

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE RATAS CON TRASPLANTE

RENAL Y DE CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO (HEPG₂) BAJO EL

TRATAMIENTO CON DISTINTOS INMUNOSUPRESORES.

Lausada Natalia Raquel

Directora de Tesis

Prof. Dra. Tacconi de Gómez Dumm Irma Nelva

Codirector de Tesis

Prof. Dr. Catalá Angel

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS (INIBIOLP)-

LABORATORIO-PROGRAMA DE TRASPLANTES DE ORGANOS Y TEJIDOS.

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, UNLP.

Miembros del Jurado:

Prof. Dra. Aveldaño Marta

Prof. Dr. Portiansky Enrique

Prof. Dr. Palacios Alejandro

TESIS

2006

Dedicatoria:

A Gustavo, Guadalupe y Candelita. A mis padres y padres políticos.

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, particularmente al Dr. Rodolfo Brenner y la Dra. María J. Tacconi de Alaniz, por haberme brindado los medios necesarios para la realización de este trabajo y mi actividad como becaria de la UNLP. A todo el personal del INIBIOLP que de una u otra manera me brindaron su apoyo. Al Dr. Carlos Marra por su enseñanza en el manejo de los cultivos celulares. Y además, por su calidez y buen humor en los momentos más difíciles de los experimentos.

A mis Directores, Dra. Nelva Tacconi de Gómez Dumm por haberme brindado la posibilidad de iniciarme en la investigación científica, por su dirección, amistad y comprensión permanente y al Dr. Ángel Catalá por su estimable supervisión científica.

Al Laboratorio-Programa de Trasplante de Órganos y Tejidos de la Facultad de Ciencias Médicas y todo su personal. A su Director, Dr. Clemente Raimondi quien generosamente me dio la oportunidad de mi formación en microcirugía experimental en el exterior, y me brindó la posibilidad de trabajar con un equipo destacado de profesionales y técnicos. Particularmente a Javier Cordone por la asistencia técnica en las cirugías experimentales, y a mis compañeros: Dr. Roberto Tanús, Claudio y Gonzalo.

Al Dr. Eduardo Dreizzen por su amistad, colaboración y asesoramiento permanente en el área de la informática médica y de la metodología de la investigación científica desde mis inicios como becaria de la UNLP.

A la dedicación y paciencia en la enseñanza de las técnicas microquirúrgicas de los Dres. Robert Zhong, Yioying Wang y Neil Parry del Laboratorio Experimental de la Universidad de Western Ontario, Canadá.

A los patólogos de la Cátedra “B” de Cirugía Dres. Héctor Del Zotto y Gisela Camihort y a la Lic. Georgina Luna por haber colaborado en los estudios histopatológicos de los trasplantes experimentales.

Deseo también expresar mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Veterinarias por haberme formado durante tantos años de estudio y particularmente a mis compañeros de la Cátedra de Medicina Operatoria los Dres Durante, Baschar, Acosta y Montesinos. A mi queridísimo Dr. Pablo Videla quien me inició en el fascinante mundo de la cirugía veterinaria y aunque no este físicamente entre nosotros su cariño y ejemplo me acompañan permanentemente.

Me resta agradecer a mis compañeras de todos los días del INIBIOLP Graciela, Eva y Cristina.

Particularmente deseo expresar mi reconocimiento a la Tec. Ppal. Cristina Pallanza de Stringa porque las palabras nunca alcanzan cuando se quiere agradecer el cariño y la dedicación optimista que brindan las personas que nos rodean, por su excelente asistencia técnica en la metodología bioquímica, y sobre todas las cosas por sus cualidades humanas.

Publicaciones parciales del trabajo de la tesis:

Lausada NR, Tacconi de Gómez Dumm IN, Camihort G, Raimondi JC. Lipid Pattern in Kidney Transplanted Rats Without Immunosuppressive Therapy. *Journal of Transplantation Proceedings* 2002; 34: 380-383.

Lausada NR, Tacconi de Gómez Dumm IN, Camihort G, Luna G, Del Zotto H, Raimondi J.C. Cambios histopatológicos renales bajo el efecto inmunosupresor de la monoterapia con sirolimus y su influencia sobre el perfil lipídico en ratas con alo-trasplante. XVII CONGRESO DE TRASPLANTE DE AMERICA LATINA Y EL CARIBE. 20 al 23 de mayo de 2003. Cusco, Perú.

Lausada NR, Gómez Dumm INT de, Raimondi JC. Modificaciones del perfil lipídico de ratas trasplantadas y de células en cultivo por el tratamiento con drogas inmunosupresoras. XI JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE AUGM. I ENCUENTRO DE JOVENES INVESTIGADORES DE LA UNLP. 11 de Setiembre de 2003, La Plata, Buenos Aires.

Lausada N., Camihort G., Luna G., Raimondi J. y Del Zotto H. “Estudio morfológico comparativo del efecto inmunosupresor del sirolimus y la ciclosporina-metilprednisona” H. XIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE NEFROLOGIA E HIPERTENSION. 21 al 24 de abril 2004. Punta del Este, Uruguay.

Lausada NR, Gómez Dumm INT. de, Luna G, Camihort G, Raimondi JC. Effect of different immunosuppressive therapies on the lipid pattern in kidney-transplanted rats. *Transplant International* 2005; 18: 524-31.

