

Artículo Original

Caracterización inmunohistoquímica de la función renal en un riñón transplantado en paciente portador de síndrome uremico hemolítico atípico por déficit de factor H.

¹Gutierrez Luciana, ^{*1}Ochoa Federico, ¹Oltra Gisela, ²Raffaele Pablo, ²Fortunato Marcela, ³Lago Néstor, ¹Zotta Elsa

¹Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

²Servicio de Nefrología. Fundación Favaloro.

³Centro de Patología. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. UBA

*Ambos contribuyeron igualmente a este trabajo

RESUMEN

El Síndrome Urémico Hemolítico se caracteriza por presentar anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Se clasifica en típico, diarrea positivo, inducido por *Escherichia coli* 0157-H7 (90%) y atípico, más comúnmente secundario a la desregulación de la vía alternativa del complemento (3-10 %). La región cromosómica 1q32 contiene el sistema regulador de la activación del complemento humano (RCA). Se relaciona con mutaciones en factores reguladores de C3 como el factor H (FH, la más común), el factor I, el factor B y la proteína constitutiva de membrana (MCP). Presenta patrones de herencia autosómica tanto dominante como recesiva. El déficit de FH autosómico dominante generalmente ocurre en adultos y la mortalidad y el riesgo de enfermedad renal terminal oscila entre el 50%-90%.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la función tubular y glomerular por técnicas de inmunohistoquímica para detectar mecanismos de transporte para agua (AQPs), urea (UT-A) y proteínas (nefrina, podocalixina y megalina) en un riñón transplantado de un paciente portador de SUH por déficit de FH que desarrolló una recidiva de SUH y lesiones por nefrotoxicidad. Detectamos un mecanismo de adaptación a la uremia por la expresión de novo de un UT-A2 en corteza renal y la disminución del UT-A1 en médula y alteraciones en el manejo proximal del agua por la disminución de la expresión de AQP1 en túbulo proximal. Las modificaciones a nivel de la expresión de la nefrina y la podocalixina podocitarias y de megalina en el túbulo proximal podrían explicar la presencia de la proteinuria

Síndrome Urémico Hemolítico Atípico, Factor H, Transportadores de Urea, Acuaporinas, Nefrina, Podocalixina, Megalina

ABSTRACT

The hemolytic uremic syndrome is characterized by microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure. It is classified in typical, positive diarrhea, induced by *Escherichia coli* 0157-H7 (90%) and atypical, most commonly secondary to the deregulation of the alternative pathway of complement (3-10%). The chromosomal region 1q32 contains the regulatory system of the activation of human complement (RCA). It is related to mutations in regulatory factors of C3 as factor H (FH, the most common), the factor I, factor B and the constitutive membrane protein (MCP). It presents both dominant and recessive autosomic inheritance patterns. The autosomic dominant alteration of FH usually occurs in adults and mortality and the risk end stage kidney disease ranges between 50% - 90%.

The aim of our work was to study tubular and glomerular function by Immunohistochemistry techniques to detect transport mechanisms for water (AQPs), urea (UT-A) and proteins (nephrin, podocalyxin and megalin) in a transplanted kidney in a patient carrier of HUS by alterations in FH that developed a recurrence of HUS and nephrotoxicity injuries. We detect an adaptation mechanism to uremia by de novo expression of UT-A2 in renal cortex and the decrease of the UT-A1 in medulla and alterations in the proximal water transport by the decrease in the expression of AQP1 in proximal tubule. The changes at the level of the expression of the podocytic nephrin and podocalyxin and megalin in the proximal

tubule may explain the presence of proteinuria
Atypical Hemolytic Uremic Syndrome, Factor H,
Urea Transporters, Aquaporins, Nephtrin, Podocalyxin, Megalin

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es el resultado de la acción de numerosos factores etiológicos y patogénicos. Consiste en la asociación de anemia hemolítica microangiopática con signos y síntomas de agresión multiparenquimatosa.

Estas lesiones se observan especialmente en tubo digestivo, riñón y encéfalo y están asociadas a trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA) (Remuzzi y col, 1995).

Aunque siempre se relaciona la presencia de SUH con el antecedente de diarreas, no es así en todos los casos. Se puede realizar una clasificación en SUH típico o diarrea positivo (D+), que presenta como antecedente enfermedades diarreicas agudas, y el atípico o diarrea negativo (D-), que no tiene este antecedente (Fonseca y col, 2009)

SUH Típico

El 90% de los casos de SUH es típico, con la presencia de diarrea asociada a bacterias patógenas como la *Escherichia coli* 0157-H7 productora de toxinas Shiga tipo I y II. (Rivero y col, 2004). La incidencia de la enfermedad registra alrededor 17 casos/100,000 en niños menores de 5 años, siendo considerada la causa más importante de IRA y la segunda causa de insuficiencia renal crónica en Argentina (Registro del Comité de Nefrología de la Sociedad Argentina de Pediatría, SAP, 2008)

SUH Atípico

La forma de SUH atípica obedece a diversas etiologías (Sosa del Valle y col, 2002; Nelson y col, 1998) Representa alrededor del 5 al 10 % de los casos de SUH.

Dentro de los casos de SUH atípico, la forma familiar corresponde a menos del 3% y se asocia principalmente con la disregulación en la vía alternativa del complemento. Se han descrito patrones de herencia autosómica tanto dominante como recesiva, implicados en la región cromosómica 1q32. Esta región del genoma humano contiene el denominado sistema regulador de la activación del complemento humano (Human Regulator of Complement Activation; RCA) un conjunto de genes que codifican proteínas del complemento presentes en el plasma o en las superficies celulares cuya función es regular la activación del Complemento. (Rodríguez de Córdoba S, 2004)

El sistema del complemento es uno de los componentes fundamentales de la respuesta inmunitaria. Consta de un conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en distintas cascadas bioquímicas, cuyas funciones son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células incluyendo la apoptosis. La mayor parte de los factores del complemento son proteínas plasmáticas y una pequeña parte de ellos son proteínas de membrana. En la activación se ponen en marcha reacciones en cascada, de forma que en cada reacción se genera un producto activo, que además de determinar que la cadena prosiga hasta la reacción siguiente, puede tener acciones biológicas importantes en la defensa del organismo. El inicio por error de esta cadena de reacciones acarrea serias consecuencias para la salud. Dado el potencial lesivo del sistema del complemento, éste se encuentra estrechamente regulado por diversos mecanismos y moléculas cuyo objeto es evitar la lisis de las células autólogas ejerciendo su acción en distintos puntos tanto en la vía clásica como en la alternativa o lítica, centrándose fundamentalmente en la activación de la proteína C3.

