



Superóxido Dismutasa de Manganeso, nitración y patología: implicancia de la modificación nitro-oxidante en el rechazo renal.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Universidad de la Republica

Montevideo Uruguay, 2014

Estudiantes:

Br. Ana Barreto

Br. Jessica Bonilla

Br. Romina Mangini

Br. Dahiana Rapetti

Orientador:

Asist. Bq. Dra. Verónica Demicheli

ÍNDICE

Resumen.....	Pág. 3.
Justificación.....	Pág. 4.
Introducción.....	Pág. 5.
Marco Teórico.....	Pág. 6.
Objetivo General, Objetivos específicos.....	Pág. 11.
Metodología.....	Pág. 11.
Resultados y Discusión.....	Pág. 12.
Conclusiones.....	Pág. 25.
Agradecimientos.....	Pág. 26.
Bibliografía.....	Pág. 27.

RESUMEN

El trasplante renal se lleva a cabo con éxito desde hace más de 50 años, pero con una tasa de supervivencia del aloinjerto a largo plazo aún problemática. Por su alta prevalencia se han investigado mucho los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el rechazo renal y se ha visto involucrada una disfunción de la enzima antioxidante superóxido dismutasa de manganeso. A raíz de esto se investigó en profundidad los procesos moleculares que involucran a dicha enzima y se comprobó que la nitración de un solo aminoácido, la tirosina 34, es la modificación que determina su inactivación. Dicha inactivación produce un aumento intracelular de radicales libres lo que perpetúa el daño irreversible por estrés oxidativo y consecuente muerte celular. Se realizó una búsqueda bibliográfica para comprender tanto la historia como el estado actual de las bases moleculares de dicho proceso y se vio una evolución del conocimiento respecto al tema. Se logró demostrar la importancia de la enzima superóxido dismutasa de manganeso en la génesis del rechazo renal crónico y se ha investigado como posible blanco terapéutico.

JUSTIFICACIÓN

Actualización del tema de investigación: rol de la enzima antioxidante mitocondrial superóxido dismutasa de manganeso y su papel en la base fisiopatológica del rechazo del trasplante renal, la cual se demostró que está involucrada en dicho proceso [1], y debido a que el trasplante renal es uno de los más prevalentes, se consideró relevante conocer detalles moleculares implicados en el mismo.

INTRODUCCIÓN

Los riñones fueron los primeros órganos trasplantados con éxito y desde hace aproximadamente 50 años es el trasplante más frecuentemente realizado [2] [3] [4].

Este trasplante presenta una alta prevalencia de rechazo y la supervivencia del aloinjerto a largo plazo (> 1 año) sigue siendo un problema importante del trasplante renal, con pérdida del órgano principalmente debido a la nefropatía crónica del aloinjerto [5] [6] [7]. Este hecho generó interés en conocer las causas fisiopatológicas que expliquen el rechazo [2] y diferentes investigadores plantearon dos teorías: causa inmunológica o inflamatoria [2]. A raíz de esto, se realizaron biopsias renales para estudio histológico, y se observó: oclusión vascular progresiva, glomerulopatía característica, y los procesos de fibrosis intersticial acompañados por atrofia tubular, que en última instancia, resulta en insuficiencia del órgano. Los hallazgos histológicos mostraron también daño por inflamación que podría estar implicada por la reacción inmunológica contra el aloinjerto [8]. Tras mejoras en las técnicas de inmunosupresión se logró aumentar la sobrevivencia del injerto renal a un año pero pese a esto, se siguieron observando altas tasas de rechazo renal crónico. Esto sugirió que además de los factores dependientes de antígenos, los mecanismos normales de reparación, que actúan en consecuencia al daño por inflamación, podrían estar involucrados en los procesos fisiopatológicos del rechazo crónico [2]. Se notó un aumento del estrés oxidativo, dado por radicales libres como anión superóxido (O_2^-) y óxido nítrico ($\cdot NO$), y nitración de proteínas. El $\cdot NO$ y O_2^- se combinan para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente agente oxidante y nitrante de varios blancos biológicos [9]. Al investigar este aumento del estrés oxidativo se halló que una serie de enzimas antioxidantes se encontraban inactivas, entre ellas la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) la cual se encontraba nitrada e inactivada luego de dos semanas post-trasplante, y a partir de las dieciséis semanas se vio una disfunción renal significativa [2].

MARCO TEÓRICO

Estructura de MnSOD

La MnSOD es una enzima antioxidante mitocondrial. Es esencial para disminuir el daño oxidativo, desbalance entre especies reactivas del oxígeno y antioxidantes naturales, producido por el metabolismo aerobio celular. Si éste daño es mantenido lleva a lesión celular y muerte. Este mecanismo se relaciona con diversas enfermedades incluyendo el rechazo crónico de órganos, la artritis, la aterosclerosis, la tumorigénesis y el proceso de isquemia/reperfusión [10].

La función de la MnSOD es reducir al radical libre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2).

La MnSOD es un homotetrámero (88 kDa) [11] que en el sitio activo tiene un ion manganeso (Mn) en un entorno triangular y bipiramidal distorsionado, coordinado por tres residuos de histidina, un aspartato y un ión hidroxilo (OH^-) o una molécula de agua [10] (Figura 1).

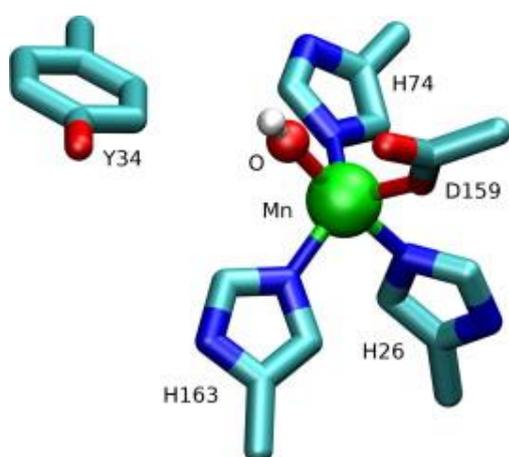


Figura 1

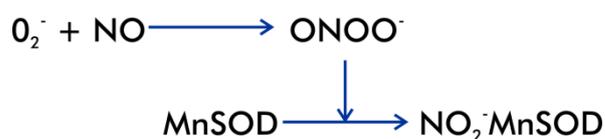
Sitio activo de MnSOD, que muestra el centro de Mn, los tres residuos de histidina y el aspartato, la O representa OH^- / H_2O y el segundo residuo de tirosina en esfera está alrededor de 5,6 Å del centro metálico. Tomado de [10].