Lausada N, Raimondi JC, Luna G, Camihort G, Tacconi de Gómez Dumm INT. Impact of ciclosporine, sirolimus and methylprednisone on the lipid pattern in kidney-transplanted rats. *WORLD TRANSPLANT CONGRESS* 2006; July, 22-27th. *Journal of Transplantation. American (Supl):*902-3.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. RESEÑA HISTÓRICA DEL TRASPLANTE RENAL Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA -----	4
I.1.A. Reseña histórica-----	4
I.1.B. Estado actual del tema-----	7
I.2. MODELOS EXPERIMENTALES MICROQUIRÚRGICOS DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS -----	9
I.3. RECHAZO AGUDO Y CRÓNICO -----	13
I.3.A. Bases bioquímicas e histológicas del rechazo-----	15
I.3.B. Rol de los leucotrienos-----	17
I.3.C. Rol de los metabolitos del ácido araquidónico-----	19
I.4. DROGAS INMUNOSUPRESORAS -----	22
I.5. METABOLISMO LIPÍDICO -----	26
I.5.A. Colesterol, triglicéridos y lipoproteínas-----	26
I.5.B. Ácidos grasos en mamíferos. Desaturasas y su regulación-----	28
I.6 DISLIPEMIAS EN EL PACIENTE CON TRASPLANTE RENAL -----	33
I.6.A. Mecanismo del daño cardiovascular y mesangial-----	35
I.7 OBJETIVOS E HIPÓTESIS -----	38
I.7.A. Objetivos-----	38

I.7.B. Hipótesis-----	40
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	
II.1. MATERIALES UTILIZADOS-----	41
II.1.A. Drogas radioactivas-----	41
II.1.B. Drogas no-radioactivas-----	41
II.2. METODOLOGÍA-----	44
II.2.A. Animales-----	44
II.2.B. Técnica quirúrgica:	
modelo microquirúrgico de trasplante renal en la rata-----	45
II.2.B.a. Material quirúrgico-----	45
II.2.B.b. Preparación preoperatoria y anestesia-----	45
II.2.B.c. Donante-----	45
II.2.B.d. Preservación-----	46
II.2.B.e. Receptor-----	46
II.2.B.f. Postoperatorio-----	49
II.2.C. Diseño experimental-----	51
II.2.D. Obtención del material de estudio-----	54
II.2.D.a. Aislamiento de microsomas renales, hepáticos y testiculares-----	54
II.2.D.b. Obtención de membranas de eritrocitos-----	54

II.2.D.c. Obtención de plasma-----	55
II.2.D.d. Dosaje de proteínas-----	55
II.2.E. Metodología del análisis de lípidos-----	55
II.2.E.a. Extracción de lípidos totales de las fracciones subcelulares y del plasma -----	55
II.2.E.b. Trigliceridemia-----	58
II.2.E.c. Colesterolemia-----	58
II.2.F. Funcionalidad renal. Determinaciones séricas: urea y creatinina-----	59
II.2.F.a. Uremia-----	59
II.2.F.b. Creatininemia-----	59
II.2.G. Estudio morfológico del parénquima renal-----	59
II.2.G.a. Aspecto macroscópico de los riñones trasplantados y propios-----	59
II.2.G.b. Estudio histopatológico del parénquima renal-----	59
II.2.H. Metodología específica utilizada para el cultivo de células-----	60
II.2.H.a. Cultivo de células tumorales HepG ₂ en monocapa-----	60
II.2.H.b. Recuento de células y estimación de la viabilidad-----	62
II.2.H.c. Efecto de la ciclosporina A y el sirolimus sobre la composición de ácidos grasos celulares de células HepG ₂ -----	65

II.2.H.d. Estudio de la incorporación y desaturación (transformación) de distintos ácidos grasos con marcación radioactiva por la línea tumoral HepG ₂ bajo el tratamiento con ciclosporina A y sirolimus-----	65
II.2.H.e. Cálculo de la incorporación total de los sustratos exógenos radioactivos-----	69
II.2.H.f. Medición de ácidos grasos por radiocromatografía gas-líquido---	69
II.2.H.g. Determinación de proteína celular total-----	71
II. 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO-----	71
CAPÍTULO III. RESULTADOS	
III.1. QUIRÚRGICOS-----	72
III.1.A. Supervivencia de las ratas trasplantadas-----	72
III.2. EVALUACION MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL RENAL-----	74
III.2.A. Aspecto macroscópico de los riñones trasplantados y propios sometidos al tratamiento inmunosupresor-----	74
III.2.B. Estudio morfológico del efecto inmunosupresor de la monoterapia con ciclosporina A, sirolimus y metilprednisona. Grado de rechazo del “graft”-----	77
III.2.C. Determinaciones séricas: urea y creatinina-----	81
III.3. ANÁLISIS DEL PERFIL LIPÍDICO DE RATAS TRASPLANTADAS TRATADAS CON LOS DISTINTOS INMUNOSUPRESORES-----	81
III.3.A. Lípidos séricos: colesterol, lipoproteínas y triglicéridos-----	81

III.3.B. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas renales, hepáticos y testiculares-----	83
III.3.C. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de plasma y membrana de eritrocitos-----	90
III.3.C.a. Índice Omega-3-----	93
III.3.D. Lípidos totales de microsomas renales-----	94
III.4. EFECTO DE LAS DROGAS INMUNOSUPRESORAS: CICLOSPORINA A Y SIROLIMUS SOBRE LA COMPOSICIÓN, INCORPORACIÓN Y METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CELULAS HEPG ₂ -----	95
III.4.A. Efecto de la ciclosporina A y el sirolimus sobre la composición de ácidos grasos celulares del hepatoma humano-----	95
III.4.B. Estudio de la incorporación y desaturación (transformación) de distintos ácidos grasos con marcación radioactiva por la línea tumoral HepG ₂ bajo el tratamiento con ciclosporina A y sirolimus-----	98
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN-----	105
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES-----	119
BIBLIOGRAFÍA-----	122

ABREVIATURAS

AG ácidos grasos

AMPc adenosinmonofosfato cíclico; del inglés “*cyclic AMP*”