La regulación de C3, al ser éste el factor central en la activación del complemento, es probablemente el mecanismo de regulación más importante.

Se han descrito mutaciones en las proteínas reguladoras del complemento como el factor H (la más común), la proteína de membrana del cofactor, el factor I, el factor B y C3. (http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_16.htm)

Factor H

El factor H (FH) del complemento es una proteína plasmática sintetizada en el hígado que, entre otras cosas, actúa como regulador central en la vía de activación del complemento.

Teniendo en cuenta sus posibles alteraciones genéticas, la forma autosómica recesiva a menudo se manifiesta en la infancia con mal pronóstico. Las recurrencias son frecuentes y la mortalidad oscila entre el 60%-70%.

La forma autosómica dominante generalmente ocurre en adultos también con mal pronóstico. En este caso la mortalidad y el riesgo de enfermedad renal terminal oscila entre el 50%-90%.

El gen codificante del factor H (CFH/HF1) se ubica dentro del sistema RCA. (Rodríguez de Córdoba y col, 2004).

Mutaciones del gen HF1 en diferentes series de pacientes con SUH se agrupan en la región C-terminal y eliminan selectivamente la capacidad de este factor

de proteger a las células y tejidos del organismo frente a la acción del complemento (Rodríguez de Córdoba y col, 2004)

Recientemente se han desarrollado técnicas que permiten identificar individuos con mutaciones en factor H. La importancia de estas técnicas radica en que estos pacientes presentan un peor pronóstico en relación a un posible trasplante renal que los pacientes con mutaciones en otros genes reguladores del C3

El trasplante renal puede ser beneficioso aunque la enfermedad puede recidivar. Se ha descrito el trasplante hepatorenal como una opción de tratamiento, sin embargo aún faltan estudios que estandaricen el manejo de estos pacientes.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar en un riñón postrasplante de un paciente con SUH por déficit de factor H la funcionalidad renal tubular a partir de la expresión de proteínas relacionadas con la reabsorción de agua, urea y proteínas y la función glomerular a través de la expresión de nefrina y podocalixina podocitarias

MATERIALES Y MÉTODOS

El riñón utilizado en este trabajo fue obtenido a partir de una nefrectomía postrasplante realizada a un paciente del Servicio de Nefrología de la Fundación Favaloro.

Los riñones controles, fueron obtenidos de nefrectomías por tumor renal, de la zona del margen de seguridad.

Historia clínica

Paciente de 22 años que debuta en el año 2004 con un cuadro de insuficiencia renal aguda anúrica. Se realizó punción biopsia renal donde se detectó la presencia de trombos en la micro circulación (microangiopatía trombótica). Ante la aparición de compromiso neurológico (síndrome convulsivo) se realizó resonancia magnética nuclear (RMN) que mostró áreas de isquemia cortical. El cuadro clínico evolucionó hacia la insuficiencia renal crónica terminal, iniciando hemodiálisis crónica desde 14/01/04. Posteriormente, en marzo del 2006 se diagnosticó SUH atípico diarrea (-). El diagnóstico del SUH por alteración en el factor H se efectuó a través del International Registry of Recurrent and familial HUS/TTP. Se secuenció la parte terminal del gen del factor H (SCR 20) donde se encontró una sustitución de citosina por timina (C3645T). Esta mutación está presente en pacientes heterocigotas y determina una sustitución de un aminoácido en posición 1191 del factor H (Ser 1191Leu).

Esta mutación está implicada en la unión con C3 del complemento y con el ácido siálico y heparán sulfatos localizados en las células endoteliales. El análisis fue realizado por Federica Castelletti, Emanuela Viridis y Giuseppe Remuzzi.

Dentro de los antecedentes familiares posee un hermano y un primo con diagnóstico de SUH por déficit de factor H. El 10/10/08 se realizó un trasplante renal con donante cadavérico. Compartía con el receptor HLA A2 y DR 11. Recibió en la inducción del trasplante Solumedrol y Timoglobulina, evolucionando sin requerimientos de diálisis en el post quirúrgico. Fue dado de alta sin complicaciones. Se lo medicó con tacrolimus, esteroides y micofenolato sódico. Se reinternó el 26/11/08 ante el aumento de la creatinina plasmática y proteinuria de 2,26 gr/24 hrs. Se realizó punción biopsia renal que dio como resultado: glomerulonefritis membrano proliferativa con microtrombos asociados a SUH. Evolucionó simultáneamente con hematuria dismórfica y esquistocitos en sangre periférica y plaquetopenia, interpretándose el cuadro como recaída del SUH. Se lo trató con Solumedrol y cinco sesiones de plasmaféresis cada 48 horas y luego una sesión semanal por 2 meses. Se rotó tacrolimus por ciclosporina por considerarse que si bien el tacrolimus es más efectivo para prevenir el rechazo agudo, presenta una mayor frecuencia de efectos secundarios que la ciclosporina. La finalidad fue intentar con otra droga de similar potencia que se controlara el rechazo y no activara la microangiopatía trombótica. De todas formas este uso es controvertido ya que ambos fármacos se han identificado como agentes etiológicos de microangiopatía trombotica. (Hakobyan y col, 2010; Loirat y col, 2008; Ferraris y col, 2002)

En Diciembre 2008 nuevamente presentó insuficiencia renal oligúrica, hemólisis, y plaquetopenia. Se indicó nuevamente plasmaféresis y diálisis. Por persistir con hemólisis, hematuria, dolor en injerto renal, al que se le sumó fiebre y compromiso del estado general se procedió al explante del órgano en febrero del 2009.

Preparación del tejido para estudios histológicos

El riñón extraído fue seccionado sagitalmente y cortado en fragmentos de 1 cm e incluido en formol-buffer (PBS) al 10%. Los cortes fueron deshidratados y posteriormente incluidos en parafina para realizar cortes de 5 µm en un micrótomo Leica.

Se realizaron coloraciones de hematoxilina-eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrómico de Mallory y metenammina plata de Jones.

