



EFEECTO DEL ENVEJECIMIENTO TISULAR EN LA FIBROSIS RENAL

**Trabajo monográfico para el curso de Metodología Científica II,
Facultad de Medicina, UDELAR**

GRUPO: Paola Carzoglio
Ramiro Funes
Rodrigo Decima
Cecilia Spiess
Miguel Alaga

ORIENTADOR: Mercedes Rodríguez-Teja
Departamento de Genética
Facultad de Medicina
UDELAR

Setiembre, 2014

INDICE

<u>INDICE</u>	2
<u>1. RESUMEN</u>	3
<u>2. INTRODUCCIÓN.</u>	3
2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA FIBROSIS RENAL	3
2.2. OBJETIVO GENERAL	6
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
<u>3. METODOLOGÍA EMPLEADA</u>	7
<u>4. CAMBIOS EN EL RIÑÓN DEBIDO A LA EDAD Y SU VÍNCULO CON LA FIBROSIS RENAL</u>	7
<u>5. MECANISMOS CELULARES DE LA FIBROSIS RENAL</u>	9
5.1 INFLAMACIÓN SOSTENIDA	10
5.2 RECLUTAMIENTO DE FIBROBLASTOS Y TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL	11
5.3 PRODUCCIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR	12
5.4 MECANISMOS QUE PERPETÚAN LA FIBROSIS	12
<u>6. BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS RENAL</u>	14
6.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- β 1	14
6.2 INTERACCIÓN ENTRE EGFR Y TGF β R: VÍAS COMPLEMENTARIAS PARA EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS RENAL	17
6.3 ANGIOTENSINA II Y SU CONTRIBUCIÓN A LA FIBROSIS RENAL	17
6.4 ESTADO ACTUAL DE LOS MICROARN EN LA FIBROSIS RENAL	18
6.5 LA PROTEÍNA ANTIENVEJECIMIENTO KLOTHO Y SU PAPEL EN LA FIBROSIS RENAL DEL RIÑÓN ENVEJECIDO	21
<u>7. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA LA FIBROSIS RENAL</u>	23
7.1 BLOQUEO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE TGF- β 1	23
7.2 TERAPIAS ANTI-ANGIOGÉNICAS	24
7.3 MICROARNS: POSIBLES BLANCOS TERAPÉUTICOS CONTRA LA FIBROSIS RENAL	24
7.4 ACTIVACIÓN DEL GEN KLOTHO PARA PREVENIR LA FIBROSIS RENAL	25
<u>8. CONCLUSIÓN</u>	26
<u>9. REFERENCIAS</u>	26

1. RESUMEN

El descenso en la tasa de fecundidad y aumento en la esperanza de vida observada en los últimos 50 años, conlleva a un aumento gradual en el envejecimiento de la población con un incremento de las enfermedades crónicas no transmisibles. Según el registro del Programa de Salud Renal del Uruguay, un 66% de los pacientes con enfermedad renal crónica son mayores de 65 años. Este fenómeno nos plantea la interrogante de cómo el envejecimiento tisular afecta la función del riñón y, en particular, cómo contribuye con la fibrosis renal. Con el envejecimiento se producen cambios morfológicos y funcionales en el riñón, como son la esclerosis glomerular y la fibrosis intersticial. Estos cambios son consecuencia de alteraciones que ocurren a nivel celular. En este trabajo se profundizará en los mecanismos celulares que desencadenan la fibrosis intersticial y la gloméruloesclerosis, describiendo en detalle el proceso de inflamación sostenida, la transformación fenotípica de las células epiteliales a miofibroblastos (**Transición Epitelio-Mesenquimal, TEM**), así como los mecanismos de producción de matriz extracelular (**MEC**) y la perpetuación de la fibrosis renal. Además, detallaremos las cascadas moleculares involucradas en el proceso de fibrosis, poniendo especial énfasis en las cascadas reguladas por el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (**TGF- $\beta 1$, Transforming Growth Factor- $\beta 1$**) y sus vías de interacción, que estimulan la producción de MEC por los miofibroblastos e inhibe su degradación. También veremos como el TGF- $\beta 1$ modula la expresión de ARN pequeños no-codificantes (**microARNs**) (que son potentes inhibidores de la expresión génica) y como el gen anti-envejecimiento *KLOTHO* modula el avance de la fibrosis renal. Por último, discutiremos futuras terapias para frenar o enlentecer el proceso de fibrosis renal, en especial aquellas que tengan como blanco las cascadas de señalización activadas por TGF- $\beta 1$, los microRNAs y posibles terapias de activación del gen *KLOTHO* para prevenir la progresión de esta patología.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Aspectos epidemiológicos de la fibrosis renal

El envejecimiento demográfico es un proceso irreversible que están

atravesando la mayoría de las poblaciones del mundo. El ritmo y la velocidad con la que las poblaciones experimentan este proceso tienen relación con las características demográficas y con los fenómenos actuales que afectan sus dinámicas y estructuras. En la historia del Uruguay, se ha observado una transición demográfica de una población joven, que recibía fuertes contingentes migratorios desde fines del siglo XIX hasta las primeras décadas del siglo XX, a una estructura demográfica envejecida, con una elevada tasa de emigrantes en segunda mitad del siglo XX⁽¹⁾. Además, durante esta transición demográfica, se observó un descenso en la tasa de mortalidad acompañado por una disminución en las tasas de fecundidad y de crecimiento a lo largo de todo el siglo pasado ⁽¹⁾. Fruto de ello, la población del Uruguay es la segunda de América Latina en presentar una estructura demográfica envejecida con una baja tasa de crecimiento ⁽²⁾. A pesar de esta situación transicional, no se le ha dado suficiente importancia a las intervenciones que podrían prevenir la alta prevalencia de factores de riesgo de enfermedades crónicas, sabiendo que en las próximas décadas es de esperar un incremento de las enfermedades crónicas no transmisibles a expensas del aumento de la población de mayores de 65 años ⁽²⁾.

Dentro de estas enfermedades crónicas no transmisibles que han aumentado a expensas del envejecimiento poblacional, se encuentran las enfermedades renales, cuya tasa de crecimiento ha aumentado un 8% a nivel mundial ⁽³⁾. El Uruguay no se encuentra por fuera de esta realidad; según el Programa de Salud Renal del Uruguay, un 66% de los pacientes que ingresan al programa son mayores de 65 años⁽⁴⁾. Registros de este programa muestran que a partir de 1981 la edad promedio de la población incidente en diálisis aumentó progresivamente, estabilizándose con pequeñas oscilaciones a partir de 1996 (Figura 1) ⁽⁵⁾.

Así, puede observarse oscilaciones en la edad promedio de los pacientes que ingresan a diálisis: en el periodo de 1981 a 1992, la edad promedio de los pacientes osciló entre 44,3 y 56,9 años; en el periodo que va de 1993 a 2004, entre 57,9 y 61,9 años; en el periodo 2005-2011 varió entre 60,4 y 63,2, siendo éste último el valor máximo de todos los periodos y observándose su correlación epidemiológica ⁽⁴⁾. Es así que, el aumento del promedio de edad de

la población en diálisis se acompaña de una incidencia creciente de la población de mayor edad (Figura 2).

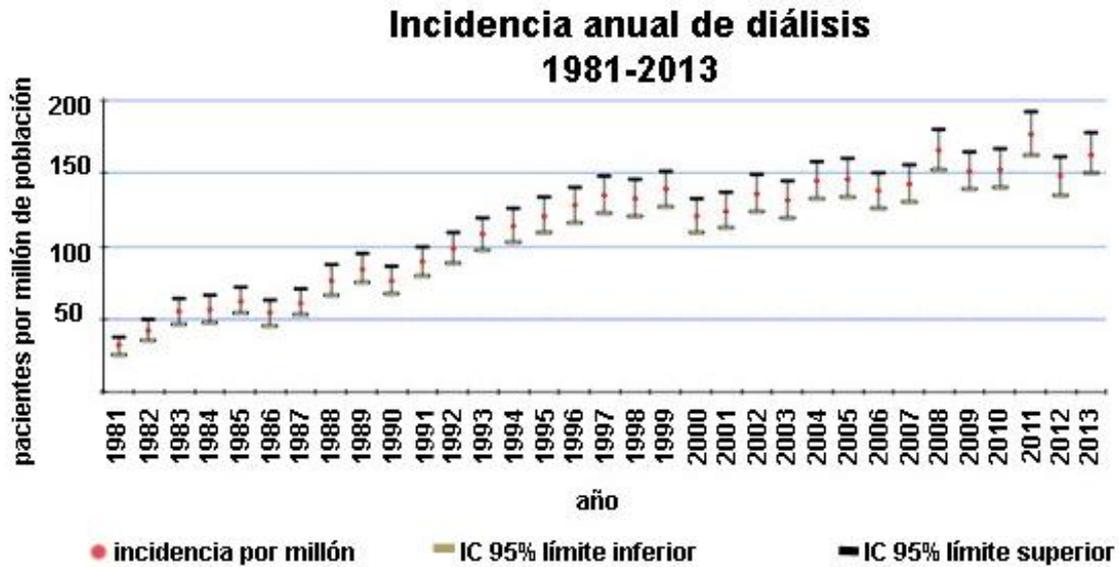


Figura 1- Incidencia anual de diálisis. IC, intervalo de confianza. Extraída del informe anual 2013 del registro uruguayo de diálisis (4)

El aumento del promedio de edad de la población en diálisis se acompaña de una incidencia creciente de la población de mayor edad. En el año 2011, la incidencia de los pacientes menores de 15 años fue de 10,6 pacientes por millón de población (**pmp**), la de los pacientes de 15 a 64 años fue de 117,6 pmp, la de la población de 65 a 75 años fue de 554,4 pmp y la de la población de 75 años y más, fue de 618.5 pmp ⁽⁴⁾ (Figura 3).