Col colesterol

CMH complejo mayor de histocompatibilidad

CsA ciclosporina A

GLC cromatografía gas líquido; del inglés: “*gas liquid chromatography*”

HDL lipoproteína de alta densidad; del inglés: “*high density lipoprotein*”

IDL lipoproteínas de intermedia densidad; del inglés: “*intermedian density lipoprotein*”

IL interleuquina

LDL lipoproteína de baja densidad: “*low density lipoprotein*”

LP lipoproteínas

LT leucotrienos

MP metilprednisona

MUFAs ácidos grasos monoinsaturados; del inglés: “*monounsaturated fatty acids*”

PG prostaglandinas

PL fosfolípidos; del inglés: “*phospholipids*”

PUFAs ácidos grasos polinosaturados; del inglés: “*polyunsaturated fatty acids*”

P/O postoperatorio

Qm quilomicrones

RP riñón propio

RT riñón trasplantado

SFAs ácidos grasos saturados; del inglés: “*saturated fatty acids*”

SRL sirolimus

TG triglicéridos

TLC cromatografía en capa fina; del inglés *“thin-layer- chromatography”*

VCI vena cava inferior

VLDL lipoproteína de muy baja densidad; del inglés *“very low density lipoprotein”*

Estudio del metabolismo lipídico de ratas con trasplante renal y de células de hepatoma humano (HepG₂) bajo el tratamiento con distintos inmunosupresores.

Palabras claves: trasplante renal, ratas, inmunosupresión, lípidos.

Los desórdenes lipídicos en pacientes con trasplante renal juegan un rol importante en la patogénesis del rechazo del órgano implantado y en la aterosclerosis generalizada. La influencia de las terapias inmunosupresoras sobre el perfil lipídico no es aun totalmente conocida, ya que se utilizan esquemas de inmunosupresión combinando drogas inmunosupresoras. El *objetivo* del presente trabajo fue evaluar el efecto que producen distintos inmunosupresores individualmente, sobre el metabolismo lipídico en ratas sometidas a trasplante renal y en células de hepatoma humano. *Materiales y métodos:* se evaluaron: ratas receptoras de trasplante renal tratadas con ciclosporina A, sirolimus y metilprednisona, ratas trasplantadas sin tratar y ratas control. Se evaluó, además, la composición de ácidos grasos celulares totales y la incorporación y metabolismo de ácidos grasos marcados en una línea de células de hepatoma humano tratada con ciclosporina A y sirolimus. Los *resultados* revelaron que los inmunosupresores utilizados incrementan los lípidos séricos. Respecto a los lípidos de membrana se observó un patrón de deficiencia de ácidos grasos polinosaturados con un incremento de los ácidos grasos saturados analizados por cromatografía-gas líquido, más acentuado en el lote tratado con esteroides. En los lípidos totales, analizados por cromatografía en capa fina, se observó un descenso de los fosfolípidos a expensas del incremento del colesterol, estudiado en las membranas microsomales renales. Del análisis in-vitro se desprende que las drogas ciclosporina A y sirolimus provocan un descenso de la actividad $\Delta 9$ desaturante con un incremento de la

actividad de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas. *Conclusiones:* El conocimiento del impacto que sobre los lípidos ejercen los nuevos inmunosupresores, podría ser utilizado para establecer estrategias en el manejo del paciente trasplantado, a fin de prevenir el infarto agudo de miocardio, principal causa de fallecimiento de estos pacientes y la pérdida de riñones trasplantados por aterosclerosis generalizada de los mismos.

Lipid metabolism study of kidney-transplanted rats and human-hepatoma cells (HepG₂) treated with different immunosuppression dugs.

Key words: kidney transplantation, rats, immunosuppression, lipids.

Lipid disorders in patients after successful kidney transplantation play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and chronic renal allograft rejection. How each individual immunosuppressive drug influences the lipid pattern, is still unclear, because of the combined therapy implemented in transplanted patients. The *objective* of this work was to evaluate the influence of different immunosuppressive drugs on the lipid metabolism in kidney-transplanted rats and in human-hepatoma cells. *Material and methods.* We evaluated kidney recipients rats treated with cyclosporine A, sirolimus and methylprednisone, non-treated transplanted and control rats. We also evaluated the cellular fatty acid composition and the incorporation and metabolism of radiolabeled fatty acids in a human-hepatoma cell line treated with cyclosporine A and sirolimus. *Results* revealed that immunosuppressive drugs provoked serum lipid enhancement. Concerning to membrane lipids we observed a polyunsaturated fatty acid deficiency with an increment of saturated fatty acids analyzed by gas-liquid-chromatography, remarkable in recipient rats treated with steroids. Total lipids analyzed by thin-layer-chromatography,

showed a decrease in phospholipids compensated by an increase in cholesterol values of kidney microsomal membranes. From the in-vitro studies it was concluded that cyclosporine A and sirolimus caused a decrease in $\Delta 9$ desaturase activity with an increment of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturase activities. In *conclusion*, the knowledge of the impact that, on the lipid profile produce the new immunosuppressant therapies, might be used to establish strategies in the management of the transplanted patient, in order to prevent heart attack events, principal reason of death of these patients and the loss of transplanted kidneys for generalized atherosclerosis of the graft.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. RESEÑA HISTÓRICA DEL TRASPLANTE RENAL Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

I.1.A. Reseña histórica

Durante los últimos años el mundo ha presenciado grandes avances en la tecnología de los trasplantes de órganos, definido por Norrie como: “el procedimiento médico mediante el cual se extraen tejidos de un individuo y se reimplantan en otro, con el propósito de que el tejido trasplantado realice en su nueva localización la misma función que realizaba previamente” (1).