Se realizó el estudio microscópico en un microscopio Nikon Eclipse-E200.

Cortes en blanco fueron utilizados para técnicas de Inmunohistoquímica

Inmunoperoxidasa

Los cortes fueron desparafinados y luego fueron colocados en cámara húmeda. Se realizó bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 0.3% durante 10 min.

Luego, los cortes fueron preincubados con suero de conejo no inmune diluido en PBS (1:100) a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos primarios (Alpha Diagnostic, USA): anti-UT-A (1:50), anti-AQP 1 (1:50) y anti-AQP 3 (1:50) a 4°C durante toda la noche.

La técnica inmunoperoxidasa fue realizada siguiendo el protocolo del kit RTU Vectastain Kit (Vector, Peterborough, UK).

La reacción se reveló con diaminobenzidina (DAB, Vector, Peterborough, UK) y se los cortes se contracoloraron con hematoxilina de Meyer. Finalmente, los cortes fueron deshidratados y montados para la observación en microscopio óptico Nikon Eclipse E-200

Inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunofluorescencia, los cortes fueron también desparafinados y luego preincubados con suero de caballo no inmune en PBS (1:100) en cámara húmeda, a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se realizó la incubación con el anticuerpo primario: (Alpha Diagnostic, USA) anti-UT-A (1:50), anti-Podocalixina (1:50), anti-Nefrina (1:50) y (Santa Cruz, USA) anti-Megalina (1:50) en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

Después de varios lavados con PBS, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fluoresceína (Santa Cruz, USA) o Cy3 (Jackson, USA) por 1 hora, en cámara húmeda a temperatura ambiente

Finalmente todos los cortes fueron enjuagados con PBS y montados con una mezcla que contiene PBS: glicerol (1:3) para ser observados en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse E200). Los controles negativos fueron realizados sin anticuerpo primario

Resultados

Caracterización histológica de la lesión renal

A nivel glomerular se observaron aislados glomérulos

en oblea (fig. 1A) y otros con áreas de proliferación mesangial y aumento de matriz con depósitos de material PAS positivo (fig. 2A). Se detectó engrosamiento de capilares glomerulares (fig. 1B y 2C) con desdoblamiento de la membrana basal (fig. 3D) compatible con un patrón membranoproliferativo. También se observó fibrosis glomerular segmentaria (fig. 3A)

Destaca a nivel intersticial marcadas áreas de fibrosis que se extienden a nivel peritubular (fig. 3B y C) y periglomerular. Coexiste infiltrado inflamatorio mononuclear

A nivel tubular se encontraron áreas con imágenes de tiroidización por dilatación tubular (fig. 1C) y necrosis tubular (Fig. 1D)

Los vasos muestran engrosamiento de la media y presencia de trombos PAS positivos (fig. 3B) en vasos de pequeño y mediano calibre. No se detectaron trombos a nivel glomerular

Caracterización inmunohistoquímica de la función renal

A nivel glomerular se estudió la expresión de proteínas del diafragma de filtración, relacionadas con la filtración de proteínas

La podocalixina es una proteína que reviste la superficie apical de podocitos y el endotelio del capilar glomerular. Es una sialoproteína que aporta su carga negativa en la regulación de la filtración proteica. La inmunofluorescencia mostró una marcada disminución en su expresión (fig. 4B), respecto al corte control (fig. 4A)

La nefrina es una proteína de la familia de las inmunoglobulinas y forma la mayor parte del diafragma de filtración glomerular. La inmunofluorescencia mostró una disminución de la marca a nivel podocitario (fig. 4E) respecto del riñón control (fig. 4D).

La función tubular proximal se estudió a partir de la expresión de megalina como técnica de evaluación de la reabsorción de proteínas y a partir de la expresión de AQP1, la reabsorción de agua.

La megalina es un receptor de la familia LDL, que se encarga de la endocitosis de proteínas, principalmente albúmina, lipoproteínas y algunas vitaminas como la vitamina D. Se ubica en los túbulos proximales renales

La inmunofluorescencia mostró en riñón control la presencia de megalina a nivel de membrana y citoplasma de los túbulos renales (fig. 5A). El riñón experimental mostró una marcada disminución de la expresión de megalina en membrana, destacando la presencia de gránulos citoplasmáticos (fig. 5B y C)

que indicarían una endocitosis del transportador La AQP1 es una proteína de membrana que forma un canal para el pasaje de agua. Se ubica en el túbulo proximal y asa descendente de Henle tanto en la membrana apical como basal. Su función está relacionada con la reabsorción de agua en estos sectores de la nefrona.

El riñón experimental mostró una disminución de la marcación a nivel de la membrana basal (fig.6B) respecto del riñón control que presenta marcación a nivel tanto de la membrana basal como de la apical (fig.6A)

La reabsorción de agua y urea a nivel del túbulo colector se estudió a partir de la expresión de AQP 3 y UT-A.

La acuaporina 3, se expresa en la membrana basolateral del túbulo colector renal.

La Inmunohistoquímica demostró que en el riñón experimental no hubo modificaciones en la expresión de este canal para el transporte de agua en la nefrona distal respecto del riñón control (fig. 7A y B)

El transportador de urea cumple una importante función en el mecanismo de concentración urinaria. Existen varias isoformas, y el anticuerpo usado reconoce el UT-A1, UT-A3 y UT-A4. De los tres, UT-A1 se ubica en la membrana apical, mientras que los otros dos en la basolateral.