Rodeando al sitio activo hay un anillo de carga electrostática positiva que atrae al $O_2^{\cdot-}$ cargado negativamente. La cavidad de acceso del sustrato, se

caracteriza por una red de puentes de hidrógeno que se compone de moléculas de disolvente y varios residuos clave, tales como glutamina 143 (Q143), tirosina 34 (Y34), tirosina 166 (Y166) e histidina 30 (H30), que son necesarios para la actividad adecuada. Se ha propuesto que el sitio catalítico actúa por un mecanismo de “ping-pong”, donde la enzima oscila en estados redox entre Mn^{3+} y Mn^{2+} [12] [13].

Mecanismo bioquímico: el $\cdot NO$ se combina con O_2^- generando $ONOO^-$. Este oxidante, que no es un radical libre, es capaz de inducir nitración de residuos de tirosina, promoviendo la formación de 3 nitrotirosina (3NT), siendo esta modificación irreversible. La 3NT ha sido utilizada como marcador de la presencia de $ONOO^-$.

El $ONOO^-$ puede reaccionar con iones como hierro, cobre o manganeso y así causar pérdida de la función celular. Tiene capacidad de inactivar enzimas, entre las que encontramos la MnSOD [14] (Esquema 1).



Esquema 1: Producción de $ONOO^-$ y la nitración de MnSOD.

Nitración e inactivación de MnSOD

Las células producen constantemente especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, las cuales están aumentados en tejidos que sufren estados inflamatorios o degenerativos. Concomitantemente se observa aumento de nitración de muchas moléculas entre ellas de diferentes proteínas [15] [16] [11]. Se sabe que la nitración del residuo de Y34 causa la inactivación de la enzima [1] [10], cuyo mecanismo es la restricción del acceso del sustrato al sitio activo, ya que este residuo es el primero en el túnel de acceso y está muy cerca del Mn [10].

Función renal normal, falla y trasplante

Los riñones son un órgano par, de gran jerarquía, que se encargan de la función excretora, regulación del medio interno, regulación de los niveles de Ca^{2+} y vitamina D, control de la presión arterial. Por diversas causas, ya sean prerrenales, renales o postrenales, muchas veces se ve alterada su función normal, manifestándose de múltiples maneras en la clínica. La combinación de signos y síntomas orienta al diagnóstico de insuficiencia renal aguda (IRA) o enfermedad renal crónica (ERC). En la IRA se puede ver alteraciones en la paraclínica de la función renal (en principio elevación asintomática de los valores de creatinina), alteraciones en la diuresis (oliguria, oligoanuria, anuria), elementos de síndrome urémico, hipervolemia, entre otras. En la ERC (donde las principales etiologías son la hipertensión arterial y la diabetes mellitus) hay cuadros más arrastrados que se caracterizan por anemia, alteraciones en el metabolismo mineral y óseo, complicaciones vasculares secundarias a la aterosclerosis, complicaciones infecciosas, nutricionales y en angioaccesos. Respecto al tratamiento de ERC, están los tratamientos sustitutivos renales (hemodiálisis y diálisis peritoneal) y el trasplante renal [17] [18].

En cuanto al trasplante renal, es el tratamiento de elección en los pacientes con ERC terminal, ya que mejora la calidad de vida y aumenta la supervivencia. Previo a esto hay que valorar que los riesgos de inmunosupresión y de la cirugía no sean excesivos, los cuales están dados por la edad avanzada y las patologías asociadas del paciente.

El trasplante renal comenzó a tener relevancia clínica a mediados del siglo pasado, luego de entender mejor los mecanismos de rechazo (base inmunológica) y como evitar o disminuir el mismo a través de fármacos (inmunosupresión) [19]. A sí mismo, a lo largo de dicho proceso, se vio que el trasplante renal de donante vivo da mejores resultados que de donante cadavérico. Esto parece ser debido a la menor edad del donante, menor tiempo de diálisis y menores comorbilidades [20].

Pese a todos los cuidados, existe la posibilidad de que el trasplante no sea bien tolerado y suceda un rechazo del injerto. En la patogenia del mismo pueden intervenir tanto mecanismos humorales como celulares. Hay tres tipos de rechazos: hiper-agudo, agudo y crónico. Esta clasificación es según como se manifieste el deterioro renal. Es decir que no depende del tiempo transcurrido entre el trasplante y la manifestación del rechazo, salvo el rechazo hiper-agudo, que ocurre en las primeras 24-48 horas tras hecho el trasplante e inclusive en la misma mesa de operación. La misma se debe a anticuerpos preformados por el receptor y se manifiesta como una anuria brusca. El rechazo agudo refiere al deterioro brusco de la función renal y se manifiesta por fiebre, oliguria, retención hidrosalina, aumento de peso, proteinuria, hipertensión y aumento de tamaño y consistencia del injerto. El rechazo renal crónico es la principal causa de fracaso tardío del injerto y se manifiesta como un deterioro gradual de la función renal, hipertensión y proteinuria (que puede llegar a rango nefrótico) [21].

Un factor no menor, implicado en la fisiopatología del resultado del trasplante renal, son las especies reactivas del oxígeno (ERO). Al extraer un riñón para trasplante, se lo somete a un período variable de *hipoperfusión e isquemia* (tras clampar la arteria renal en el acto quirúrgico). Esto trae como consecuencia una disminución de adenosintrifosfato (ATP), un aumento de ERO y alteraciones en el citoesqueleto celular. A su vez se genera una disminución de antioxidantes endógenos. La *reperfusión* del órgano (cuando se desobstruye la arteria renal), si bien garantiza un aporte de oxígeno para restablecer el metabolismo normal, también actúa como un factor desencadenante del daño celular, ya que genera una producción masiva de ERO [22].

Datos nacionales

A nivel nacional, el primer trasplante renal se realizó en el año 1969 de un donante cadavérico y en 1981 se elaboró un programa de trasplante renal cadavérico.

El registro Uruguayo de trasplante renal en diciembre 2008 publicó que se realizaron 1357 trasplantes durante ese año (últimos datos publicados) [23] (Figuras 2 y 3).

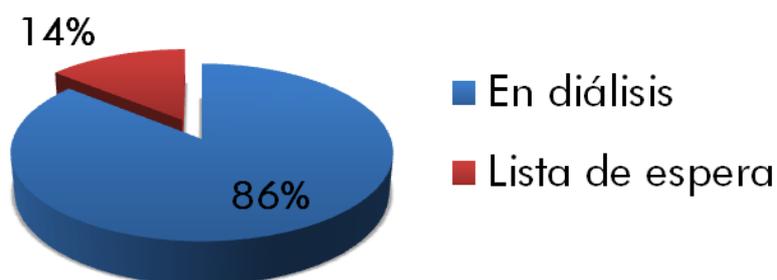


Figura 2: Pacientes en diálisis (2621) y en lista de espera para diálisis o trasplante (418) 2008. Tomado de [23].