El reemplazo de un órgano enfermo por otro sano constituye la forma más espectacular de la medicina reparadora y precisamente por ello ha sido un sueño largamente anhelado



por la humanidad el cual tiene su representación en ciertas formas de la mitología. Jacobo de la Vorágina en su “Leyenda Dorada”, escrita en el s. XIII, refiere que los Santos Cosme y Damián, mártires y patronos de los cirujanos, constituyen la primera imagen del homotrasplante (se realiza entre individuos diferentes de la misma especie) de donante cadavérico con finalidad terapéutica. Los Santos amputaron la pierna de un gladiador etíope muerto para

reemplazar la pierna gangrenosa del diácono Justiniano, sacristán de la basílica de Roma.

Fuente de la ilustración: Pedro Bepругuete 1450-1504. Óleo sobre tabla, San Cosme y San Damián.

Museo de la Real Colegiata Covarrubias, Burgos, España.

La historia de los trasplantes de órganos, haciendo alusión particularmente al trasplante renal, comenzó a principios del s. XX. En 1902 Ullmann's (2), cirujano vienés, comunicó el primer autotrasplante (se realizan dentro de un mismo individuo) de riñón de un perro a los vasos de su nuca empleando tubos protésicos (3). Sin embargo, allí comenzó un largo y difícil proceso. La primera revolución se produce cuando Alexis Carrel en 1901 describe las suturas vasculares resolviendo así uno de los principales problemas técnicos del implante y revascularización del órgano. (4). Carrell recibió el premio Nobel en 1912 por su investigación sobre las anastomosis vasculares (5). En 1933, el armenio Voronoi realizó el primer trasplante renal a una joven en estado de coma urémico, a causa de una intoxicación, utilizando como donante a un hombre que había sufrido un accidente fatal. Los riñones trasplantados en la joven produjeron inmediatamente orina pero, presentaron un importante deterioro de su función durante las primeras 48 horas. Voronoi comunicó en 1949 haber repetido la experiencia con otros cinco trasplantes renales con donante cadavérico sin obtener resultados favorables (6). En 1950 se realizó en Chicago, EE.UU, el primer trasplante de riñón con implante intraabdominal a una mujer que padecía de poliquistosis renal con función precaria a la que se le extrajo uno de sus riñones poliquísticos y se le sustituyó por el riñón sano de un donante cadavérico. A los dos meses se comprobó que el riñón aún mantenía su función normal (7). El primer trasplante con éxito absoluto, se realizó en 1954 entre gemelos univitelinos, sin necesidad de utilizar terapias inmunosupresoras (8). Paralelamente se detectó un problema que sería motivo de investigación durante décadas, que es el rechazo del organismo hacia el órgano injertado, ya que el sistema inmunológico del receptor reconocía a ese órgano como un cuerpo extraño, ajeno a su sistema, y por lo tanto generaba anticuerpos de defensa para

rechazarlo. Los médicos comenzaron a investigar el grado de identidad entre el donante y el receptor: la "histocompatibilidad". Esto condujo al desarrollo de drogas que permitían evitar el rechazo del órgano. En aquella época, comenzaron las pruebas de diversas combinaciones de drogas inmunosupresoras. Ya a mediados de siglo, el saber y la tecnología médica, estaban en condiciones de poder controlar el proceso inmunológico del rechazo agudo y derribar esta segunda gran barrera para la realización del trasplante como opción terapéutica a la enfermedad renal en estadio terminal. Durante la década de los '50 se avanzó en la investigación inmunológica, siendo en 1958, en Boston, donde se realizó un trasplante utilizando drogas inmunosupresoras (3). Se logró una importante mejoría de la función inicial del implante no obstante, la paciente murió a causa de las infecciones provocadas por la inmunosupresión. En 1963, Guy Alexandre en Lovaina (Bruselas) realizó el primer trasplante renal utilizando como donante un cadáver en situación de "muerte cerebral" sin paro cardíaco (donante cadavérico con corazón latente) implementando drogas inmunosupresoras. El receptor falleció un mes más tarde por septicemia. En 1964 realizó el segundo trasplante renal de estas características y tras la utilización más apropiada de la inmunosupresión el riñón funcionó durante más de seis años (9). Es a partir de la década de los '80 cuando se produce la gran explosión de trasplantes en el mundo, incrementándose notablemente la cantidad de esta práctica quirúrgica cada año. El hito histórico que marcara este período fue en 1978 la aparición de la ciclosporina A (CsA), utilizada como inmunosupresor, abriendo una etapa que significó el comienzo de trasplantes exitosos, que posibilitó salvar y mejorar la calidad de vida a muchas personas en el mundo entero (10). Tras la utilización masiva de esta terapéutica de órganos de reemplazo otra problemática que aparece es la escasez de los

mismos que ha llevado a despertar el interés por utilizar órganos artificiales o xenotrasplantes (heterotrasplante: trasplantes entre especies diferentes al ser humano). El primer xenotrasplante renal exitoso fue llevado a cabo por Reemtsma en 1963 (11). En un sólo receptor lograron una supervivencia de nueve meses. Sin embargo, hasta la actualidad no se ha logrado reproducir este resultado a pesar de los intentos de superar las barreras del rechazo hiperagudo y la septicemia. Aún no es posible discutir acerca de resultados a largo plazo en el xenotrasplante (12). Mientras los órganos artificiales o los xenotrasplantes no superen la etapa experimental y lleguen a ser aplicables en la clínica diaria, las únicas posibilidades existentes en este sentido involucran como potenciales donantes a una persona viva emparentada con el receptor (donante vivo) o a un cadáver (donante cadavérico).