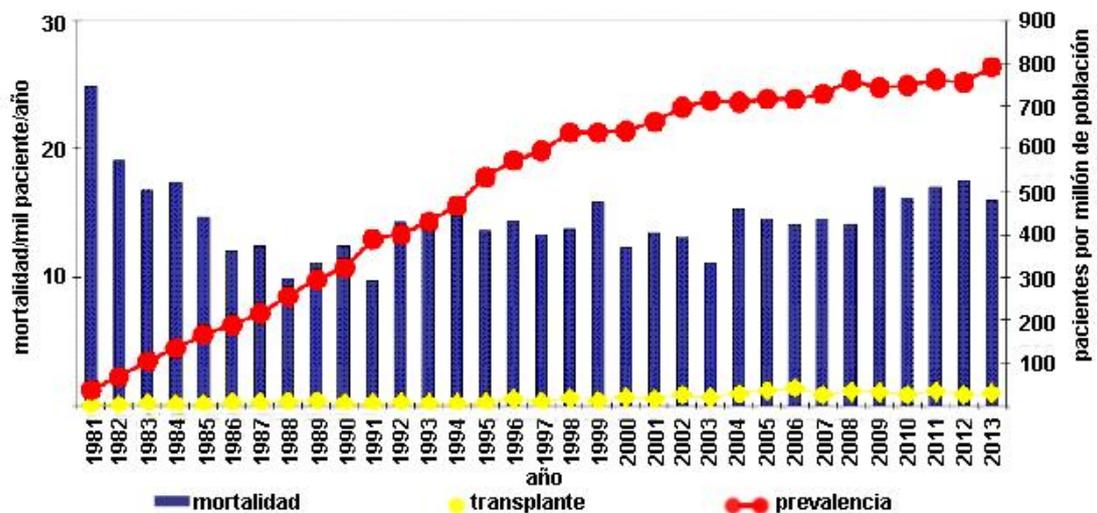


Figura 2. Prevalencia en diálisis, incidencia de trasplante renal y mortalidad en diálisis periodo 1981-2013. Extraída del informe anual 2013, del registro uruguayo de diálisis (4).

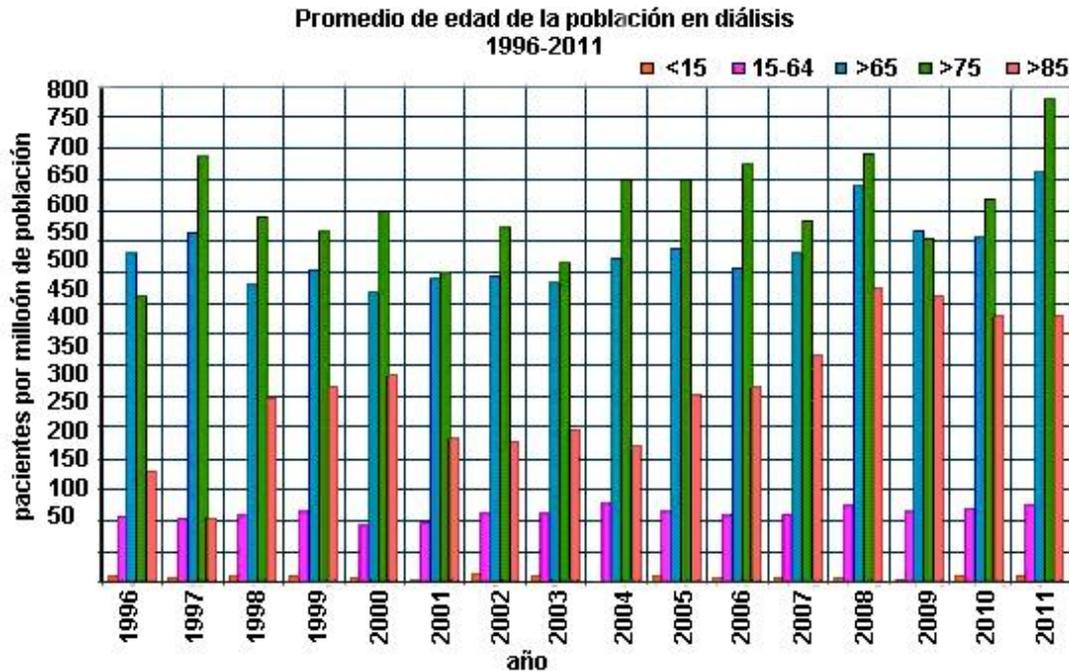


Figura. 3. Gráfico que muestra que el aumento del promedio de edad de la población en diálisis se acompaña de una incidencia creciente de la población de mayor edad. Datos extraídos de tabla de informe anual de diálisis año 2013.

Este aumento en la incidencia de la Enfermedad Renal Crónica (**ERC**) con la edad del paciente, nos plantea la interrogante de cómo el envejecimiento tisular afecta la función del riñón y, en particular, cómo contribuye con la fibrosis renal. Sin embargo, resulta difícil discernir cuánto el envejecimiento tisular *per se* coopera con el proceso de fibrosis renal de cada paciente, debido a la presencia de enfermedades crónicas prevalentes en adulto como son la diabetes mellitus e hipertensión arterial, enfermedades que, en su evolución natural, generan daño renal con la consiguiente fibrosis renal y progresión hacia la ERC.

2.2. Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica del efecto del envejecimiento tisular en el proceso de fibrosis renal.

2.3. Objetivos específicos

Específicamente pondremos énfasis en el estudio de:

- los cambios morfológicos del riñón producidos durante el proceso de envejecimiento y su relación con la fibrosis renal
- los mecanismo celulares involucrados en el curso de la fibrosis renal
- las bases moleculares que modulan el proceso de fibrosis renal

- las estrategias terapéuticas para detener o enlentecer la evolución de la fibrosis renal

3. METODOLOGÍA EMPLEADA

Durante este trabajo se realizaron sesiones (una vez por semana) de discusión de artículos científicos de referencia nacional e internacional. Para ello, se dividió el tema en 5 subtemas en donde cada integrante del grupo se hizo experto en uno de los subtemas. En cada sesión el estudiante experto presentó al resto del grupo (presentaciones de 15-20 minutos) un artículo de su elección relevante en su área.

Tabla 1- Expertos de cada subtema y criterios de elección del material de estudio.

Estudiante	Subtema	Criterios de elección de material de estudio
Carzoglio P.	Aspectos epidemiológicos de la fibrosis renal	Búsqueda de revisiones y artículos científicos contenidos en base de datos. "Enfermedad renal crónica", "transición demográfica", "enfermedades no transmisibles", "envejecimiento". Consulta de datos del Programa de Salud Renal del Uruguay
Funes R.	Cambios morfológicos del riñón debido a la edad y su relación con la fibrosis renal	Búsqueda de revisiones y artículos científicos conteniendo en bases de datos (PubMed) las palabras clave: "renal fibrosis", "aging", "glomerulosclerosis". Consulta a libros de texto.
Décima R.	Mecanismos celulares involucrados en la fibrosis renal	Búsqueda de revisiones y artículos científicos contenidos en base de datos (PubMed). Palabras clave: "fibroblast", "EMT", "renal fibrosis", "tubulointerstitial"
Spiess C.	Bases moleculares de la fibrosis renal	Búsqueda de revisiones y artículos científicos conteniendo en bases de datos (PubMed) las palabras clave: "renal fibrosis", "aging", "molecular pathway", "TGF- β ", "microRNA", "Klotho".
Alaga M.	Estrategias terapéuticas de la fibrosis renal	Búsqueda de revisiones y artículos científicos contenidos en base de datos (PubMed), palabras clave: "Klotho" "therapy", "TGF- β ", "IECA", "microRNA".

4. CAMBIOS EN EL RIÑÓN DEBIDO A LA EDAD Y SU VÍNCULO CON LA FIBROSIS RENAL

Morfológicamente, se observan diferencias entre el riñón de un individuo joven y el de uno adulto. Ya en 1976 Griffiths y colaboradores observaron en riñones envejecidos, obtenidos a partir de necropsias de pacientes normotensos mayores de 50 años, una disminución significativa del tamaño del riñón, con pérdida de tejido cortical que se correlaciona positivamente con el compromiso de la vasculatura renal ⁽⁶⁾. En el hombre, durante el proceso de envejecimiento, se observa una pérdida progresiva de masa renal; el peso de los riñones disminuye desde 250 gramos en el adulto joven a 180-200 gramos en la octava década de vida ^(7, 8). En este sentido, un estudio realizado por Miletic y colaboradores demostró que a partir de los 30 años hay un discreto descenso del peso absoluto del riñón hasta los 59 años, acentuándose luego

de los 60 años de edad ⁽⁹⁾. Además de observar una disminución del peso renal con la edad, Hoy y colaboradores mostraron que el número de glomérulos desciende y el porcentaje de los mismos esclerosados aumenta durante el proceso de envejecimiento ⁽¹⁰⁾. Análisis de autopsias de donantes fallecidos mayores a 55 años muestran un incremento de glomérulos escleróticos con respecto a riñones de donantes fallecidos menores de 40 años⁽⁸⁾. En un estudio reciente llevado a cabo por Rule y colaboradores, se analizaron muestras de biopsia de riñón, corroborándose una disminución de la densidad glomerular con el envejecimiento, mostrando además que ésta disminución se acentúa en presencia de gloméruloesclerosis ⁽¹¹⁾. Debido a que el proceso esclerosante del glomérulo lleva a la acumulación de **Matriz Extra Celular (MEC)**, el mismo puede dar lugar a la obliteración de algunas o todas las luces capilares en los glomérulos afectados, dando lugar a la formación de adherencias fibrosas entre las porciones escleróticas de los glomérulos, el epitelio parietal y las cápsulas de Bowman cercanas ⁽¹²⁾.