El riñón experimental mostró una marcada disminución de la expresión apical a nivel del túbulo colector medular (fig. 8A y D) destacando la expresión del transportador en túbulos proximales, tanto en membrana apical como basolateral respecto al riñón control (fig. 8B y C)

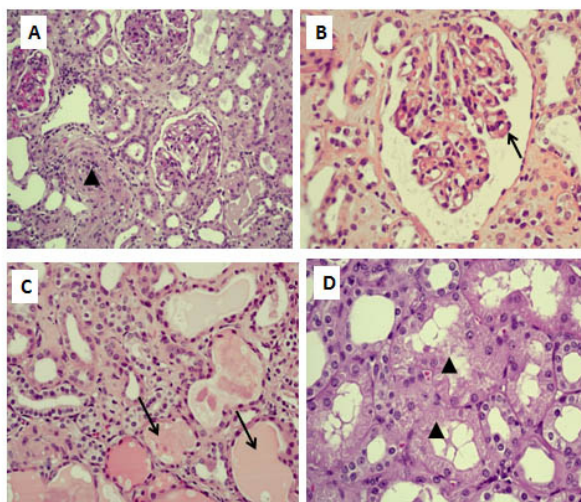


Figura 1: Hematoxilina- eosina. (A) Glomérulos en oblea (cabeza de flecha negra), (B) engrosamiento de asas capilares a nivel glomerular (flecha negra), (C) imagen de tiroidización luminal (flechas negras), (D) necrosis tubular, con pérdida del borde en cepillo apical, pérdida de núcleos y esfascelamiento celular (cabezas de flechas negras D) A: 20x; B:400x; C y D: 1000x

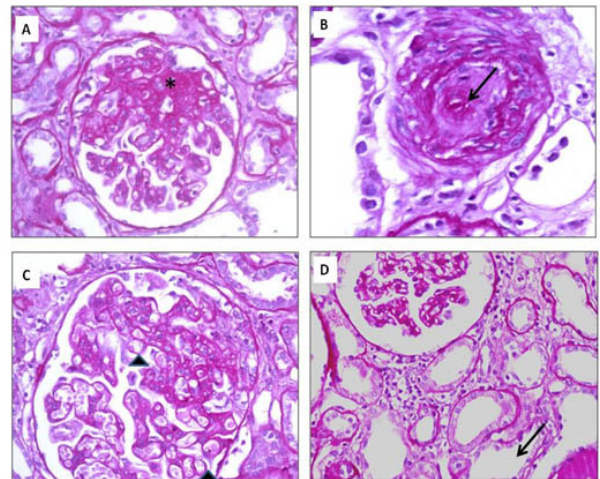


Figura 2: (A) Se observa glomérulo con colapso capilar y material PAS positivo mesangial (asterisco negro), (B) luces vasculares con trombos PAS positivos (flecha negra), (C) Los capilares glomerulares muestran engrosamiento de la membrana basal (cabeza de flechas negras) y (D) zonas de dilatación tubular (flecha negra). A-C: 1000x; D 400x

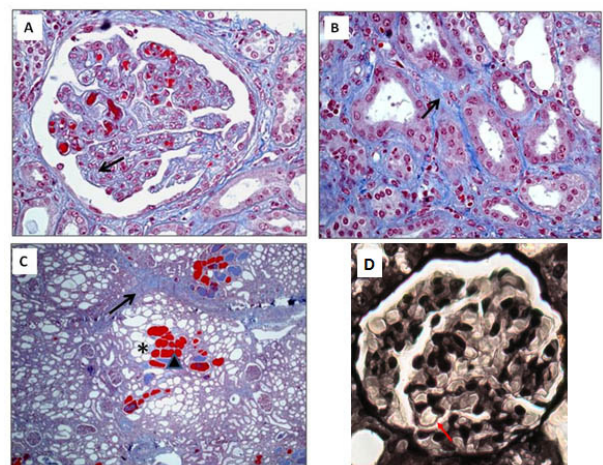


Figura 3: (A) Se observa zonas de fibrosis glomerular y proliferación mesangial (flecha negra). (B y C) Se destacan áreas de fibrosis peritubular (flechas negras) y (C) con dilatación tubular (asterisco negro) e imagen de tiroidización (cabeza de flecha negra). (D) Se detectan sectores con desdoblamiento de la membrana basal (flechas negras, D) A, B y D: 1000x; C: 100x.

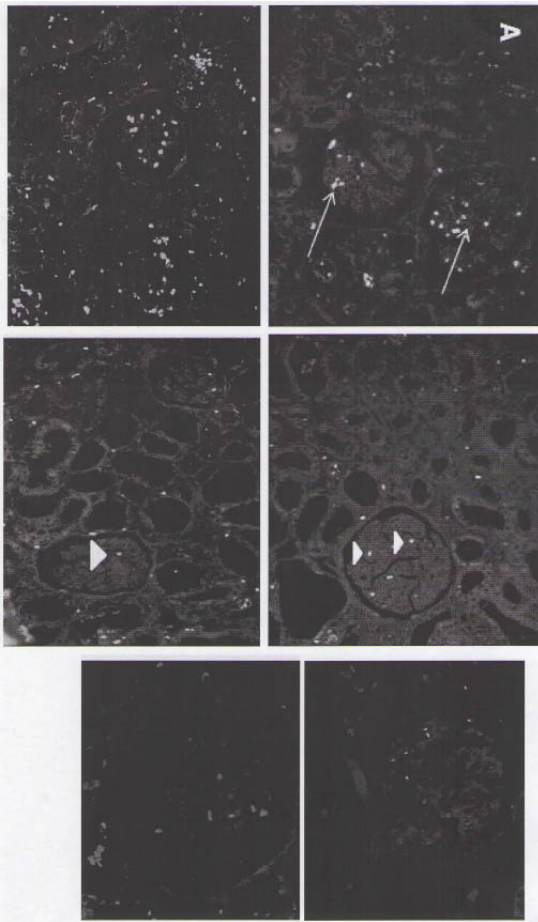


Figura 4: (A) Se observa marcación de podocalixina a nivel glomerular en riñón control (flechas blancas). (B) En el riñón experimental se observa una disminución en la expresión (cabeza de flechas blancas). (C) Control negativo para podocalixina (D) Marcación de nefrina a nivel podocitario en el riñón control (flechas blancas), (E) Marcada disminución de la expresión de nefrina en el riñón experimental (cabeza de flecha blanca), (F) control negativo para nefrina A, B, D y E 200x; C y F 1000x. Inmunofluorescencia indirecta

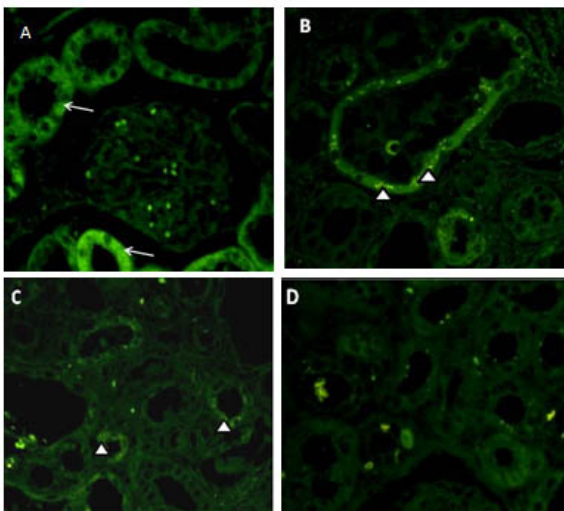


Figura 5: (A) Túbulos proximales del riñón normal con expresión de megalina en citoplasma y membrana celular (flechas blancas). (B y C) En el riñón experimental se observan gránulos citoplasmáticos (cabezas de flecha blancas). (D) Control negativo.