Podemos entonces dividir la historia de los trasplantes de órganos en distintas fases marcadas por hitos que hicieron evolucionar favorablemente esta terapéutica:

1. Desarrollo de técnicas quirúrgicas con la introducción de las suturas vasculares.
2. Concepto de complejo de histocompatibilidad, del rechazo y de las terapias inmosupresoras.
3. Desafío actual, obtener supervivencia prolongada con calidad de vida en el receptor optimizando las terapias inmunosupresoras.

I.1.B. Estado actual del tema

El desarrollo de técnicas quirúrgicas apropiadas, los regímenes de inmunosupresión y la terapéutica dirigida a abolir los factores de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular postrasplante, han contribuido a prolongar la supervivencia tanto del injerto como del

paciente (13). La literatura científica describe que se ha logrado extender la supervivencia alcanzada de 55% en las décadas del 70 y 80 hasta el 86% en la actualidad (14). Sin embargo, el infarto agudo de miocardio, producido por arteriosclerosis coronaria, es la principal causa de muerte de los pacientes con trasplante renal funcional y además, la nefropatía crónica del aloinjerto que produce pérdida del mismo se manifiesta con arteriosclerosis generalizada que afecta a todo el árbol vascular del implante (13). Los factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad cardiovascular en estos pacientes incluyen todos aquellos que afectan a la población en general. No obstante, existe un factor predisponente propio de los pacientes trasplantados que es la toxicidad de las terapias inmunosupresoras. Como resultado, la enfermedad cardiovascular es cuatro veces más prevalente en los pacientes con trasplante renal que en la población general (15). Frecuentemente, ellos presentan hipertensión, hiperlipidemia y diabetes (16, 17). La hipertensión se presenta por encima del 85% de los receptores de trasplante renal (18). Además de ser un reconocido factor de riesgo de enfermedad cardiovascular es un factor de riesgo para el riñón trasplantado (19). La hiperlipidemia también tiene implicancias en el desarrollo de la nefropatía del aloinjerto (20). El riesgo de sufrir de infarto agudo de miocardio en pacientes con hipercolesterolemia se exagera en los pacientes con trasplante renal (16). La alta prevalencia de padecer hipertensión e hiperlipidemia en pacientes con trasplante renal se encuentra asociada a numerosos factores incluyendo la toxicidad de las drogas inmunosupresoras, las cuales en mayor o menor grado producen además de otros efectos colaterales trastornos en el metabolismo lipídico, demostrado tanto en ensayos clínicos como en modelos experimentales de trasplante (20-22). Esto motiva la combinación de las drogas inmunosupresoras en distintos regímenes de

inmunosupresión con el objetivo de disminuir las dosis utilizadas y así la toxicidad de las mismas y sus efectos colaterales. El objetivo actual de numerosos centros de investigación abocados a investigar la problemática del trasplante es el de optimizar los esquemas de inmunosupresión para mejorar la calidad de vida del paciente y prolongar la supervivencia tanto del injerto como del receptor. Los modelos experimentales de trasplante nos ofrecen una herramienta muy importante para lograr explicar ciertos interrogantes analizando muestras que son imposibles de obtener del paciente (22). Además, es posible complementar estos experimentos realizando pruebas en cultivos celulares para estudiar los fenómenos básicos involucrados (23-26).

I.2. MODELOS EXPERIMENTALES MICROQUIRÚRGICOS DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Como se mencionó anteriormente se ha avanzado notablemente en el trasplante renal clínico como única opción terapéutica en la enfermedad renal terminal. Estos adelantos se han llevado a cabo con los resultados obtenidos de estudios in-vitro, modelos animales de trasplantes y ensayos clínicos (27). Con los modelos animales de trasplantes es posible obtener resultados que pueden ser cuidadosamente extrapolados a la problemática del paciente trasplantado para dar respuesta a problemas médicos existentes. Ellos brindan la posibilidad de poder practicar ensayos exhaustivos arrojando datos imposibles de obtener en el ser humano. Los pequeños roedores de laboratorio se han constituido en el animal de elección como modelo de trasplante por el bajo costo de adquisición y mantenimiento, así como su resistencia microbiológica a procedimientos quirúrgicos mayores. Además, se encuentran genéticamente definidos y requieren de la intervención de un solo cirujano tanto para la cirugía del donante como la del receptor. Mientras que mamíferos de mayor

tamaño tales como gato, perro, cerdo y mono, son particularmente útiles en el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, presentan las desventajas de requerir los cuidados del manejo aséptico durante el acto quirúrgico; requieren más de un operador en las intervenciones quirúrgicas y sus cuidados postoperatorios demandan un elevado costo.

El uso de la rata de laboratorio en la investigación de los trasplantes viscerales conlleva aparejado el desarrollo técnico en el campo de la microcirugía experimental. Esta se define como aquella técnica quirúrgica que se lleva a cabo bajo un elemento de magnificación (lupa y microscopio quirúrgico). El éxito de la técnica depende del manejo atraumático de los tejidos y de una cuidadosa hemostasis. Tanto el tiempo de disección, perfusión, ablación como de implante exigen de un minucioso conocimiento de las relaciones viscerales, los pedículos vasculares y sus variaciones anatómicas. Asimismo, es indispensable un entrenamiento disciplinado para obtener resultados óptimos al implementar la técnica microquirúrgica y poder utilizar el modelo de trasplante escogido como método de ensayo (28).

Los modelos microquirúrgicos de trasplante en la rata, se clasifican de acuerdo a las cepas involucradas como donantes y receptores y al sitio de implante del órgano en el receptor:

De acuerdo a las cepas involucradas:

- Trasplante isogénico: son los que se realizan entre ratas de la misma cepa endocriadas (*inbred*). Las mismas se obtienen por cruzamientos entre ratas emparentadas. En la generación número 20 estas ratas poseen un grado de homocigosis de 98.4 % con un 1.6 % de heterocigosis residual que permanece aún con sucesivos cruzamientos entre hermanos (29).