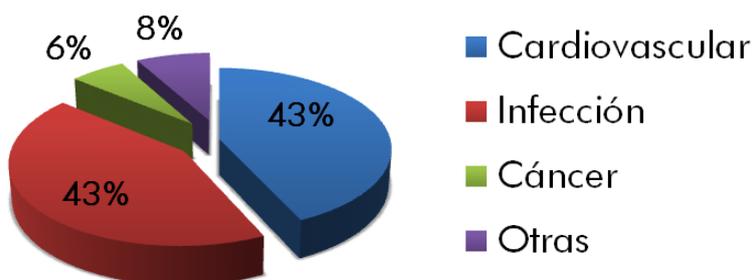


Figura 3: Causas de muerte en los pacientes trasplantados, 2008. Tomado de [23].

Analizando las cifras mostradas, se reafirma el interés por el estudio de mecanismos implicados en el rechazo de trasplante renal, debido a que es tan prevalente a nivel nacional; y las implicancias del aumento del estrés oxidativo en este evento.

OBJETIVOS GENERAL

Actualizar la información acerca del rol de la MnSOD en el rechazo renal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el papel de la MnSOD en la fisiología normal.
- Comprender el proceso de nitración que causa inactivación de la MnSOD.
- Entender los procesos moleculares de la MnSOD implicados en diferentes patologías en general y en particular en el rechazo crónico renal.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica. La estrategia para la misma fue por palabras claves en ScienceDirect (portal Tombó) y Google académico: *MnSOD and nitration; nitration and renal allograft rejection; renal allograft rejection and MnSOD.*

Para la selección de artículos usamos los siguientes criterios:

- de inclusión: relación de la MnSOD y el rechazo renal crónico, estructura y función de la MnSOD.
- de exclusión: no disponible gratuitamente
- de eliminación: relación de la MnSOD con otras enfermedades, comparación de la MnSOD con otros antioxidantes.

Además se concurrió a la cátedra de Nefrología para obtener información acerca de la fisiopatología del rechazo renal, estudios solicitados y epidemiología de trasplante renal en nuestro país.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se realiza una síntesis de resultados de los artículos seleccionados con los criterios ya detallados en la metodología. Abarcando temas desde la estructura y función normal de la MnSOD, evolución del conocimiento respecto al tema y perspectivas de su aplicación a futuro.

Estructura y función.

En el estudio “*The structural biochemistry of the superoxide dismutases*” de J.J. Perry *et al* [24] se estudió las generalidades bioquímicas de las distintas SODs lo que reveló la importancia de estas enzimas en la protección a las células frente al daño mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS), por lo que tal vez una alteración en la estructura podría conducir a diferentes enfermedades.

Además, en trabajos que estudiaron la estructura tridimensional de la MnSOD, se determinó la importancia de la Y34 en el desarrollo de la función normal de ésta [10].

En 1998 [1] se reportó que la inactivación de MnSOD era debido a la nitración exclusiva de Y34 por el peroxinitrito, residuo cercano al manganeso del sitio activo. Hasta ese entonces se trataba del primer ejemplo de inactivación mediada por peroxinitrito. La misma se evidenció mediante un aumento en la masa molecular medida por espectrofotometría de masa, compatible con la nitración. A su vez se notó que dicha inactivación era dependiente de la concentración de MnSOD y peroxinitrito. En el trabajo de Mac Millan-Crow “*Tyrosine Modifications and Inactivation of Active Site Manganese Superoxide Dismutase Mutant (Y34F) by Peroxynitrite*” [25] se demostró que los residuos de tirosina (45 y 193) que son susceptibles a la nitración por el ONOO^- se encuentran entre uno o dos residuos de glutamato en su estructura cristalina, pero la Y34 no tiene residuos de glutamato proximales y aun así es nitrada. Se supuso que el átomo de manganeso cargado positivamente puede alterar el estado de ionización de la Y34, de tal modo que sea más susceptible al ataque electrófilo o que simplemente se atraiga al ONOO^- cargado negativamente al sitio activo.

En 1999 Mac Millan-Crow *et al* [25] crearon una MnSOD mutante con un residuo de fenilalanina en lugar de la Y34 (Y34F) y sometieron a MnSOD original y a MnSOD mutante a peroxinitrito. Ambas enzimas se inactivaron aunque la mutante no tan eficazmente.

Luego se comprobó, en otro estudio [10], que la nitración de la Y34 es la causa de la inactivación de la enzima porque el grupo fenol se desprotona, cambiando a 3-nitrotirosina 34 (NY34) generando una repulsión electroestática y estérica, que se refleja en un aumento dramático del perfil de energía libre para el acceso del sustrato (superóxido) al centro metálico, lo que resulta en un canal bloqueado y por lo tanto la inactivación de la enzima. También se confirmó, en el estudio de Quint P *et al* en el año 2006 [11], al comparar la estructura cristalina de la MnSOD nitrada y no nitrada y no observar cambios conformacionales significativos, que la inhibición de la catálisis puede atribuirse a un efecto estérico de NY34. Esta impide el acceso del sustrato al sitio activo así como la alteración de la red de los enlaces de hidrógeno en el túnel de acceso, que impiden la transferencia de protones en la catálisis [5].

Se consideró relevante el estudio de Moreno *et al* [10] que analizó y definió el proceso molecular de la nitración de la MnSOD para lograr comprender la estructura normal de la proteína así como la inactivación mediante la nitración de un solo aminoácido (Y34) en contraste con estudios citados anteriormente.

Se estudió cuál o cuáles eran los agentes que podían nitrar e inactivar a MnSOD [26] y se vio que en presencia de ONOO^- la enzima efectivamente se inactivaba, pero en presencia de O_2^- u $\cdot\text{NO}$ por separado la proteína sigue enzimáticamente activa y no se registraron niveles de 3- nitrotirosina. En contraste cuando se la expuso a los productos de la hemólisis del ONOO^- (hidroxilo y dióxido de nitrógeno, OH y NO_2 respectivamente), la MnSOD no se inactivó, aunque sí se encontró 3NT, y es porque NO_2 es agente de nitración de los residuos Y45 y Y193 {Demicheli, 2007 #349}. Por lo que en este estudio también se demostró que el aminoácido crítico es la Y34, y es la nitración de este único residuo la causa de inactivación de MnSOD.

