughn WK, Spees Ek, Lucas BA: The detrimental effect of delayed graft function in cadaver donor renal transplantation. *Transplantation* 643-48, 1984.
  46. Ventura CG, Coimbra TM, De Campos SB, De Castro I, Yu L, Seguro AC: Mycophenolate mofetil attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Soc Nephrol* 2524-33, 2002.
  47. Finn WF: Recovery from acute renal failure in acute renal failure. De Brenner BM, New York. USA. Edited Churchill, 1988; pp. 875-10.
  48. Mattos AM, Olyaei AJ, Bennet WM: Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenge for the future. *Am J Kidney Dis* 333-46, 2000.
  49. Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 593-623, 1999.
  50. Jones EA, Shoskes DA: The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavonoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. *J Urol* 999-1004, 2000.
  51. González N, Álvarez V, Pons H, Parra G, Quiroz Y, Rodríguez-Iturbe B: Mycophenolate mofetil aggravates post-ischemic acute renal failure in rats. *Transplantation Proceedings* 34.1-000, 2002.
  52. De Greef KE, Ysebaert DK, Ghielli M, Vercauteren SR, Nouwen EJ, Eyskens EJ, De Broe ME: Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol* 110-15, 1998.
  53. Baer P, Gauer S, Hauser I: Effects of mycophenolic acid on human renal proximal and distal tubular cells *in vitro*. *Nephrol Dial Transplant* 184-90.
  54. Al-Awqati Q, Oliver JA: Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 387-95, 2002.
  55. Eugui EM, Mirkovich A, Allison AC: Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice. *Scand J Immunol* 175-83, 1991.
  56. Raisanen-Sokolowski A, Vuoristo P, Myllarniemi M, Yilmaz S, Kallio E, Hayry P: Mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) inhibits inflammation and smooth muscle cell proliferation in rat aortic allografts. *Transplant Immunol* 342-51, 1995.
  57. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P: Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Soc Nephrol* 1188-99, 2003.