Mediante microscopía óptica de secciones de corteza renal de ratas adultas de diferentes edades, Gagliano y colaboradores confirmaron un aumento progresivo de fibrosis en la corteza renal, conjuntamente con la acumulación de colágeno tipo uno - uno de los mayores componentes de la MEC - en el intersticio renal durante el proceso de envejecimiento ⁽¹³⁾. Buscando caracterizar los cambios que ocurren en la MEC renal con la edad, Abrass y colaboradores realizaron un estudio donde utilizaron ratas de distintas edades y describieron, mediante inmunohistoquímica, la existencia de 3 grandes cambios: un engrosamiento generalizado de la membrana basal glomerular y tubular, un aumento significativo en la cantidad de MEC en el intersticio renal y la aparición de áreas focales de atrofia tubular y cicatrización intersticial ⁽¹⁴⁾. En cuanto al aumento del grosor de la membrana basal glomerular, los autores observaron que éste se debía mayoritariamente a un incremento en los niveles de laminina, componente principal de la membrana basal. Sin embargo, el aumento en el grosor de la membrana basal tubular, está dado por un incremento en las concentraciones de colágeno tipo IV y fibronectina ⁽¹⁴⁾. Respecto al aumento significativo de MEC en el intersticio renal, éste fue detectado solamente en ratas adultas previo al desarrollo de glomeruloesclerosis y atrofia tubular ⁽¹⁴⁾. Aparte de los cambios descriptos

anteriormente, se observó zonas de expansión intersticial adyacentes a áreas de atrofia tubular, con acumulación de fibronectina y colágeno tipo I e infiltración de macrófagos ⁽¹⁴⁾.

Los cambios en los vasos sanguíneos que ocurren en el riñón envejecido juegan un rol preponderante en el daño renal ya que el resultado final de estos cambios es un descenso del flujo sanguíneo renal con la edad avanzada del paciente ⁽¹²⁾. Se observan cambios escleróticos en las paredes de los grandes vasos renales que empeoran cuando existe hipertensión asociada ⁽¹²⁾. Este grado mayor de esclerosis vascular con el envejecimiento se evidencia por el aumento de la esclerosis en el sector intimal y capa medial de arterias humanas corticales de personas adultas mayores comparado con niños ⁽⁸⁾. Estos cambios, junto con el engrosamiento de la membrana basal, tanto de los glomérulos como de los túbulos renales, favorecen la progresiva reducción y simplificación de los canales vasculares, contribuyendo así con la fibrosis renal durante el proceso de envejecimiento ⁽⁸⁾. Urbietta-Caceres y colaboradores observaron un descenso en la densidad vasos de la corteza renal en ratas hembras envejecidas, que se acentuaba por la pérdida de estrógenos (potentes inductores de la angiogénesis renal) ⁽¹⁵⁾. Además, los autores confirmaron que el envejecimiento incrementa la fibrosis túbulointersticial y que ésta se exacerba por la falta de estrógenos en las ratas ovariectomizadas ⁽¹⁵⁾. Estos resultados sugieren que el envejecimiento en ratones hembras lleva a una pérdida de la microvasculatura y a un aumento de la fibrosis renal al descender los niveles de estrógenos ⁽¹⁵⁾.

Todos estos cambios morfológicos que llevan a la fibrosis renal como consecuencia del envejecimiento tisular, son similares a los observados en modelos experimentales de falla renal progresiva y en pacientes con ERC ⁽¹⁶⁾ y se ven acentuados en pacientes con enfermedades como diabetes e hipertensión.

5. MECANISMOS CELULARES DE LA FIBRÓISIS RENAL

En este apartado nos queremos centrar en los aspectos más importantes de los mecanismos celulares que promueven el desarrollo de fibrosis renal. Empezando por el proceso en el cual los daños producidos en el riñón conducen a la inflamación, con la consiguiente respuesta inmune humoral y

celular, que por el carácter sostenido de la noxa se hace crónica, resultando en fibrosis renal. En este proceso, juegan un rol importante algunos tipos celulares como son los fibroblastos, los mayores productores de MEC. Estudiaremos de dónde provienen los fibroblastos y cómo se activan, cómo se produce la MEC y cuál es su composición. Por último, estudiaremos cuáles son los factores que perpetúan el desarrollo de las fibrosis. Estos factores causan una injuria sostenida a nivel del parénquima renal, que llevará al desarrollo de una inflamación crónica (no-resolutiva), dando paso a una etapa fibrogénica con la consiguiente pérdida progresiva e irreversible de la función renal.

5.1 Inflamación sostenida

La fibrogénesis se considera un proceso de cicatrización fallida, en un intento de reparar y reconstruir el daño ⁽¹⁷⁾. La estrecha relación entre la inflamación y la extensión de la fibrosis está bien establecida. La inflamación sostenida produce un gradiente de citoquinas quimiotácticas, como **CCL-1** (Chemokine **C-C** motif **Ligand 1**) e Interleuquina-8, que guían a las células inflamatorias para su infiltración en el tejido dañado ⁽¹⁸⁾. Una vez allí se activan y producen moléculas que dañan aun más al tejido, como **Especies Reactivas del Oxígeno (ERO)**, e inducen la producción de citoquinas fibrogénicas y factores de crecimiento ⁽¹⁷⁾. Entre las células inflamatorias, se ha visto que los macrófagos juegan un rol importante en el desarrollo de fibrosis renal; se ha demostrado que la depleción sistémica de macrófagos luego de una injuria por isquemia y reperfusión reduce la inflamación, disminuye el ARN mensajero (**ARNm**) de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, atenúa los cambios histológicos y se reduce la expresión de TGF- β 1 (una potente citoquina pro-fibrótica), todo lo cual reduce la fibrosis renal a largo plazo ⁽¹⁹⁾. Sin embargo, se ha visto que no todos los macrófagos son perjudiciales, sino que algunos subtipos ayudan en la reparación y regeneración tisular ⁽²⁰⁾. Al disminuir los macrófagos, disminuye la cantidad de neutrófilos que llegan al riñón ⁽¹⁹⁾ lo que supone que quizás los neutrófilos también jueguen un rol importante en la progresión de la enfermedad renal. El reclutamiento y activación de linfocitos T es un acontecimiento temprano también importante en el inicio de la fibrosis renal; de hecho los ratones que carecen de linfocitos B y T maduros debido a una deficiencia de la proteína activadora-recombinante de V (D) J (RAG1)

están protegidos contra la fibrosis luego de una injuria obstructiva ⁽²¹⁾. La inflamación no-resolutiva, producto de una injuria crónica, conduce inexorablemente a la fibrogénesis, ya que genera un círculo vicioso de inflamación, daño tisular y fibrosis.

5.2 Reclutamiento de fibroblastos y transición epitelio-mesenquimal

La fibrogénesis se inicia en pequeñas áreas aleatorias de inflamación y luego se expande difusamente si el estímulo profibrótico persiste ⁽²²⁾. Este microambiente hostil que se genera en el riñón debido a la injuria sostenida y la inflamación, produce una activación de las células productoras de MEC, paso fundamental en el desarrollo de la fibrogénesis renal ⁽¹⁷⁾. Las células productoras de matriz están representadas principalmente por los fibroblastos, cuya activación está relacionada con el riesgo de fibrosis ya que generan gran cantidad de componentes de MEC como fibronectina, colágeno tipo I y tipo III, así como fragmentos residuales de colágeno tipo IV (componente de la membrana basal que sostiene el endotelio o epitelio tubular) ⁽²²⁾. Los fibroblastos, una vez que son activados, expresan una isoforma de actina, llamada α -Actina del Musculo Liso (**α -SMA, α -Smooth Muscle Actin**), por lo que en algunas ocasiones se les llama miofibroblastos ⁽¹⁷⁾.

Es de gran importancia estudiar el origen, activación y regulación de estos miofibroblastos productores de MEC, ya que son un componente esencial para que se produzca el establecimiento de la fibrosis renal. Se han propuesto múltiples orígenes de los miofibroblastos a través de diferentes mecanismos como la activación de fibroblastos intersticiales, la diferenciación de los pericitos vasculares, el reclutamiento de fibroblastos circulantes, transición del fenotipo endotelio a fenotipo mesenquimal (**TEndo-M, Transición Endotelio-Mesenquimal**) en los capilares y transición fenotipo epitelial a fenotipo mesenquimal (**TEM, Transición Epitelio-Mesenquimal**) de los túbulos renales ⁽¹⁷⁾. En esta revisión nos centraremos en los procesos TEndo-M y TEM, ya que contribuyen con la progresión irreversible de la fibrosis renal produciendo rarefacción capilar y potenciando el proceso inflamatorio ⁽²³⁾.