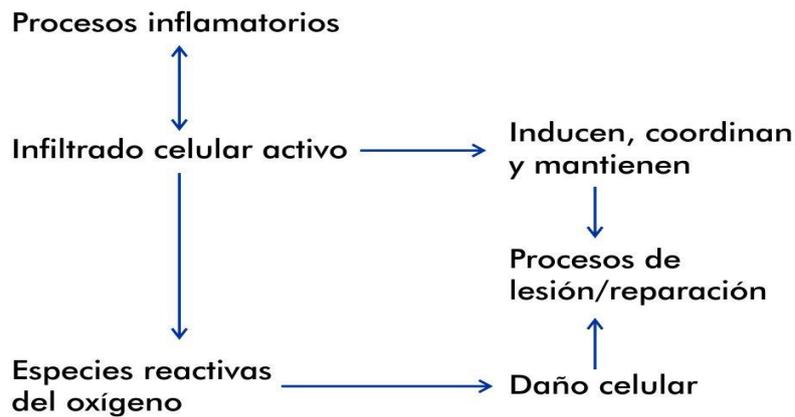
La esencialidad de la enzima MnSOD quedó evidenciada por el estudio {Huang, 1995 #379} "*Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant*

mice lacking manganese superoxide dismutase”, donde mediante un modelo de ratones MnSOD knockout, observaron que los animales no sobrevivieron más de 21 días (promedio de vida media es de 2 a 3 años). Es esencial que la proteína esté activa para poder desarrollar correctamente su función y como se vio más arriba, el concepto de cómo se inactiva ha ido cambiando. Al saber que la enzima es esencial, fue lógico suponer que su déficit o inactivación puede causar enfermedad y esto fue revisado por Souza *et al* [9] mediante una búsqueda bibliográfica se planteó discernir si la nitración de MnSOD es una alteración que causa estados patológicos o es un marcador presente en estos estados. Este trabajo describió que la 3- nitrotirosina es una modificación postraduccional presente en muchas condiciones patológicas aguda y crónica, siendo un proceso selectivo que ocurre en algunas proteínas y en determinados residuos de tirosina de esas proteínas. La acumulación de datos sugirió una fuerte correlación entre niveles elevados de 3NT y los mecanismos implicados en el desarrollo de las distintas enfermedades [9].

El interés de este grupo de estudio es estudiar la relación entre inactivación de MnSOD y el rechazo crónico de aloinjertos renales.

Inactivación de MnSOD y rechazo crónico de aloinjertos renales

En el estudio histopatológico de tejido de aloinjertos con rechazo crónico se observó oclusión vascular progresiva, glomerulopatía progresiva y fibrosis tubular que lleva a atrofia tubular, estas características denotan insuficiencia renal [8]. Son múltiples los factores que llevan a la insuficiencia renal y el posterior rechazo [23] [21]; entre ellos los inmunológicos y los inflamatorios. Con el avance de la inmunología se logró mejorar mucho la compatibilidad donante receptor. Por lo tanto, se centró la atención en el componente inflamatorio (Esquema 2).



Esquema 2: Daños por proceso inflamatorio.

En el rechazo renal crónico se han visto: altos niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ y $\cdot\text{NO}$ [27] y alteración de procesos normales de reparación frente a daño por ROS [5]. En el estudio de Mac Millan-Crow [5] se halló en aloinjertos renales con rechazo crónico de tres pacientes a los que se les hizo nefrectomía, que los niveles de nitración de tirosina eran altos y la actividad enzimática de la MnSOD estaba dramáticamente disminuida. Se comparó con un riñón no patológico de paciente no apto para trasplante, y se vieron niveles bajos pero detectables de 3-nitrotirosina y la actividad de MnSOD no disminuida.

Al exponer MnSOD recombinante a diferentes concentraciones de ONOO^- se vio que la inactivación es dosis dependiente, por lo que quizá el hallazgo de MnSOD nitrada en condiciones basales normales es a causa de la presencia de niveles de ONOO^- basales [5].

Se ha visto que la concentración de MnSOD aumenta en respuesta frente al estrés oxidativo y aun así se vio muy disminuida su actividad enzimática. Este hallazgo paradójico es debido al aumento de ONOO^- , que también aumenta con el estrés oxidativo, ya que se comprobó por inmunotinción el incremento en estado nitrado de la MnSOD [5].

El ONOO^- nitra e inactiva numerosas enzimas mitocondriales como aconitasa, Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (NADH deshidrogenasa), succinato-deshidrogenasa entre otras, causando daño. Además, el incremento

de la concentración de ONOO^- puede inducir pérdida de reservas energéticas, peroxidación lipídica, ruptura del ADN y apoptosis [5] lo que coincidió con lo observado en ratones MnSOD knockout [28].

El consumo y/o la inactivación de los antioxidantes naturales conducen al agotamiento de los mismos. Esto expone a las células a daños irreversibles, observándose a nivel histológico atrofia tubular que podría ser el factor determinante más importante en la pérdida de función renal y consecuente rechazo crónico del trasplante [5].

En el estudio de Mac Millan-Crow *et al* año 2001[2] se creó un modelo de ratón con nefropatía crónica del aloinjerto y un modelo de ratón sin nefropatía crónica del aloinjerto. Se los siguió postrasplante desde la semana 2 a la 52 con función renal (albuminuria de 24 horas) y con estudios histológicos (para medir niveles de nitrotirosina y actividad enzimática). Se observó nitración de estructuras glomerulares y tubulares desde la semana 2 postrasplante, sin embargo se observó disfunción renal progresiva desde la semana 16 a la 52 en los ratones con nefropatía crónica del aloinjerto. Por otro lado, en los ratones sin nefropatía, los niveles de nitrotirosina se mantuvieron bajos y la función renal no se vio alterada. O sea, la nitración de la MnSOD precede a la insuficiencia renal y la disfunción mitocondrial es un evento temprano que lleva a la disfunción renal progresiva. Suponiendo que estos datos se pudieran extrapolar a humanos, sería interesante ver a futuro posibles maneras de evitar dichos eventos, ya sea con métodos preoperatorios, operatorios o postoperatorios.

Además, en este estudio, se observó la nitración del citocromo C a partir de la semana 4, por lo que se planteó que al inactivarse la MnSOD se acumularía las ROS lo que favorece la nitración y/o inactivación de otros objetivos biológicos [2].

Hasta este punto nos hemos referido a estudios que tratan de la inhibición de la MnSOD en casos de rechazo de trasplante renal o su simulación. En 2011, más allá de trasplante renal, se quiso saber qué consecuencias tiene la inhibición de la MnSOD renal en el trastorno renal. Para ello se crearon ratones

mutados, los cuales eran 50% o 100% deficientes en dicha enzima, específicamente a nivel renal, y se compararon con ratones control [29]. En los ratones mutados se vio una predominante disminución en la actividad de la MnSOD en la médula renal, no siendo así en otros órganos. En comparación a los ratones control, no mostraron cambios en la supervivencia, pero sí en el peso corporal, los ratones mutados eran más pequeños (figura 4). Si bien la disminución o pérdida de MnSOD indujo cambios morfológicos y procesos inflamatorios en los túbulos distales, no hubo alteraciones evidentes en la función renal. Esto dejó en evidencia, que el hecho de que los ratones mutados fueran más pequeños, no era debido a que la alteración renal causara alteraciones en el sistema musculo-esquelético. Sin embargo en ambos grupos de ratones, mutado y control, hubo altos niveles de nitración, es decir que la inhibición de la MnSOD hace que aumente la producción de oxidantes en el riñón. Es importante destacar dos cosas: la primera, es que los efectos de la inhibición de la MnSOD fueron dependientes de su nivel de modificación genética en la nitración de tirosina (figura 5); la segunda, la expresión de Cu-ZnSOD no se vio alterada, lo que reflejaría que hay una regulación independiente de estas dos formas intracelulares de SOD [29].