Este modelo se utiliza en estudios donde se analizan fenómenos no inmunológicos de daño del injerto tales como la influencia de las soluciones de preservación sobre la calidad de los órganos (30), y los daños por isquemia y reperfusión del injerto (31).

- Trasplante alogénico: son los que se realizan entre ratas de la misma cepa exocriadas (*outbred*) o entre ratas de distinta cepa. Este modelo tiende al trasplante con alto grado de heterocigosis es decir ratas trasplantadas no emparentadas entre si (29).

En este modelo las ratas trasplantadas presentan grados variables de rechazo del órgano trasplantado que se asemeja a la población humana, Tabla 1. Es la combinación apropiada para estudiar los fenómenos inmunológicos de rechazo y las terapias inmunosupresoras. El grado de rechazo se establece por histopatología del tejido trasplantado (32)

- Trasplante xenogénico: son los que se realizan entre pequeños roedores de distinta especie. La especie mas utilizada es el hámster como donante y la rata como receptora (33), o la rata con una media de 30 gramos de peso como donante y el ratón adulto como receptor (34).

La Tabla 1 muestra en detalle las diferencias inmunológicas entre las combinaciones posibles de trasplante de órganos en la rata.

Tabla 1. Diferencias inmunológicas entre las cepas y stocks de ratas utilizadas en los modelos experimentales de trasplantes.

Grupo	MHC		No-MHC	Rechazo	Tipo de rechazo	Células efectoras
	Clase I	Clase II				
Singénico	Idéntico		Idéntico	Ninguno		
Alogénico	Idéntico		Diferente	Leve	HVG ^a	Linfocitos T
	Diferente	Idéntico	Idéntico	Moderado	HVG ^a	Linfocitos T
	Idéntico	Diferente	Idéntico	Severo	HVG ^a	Linfocitos T
	Diferente	Diferente	Idéntico	Severo	HVG ^a	Linfocitos T
Xenogénico	Diferente		Diferente	Severo	HVG ^a	Linfocitos T
					AR ^b	Linfocitos B
					HAR ^c	Linfocitos T

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

HVG^a (*host versus graft rejection*): Las células del receptor destruyen al tejido trasplantado debido a diferencias alélicas.

AR^b (*acute rejection*): Anticuerpos inducidos por la presencia del tejido extraño destruyen el injerto.

HAR^c (*hyperacute rejection*): Anticuerpos previamente formados provocan la destrucción del tejido trasplantado.

“Tabla 1: diferencias inmunológicas” extraída del Capítulo III, página 18. *Experimental Microsurgery as an Educational Concept and Scientific Basis for a Research Group: Principles of the Technical Development of Animal Models in Transplantation Research*. Thiede A., Timmermann W., Gassel HJ. En: *Organ Transplantation in Rats and Mice*. Timmermann W., Gassel HJ., Ulrichs K., Zhong R., Thiede A. (Eds.). Springer Verlag, Heilderberg, Berlin, 1998.

De acuerdo al sitio anatómico de implante del órgano en el receptor:

- Ortotópico: El órgano se implanta en su localización anatómica original.
- Heterotópico: el órgano se implanta en un sitio que difiere de su posición anatómica original.

I.3. RECHAZO AGUDO Y CRÓNICO

Una de las causas de fracaso del trasplante de órganos sólidos es por rechazo agudo o crónico del tejido implantado. En esta clasificación, a pesar de permanecer aún en vigencia, los factores del rechazo agudo y crónico se hallan relacionados entre si.

Factores que intervienen en el rechazo agudo

- Activación y proliferación de linfocitos CD4.
- Producción de diversas interleuquinas (IL), interferón- γ y factor de necrosis tisular- β (linfotóxina).
- Estimulación de la síntesis de anticuerpos.
- Reclutamiento y activación de macrófagos, linfocitos NK (*natural killer*) y linfocitos citotóxicos.
- Infiltración del parénquima renal con células inflamatorias, daño de las arteriolas y vénulas.
- Vasoconstricción con disminución de la velocidad de filtración glomerular y del flujo plasmático renal.

Factores que intervienen en el rechazo crónico: no-inmunológicos e inmunológicos:

No inmunológicos:

- Injuria por isquemia y reperfusión. La prolongación del tiempo de isquemia fría disminuye la supervivencia del injerto (32).
- Raza. La vida media del riñón implantado es inferior en los seres humanos de origen africano (mayor incompatibilidad antigénica) (35, 36).

- Los riñones subóptimos por provenir de donantes con criterios expandidos (mayores a 65 años) (37), o cuando existe un desbalance entre el número de nefronas viables del donante y la demanda del receptor (38).
- Calidad del donante “vivo” versus “cadavérico” (39).
- Hiperlipidemia. Es controvertido ubicarla dentro de los factores inmunológicos o no-inmunológicos. La hiperlipidemia aumenta la expresión de receptores para el factor de crecimiento plaquetario en el músculo liso y las células del mesangio. La proliferación de las células de la íntima mediaría el rechazo vascular. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas también aumentan el factor de crecimiento plaquetario. Además, las LDL aumentan la adherencia de los leucocitos y monocitos a las células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de adhesión vascular en el endotelio. Las LDL oxidadas también aumentan la expresión de CMH clase II (40, 41).