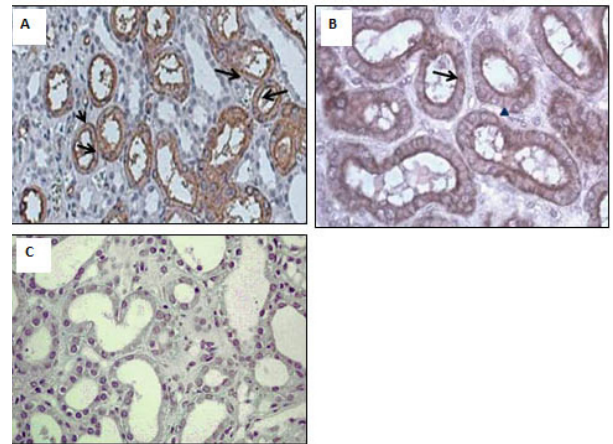


Figura 6: (A) La AQP1 se expresó en membrana apical y basal de túbulos proximales controles (flechas negras). (B) El riñón experimental presentó pérdida de marcación basal (cabeza de flecha negra) con mantenimiento de la marca a nivel apical (flecha negra). (C) Control negativo. A: 200x; B y C 400x. Inmunoperoxidasa

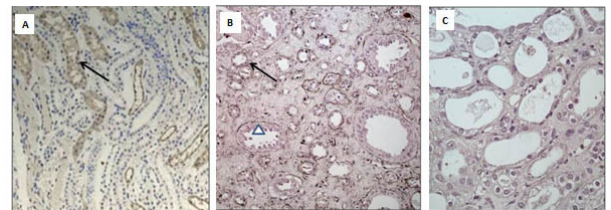


Figura 7: (A y B) Se observa la marca de AQP3 en túbulos colectores medulares tanto en el riñón control como el experimental (flechas negras). (B) El riñón experimental mantuvo su expresión de AQP3 normalmente en membrana basolateral (cabeza de flecha blanca) (C) Control negativo C.

A y B 200x; C 400x. Inmunoperoxidasa

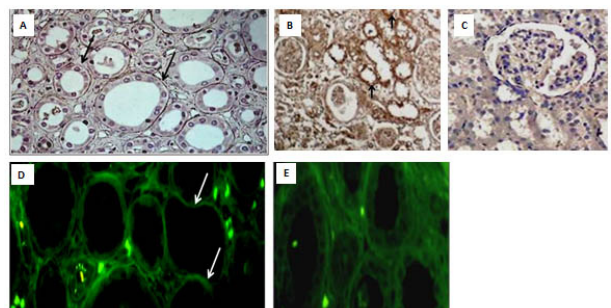


Figura 8: (A) Se detecta la expresión de UT-A en médula renal a nivel de la membrana basolateral del riñón experimental (flechas negras) (B) Se observa la presencia de un transportador UT-A en corteza renal experimental (flechas negras), respecto al (C) riñón control D y F 1000x. Inmunofluorescencia indirecta; E y G 400x. Inmunoperoxidasa. A y C 400x; B 200x. Inmunoperoxidasa.

(D) Se observa la marca de UT-A en membrana basolateral de túbulo colectores medulares (flechas blancas),

(E) Control negativo Inmunofluorescencia indirecta.

Discusión

El SUH atípico por déficit de factor H es una enfermedad genética involucrada en el desarrollo de una insuficiencia renal secundaria a una microangiopatía trombótica.

En nuestro caso, el paciente recibió un trasplante renal en octubre de 2008. Presentó una evolución desfavorable, con desarrollo de proteinuria de 2.26gr/24 hrs y aumento de creatinina plasmática.

Finalmente en febrero de 2009, se decide extraer el riñón.

Las dos primeras causas de pérdida del aloinjerto renal son la muerte con injerto funcionante y la nefropatía crónica del trasplante (NCT), siendo responsable cada una de ellas de la pérdida de aproximadamente el 40 % de los injertos (Ojo AO y col, 2000; Paul LC, 1995). Desde el punto de vista clínico, la presencia de NCT se sospecha cuando existe un deterioro lento y progresivo de la función renal que habitualmente se acompaña de proteinuria e hipertensión (Paul LC y col, 1993). Si bien es de destacar que el paciente presentó recurrencia del SUH (anemia microangiopática: esquistocitos y trombocitopenia)

El estudio histológico del riñón transplantado realizado en nuestro trabajo reveló el desarrollo de trombos en la microvasculatura. No detectamos trombos a nivel glomerular. Por microscopía de luz los trombos pueden ser detectados en gran cantidad o ser no identificables, aun con técnicas específicas (D'Agati y col, 2005). La presencia de trombos en la microvasculatura puede ser secundaria a múltiples causas asociadas al trasplante (rechazo mediado por anticuerpos, toxicidad de algunos inmunosupresores) o la recidiva de la nefropatía de base.

En efecto, nosotros encontramos a nivel glomerular engrosamiento de asas capilares y depósito de material PAS (+) con presencia de glomérulos en oblea.

El engrosamiento de capilares glomerulares con la técnica de metenamina plata mostró un desdoblamiento de la membrana basal producido por edema subendotelial, lesión típica de la microangiopatía por SUH (Ruggenti P y col, 2001)

A nivel tubular hemos encontrado una marcada dilatación e imágenes de tiroidización y a nivel del intersticio renal observamos infiltrado inflamatorio mononuclear y fibrosis. A nivel vascular se destacó la presencia de trombos fibrino plaquetarios en vasos de pequeño y mediano calibre. Estas alteraciones microangiopáticas son similares a las observadas en riñones transplantados que presentan lesiones por isquemia de reperfusión donde también se desarrollan trombos fibrino plaquetarios, pero que a diferencia de nuestro caso, presentan además neutrófilos (Arago y col, 2007)

A nivel tubular también se observaron focos de necrosis que podrían estar relacionados con el deterioro producido por la hipoxia en las células renales durante la muerte cerebral del donante y que continúa durante preservación y la reperfusión del órgano.