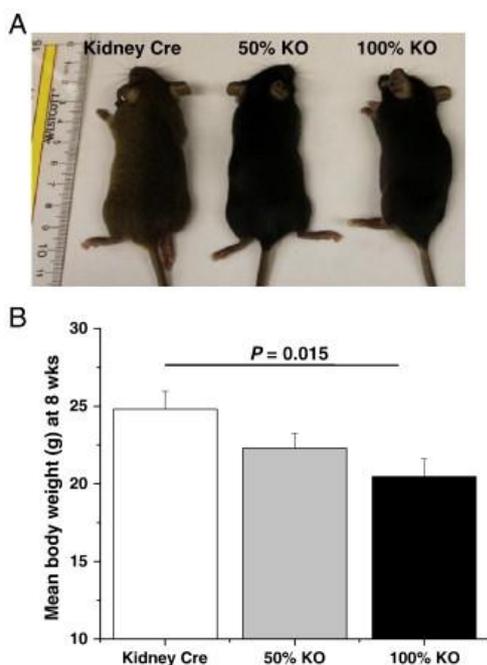


Figura 4: A) Los ratones que tenían la MnSOD renal específica 100% mutada eran evidentemente más pequeños que el resto. B) Cuando se comparó la media de peso corporal de los ratones a las 8 semanas de edad, se vio que en los ratones que tenía la MnSOD renal específica mutada, el peso era significativamente menor. **Tomado de [29].**

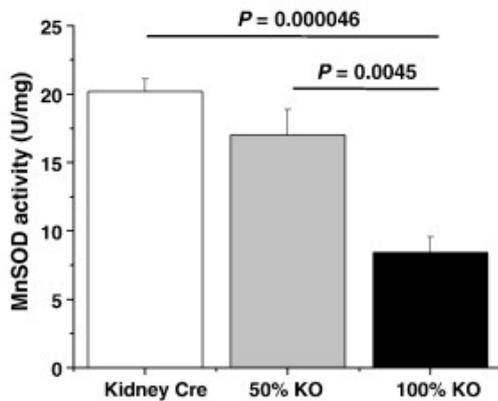


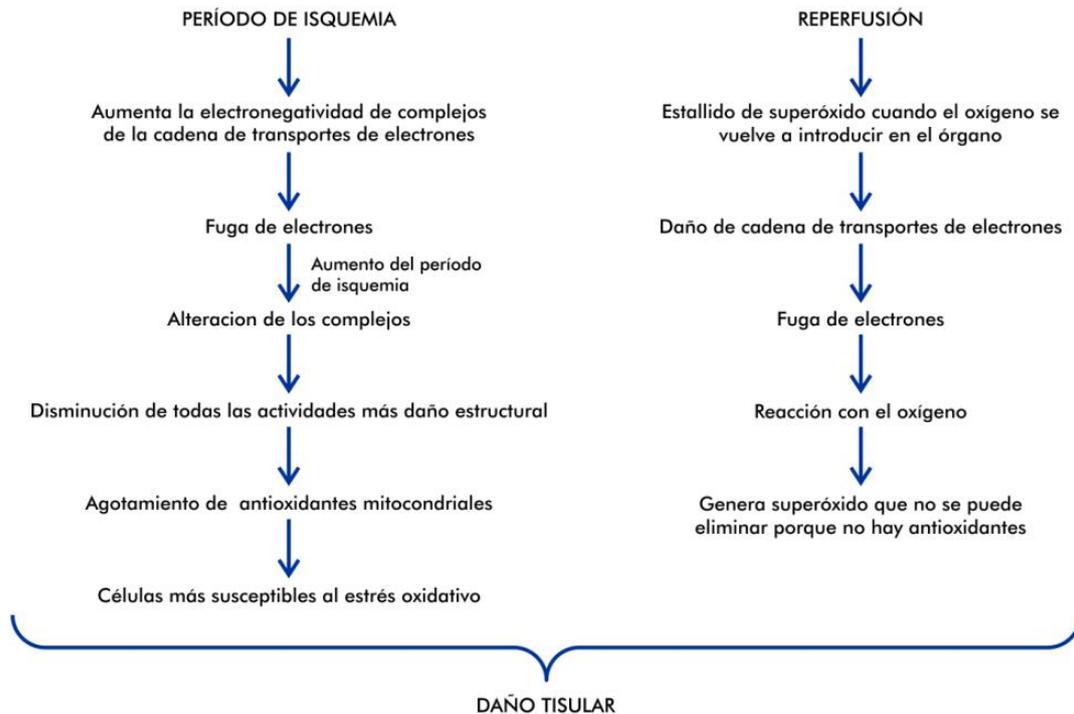
Figura 5: La expresión y actividad de MnSOD es menor para aquellos ratones que tienen mutada dicha enzima. Hay una evidente correlación según cual sea la carga de mutación genética. **Tomado de[29].**

MnSOD en isquemia/reperfusión (I/R)

En el estudio realizado por Cruthirds *et al* [30] se demostró que a los 30 minutos de isquemia había nitración de tirosina en la MnSOD, que a las 3 horas de la reperfusión comenzó a aumentar. Además, a las 3 horas de isquemia aumentó significativamente la creatinina sérica y se perdió la integridad de la membrana mitocondrial pero no se observó apoptosis.

Por otro lado, la cantidad de MnSOD era normal pero la actividad enzimática estaba disminuida en ratones que sufrieron I/R. En contraposición, en los animales con I/R simulada, tanto la cantidad como la actividad se mantuvieron normales.

Concomitantemente, la pérdida de la actividad de la MnSOD generó aumento de oxidantes dentro de la mitocondria, por lo que se evidenció que hay otras proteínas involucradas en el proceso de nitración como fue la citocromo C. La MnSOD nitrada precede a la nitración del citocromo C, por lo que se especuló que la lesión mitocondrial es progresiva [30] (Esquema 3).



Esquema 3: Daño tisular dado por el proceso de isquemia/ reperusión.

En otro estudio [31] realizó un experimento con ratas en el cual se asignaron tres grupos, al primero no se lo sometió a I/R ni se le administró MnSOD recombinante humana (grupo SH), al segundo se lo sometió al I/R pero no se le suministró MnSOD recombinante humana (grupo C), al tercer y último grupo se le aplicó el proceso de I/R y se le administró MnSOD recombinante humana intraperitoneal (grupo IP). Se halló que con la administración de MnSOD recombinante humana intraperitoneal: mejora la función renal (figura 6), disminuye necrosis tubular aguda (figura 7) y la tinción de nitrotirosina fue negativa en túbulos renales. Se vio que las lesiones del tejido mejoraron en el grupo IP vs el grupo C.