Durante la TEM o TEndo-M, las células epiteliales o endoteliales, respectivamente, comienzan una transición fenotípica en un proceso de embriogénesis reversa hacia su transformación a una célula mesenquimatosa

del tipo fibroblástica ⁽²⁴⁾. Este proceso también se observa en el parénquima de otros órganos dañados y durante las metástasis tumorales. Está frecuentemente precedido por una inflamación intersticial crónica y puede ser una respuesta adaptativa de las células epiteliales a un ambiente hostil ^(24, 25). Se ha estudiado la TEM in vitro exponiendo podocitos inmortalizados de ratón en un microambiente con altas concentraciones de la citoquina profibrótica TGF- β 1, observándose una disminución en la expresión de proteínas de adhesión características del fenotipo epitelial podocitario (como ser p-cadherina, ZO-1 y nefrina); así también como un aumento en la expresión de marcadores característicos del fenotipo mesénquimal (como la desmina, colágeno tipo I, fibronectina y la metalo-proteasa-9) ⁽²⁵⁾. Además, es importante mencionar que esta transición se acompaña de una disminución de la función de barrera de filtración en dichos podocitos. Los podocitos son capaces de desarrollar una TEM luego de una injuria y esta conversión fenotípica causa la pérdida de las características epiteliales especializadas para adquirir nuevos marcadores mesenquimales ⁽²⁵⁾.

5.3 Producción de matriz extracelular

Los fibroblastos activados, sin importar su origen, producen una gran cantidad de componentes de la MEC⁽¹⁷⁾. Esto lleva a una acumulación excesiva de matriz intersticial, particularmente de fibras de colágeno tipo I y III, como también de fibronectina ⁽²²⁾. La expresión y síntesis de proteínas de la MEC, que realizan las células productoras de matriz, está controlada a nivel de la transcripción génica en respuesta a varias señales pro-fibrogénicas extracelulares. Entre estas señales se encuentran las que están por debajo de TGF- β 1 y la Angiotensina II (**Ang II**). Estas moléculas fibrogénicas activan una variedad de factores de transcripción que se unen a secuencias específicas en la región promotora de los genes de los componentes de la matriz (como ser colágeno y fibronectina) para activar su transcripción ⁽²⁶⁾. Como detallaremos más adelante, la vía señalización canónica de TGF- β 1 desencadena uno de los efectos pro-fibróticos mas fuertes en la producción de MEC ⁽²²⁾.

5.4 Mecanismos que perpetúan la fibrosis

Nos interesa destacar que el proceso de fibrosis renal no es solo el resultado de acumulación excesiva de MEC, sino que se perpetúa mediante

diversos procesos como lo son la injuria tubular, rarefacción microvascular y la hipoxia crónica. Las células del epitelio tubular están expuestas a variedad de insultos tóxicos, metabólicos, isquémicos e inmunológicos. En el caso de la fibrosis renal, en que estos insultos se dan de una manera prolongada, el epitelio tubular produce varios tipos de respuesta; entre éstas destacamos la proliferación y la síntesis de citoquinas y quimioquinas que pueden contribuir con la inflamación, con la TEM, o pueden inducir a la apoptosis^(17, 22, 25). Con el tiempo, la injuria tubulointerstitial prolongada se asocia con pérdida de mitocondrias, atrofia tubular y fibrosis intersticial⁽²²⁾.

En etapas tempranas la matriz de colágeno es susceptible a la proteólisis y por lo tanto la fibrosis es potencialmente reversible, lo que genera una cicatrización del tejido. Sin embargo, al perpetuarse y avanzar la fibrosis, se producen modificaciones bioquímicas en las proteínas de la matriz, produciendo cross-linking inducidos por enzimas transglutaminasas y lysyl oxidasa, que le otorgan rigidez y protección frente a la proteólisis⁽²⁷⁾.

La rarefacción microvascular es también uno de los procesos marcadores de fibrosis tubulointerstitial, sobre todo en estadios avanzados, en donde marca su irreversibilidad y perpetuación en el tiempo. Uno de los mecanismos por los cuales se produce la rarefacción microvascular involucra la TEndoM, que como discutimos anteriormente lleva a la pérdida de células endoteliales⁽²³⁾. A su vez, la rarefacción microvascular produce hipoxia, lo que genera un círculo vicioso. La hipoxia crónica se ve como resultado también de la disminución de la difusión del oxígeno debido a la fibrosis y al aumento de las demandas metabólicas por las células tubulares. Tanto la hipoxia como el estrés oxidativo inducen la apoptosis de las células endoteliales. Durante este proceso de rarefacción de la microvasculatura renal se produce un desbalance entre estímulos pro- y anti-angiogénicos en el ambiente renal⁽¹⁷⁾.

En un estudio reciente, se demuestra como la edad tiene incidencia en la progresión a la enfermedad renal crónica. Para ellos los autores le practicaron una injuria renal aguda isquémica bilateral a dos grupos de ratones, uno de 8-10 semanas (jóvenes) y otro de 46-49 semanas (adultos), para luego realizarles una biopsia renal⁽²⁸⁾. Los resultados demostraron que los ratones envejecidos tienen una mayor mortalidad luego de la injuria renal y los que

sobreviven tienen una prolongación de la injuria, que se correlaciona con una disminución en su capacidad de proliferación celular. La fibrosis tubulointersticial fue significativamente mayor en ratones envejecidos. Además, por inmunohistoquímica observan un mayor infiltrado de células inflamatorias y la pérdida de microvasculatura en los ratones adultos ⁽²⁸⁾. Este estudio también demuestra cómo influye el modelo de comorbilidad renal en el trasfondo del envejecimiento en contraposición al modelo clásico en ratones jóvenes, para el estudio de la enfermedad renal crónica ⁽²⁸⁾.

6. BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS RENAL

Conocer las cascadas de señalización que regulan las diferentes etapas del proceso de fibrosis renal es importante para prevenir y desarrollar terapias contra ésta. Muchos factores moleculares han sido identificados en la génesis de la fibrosis renal, especialmente en el proceso TEM⁽²⁹⁾. Entre las cascadas más estudiadas, se encuentra la vía de señalización de TGF- β 1, que se ha visto implicada en los diferentes procesos que caracterizan a la fibrosis renal, como lo son la TEM, la producción de MEC, la infiltración de células inmunológicas y la angiogénesis ⁽²⁶⁾. Otras cascadas que promueven el avance de la fibrosis renal y que interaccionan con la vía de señalización de TGF- β 1, son las cascadas activadas por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**, **E**pidermial **G**rowth **F**actor **R**eceptor) y el sistema renina angiotensina aldosterona (**SRAA**) ^(30, 31).

6.1 Vía de señalización del TGF- β 1

TGF- β 1 es miembro de la superfamilia TGF β , que incluye activinas, inhibinas, factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas óseas (**BMP**, **B**one **M**orphogenetic **P**roteins). TGF- β 1 es una citoquina expresada ubicuamente y tiene un amplio espectro de funciones. Tanto TGF- β 1 como sus isoformas (TGF- β 2 y 3), son secretados como precursores latentes formando un complejo con su proteína de unión (**LTBP**, **L**atent **T**G**F** **B**inding **P**roteins). Para activarse, TGF- β 1 debe disociarse de LTBP a través de la proteólisis mediada por la plasmina, ERO y trombospondina 1 (**TSP-1**) entre otros. Una vez activo, TGF β 1 se une a sus receptores en la membrana celular y actúa de manera parácrina y autócrina. Se reconocen dos grandes vías de señalización intracelulares activadas por TGF- β 1: la vía canónica dependiente de los

factores de transcripción Smads y la vía no-canónica o independiente de Smads. La vía canónica ha demostrado ser la más importante en muchos procesos fisiopatológicos del riñón, incluyendo la génesis de fibrosis túbulointersticial en patologías renales. Esta vía comienza cuando TGF- β 1 se une a su receptor de membrana celular TGF β RII; esta unión activa al receptor de membrana tirosinquinasa TGF β RI que fosforila a Smad 2 y Smad 3. La fosforilación de Smad 2 y 3 induce su activación y se unen a Smad 4 formando un complejo; este complejo se transloca al núcleo para controlar la transcripción de genes pro-fibróticos, como son los genes que codifican para las proteínas de la MEC, las proteínas que caracterizan al fenotipo miofibroblástico, citoquinas implicadas en la infiltración del intersticio renal por las células del sistema inmune, factores pro- y anti-angiogénicos y microARNs implicados en la regulación de la fibrosis renal (Figura 4) (por revisión⁽²⁶⁾).

Se ha demostrado que TGF- β 1 media la progresión de fibrosis renal al estimular la producción de MEC al mismo tiempo que inhibe su degradación⁽²⁶⁾. Entre los genes pro-fibróticos (responsables de la acumulación de MEC) inducidos por TGF- β 1, se encuentra el gen que codifica para el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (**PAI-1, Plasminogen Activator Inhibitor-1**)⁽³²⁻³⁴⁾. PAI -1 es un potente inhibidor de la cascada proteolítica pericelular dependiente de la plasmina^(33, 34) y se ha demostrado en modelos de Uropatía Obstructiva Unilateral (**UOU**) murinos que PAI-1 contribuye a la fibrosis túbulointersticial renal al inhibir la degradación de la MEC⁽³⁴⁾.

Hace ya más de una década que Fan y colaboradores han demostrado, en cultivos de células epiteliales renales de rata, que TGF- β 1 induce la diferenciación de células epiteliales renales a miofibroblastos de una manera dosis dependiente⁽³⁵⁾. Entre los genes que han sido caracterizados como claves en la génesis de fibrosis renal, se encuentran aquellos implicados en la generación de ERO. Entre las enzimas generadoras de ERO, las isoformas de la NADPH oxidasa C (**NOX, NADPH OXidase**) se han visto implicadas en la TEM⁽³⁴⁾. La exposición de cultivos de fibroblastos renales a TGF- β 1 aumenta los niveles de ERO y de su enzima generadora, NOX4; en concordancia, cuando se inhibe la síntesis de ERO o de NOX4, disminuye la expresión de proteínas características del fenotipo miofibroblástico inducido por TGF- β 1. Esto sugiere que NOX4/ERO actúan como mediadores de la inducción de TEM

por parte de TGF- β 1⁽³⁶⁾. Se propone que, a través de Smad 3, TGF- β 1 induce la expresión de NOX4 y por ende la generación de ERO, llevando a la TEM (Figura 4)⁽³⁶⁾.