Inmunológicos:

- Humorales: En el engrosamiento de la íntima y en la necrosis fibrinoide se han detectado complejos antígeno-anticuerpo, complemento, inmunoglobulinas y anticuerpos antiendotelio (41).
- Celulares: Reclutamiento de macrófagos
- Citoquinas y factores de crecimiento. Las principales citoquinas asociadas con el rechazo crónico del injerto son el factor transformador de crecimiento- β , el factor de crecimiento epidermoide, el factor de crecimiento plaquetario y la IL 6 (42). El TGF- β está relacionado con la fibrosis progresiva y provoca acumulación de fibronectina y

tenascina (proteínas involucradas en la remodelación tisular). La inhibición de la angiotensina II disminuye la fibrosis intersticial mediada por el TGF- β . Los trasplantes con rechazo agudo o crónico poseen aumentados los niveles de receptores de PDGF en la pared vascular y en el mesangio. Esta citoquina es un mitógeno de las células del músculo liso y de las células mesangiales las cuales aumentan la síntesis de colágeno y elastina (43, 44).

- Los episodios previos de rechazo agudo, los cuales son en muchos casos silentes, influyen en la evolución hacia el rechazo crónico del aloinjerto. El tiempo de supervivencia del injerto es mayor en pacientes que no han padecido rechazo agudo (15).

Características histológicas del rechazo agudo.

- Presencia de células inflamatorias.

Características histo-fisiológicas del rechazo crónico.

- Fibrosis intersticial
- Atrofia tubular
- Engrosamiento de la pared vascular con hiperplasia de la íntima.
- Lento y severo deterioro de la función renal con desarrollo de proteinuria e hipertensión.

I.3.A. Bases bioquímicas e histológicas del rechazo.

La sensibilización y la evidencia histológica del rechazo renal se pone en evidencia experimentalmente a los 4 días del trasplante (45). La respuesta inmune a las células extrañas del riñón injertado se encuentra mediada por las células CD4. Los componentes celulares del rechazo son la activación y proliferación de los linfocitos T y el reclutamiento

y activación de macrófagos, linfocitos NK y linfocitos citotóxicos (46, 47). Se sabe que los linfocitos CD4 producen IL2, interferón- γ y factor de necrosis tisular- β . Estas linfoquinas producen activación de los linfocitos y los macrófagos, y la respuesta inmediata está dirigida a los antígenos de las células endoteliales vasculares del injerto. Por otra parte, los linfocitos CD4 liberan linfoquinas IL4, IL5 e IL6 que facilitan la producción de anticuerpos que dañan la pared endotelial del injerto llevándolo a la degeneración hialina (48).

El rechazo agudo del riñón trasplantado se caracteriza por una infiltración del parénquima renal con una población de diferentes células inflamatorias. Durante los episodios de rechazo el riñón injertado presenta una vasoconstricción con marcada reducción de la velocidad de filtración glomerular y del flujo plasmático renal. Generalmente el grado de incapacidad funcional es mayor del que cabría esperar teniendo en cuenta la histología del riñón. De aquí que algunos investigadores han postulado que las células inflamatorias que forman parte del infiltrado producen compuestos de acción local que atentan con la función hemodinámica renal. En este sentido se ha implicado a los metabolitos del ácido araquidónico, producidos por las vías de la ciclooxigenasa y la 5-lipooxigenasa, como mediadores importantes en la función renal durante el rechazo agudo. En la rata, durante el rechazo del injerto renal se encuentran aumentados los metabolitos derivados del ácido araquidónico, por la vía de la lipooxigenas (47, 49, 50).

En modelos animales de rechazo de trasplante renal se ha atribuido un rol funcional al tromboxano A₂, metabolito de la ciclooxigenasa (51, 52).

I.3.B. Rol de los leucotrienos

El metabolismo del ácido araquidónico por vía de la 5-lipooxigenasa produce 2 especies biológicamente activas: el leucotrieno (LT) B₄ y los péptidoleucotrienos LTC₄, LTD₄ y LTE₄. Aunque estos compuestos son producidos a partir del mismo metabolito, sus efectos biológicos son diferentes (53). Los efectos del LTB₄ tienden a la proinflamación y a la inmunomodulación mientras que los péptidoleucotrienos, conocidos como las sustancias de reacción lenta de la anafilaxia, poseen efectos que son primordialmente vasculares y hemodinámicos. Por ejemplo, el LTB₄ es un potente agente quimiotáctico que promueve la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. El LTB₄ también induce la agregación de las células polimorfonucleares, estimula la generación y liberación de intermediarios del oxígeno reactivo y aumenta la producción de citoquinas como la IL-1 de los monocitos, y la IL-2 y el interferón- γ producido por las células T. Cada una de estas citoquinas ha sido implicada en la patogénesis del rechazo agudo. Los péptidoleucotrienos LTC₄ y LTD₄ son potentes vasoconstrictores y pueden aumentar la permeabilidad de las vénulas poscapilares lo cual produce filtración de macromoléculas. Esto a su vez, podría indirectamente aumentar la adhesividad de células polimorfonucleares al endotelio estimulando la liberación de otros mediadores inflamatorios como el factor activador plaquetario. Además, estimulan la contracción de las células mesangiales glomerulares. En el riñón, la superproducción de estos compuestos podría disminuir la filtración glomerular reduciendo el flujo sanguíneo renal o el área disponible para la ultrafiltración. El LTC₄ y el LTD₄ estimulan la síntesis de tromboxano A₂ el que a su vez es vasoconstrictor y agregante plaquetario. La agregación de las plaquetas dentro de los vasos en el injerto contribuiría a la injuria microvascular a través

de la liberación de factores de crecimiento u otros mediadores vasoactivos, y por la formación de microtrombos. Teniendo en cuenta sus propiedades biológicas la producción de los leucotrienos durante el rechazo promovería la inflamación e injuria renal directa o indirectamente a través de diferentes mecanismos. En estudios previos se ha sugerido que durante el rechazo renal agudo del trasplante estaría aumentada la producción de leucotrienos. Ambos tipos de LT los LTB₄ y los peptidoleucotrienos estimulan la disfunción y provocan la injuria del trasplante. Si se administran por infusión aguda inhibidores de los receptores de los LT, se produce una rápida pero modesta mejoría de la función renal atribuida a la desaparición de la vasoconstricción. Si en cambio, se administra un inhibidor de la 5-lipooxigenasa, el efecto es sostenido y, en ratas, extiende la supervivencia del trasplante durante 6 días más que en los controles. Esto sugiere que paralelamente al efecto vasoconstrictor, los leucotrienos promueven la injuria y disfunción renal por otros mecanismos (49, 51, 52, 54).