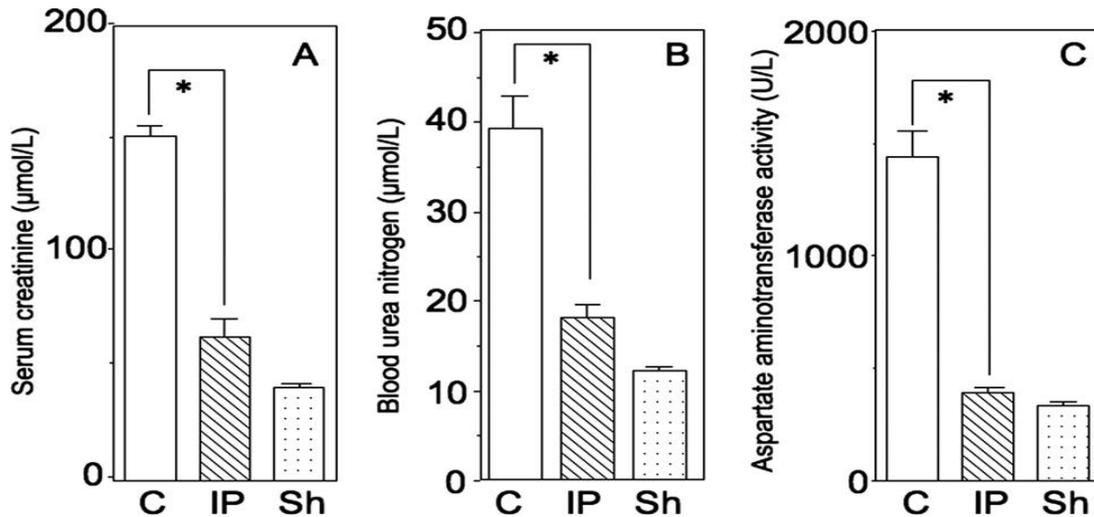


Figura 6: Cambios en los marcadores de la función renal durante la I/R. A: Concentración de creatinina sérica. B: concentración de nitrógeno ureico en sangre. C: actividad de la aspartato aminotransferasa **Tomado de [31].**

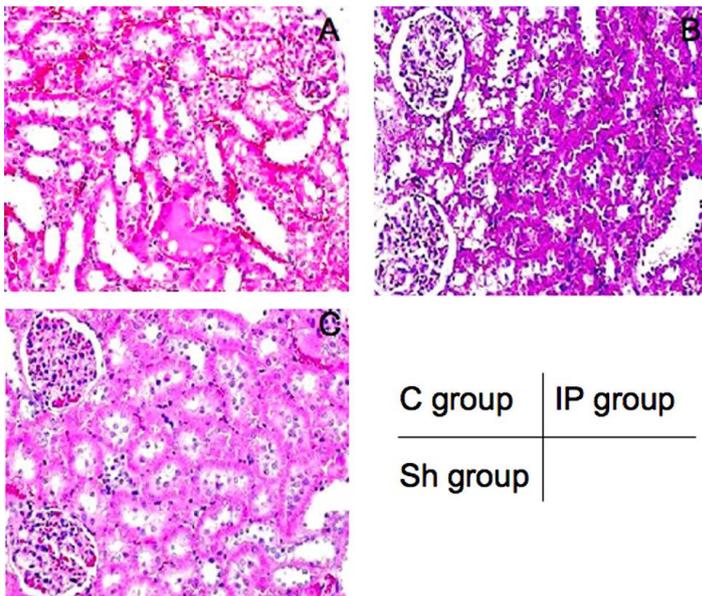


Figura 7: tinción Hematoxilina- Eosina de secciones renales durante la I/R. **Tomado de [31].**

La lesión tisular como consecuencia de la I/R es similar a lo observado en el rechazo agudo y la nefropatía crónica del aloinjerto [31].

Suponemos por lo demostrado anteriormente, que es beneficioso la administración de MnSOD recombinante humana para disminuir los daños tisulares en el rechazo crónico del aloinjerto.

Se han estudiado los efectos protectores de distintos agentes como antioxidantes que podrían administrarse para complementar las defensas celulares contra el estrés oxidativo. Es el caso del flavinoide conocido como vitamina P [32], se probó que reducía el daño si se lo administraba previamente en un modelo de I/R inducido en riñón de rata. En este estudio se utilizó la actividad enzimática de la MnSOD como marcador del nivel de daño renal como consecuencia de la I/R, lo que demostró la aceptación de su papel protagónico en el desarrollo de estados patológicos.

En el trasplante renal, así como en todos los trasplantes, el órgano a trasplantar sufre un proceso de I/R, por el cual suponemos que se generan lesiones por el aumento de ROS que dañan la membrana y estructuras celulares. Este aumento de ROS produce consumo de los antioxidantes endógenos naturales, que podría causar su agotamiento y como consecuencia la muerte celular. Por esto creemos importante el estudio de posibles agentes exógenos que actúen como antioxidantes complementarios para evitar y proteger contra este tipo de daño.

Ahora bien, actualmente no se dan antioxidantes exógenos antes del trasplante ni después; sin embargo el rechazo y la disfunción no se observan siempre como episodios agudos, como sería de esperar si siempre fallara o se sobrepasara los mecanismos antioxidantes propios. Así que de alguna manera la célula puede sobreponerse a la injuria por I/R del trasplante y prolongarse la viabilidad y funcionalidad del órgano. Creemos que tal vez la injuria por I/R del trasplante no es tan prolongada como en los modelos animales de experimentación, y por esto la célula puede sobreponerse a una lesión de menor entidad. También como se vio en el estudio de Mac Millan Crow *et al* [33], la mitocondria tiene gran poder de reparación. En este estudio se creó un modelo celular *in vitro* para estudiar la expresión de MnSOD y su actividad. Mediante ARN de interferencia (ARNi) disminuyeron la expresión de la enzima en células de riñón de rata normales. Se vio que a las 24-48 horas del inicio de la incubación con el ARNi, los niveles de MnSOD disminuyeron drásticamente así como su actividad enzimática. Como era de esperar los niveles de $O_2^{\cdot -}$ aumentaron y este reaccionó con el $\cdot NO$ para formar el $ONOO^{\cdot -}$ y así aumentó

el nivel de nitrotirosina concomitantemente. A las 72 horas post incubación con ARNi se observó que los niveles de MnSOD y oxidantes volvían a valores normales. Se plantearon como posible justificación, la inmensa reparación mitocondrial debido a la inducción transitoria de la biogénesis mitocondrial, mediada por el descenso de la concentración de MnSOD y aumento del ONOO⁻ (figura 8).