Evidentemente la coexistencia de lesiones agudas y crónicas, en los pacientes transplantados, resta precisión al daño intersticial como medida cuantitativa. A pesar de estas limitaciones se ha demostrado esta alteración en biopsias realizadas a los 6 meses y se asocia, aunque débilmente a la supervivencia a largo plazo del injerto (Nicholson ML y col, 1996)

Fisiológicamente, el riñón, es fundamental para el mantenimiento del equilibrio del medio interno y por ende de la vida.

El estudio de mecanismos de transporte para agua, solutos y proteínas nos permitió detectar alteraciones que podrían ser compatibles con mecanismos de adaptación a la lesión tubular o simplemente consecuencia de esa lesión.

El glomérulo del riñón humano filtra en condiciones normales aproximadamente 54g de urea del plasma sanguíneo por día. Aproximadamente de 12 a 14 g de la urea filtrada es reabsorbida, 40% de este proceso ocurre en los túbulo proximales

Nuestros experimentos de inmunohistoquímica detectaron una alteración en la expresión de transportadores de urea de la familia UT-A. El anticuerpo utilizado detecta UT-A1, A2 y A4.

Encontramos en primer lugar, una disminución en la expresión apical del transportador de urea en túbulo colectores medulares, que podría corresponder al UT-A1, ubicado normalmente en esta membrana. (Bagnasco y col. 2000)

Alteraciones en la expresión de los transportadores de urea medulares han sido reportadas en la evolución de otras nefropatías. Por ejemplo, la disminución expresión de UT-A1 y UT-A2 en médula renal de ratas urémicas por insuficiencia renal crónica (Hu y col, 2000). En este trabajo, los autores sugieren que la expresión del transportador puede variar en respuesta a la carga tubular de urea. De esta forma, la concentración de urea aumentada en el líquido extracelular durante la insuficiencia renal, tendría un efecto directo en su regulación, evitando la reabsorción y así el mayor aumento de la concentración de urea en plasma.

En segundo lugar detectamos la expresión de novo en corteza renal, a nivel tanto apical como basolateral de los túbulos proximales de un transportador para urea. De acuerdo con estos resultados en un modelo de insuficiencia renal en ratas se identificó la presencia de un transportador del tipo UT-A2 en túbulos proximales (Zotta y col, 2008) Otros autores han descrito el aumento en la expresión de un UT-A2 en hígado de ratas con insuficiencia renal indicando que esta respuesta podría ser un mecanismo adaptativo a las alteraciones producidas por la urea durante esta enfermedad (Klein y col, 2002). Por lo tanto, la expresión del UT-A2 en corteza renal podría considerarse también un mecanismo adaptativo de las nefronas remanentes que permite la secreción de este soluto para disminuir el aumento de urea plasmática.

En conclusión, en nuestro caso, la presencia de transportadores de urea tipo UT-A2 en la corteza del riñón transplantado permitiría una secreción rápida de urea a la luz del túbulo proximal renal. Al mismo tiempo, la disminución de la reabsorción medular por disminución del UT-A1 en la membrana apical de los túbulos colectores podrían ser considerados como mecanismos de adaptación de las nefronas remanentes ante el aumento de la concentración plasmática de urea. (fig 9) (Zotta E, 2004)

La urea es uno de los principales componentes del mecanismo de concentración y dilución de la orina. Otro componente importante es el agua. Como es conocido, el agua se mueve a través de las membranas biológicas debido a la presencia de un gradiente osmótico. Puede realizar el pasaje a nivel paracelular (a través de las uniones intercelulares) o a nivel transcelular (utilizando proteínas transportadoras llamadas acuaporinas).

Característicamente, la capacidad de concentración urinaria disminuye en respuesta a la reducción de la masa renal funcionante (Hayslett, J. P, 1979).

En el riñón transplantado estudiamos la expresión de

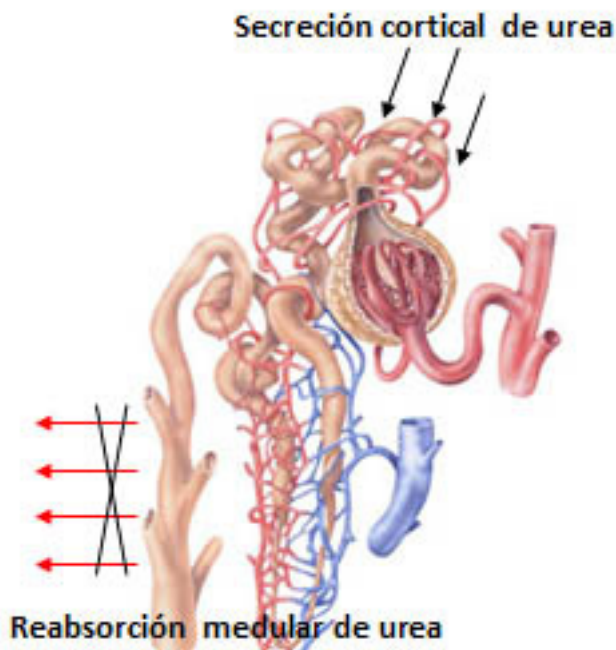


Figura 9. Esquema que muestra los posibles mecanismos de adaptación al manejo renal de la urea durante la insuficiencia renal. No hay reabsorción de urea en los túbulos colectores de las nefronas remanentes. La disminución de la absorción medular y la secreción cortical tratarían de contrarrestar el aumento de la concentración plasmática observado durante la IRC

la AQP1 ubicada normalmente en membrana apical y basolateral de los túbulos proximales y AQP3 que se expresa en el riñón sin patologías en la membrana basolateral de los túbulos colectores medulares (Yumi y col. 2010). Nuestros resultados demostraron una alteración en el patrón normal de expresión de solo una de estas moléculas.