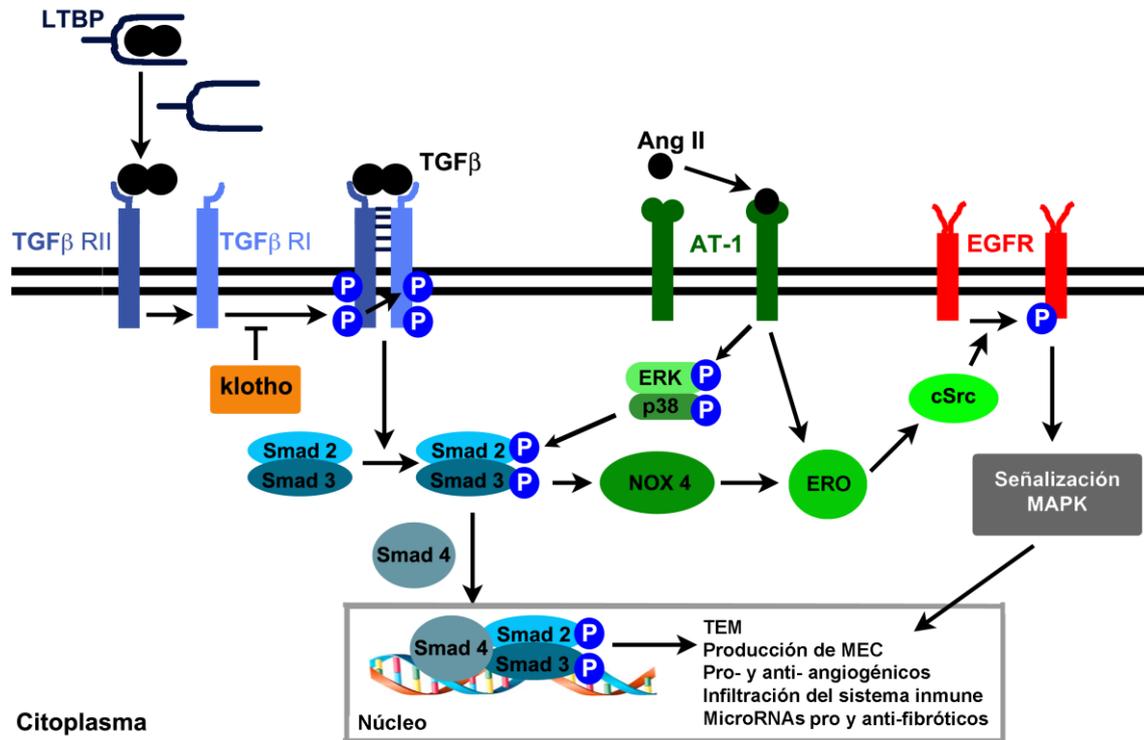


Figura. 4. Vías moleculares de señalización involucradas en el proceso de fibrosis renal. El mecanismo más estudiado es la vía canónica TGF- β 1/Smad. TGF- β 1, al unirse a su receptor TGF- β RII, induce la dimerización de éste con TGF- β RI. Este heterodímero fosforila a los factores de transcripción Smad 2 y 3, los cuales posteriormente forman un complejo con Smad 4 que se transloca al núcleo y estimula la transcripción de genes profibróticos involucrados en la TEM, la producción de MEC, la angiogénesis, la infiltración del sistema inmune y la síntesis de microARNs. A su vez, la Ang II, al unirse a su receptor AT1, estimula la transactivación de EGFR. Estas interacciones promueven y perpetúan la fibrosis renal inducida por TGF- β 1.

Por otra parte, TGF- β 1 es reconocida como una citoquina anti-inflamatoria; se ha demostrado que TGF- β 1 unido LTBP, tiene un papel protector en la inflamación renal^(26, 37). Los incrementos en la expresión de TGF- β 1 latente en ratones los protege frente a la inflamación y fibrosis renal en modelos de UOU y glomerulonefritis rápidamente progresiva, disminuyendo la infiltración leucocitaria en el tejido renal^(26, 37, 38).

En cuanto a la angiogénesis, se ha demostrado que TGF- β 1 es un modulador del desarrollo de los vasos sanguíneos durante procesos como la embriogénesis, la progresión de las enfermedades crónicas y el envejecimiento^(26, 39, 40). Nakagawa y colaboradores demostraron que TGF- β 1 induce la síntesis de factores pro- y anti-angiogénicos. A través de Smad 2, TGF- β 1 regula la expresión de TSP-1, un factor anti-angiogénico, mientras que a través de Smad 3, TGF- β 1 regula la expresión del factor de crecimiento vascular

endotelial (**VEGF**, **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor) en cultivos celulares de túbulo contorneado proximal de riñón de rata⁽⁴⁰⁾.

Como detallaremos más adelante, TGF- β 1 regula la expresión de cuatro familias de microARNs: miR-21, miR-200, miR-29 y miR-433; todas ellos potentes moduladores de la TEM, del proceso de remodelación de la MEC y de la progresión de la fibrosis renal (ver revisión ⁽⁴¹⁾).

6.2 Interacción entre EGFR y TGF β R: vías complementarias para el desarrollo de la fibrosis renal

Se ha demostrado que la vía de señalización de EGFR está relacionada con la progresión de la enfermedad renal y la consiguiente fibrosis ^(30, 33). Samakaron y colaboradores han demostrado que la cascada de EGFR es activada en modelos de fibrosis renal por UOU y es necesaria para la expresión de genes pro-fibróticos inducidos por TGF- β 1 ⁽³³⁾. En este estudio, los autores demuestran que, por un lado, TGF- β 1 transactiva a EGFR mediante la producción de ERO mientras que, por otro lado, la interacción entre la cascada de EGFR y la vía canónica de TGF- β 1 activa y mantiene la expresión de genes pro-fibróticos (como ser fibronectina y PAI -1). En cuanto a la transactivación de EGFR inducida por TGF- β 1 y mediada por NOX4/ERO, se propone que ERO activaría a una tirosinquinasa intracelular no ligada a un receptor, llamada c-Src, que fosforilaría a EGFR. Esta fosforilación induciría la cascada de señalización de las MAPK (MAPK, **M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inases). Una vez activada esta cascada, se activaría la transcripción de genes pro-fibróticos necesarios para el progreso de la fibrosis renal (Figura 4)(ver revisión ⁽³⁴⁾).

6.3 Angiotensina II y su contribución a la fibrosis renal

Hace tiempo que se vincula a la Ang II con el desarrollo de fibrosis en distintos órganos, como por ejemplo la fibrosis en los vasos sanguíneos ⁽³¹⁾. A modo de ejemplo, se ha demostrado que la actividad incrementada del SRAA está involucrado en el desarrollo de lesiones fibróticas vasculares, tanto en humanos como en ratones ⁽³¹⁾. A nivel renal, existen fuertes evidencias de que la Ang II está involucrada en el desarrollo de la fibrosis renal, sobre todo en lo que se refiere a la ERC. Se ha señalado a la Ang II como un factor pro-fibrótico que participa en la mesangioesclerosis y fibrosis glomerular en la ERC avanzada ⁽⁴²⁾. Leelahavanichkul y colaboradores demostraron en ratones que

el desarrollo de ERC debido una nefrectomía parcial de la masa renal total (modelo de ERC conocido como “modelo del riñón remanente”), podía ser aplacado mediante un antihipertensivo, llamado olmesartan, que inhibe al receptor de Ang II (**AT-1**, **Angiotensin receptor Type-1**)⁽⁴³⁾. La especificidad del mecanismo de acción de la Ang II en la fibrosis renal en este estudio fue corroborada mediante el uso de otro antihipertensivo, que no inhibe el receptor de Ang II (la hidralazina) y que por ende no disminuía la progresión de ERC en el modelo de riñón remanente ⁽⁴³⁾.

Nuevamente, TGF- β 1 adquiere nuevamente un papel protagónico. Se demostró que la Ang II estimula la vía canónica de TGF- β 1 independientemente del ligando, mediante la activación de las MAPKs, p38 y ERK1/2 (**ERK1/2**, **Extracellular signal-Regulated Kinases 1 y 2**)^(30, 31, 42, 44, 45) (Figura 4). Una vez activadas mediante su fosforilación, ERK1/2 y p38 regulan diversas actividades celulares a través de la estimulación de la expresión génica, como ser mitosis, metabolismo, apoptosis, diferenciación y movilidad celular (ver revisión ⁽⁴⁶⁾). Yang y colaboradores mostraron que el tratamiento con Ang II de células tubulares renales inducía la expresión de colágeno tipo I mediante la activación de la vía ERK/p38 de las MAPK⁽⁴⁵⁾. Posteriormente, Chen y colaboradores demostraron que la transactivación de EGFR durante la fibrosis túbulointersticial renal puede ser mediada por la Ang II a través de una vía no dependiente de ligando, que mantiene a EGFR continuamente activado. Esta activación persistente es crucial para que se produzca un incremento en la actividad pro-fibrótica de TGF- β 1⁽³⁰⁾. Estos autores proponen que, mediante la producción de ERO, la Ang II transactivaría la cascada de EGFR (vía fosforilación por c-Src) (Figura 4). Esta activación de EGFR independiente de su ligando llevaría a una inducción de la vía de las MAPK y la consiguiente progresión de la fibrosis túbulointersticial. A su vez, el aumento de la actividad de TGF β -1 produciría ERO, que activaría a Src produciendo un círculo vicioso que autoperpetuaría la fibrogénesis renal⁽³⁰⁾.