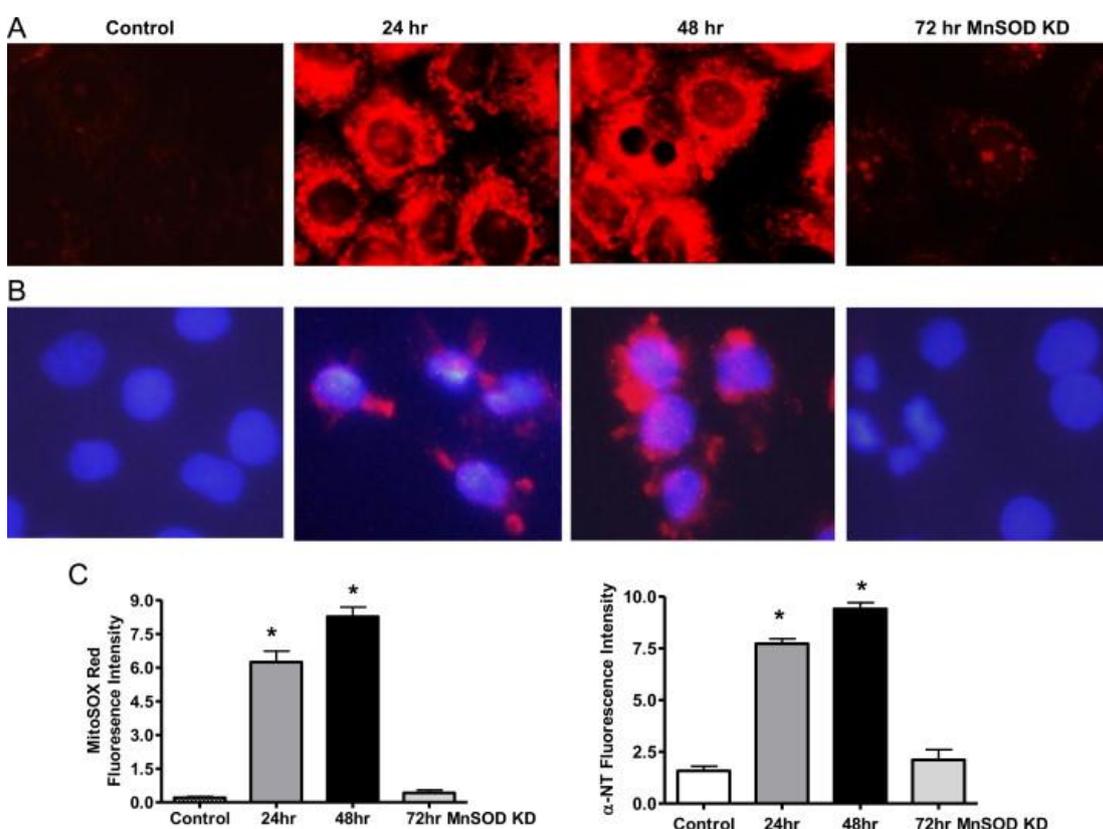


Figura 8: (A) muestra imágenes representativas del aumento de fluorescencia. (B) Nitrotirosina también se incrementó significativamente después de la caída de MnSOD tanto a las 24 y 48 h después de la transfección, pero regresó a la línea de base después de 72 h. (C) Gráficos que muestran la cuantificación sobre la base de la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias). * $p < 0,05$ en comparación con las células control. Tomado de [33].

Se planteó que el peroxinitrito tendría entonces efectos nocivos y beneficiosos sobre la biogénesis mitocondrial que es dependiente de la dosis: a pequeñas dosis la estimula y a grandes dosis la reduce significativamente [33]. Este modelo *in vitro* no representa los escenarios más complejos que ocurren en las distintas patologías, aun así sus resultados fueron importantes. Este doble papel del ONOO⁻ puede tener importantes implicancias en la enfermedad pero debe seguir estudiándose ya que se supone que *in vivo* la recuperación de la inactivación de MnSOD no es tan rápida como lo que sucedió *in vitro*, sino que puede mantenerse por semanas [33].

Perspectivas y aplicaciones a futuro de conocimientos actuales con respecto al rechazo renal

La importancia de conocer los mecanismos fisiopatológicos en la inducción y progresión del daño renal tras el trasplante de aloinjerto, es que posiblemente se pueda encontrar una manera de disminuir o evitar dicho desenlace.

Se sabe que la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es uno de los mediadores en la inducción y progresión del rechazo renal agudo [34]. Quizás la inhibición selectiva de iNOS disminuya el daño histológico y prolongue la supervivencia del injerto a largo plazo. Se ha visto que la administración de bloqueadores selectivos de iNOS a aloinjertos reducía la caída de la función renal. También se obtuvo efectos beneficiosos sobre la morfología tubulointersticial [34].

Las técnicas de conservación de órganos y el proceso de isquemia/reperfusión, generan cambios patológicos que hacen que haya un aumento excesivo de oxidantes que “vencen” a los antioxidantes endógenos (como ya se ha mencionado anteriormente). Esto llevará más tarde a la disfunción mitocondrial y daño tisular.

Posible perspectiva farmacológica: En 2007 se puso en evidencia los resultados de experimentos que se realizaron para ver el potencial terapéutico de un antioxidante a base de metaloporfirina [35]. Los objetivos fueron tratar de demostrar si era posible disminuir la inhibición de MnSOD y la lesión renal en un modelo de I/R en ratones experimentales. Las variables que se tuvieron en cuenta fueron las siguientes: función renal (valorada mediante el aclaramiento

de creatinina), capacidad de la porfirina de inhibir la MnSOD y evidencia de daño tisular. Los cambios evidentemente positivos se vieron cuando la porfirina se administró 24 horas antes de la nefrectomía. En dicho grupo de ratones hubo notables mejoras en la función renal, un aumento en la actividad de MnSOD (no así en los niveles) y el daño tisular verdaderamente disminuido. La explicación para esto fue que tras el periodo I/R hubo un intenso cambio en el patrón y la función de los complejos respiratorios, principalmente el complejo V (ATP sintasa). El tratamiento con porfirina 24 horas previas a la nefrectomía, restauró los niveles de ATP de forma significativa. Dicho aumento al parecer protegió a la mitocondria de la excesiva producción de oxidantes tras el periodo I/R. A su vez, en dicho experimento se pudo probar que la porfirina no se comportó como un mimético de MnSOD y que el bloqueo en la producción de oxidantes lo hizo de manera indirecta.

CONCLUSIONES

Se realizó una actualización de la información referente a MnSOD y sus modificaciones oxidativas, enfocándonos en detalle en lo que ocurre en el rechazo del trasplante renal.

Este trabajo permitió comprender en profundidad bases moleculares de una patología puntual, y acercarse más al detalle de uno de los tantos procesos involucrado en el rechazo renal.