La expresión de AQP3 en el túbulo colector no sufrió modificaciones. Este resultado es acorde a otras observaciones realizadas en un modelo de insuficiencia renal, donde no detectan prácticamente modificaciones en la expresión de acuaporinas medulares (Bonilla-Félix y col, 1992). Sin embargo, otros autores han detectado alteraciones en la expresión de acuaporinas a este nivel en la enfermedad renal crónica (Tae-Hwan Kwon y col, 1998). Por lo tanto estas alteraciones son variables, dependiendo probablemente de la patología de base. En el riñón transplantado nuestros resultados sobre la expresión de AQP1 fueron diferentes. Observamos una marcada disminución de su expresión basolateral en el túbulo proximal.

Este túbulo es el encargado de reabsorber el 70-80%

del agua filtrada, tanto por la vía paracelular como transcelular. Estudios fisiológicos han demostrado que la fracción de agua reabsorbida en el túbulo proximal durante la insuficiencia renal se reduce significativamente (Fine y col, 1972). La expresión modificada en ambas membranas podría estar relacionada con diferencias en la ultraestructura del túbulo secundarias a la hipertrofia (Salehmoghaddam y col, 1985). Sin embargo, hasta el momento no se conocen otros mecanismos involucrados en la patogénesis de la alteración de AQP1 en túbulo proximal.

Es posible que esta disminución basolateral juegue un papel preponderante en la disminución de la reabsorción fraccional de agua por el túbulo proximal durante la insuficiencia renal. Sin embargo, la contribución de la reducción de los niveles de AQP1 aún no está completamente estudiada. En efecto, una variedad de factores han sido implicados en la patogénesis de los trastornos en la concentración urinaria durante la insuficiencia renal, pero los mecanismos celulares y moleculares aún están en estudio. Otra importante función de los túbulos renales, específicamente los proximales, es la relacionada con la reabsorción de proteínas filtradas como albúmina y proteínas de bajo peso molecular. La realiza a través del sistema de endocitosis mediado por megalina.

En nuestro caso, el riñón transplantado mostró una significativa disminución en la expresión de megalina proximal. Detectamos la presencia de gránulos intracitoplasmáticos que podrían estar indicando una endocitosis de este receptor que estaría involucrada en la disminución de su expresión. Resultados similares fueron observados en estadios tempranos de nefropatías en modelos animales (Russo y col, 2007; Tojo, 2001).

Durante el desarrollo de este tipo de nefropatías se produce un aumento en la liberación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1). Una de las acciones descritas últimamente para este factor es justamente producir la endocitosis de la megalina (Gekle y col, 2003). Se ha comprobado que la alteración en las funciones de la megalina serían las responsables de la aparición de microproteinuria

(Pontuch y col, 1992; Hong y col, 2003). Sin embargo, el mecanismo de regulación aún no ha sido elucidado. El manejo renal de las proteínas también se encuentra relacionado con la barrera de filtración, específicamente con los podocitos.

En respuesta a muchos tipos de agresión, los podocitos sufren cambios morfológicos que se deben a

una alteración del citoesqueleto y la unión intercelular (Kanwar y col, 1991). Esta alteración se denomina «borramiento» (o fusión) de procesos podocitarios. Este proceso es reversible y está directamente relacionado con proteinuria en humanos y modelos experimentales (Verma y col, 2006).

La nefrina y la podocalixina interactúan con el citoesqueleto del podocito y participan en la transmisión de señales intracelulares e intercelulares (Dieguez, 2003). En riñones normales estas proteínas aparecen codistribuidas a lo largo de la parte externa de la membrana basal glomerular. Esta distribución normal se alteró en nuestro caso, donde detectamos una disminución en la expresión de ambas proteínas. De acuerdo con nuestros resultados, se sabe que cuando hay alteraciones en la expresión de estas proteínas, todo el complejo puede perder su estructura normal y alterar su función llevando a la presencia de proteinuria, cuantificada en nuestro paciente (2.26gr/24 hrs)

Es posible que el diafragma de filtración, además de ser un filtro dependiente del tamaño de las moléculas, dependa también de la carga eléctrica aportada por la podocalixina, pudiendo evitar que este diafragma colapse (Smithies O, 2003)

Finalmente es importante comentar que la presencia de trombos en la microvasculatura podría ser secundaria al tratamiento, pero en este caso, el patrón membranoproliferativo de las membranas basales glomerulares es un indicador importante de que la microangiopatía es producida por el SUH (D Agati V y col.2005; Ruggenti P y col, 2001)

En conclusión, los hallazgos más importantes de nuestro trabajo sugieren que el riñón transplantado presentó:

1. Desarrollo de un mecanismo de adaptación fisiomolecular al manejo renal de la urea con el objeto de evitar mayores aumentos de su concentración plasmática a través de la expresión de novo de un UT-A2 en corteza renal y la disminución del UT-A1 en médula.
2. Alteraciones en el manejo proximal del agua, detectado por la disminución de la expresión de AQP1 en la membrana apical.
3. El desarrollo de proteinuria en el paciente podría estar relacionado con las alteraciones detectadas a nivel de la expresión de la nefrina y la podocalixina en el diafragma de filtración glomerular.
4. Desarrollo de una microangiopatía trombótica por recidiva de SUH
5. Lesiones por nefrotoxicidad.