6.4 Estado actual de los microARN en la fibrosis renal

Los microARNs son pequeñas moléculas (de aproximadamente 22 bases de largo) de ARN simple cadena, no codificante, que inhiben la traducción o facilitan la degradación de ARN mensajeros (**ARNm**) diana. Sus secuencias

codificantes se localizan intra e intergénicamente en el ADN nuclear de la célula y muchas de estas secuencias tienen sus propios elementos reguladores, por lo cual actúan como unidades transcripcionales independientes. Son inicialmente producidos en el núcleo por la ARN polimerasa II y III a partir de ADN; este transcrito primario es luego procesado por una RNAasa nuclear, llamada Drosha, transformándolos en pre-miARN. Luego, a través de la Exportina 5, son trasladados al citoplasma donde los pre-microARN son procesados por la ARNasa III, llamada Dicer, produciendo microARN doble cadena de 19-24 pares de bases de largo. Estos ARN doble cadena se separan y una de las cadenas actúa como microARN maduro mientras que la otra se degrada, aunque se ha demostrado que, en ocasiones, esta última puede también funcionar como microARN maduro. Los microARN maduros son cargados en el complejo de silenciamiento inducido por miARN (**miRISC**) donde, al aparearse de manera total o parcialmente complementaria con su ARNm blanco, silencia la traducción de éste último (Figura 5). Algoritmos informáticos predicen que cada microARN tiene cientos de ARNm blancos y regulan aproximadamente 60% de los genes codificantes de proteínas en humanos (ver revisiones ⁽⁴¹⁾ y ⁽⁴⁷⁾).

Existen una gran cantidad de estudios que muestran que los microARNs son órgano-específicos y que están involucrados en la génesis de la fibrosis (ver revisión ⁽⁴¹⁾). Particularmente en el riñón, los microARNs son esenciales para su correcto desarrollo embrionario y homeostasis (ver revisiones ^(41, 47, 48)). Existen varias familias de microARNs que se han visto implicadas en la fibrosis renal; entre ellas se destacan miR-21, miR-200, miR-29 y miR-433.

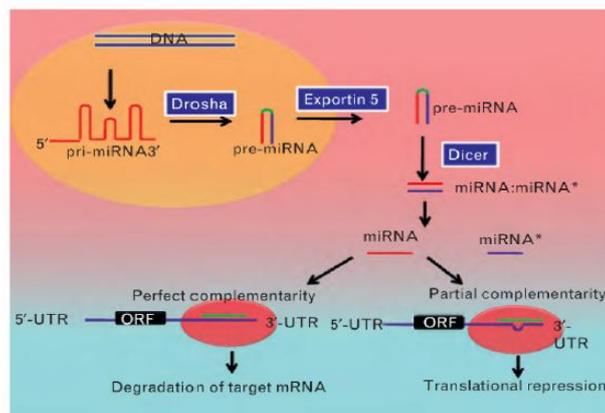


Figura 5. Síntesis, procesamiento y mecanismo de acción de los microARNs. Son sintetizados a partir de un molde de ADN y procesados por Drosha. Una vez exportados del núcleo por la Exportina 5, se unen a ARNm para degradar o reprimir su traducción. Extraído de Patel y colaboradores ⁽⁴¹⁾.

En cuanto al miR-21, Godwin y colaboradores demostraron que, inmediatamente después del daño a riñones murinos provocado por injuria y reperusión, los niveles de miR-21 aumentan en las células epiteliales tubulares⁽⁴⁹⁾. Además, la exposición de células tubulares epiteliales cultivadas a TGF- β 1 induce un aumento en la expresión de este microARN^(49, 50) mediante la vía canónica mediada por las proteínas Smad⁽⁵⁰⁾; de hecho, Zhong y colaboradores observaron que el tratamiento con TGF- β 1 de células epiteliales tubulares deficientes del gen *Smad3* no afecta los niveles de miR-21, demostrando el requerimiento de Smad3 para la inducción de miR-21 por TGF- β 1⁽⁵⁰⁾. Respecto al rol de miR-21 en la fibrosis renal, la sobreexpresión del mismo induce un aumento en los niveles de proteínas marcadoras de la fibrosis renal, como son el colágeno tipo 1 y la fibronectina⁽⁵⁰⁾. *In vivo*, se ha demostrado que los niveles de este microARN se ven aumentados en riñones de modelos de UOU murinos y que miR-21 se encuentra fundamentalmente sobreexpresado en células epiteliales tubulares de la corteza renal⁽⁵¹⁾. La inhibición de miR-21 con anti-miR-21 disminuye el depósito de colágeno y la infiltración renal de los macrófagos⁽⁵¹⁾.

La familia de microRNAs miR-200 consiste en cinco miembros: miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 y miR-141 (ver revisión⁽⁴¹⁾). Se ha propuesto que miR-200 protege a las células tubulares epiteliales de la des-diferenciación y del proceso de TEM que se lleva a cabo durante la progresión de fibrosis renal^(52, 53). La expresión ectópica de miR-200 en células tubulares renales brindó resistencia a la inducción de TEM y, en concordancia, la inhibición de la expresión de este micro-RNA por ARN de interferencia suprimió la expresión de proteínas características del fenotipo epitelial y estimuló la expresión de proteínas del fenotipo miofibroblástico por parte de éstas células⁽⁵³⁾. Así mismo, la inyección de miR-200b en los uréteres de riñones de ratas obstruidos logró disminuir la fibrosis túbulo intersticial después de 6 días de la realización de UOU⁽⁵²⁾. Se piensa que el mecanismo molecular mediante el cual estos microARNs tienen acción anti-fibrótica sería la inhibición directa de la expresión de dos factores de transcripción implicados en la TEM, Zeb1 y Zeb2⁽⁵³⁾. Estos factores de transcripción son represores de la expresión de E-cadherina, una proteína clave para las adhesiones adherentes de las células

epiteliales⁽⁵⁴⁾. Aparentemente, la vía canónica de TGF β -1 es responsable de la regulación negativa de miR-200 durante el proceso de fibrosis renal^(53, 54).

La familia miR-29 consiste en tres miembros: miR-29a, miR-29b-1 y miR-29b2 y miR-29c, que se expresan abundantemente en los pulmones, corazón y en los riñones (ver revisión⁽⁴¹⁾). Qin y colaboradores demostraron el rol anti-fibrótico de esta familia de microARNs luego de someter a ratones a una UOU y observar una disminución significativa en la expresión de miR-29 en el riñón, mientras que en ratones knock-out para el gen *Smad3* los niveles de miR-29 aumentan luego de una UOU⁽⁵⁵⁾. Además, el incremento en la expresión de miR-29 reprime la síntesis de colágeno I y III inducida por TGF- β 1 en las células epiteliales renales en cultivo⁽⁵⁵⁾. Todos estos resultados sugieren que TGF- β 1 inhibe la expresión de miR-29 vía *Smad3*, inhibiendo los mecanismos anti-fibróticos de este microARN⁽⁵⁵⁾.

Por último, Li y colaboradores demostraron que miR-433 participa en un mecanismo de retroalimentación positiva de la cascada de señalización de TGF- β 1 durante el proceso de fibrosis renal⁽⁵⁶⁾. Experimentos *in vivo* e *in vitro* demostraron que los niveles de miR-433 aumentan en células epiteliales de los túbulos renales en respuesta al TGF- β 1 y en ratones con fibrosis renal generada por una UOU⁽⁵⁶⁾. De acuerdo a los resultados obtenidos, los autores postulan que TGF- β 1 estimula la expresión de miR-433 vía *Smad3*. Luego de activada la señal inducida por TGF- β 1, *Smad3* se une al promotor del gen miR-433 y activa su expresión⁽⁵⁶⁾. A su vez, miR-433 potencia la vía de señalización de TGF- β 1 mediante la represión de la expresión de Azin 1, un potente represor de la antizima que inhibe la síntesis de poliaminas⁽⁵⁶⁾. La inhibición de la síntesis de poliaminas induce la expresión de TGF- β 1, sus receptores (TGF β RI y TGF β RII) y *Smad3*, de modo que miR-433 crea un feedback positivo y aumenta la expresión de TGF- β 1, amplificando su señal como sucede en la etapa crónica de la enfermedad renal⁽⁵⁶⁾.

6.5 La proteína antienvjecimiento Klotho y su papel en la fibrosis renal del riñón envejecido

Los modelos hasta ahora mencionados en los estudios de las cascadas moleculares que modulan la fibrosis renal, se basan en la inducción de la ERC a través de distintos mecanismos patogénicos (modelos de diabetes, hipertensión y UOU). Sin embargo, la fibrosis renal también es un fenómeno

del envejecimiento y, como tal, es importante conocer qué mecanismos vinculan a ambos sucesos. El envejecimiento es un fenómeno complejo que resulta de una interacción entre factores genéticos y ambientales ⁽⁵⁷⁾. Dentro de los factores genéticos, se ha identificado al gen *Klotho* como un gen anti-envejecimiento, que codifica para una proteína con efectos pleiotrópicos. Este gen fue descubierto por Kuro-o y colegas en 1997 al revelar que la inhibición de la expresión de este gen conlleva a fenotipos de envejecimiento prematuro en ratones ⁽⁵⁸⁾. En el 2005, los mismos autores demuestran que la sobreexpresión de *Klotho* en ratones transgénicos puede extender su expectativa de vida, sugiriendo que *Klotho* funciona como un supresor del envejecimiento en mamíferos ⁽⁵⁹⁾. La deficiencia de *Klotho* aumenta la susceptibilidad al daño renal debido a un atraso en la recuperación luego de una injuria, induciendo fibrosis renal ⁽⁶⁰⁾. En comparación con los ratones wild type, los riñones de ratones knock-out para el gen *Klotho* que sufrieron una UOU presentan altos niveles de TGF- β 1 acompañados por un aumento en la expresión de los marcadores miofibroblásticos α -SMA, PAI-1 y fibronectina, así como depósitos de fibrina glomerular y tubulointersticial ⁽⁶⁰⁾.