Se observó la enorme importancia de la enzima y su nitración en dicha patología, y surge la idea de su utilización a nivel nacional en dos aspectos: uno de ellos como diagnóstico precoz de rechazo renal agudo, y por otro lado como forma de tratamiento al poder administrar la MnSOD pre-trasplante, y de esta forma disminuir los daños causados por el proceso de reperfusión.

AGRADECIMIENTOS

- Primero que todo queremos agradecerle a nuestra tutora Verónica Demicheli, por guiarnos y apoyarnos en este trabajo y proceso de aprendizaje.
- Agradecemos a la Dr Cecilia Baccino residente de Nefrología, por habernos dedicado tiempo y contestarnos algunas dudas.
- Agradecemos a Cynthia Pereira (amiga de Jessica Bonilla), por socorrernos cuando teníamos problemas técnicos.
- Finalmente, agradecemos a Dahiana y Romina (ambas, integrantes de dicho grupo de trabajo), por compartir sus respectivos hogares y convertirlos en “oficinas de trabajo”.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yamakura, F., et al., *Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine*. J Biol Chem, 1998. 273(23): p. 14085-9.
2. MacMillan-Crow, L.A., et al., *Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. 31(12): p. 1603-1608.
3. Hume, D.M., Merrill, J.P, Miller, B.J, Thorn, G.M, *Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases*. Clin. Invest, 1955. 34: p. 327-330.
4. Murray, J.E., Merrill, J.P, Harrison, J.H, *Kidney Transplantation Between Seven Pairs of Identical Twins*. Ann. Surg., 1958. 148: p. 343-359.
5. MacMillan-Crow, L.A., Joseph S. Beckman, *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. Medical sciences, 1996. 93: p. 11853-11858.
6. Cecka, J.M., *Transplant. Proc.* 1991. 23: p. 1263-1264.
7. Almond, P.S., Matas, Gillingham, Dunn, D.L, Payne, W.D, Gores, Gruessner, L.R, Najarian, J.S, *Transplantation*. 1993. 55: p. 752-756.
8. Porter, K.A., *in Pathology of the Kidney, ed. Hiptinstall*. 1992: p. 1799-1933.
9. Souza, J.M., G. Peluffo, and R. Radi, *Protein tyrosine nitration—Functional alteration or just a biomarker?* Free Radical Biology and Medicine, 2008. 45(4): p. 357-366.
10. Moreno, D.M., et al., *Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010. 507(2): p. 304-309.
11. P. Quint, R.R., R. Mikulski, R. McKenna, D.N. Silverman, *Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: Mechanism of inactivation*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. 40: p. 453-458.
12. J. L. Hsu, Y.H., C. Tu, D. O. Connor, H. S. Nick, D. N. Silverman, *J. Biol. Chem.* 1996. 271: p. 17687- 17691.
13. C. Bull, E.C.N., T. Yoshida, J.A. Fee, J. Am, *Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase*. Chem. Soc, 1991. 113: p. 4069-4076.
14. Castro, L., et al., *Mitochondrial protein tyrosine nitration*. Free radical research, 2011. 45(1): p. 37-52.
15. G.E.O, B., H.E, Parge, M.J, Hickey, W.F. Beyer, R.A, Hallewell, J.A. Tainer, *The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles*. Cell, 1992. 71: p. 107-118.
16. I. Ayala, J.J.P.P., J. Szsczepanski, J.A. Tainer, M.T. Vala, H.S. Nick, D.N. Silverman, *Hydrogen Bonding in Human Manganese Superoxide Dismutase Containing 3-Fluorotyrosine*. Biophys. J, 2005. 89: p. 4171-4179.

17. Centro de Nefrología, H.d.C., Facultad de Medicina, UDELAR, *Injuria renal aguda, guía clínica*. 2013.
18. Centro de Nefrología, H.d.C., Facultad de Medicina, UDELAR, *Enfermedad renal crónica, guía clínica*. 2013.
19. J.C. Ruiz San Millán, G.F.y.E.R., *Aspectos especiales de manejo del paciente con insuficiencia renal. Tratamientos sustitutivos, tipos e indicaciones. Trasplante renal*. *Medicine*, 2007: p. 9(79):5087-5096.
20. L. Guirado¹, E.V., M. Clèries², J. M. Díaz¹, C. Facundo¹ y R. García-Maset¹ y Registro de enfermos renales de Cataluña (RMRC)², *¿Porqué el trasplante renal de donante vivo da mejores resultados que el trasplante renal de donante cadavérico?* *Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología*, 2008: p. 28 (2) 159-167.
21. Farreras, R., *Medicina Interna*. I, II.
22. Bernabeu, D.A.S., *El estrés oxidativo en la fisiopatología del trasplante renal*. *Revista cubana investigación biomédica*, 1999. 18(3): p. 225-230.
23. renal, C.d.r.d.t., *Desarrollo de Trasplante Renal en Uruguay*. 2008.
24. Perry, J.J.P., et al., *The structural biochemistry of the superoxide dismutases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2009. 1804(2): p. 245-262.
25. MacMillan-Crow, L.A. and J.A. Thompson, *Tyrosine Modifications and Inactivation of Active Site Manganese Superoxide Dismutase Mutant (Y34F) by Peroxynitrite*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999. 366(1): p. 82-88.
26. Demicheli, V.n., et al., *Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007. 42(9): p. 1359-1368.
27. Ischiropoulos, B., *Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase*. *arch. Biochem. Biophys*, 1992. 298: p. 446-451.
28. Huang, C., Melov, Noble, Ursell, Olson, Yoshimura, Berger, Chan, *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase*. *Nat. Genet.*, 1995. 11: p. 376-381.
29. Parajuli, N., et al., *Generation and characterization of a novel kidney-specific manganese superoxide dismutase knockout mouse*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. 51(2): p. 406-416.
30. Cruthirds, D.L., et al., *Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003. 412(1): p. 27-33.
31. Rahman, N.A., et al., *Role of Peroxynitrite and Recombinant Human Manganese Superoxide Dismutase in Reducing Ischemia-Reperfusion Renal Tissue Injury*. *Transplantation Proceedings*, 2009. 41(9): p. 3603-3610.
32. Korkmaz, A. and D.r. Kolankaya, *Protective Effect of Rutin on the Ischemia/Reperfusion Induced Damage in Rat Kidney*. *Journal of Surgical Research*, 2009. 164(2): p. 309-315.
33. MacMillan-Crow, L.A., et al., *Peroxynitrite induced mitochondrial biogenesis following MnSOD knockdown in normal rat kidney (NRK) cells*. 2014. p. 348-357.

34. Vos, I.H.C., et al., *Inhibition of inducible nitric oxide synthase improves graft function and reduces tubulointerstitial injury in renal allograft rejection*. European Journal of Pharmacology, 2000. 391(1&2): p. 31-38.
35. Saba, H., et al., *Manganese porphyrin reduces renal injury and mitochondrial damage during ischemia/reperfusion*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. 42(10): p. 1571-1578.