Bibliografía

1. Arago E, Ribeiro de Maura L, Manual de trasplante renal. 1era Ed. Manole Ltda (Brasil). Cap. 26 Anatomía patológica del trasplante renal, Pag. 355-369. 2007
2. Bagnasco SM. How renal cells handle urea. *Celular physiology and biochemistry*. 10: 379-384. 2000
3. Bonilla-Felix M, Hamm L, Herndon J, Vehaskari V. Response of cortical collecting ducts from remnant kidneys to arginine vasopressin. *Kidney Int*. 41: 1150-1154. 1992
4. D'Agati VD, Jennette JC, Silva FG Non neoplastic kidney diseases. Capítulo 18 Thrombotic microangiopathies and coagulopathies. páginas 481-516. *Anerinan Registry of Pathology Washington DC and Armed Forces Institute of Pathology Washington DC*. 2005
5. Dieguez SM, Bases moleculares de la barrera de filtración glomerular-Síndrome nefrótico corticorresistente, 3er congreso de Nefrología por internet. 2003. (<http://www.uninet.edu/cin2003/conf/sdieguez/dieguez.html>)
6. Ferraris JR, Ramirez JA, Ruiz S, Caletti MG, Vallejo G, Piantanida JJ, Araujo JL, Sojo ET. Shiga Toxin associated hemolytic uremic syndrome: absence of recurrence after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 17: 809-814. 2002
7. Fine L, Trizna W, Bourgoignie J, Bricker N. Functional profile of the isolated uremic nephron. Role of compensatory hypertrophy in the control of fluid reabsorption by the proximal straight tubule. *J. Clin. Invest*. 61: 1508-1518. 1978
8. Fonseca S, Lara Vega P Síndrome urémico hemolítico. (Revisión Bibliográfica) *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXVI* (588) 213-217; 2009
9. Gekle M, Knaus P, Nielsen R, Mildenerberger S, Freudinger R, Wohlfarth V, Sauvart C, Christensen E. Transforming growth factor- β 1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *J. Physiol*. 552 (2): 471-481. 2003
10. Hakobyan S, Tortajada A, Harris CL, R de Cordoba S and Morgan BP. Variant -Specific quantification of factor H in plasma identifies null alleles associated with atypical hemolytic syndrome. *Kidney International* 78, 782-788. 2010
11. Hayslett J. Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol. Rev*. 59: 137-164. 1979
12. Hong C, Hughes K, Chia K, Ng V, Ling S. Urinary α 1-microglobulin as a marker of nephropathy in type 2 diabetic Asian subjects in Singapore. *Diabetes Care*, vol. 26 (2): 338-342. 2003
13. http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_16.htm (Sistema complemento)
14. Hu MC, Bankir L, Michelet S, Rousselet G, Trinh-Trang-Tan M-M. Massive reduction of urea transporters in remnant kidney and brain of uremic rats. *Kidney Int*. 58: 1202-1210. 2000
15. Kanwar Y, Liu Z, Kashihara N, Wallner E. Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin Nephrol* 11: 390-413. 1991
16. Klein JD, Roberts BR, Sands JM, et al. Acidosis mediates the up regulation of UT-A protein in livers from uremic rats. *J Am Soc Nephrol*. 13:581-587. 2002
17. Loirat C, Fremeaux - Bacchi V. Hemolytic uremic syndrome recurrence after transplantation, *Pediatr Trasplantation* 12:619-629. 2008
18. Nelson WE, Behrman RE, Kligman RM, Arvin AM. *Tratado de Pediatría*. 15ta Ed. Santiago de Atahualtepec (México): McGraw-Hill Interamericana Editores S.A.; 1998; vol 2: 1861-1862)
19. Nicholson ML, McCulloch TA, Harper SJ, et al. Early measurement of interstitial fibrosis predicts long term renal function and graft survival in renal transplantation. *British J Surg*. 83: 1082-1085. 1996
20. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA et al. Long term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int* 57: 307-311. 2000
21. Paul LC, Häyry P, Foege M, et al. Diagnostic criteria for chronic rejection/accelerated graft atherosclerosis in heart and kidney transplants: Proposal from the Fourth Alexis Carrel Conference on Chronic Rejection and Accelerated Arteriosclerosis in Transplanted Organs. *Transplant Proc*; 25: 2020. 1993
22. Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int*. 47: 1491-1499. 1995
23. Pontuch P, Jensen T, Deckert T, Ondrejka P, Mikulecky M. Urinary excretion of retinol-binding protein in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria and clinical diabetic nephropathy. *Acta Diabetologica*. 28(3-4): 206-210. 1992
24. Remuzzi G, Ruggenti P. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 48:2-19, 1995.
25. Rivero MA, Padola NL, Etcheverría AI, Parma AE. Escherichia coli enterohemorrágica y Síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2004, 64: 352-356
26. Rodríguez de Córdoba S, Peña A, Rivera F, López Trascasa M y Sánchez-Corral P. Factores genéticos de predisposición al Síndrome Hemolítico Urémico. Implicaciones diagnósticas y terapéuticas. *NEFROLOGÍA*. Vol. XXIV. Número 1. 2004
27. Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 60:831-846. 2001
28. Russo L, Del Re E, Brown D, Lin H. Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)- β 1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: amelioration by soluble TGF- β type II receptor. *Diabetes*. 56 (2): 380-388. 2007
29. Salehmoghaddam S, Bradley T, Mikhail N, Badie B, Dezfooly E, Nord W, Trizna R, Fine L. Hypertrophy of basolateral Na-K pump activity in the proximal tubule of the remnant kidney. *Lab. Invest*. 53: 443-452. 1985
30. Smithies O. Why the kidney glomerulus does not clog: a gel permeation/ diffusion hypothesis of renal function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 4108-13. 2003
31. Sosa del Valle J, Pascale R, Pascual C, Mai K, Grichener J, Fayad A. Síndrome urémico hemolítico asociado a *Streptococcus pneumoniae*. A propósito de un caso. *Rev Hosp Niños Baires*. 2002; 44 (199): 226-229;
32. Tae-Hwan K, Jorgen F, Mark A, Soren N. Reduced AQP1, -2, and -3 levels in kidneys of rats with CRF induced by surgical reduction in renal mass. *Am. J. Physiol*. 275. *Renal Physiol*. 44: F724-F741. 1998
33. Tojo A, Onozato M, Ha H, et al. Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. *Histochemistry and Cell Biology*. 116(3): 269-276. 2001
34. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 116:1346-59. 2006
35. Yumi N, Elsel S, Eriko O, Sel S. Auaporins in kidney pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol* 6: 168-178. 2010
36. Zotta E, Ochoa F, Tironi Farinati C, Damiano A, Silberstein C, Levy Yeyati N, Ibarra C. UT-A expression in pars recta from a rat model of chronic renal failure. *J Nephrol*. 21: 947-958. 2008
37. Zotta E. Tesis de Doctorado. Manejo renal del agua y la urea durante la insuficiencia renal aguda y crónica. Capítulo 9 Conclusiones generales. Biblioteca de la Facultad de Medicina UBA. 2004.

Recibido en su forma original: 30 de noviembre de 2010

En su forma corregida: 18 de enero de 2011

Aceptación Final: 21 de febrero de 2011

Dra. Luciana Gutierrez

Laboratorio de Fisiopatogenia. Departamento de Fisiología.

Facultad de Medicina UBA

e-mail: ezotta@fmed.uba.ar