La familia de proteínas *Klotho* consiste en tres proteínas transmembrana (α -, β - y γ - *Klotho*). Específicamente, α -*Klotho* se expresa predominantemente en las células epiteliales del túbulo contorneado distal y con menor abundancia en las células del túbulo contorneado proximal. *Klotho* se compone de tres dominios: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular puede ser clivado por las proteasas de membrana de la familia ADAM (**ADAM, A Desintegrin And Metalloproteinase**), lo cual hace que *Klotho* exista en dos isoformas: una secretada, actuando a modo de hormona y produciendo efectos sistémicos, y otra transmembrana, que actúa como coreceptor del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (**FGF 23, Fibroblast Growth Factor 23**) (por revisión ⁽⁵⁷⁾).

En lo que respecta a la fibrosis renal, Haruna y colaboradores observaron que si a ratones con glomerulonefritis se le inducía la sobreexpresión de *Klotho*, disminuía la fibrosis túbulointersticial ⁽⁶¹⁾. En 2010, Doi y colaboradores observaron en cortes histológicos de riñones de ratones sometidos a una UOU que la administración exógena de *Klotho* soluble también disminuye la fibrosis túbulointersticial ⁽⁶²⁾. A nivel molecular, la administración exógena de *Klotho*

soluble inhibe la expresión de proteínas marcadoras del fenotipo miofibroblástico, como son la α -SMA y el colágeno tipo 1⁽⁶²⁾. En principio, Klotho soluble es capaz de inhibir la cascada de señalización de TGF- β 1 mediante la unión a al receptor TGF β RII, impidiendo la formación del complejo TGF β RII-TGF β RI (Figura 4) e inhibiendo la TEM observada en los procesos de fibrosis renal⁽⁶²⁾. Sin embargo, los autores destacan que Klotho no solamente actúa sobre la vía de señalización de TGF- β 1, sino también es capaz de inhibir otras cascadas moleculares que estimulan la TEM, planteando la existencia de un sinergismo entre las distintas cascadas moleculares durante el proceso de fibrosis renal⁽⁶²⁾.

7. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA LA FIBROSIS RENAL

Durante muchos años se ha estudiado los mecanismos involucrados en la fibrosis renal y, en base a estos conocimientos, se ha intentado encontrar una terapia para detener su progresión. A pesar de estar lejos de una cura completa, hay varios estudios que han demostrado terapias moleculares efectivas en disminuir la fibrosis; entre las más destacados se encuentran el bloqueo de la cascada de señalización de TGF- β 1, los inhibidores de la enzima convertidora de Ang II (**IECA**), el uso de los microARNs como blancos y la activación del gen *Klotho*.

7.1 Bloqueo de la vía de señalización de TGF- β 1

A pesar de haber una gran variedad de moléculas implicadas en el proceso de la fibrosis, es indiscutible que la vía canónica de señalización TGF- β 1 juega un rol primordial. En un estudio (en fase 1) realizado por Trachtman y colaboradores, se bloqueó esta vía de señalización mediante un anticuerpo monoclonal que neutraliza la forma activa de TGF- β 1, llamado Fresolimumab, registrándose un enlentecimiento en la progresión de la fibrosis renal⁽⁶³⁾. Durante el estudio, se le administró una única dosis de Fresolimumab a pacientes con resistencia al tratamiento de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, observándose que 3 de los 16 pacientes del estudio tuvieron una disminución significativa de su proteinuria, presentando solamente efectos secundarios de intensidad leve a media⁽⁶³⁾. Los autores proponen un futuro estudio que, con un número mayor de pacientes conjuntamente con la

administración de más de una dosis del fármaco, podría obtener mejores resultados ⁽⁶³⁾.

En otro estudio realizado por Park y colaboradores, se investigó el efecto del clorhidrato de glucosamina en ratones con una UOU, con el fin de atenuar la señal de TGF- β 1 ⁽⁶⁴⁾. La glucosamina es un glucosaminoglicano que se encuentra en el cartílago y fluido sinovial y es muy utilizada como tratamiento contra la artritis por sus efectos protectores en los cartílagos. Los autores utilizaron la glucosamina para inhibir la N-Glicosilación del receptor TGF β RII, inhibiendo de este modo su unión con TGF- β 1. Los resultados demostraron que la glucosamina inhibe de manera significativa el aumento de α -SMA, del colágeno tipo 1 y la fibronectina en las células que fueron tratadas con TGF- β 1 y en los ratones sometidos a una UOU. Park y sus colaboradores concluyeron que la glucosamina bloquea de manera eficaz la cascada de señalización de TGF- β 1 y sugieren su potencial uso en la clínica como para prevenir la fibrosis renal ⁽⁶⁴⁾.

7.2 Terapias anti-angiogénicas

El aumento en la actividad del eje SRAA resulta en hipertensión arterial y glomerular, causando daño en el parénquima y contribuyendo con la patogenia de la fibrosis renal. Debido al rol importante que cumple el eje SRAA en la fisiopatología de la fibrosis renal, se ha estudiado el efecto de **Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Ang II (IECA)** como terapia para la fibrosis renal ⁽⁶⁵⁾. En un estudio realizado por Mizobuchi y colaboradores se observó un resultado muy beneficioso al enlentecer el proceso de fibrosis renal con Enalapril, un IECA ampliamente utilizado ⁽⁶⁶⁾. Al inhibir la cascada de señalización de la Ang II, el Enalapril disminuye indirectamente la vía de TGF- β 1 aplacando sus efectos pro-fibróticos. A pesar de que hoy en día el tratamiento de la fibrosis con Enalapril es muy utilizado, no se ha logrado un cambio en el curso de la enfermedad, la cual progresa, aunque más lentamente, hasta terminar su etapa final caracterizada por expansión de la matriz, fibrosis intersticial, atrofia tubular y glomeruloesclerosis ⁽⁶⁶⁾.

7.3 MicroARNs: posibles blancos terapéuticos contra la fibrosis renal

Como mencionamos anteriormente, algunos microARNs son capaces de modular la fibrosis renal y varios estudios plantean su posible uso como blanco

de acción para una terapia ⁽⁴¹⁾. Un estudio reciente presentado por Chung y colaboradores propone que, tanto la sobreexpresión de miR-29, así como la inhibición de miR-21, podrían servir como futuras terapias contra la fibrosis renal ⁽⁶⁷⁾. Ambos microRNAs son regulados directamente por Smad3 luego de la activación de la vía canónica de TGF- β 1; mientras que el miR-29 anti-fibrótico es inhibido por Smad3 ⁽⁵⁵⁾, el miR-21 con acción pro-fibrótica es activado por este factor de transcripción ⁽⁵¹⁾. Además, Chung y colaboradores exploran el papel de Smad7, un inhibidor del complejo Smad2/Smad3, en el proceso de fibrosis renal; también investigan como la sobreexpresión del mismo bloquea la inhibición de miR-29 e inhibe la estimulación de miR-21 ⁽⁶⁷⁾. Concordantemente, la degradación de Smad7 activa la señal de TGF- β 1 e inhibe y reprime miR-21 y miR-29, respectivamente ⁽⁶⁷⁾

Otro de estudio plantea la inhibición de la expresión de miR-433 por ultrasonido para reprimir la cascada de señalización de TGF- β 1 ⁽⁵⁶⁾. Los resultados observados son positivos, mostrando una inhibición del circuito de retroalimentación de la vía TGF- β 1 conjuntamente con una disminución en los niveles de colágeno tipo I, fibronectina y α -SMA en células, sugiriendo que el bloqueo de la acción de miR-433 podría servir como una futura terapia para detener la fibrosis renal ⁽⁵⁶⁾.

7.4 Activación del gen *Klotho* para prevenir la fibrosis renal

La administración exógena de la proteína *Klotho* a ratones protege al riñón de la injuria por isquemia-reperfusión y de esta manera cambia la dirección de la enfermedad renal crónica ⁽⁶⁰⁾. Además, aumentando los niveles de *Klotho* endógeno al doble de su valor normal en el plasma, se logra proteger al riñón de los efectos de un evento de isquemia-reperfusión, de una glomerulonefritis y de la ERC ⁽⁶⁰⁾, sugiriendo que la estimulación de la expresión del gen *Klotho* podría servir como terapia para impedir el avance de la fibrosis renal. Con esta idea se han estudiado varios factores capaces de aumentar la actividad de *Klotho* en el riñón, entre ellos se encuentran: la activación de receptores gamma por los peroxisoma ⁽⁶⁸⁾, restricción del fosfato urinario y vitamina D que forman un circuito de retroalimentación positiva ⁽⁶⁹⁾ e inhibir el eje Ang II que bloquea el receptor AT1 que favorece la estimulación de *Klotho* disminuyendo el estrés oxidativo ⁽⁷⁰⁾.

8. CONCLUSIÓN

La enfermedad renal crónica es la consecuencia final de varias patologías renales, cuya incidencia va en aumento debido en parte al envejecimiento de la población a nivel mundial. Los principales cambios histológicos del riñón que se observan en los modelos renales de envejecimiento tisular son la glomeruloesclerosis y la fibrosis túbulo intersticial. Dado el carácter evolutivo a la falla renal terminal que presenta la fibrosis renal, se hace necesario el estudio de su patogenia y las distintas formas de influir en ella para detener o enlentecer este proceso. La fibrosis renal podría verse no sólo como el depósito de matriz extracelular en el intersticio sino también como producto de una serie de transformaciones celulares que genera un círculo vicioso que perpetúa la fibrosis. Es interesante el estudio del reclutamiento y la activación de fibroblastos, paso fundamental en la formación de fibrosis tubulointersticial. De las vías moleculares implicadas en estos procesos, la vía TGF- β 1/ Smad es la más estudiada en el proceso de fibrosis renal. Esta vía, junto con su interacción con otras como la de la Ang II y el EGFR, promueve la expresión de genes profibróticos. Estas interacciones hacen de la base molecular de este proceso, una compleja red de vías de señalización, cuyo estudio detallado es necesario para la creación de terapias que puedan enlentecer la fibrosis. A pesar de haber varios estudios que prueban la utilidad de terapias como los IECA y anticuerpos monoclonales anti TGF- β 1, todavía se sigue investigando para poder hallar una terapia realmente efectiva.

Destacamos que muchos de los modelos de fibrosis renal utilizados por las diversas investigaciones para su estudio molecular fueron modelos de fibrosis desencadenada por situaciones patológicas, las cuales, si bien acompañan frecuentemente al envejecimiento, no siempre están presentes. Creemos que utilizar modelos más representativos del envejecimiento tisular junto con el estudio de la proteína Klotho, caracterizado como la proteína “anti envejecimiento” podría permitir una mejor aproximación respecto al efecto del envejecimiento tisular en la fibrosis túbulo intersticial renal.

9. REFERENCIAS

1. Pellegrino A. El Uruguay del siglo XX. La sociedad. Montevideo: Banda Oriental; 2008.

2. Chackiel J. La dinámica demográfica en América Latina Santiago de Chile: CEPAL, 2004.
3. El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney international*. 2005;68(6):2918-29.
4. Gonzalez C, Ferreiro A, Schwedt E. Informe Anual. Montevideo, Uruguay.: 2013.
5. Informe Anual. Montevideo, Uruguay.: Fondo Nacional de Recursos, 2012.
6. Griffiths GJ, Robinson MB, Path MRC, Cartwright GO, McLachlan M. Loss of renal tissue in the elderly. *British Journal of Radiology*. 1976;49:111-7.
7. McLachlan M, Wasserman P. Changes in sizes and distensibility of the aging kidney. *The British Journal of Radiology*. 1981;54:488-91.
8. Brenner B. *The Kidney*. 9° ed. Elsevier, editor. Philadelphia: Elsevier; 2012. 2938 p.
9. Miletic D, Fuckar Z, Sustic A, Mozetic V, Stimac D, Zauhar G. Sonographic measurement of absolute and relative renal length in adults. *Journal of clinical ultrasound : JCU*. 1998;26(4):185-9.
10. Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Cass A, Johnson K, Bertram JF. A stereological study of glomerular number and volume: preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney international Supplement*. 2003(83):S31-7.
11. Rule AD, Semret MH, Amer H, Cornell LD, Taler SJ, Lieske JC, et al. Association of kidney function and metabolic risk factors with density of glomeruli on renal biopsy samples from living donors. *Mayo Clinic proceedings*. 2011;86(4):282-90.
12. Cotran Ry. *Patología estructural y funcional*. Patología estructural y funcional. 8° ed. Barcelona, España: El Sevier España S.L; 2010. p. 905-70.
13. Gagliano N, Arosio B, Santambrogio D, Balestrieri MR, Padoani G, Tagliabue J, et al. Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat kidney cortex. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2000;55(8):B365-72.
14. Abrass CK, Adcox MJ, Raugi GJ. Aging-associated changes in renal extracellular matrix. *The American journal of pathology*. 1995;146(3):742-52.
15. Urbietta-Caceres VH, Syed FA, Lin J, Zhu XY, Jordan KL, Bell CC, et al. Age-dependent renal cortical microvascular loss in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(8):E979-86.
16. Čukuranović R, Vlajković S. Age related anatomical and functional characteristics of human kidney. *Medicine and Biology* 2005;12(2):61-9.
17. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(12):684-96.
18. Moser B, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63 Suppl 2:ii84-ii9.
19. Ko GJ, Boo CS, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2008;23(3):842-52.
20. Cockwell KSEaP. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. 2005.

21. Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS, et al. Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney international*. 2010;78(4):351-62.
22. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(11):1819-34.
23. Campanholle G, Ligresti G, Gharib SA, Duffield JS. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(7):C591-603.
24. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(2):212-22.
25. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *The American journal of pathology*. 2008;172(2):299-308.
26. Lan HY. Diverse Roles of TGF- β /Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. *International Journal of Biological Sciences*. 2011;7:1056-67.
27. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*. 2005;12(4):353-65.
28. Clements ME, Chaber CJ, Ledbetter SR, Zuk A. Increased cellular senescence and vascular rarefaction exacerbate the progression of kidney fibrosis in aged mice following transient ischemic injury. *PloS one*. 2013;8(8):e70464.
29. Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15(1):1-12.
30. Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, et al. EGFR signaling promotes TGFbeta-dependent renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(2):215-24.
31. Wang W, Huang XR, Canlas E, Oka K, Truong LD, Deng C, et al. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ Res*. 2006;98(8):1032-9.
32. Oda T, Jung YO, Kim HS, Cai X, Lopez-Guisa JM, Ikeda Y, et al. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney international*. 2001;60(2):587-96.
33. Samarakoon R, Dobberfuhr AD, Cooley C, Overstreet JM, Patel S, Goldschmeding R, et al. Induction of renal fibrotic genes by TGF-beta1 requires EGFR activation, p53 and reactive oxygen species. *Cellular signalling*. 2013;25(11):2198-209.
34. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF-beta signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cellular signalling*. 2013;25(1):264-8.
35. Jun-Ming Fan Y-yN, Prudence A. Hill, David J. Nikolic-Paterson, Wei Mu, Robert C. Atkins, and Hui Y.Lan. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney international*. 1999;56:1455-67.
36. Bondi CD, Manickam N, Lee DY, Block K, Gorin Y, Abboud HE, et al. NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(1):93-102.

37. Wang W, Huang XR, Li AG, Liu F, Li JH, Truong LD, et al. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(5):1371-83.
38. Huang XR, Chung AC, Zhou L, Wang XJ, Lan HY. Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(2):233-42.
39. Philippe Bertolino PMD, PhD; Franck Lebrin PaPtD, PhD. Transforming Growth Factor- β Signal Transduction in Angiogenesis and Vascular Disorders. *Chest*. 2005.
40. Nakagawa T, Li JH, Garcia G, Mu W, Piek E, Ttinger E, et al. TGF-b induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney international*. 2004;66:605-13.
41. Patel V, Nouredine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(4):410-6.
42. Boggia J. Fisiopatología. Fisiopatología. 2. Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro; 2011. p. 217-309.
43. Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, et al. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney international*. 2010;78(11):1136-53.
44. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation*. 2005;111(19):2509-17.
45. Yang F, Chung AC, Huang XR, Lan HY. Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3. *Hypertension*. 2009;54(4):877-84.
46. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2004;68(2):320-44.
47. Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K. MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT. *BioMed research international*. 2013;2013:125469.
48. Lee HM, Nguyen DT, Lu LF. Progress and challenge of microRNA research in immunity. *Frontiers in genetics*. 2014;5:178.
49. Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(32):14339-44.
50. Zhong X, Chung AC, Chen HY, Meng XM, Lan HY. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(9):1668-81.
51. Zarjou A, Yang S, Abraham E, Agarwal A, Liu G. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;301(4):F793-801.
52. Oba S, Kumano S, Suzuki E, Nishimatsu H, Takahashi M, Takamori H, et al. miR-200b precursor can ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis. *PloS one*. 2010;5(10):e13614.

53. Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, et al. The miR-200 family regulates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;302(3):F369-79.
54. Korpala M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(22):14910-4.
55. Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, et al. TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(8):1462-74.
56. Li R, Chung AC, Dong Y, Yang W, Zhong X, Lan HY. The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF-beta/Smad3-Azin1 pathway. *Kidney international*. 2013;84(6):1129-44.
57. Sopjani MD, Kolgeci S, Abazi S, Sopjani M. Significance of the anti-aging protein Klotho. *Molecular Membrane Biology*,. 2013:1-17.
58. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Sugat T, Ohyamat Y, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6):45-51.
59. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* 2005;309(5742):1829-33.
60. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Renal and extrarenal actions of Klotho. *Semin Nephrol*. 2013;33(2):118-29.
61. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *PNAS*. 2007;104(7):2331-6.
62. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(10):8655-65.
63. Trachtman H, Fervenza FC, Gipson DS, Heering P, Jayne DR, Peters H, et al. A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF-beta antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney international*. 2011;79(11):1236-43.
64. Park J, Lee SY, Ooshima A, Yang KM, Kang JM, Kim YW, et al. Glucosamine hydrochloride exerts a protective effect against unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by attenuating TGF-beta signaling. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(11):1273-84.
65. Krause MW, Fonseca VA, Shah SV. Combination inhibition of the renin-angiotensin system: is more better? *Kidney international*. 2011;80(3):245-55.
66. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Akizawa T, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(6):1796-806.
67. Chung AC, Dong Y, Yang W, Zhong X, Li R, Lan HY. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF-beta/Smad3-regulated microRNAs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(2):388-98.

68. Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, et al. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney international*. 2008;74(6):732-9.
69. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Molecular endocrinology*. 2003;17(12):2393-403.
70. Yoon HE, Ghee JY, Piao S, Song JH, Han DH, Kim S, et al. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(3):800-13.