En el riñón normal la expresión del complejo del antígeno de CMH clase II está fuertemente regulada y restringida a las células dendríticas, macrófagos, linfocitos T y B así como a las células endoteliales (55). Durante el rechazo, la expresión del complejo del antígeno CMH II está aumentada y se cree que este es el componente crítico que lleva a la destrucción del injerto. La inhibición de la 5-lipooxigenasa con MK 886 inhibe drásticamente la expresión del CMH clase II en el riñón injertado. La inhibición de los receptores de los péptidoleucotrienos no reduce la expresión de los CMH clase II, lo cual plantea interrogantes sobre la participación de los LTB₄ en este proceso (56).

En el rechazo agudo del injerto renal es frecuente observar inflamación y daño de las arteriolas y las vénulas. Esta lesión de la microvasculatura renal reduce el flujo sanguíneo

contribuyendo a la muerte del injerto. Más aún, la identificación de la injuria endotelial y la venulitis en las biopsias clínicas es considerado un aspecto característico del rechazo celular agudo. Estas lesiones se previenen tanto con la administración de inhibidores de la lipooxigenasa como con el bloqueo de los receptores de péptidoleucotrienos, lo cual confirmaría la participación de los LTB₄ en la patogénesis de estas anomalías vasculares (56).

I.3.C. Rol de los metabolitos del ácido araquidónico

Prostaciclina y tromboxanos

En el rechazo agudo del injerto renal juegan un papel importante el aumento del depósito de plaquetas y la reducción de la perfusión vascular. Estos trastornos podrían contribuir o, eventualmente, ser los responsables del infarto del injerto. Estos cambios podrían estar mediados por la prostaglandina (PG) I₂ y el tromboxano A₂ ya que ambos son altamente vasoactivos y probablemente participarían de la interacción pared vascular-plaquetas. La PGE₂ también es de interés en estos casos porque es una de la PG más abundantes en el riñón y podría ser un regulador endógeno de la respuesta inmune. La PGI₂ y el tromboxano A₂ son muy inestables y rápidamente se transformen en 6-ceto-PGI_{1α} y tromboxano B₂, respectivamente (57).

Si se compara un alotrasplante con un isotrasplante de riñón de rata se observa que al cabo de 7 días aumenta significativamente la síntesis de tromboxano B₂. Esto está de acuerdo con el aumento de tromboxano B₂ en la orina de pacientes con rechazo de trasplante renal. En incubaciones de corteza renal, si se compara con una rata normal, en el isotrasplante aumenta 5 veces la PGE₂, 7 veces la 6-ceto-PGI_{1α} y más de 100 veces el

tromboxano B₂. No se sabe con certeza el origen del tromboxano B₂. Una fuente posible puede ser las plaquetas ya que son ricas en tromboxano sintetasa y en los pacientes trasplantados se observa una reducción plaquetaria. Sin embargo, al microscopio electrónico se observan pocas plaquetas depositadas en la corteza renal. Otra posibilidad sería la producción de tromboxano B₂ por el infiltrado celular ya que se ha observado que, *in vitro*, los monocitos liberan tromboxano B₂. No obstante, el tromboxano B₂ aparece previamente a que se produzca el infiltrado de la pared celular, de modo que es controvertido el origen del aumento del tromboxano B₂. Por último cabe pensar que la síntesis del tromboxano se produciría en el parénquima renal y en la pared vascular. Los inhibidores de la síntesis de tromboxano aumentan el flujo renal en riñones hidronefróticos y durante el rechazo, de modo que el tromboxano A₂ debe tener un papel regulador del tono vascular renal. El aumento de la producción de tromboxano A₂ contribuiría a aumentar la resistencia vascular durante el rechazo celular agudo. Además, se sabe que el tromboxano A₂ aumenta la agregación plaquetaria de modo que favorecería el depósito de plaquetas (57). La infusión de inhibidores de enzimas responsables en la síntesis de tromboxanos, el OKY-046, administrado en un modelo de alotrasplante en la arteria renal de ratas, redujo significativamente la excreción de tromboxano B₂ (51).

El uso de antagonistas o inhibidores específicos de la síntesis de tromboxanos ofrece un campo interesante para evaluar las consecuencias del rechazo agudo del injerto renal (57, 58).

Prostaglandinas

La PGE₁ en dosis farmacológicas es un potente inhibidor de la mitogénesis de las células T así como de la citotoxicidad mediada por los linfocitos (45). La PGE₁ es un activador

de la adenilato ciclasa la que produce un aumento del adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) de los linfocitos y por esta vía inhibe la proliferación y la función citotóxica de las células T. De manera que la posibilidad de manipular los niveles intracelulares de AMPC ofrece potencialidad terapéutica en el trasplante clínico. Sin embargo, la terapéutica con PGE₁ es limitada porque posee una vida media biológica breve. En el trasplante renal en ratas se ha probado la acción terapéutica de un derivado de la PGE₁, la 15(S)-15-metil PGE₁ con prolongada vida media biológica. Este compuesto resultó eficaz en ratas con vasculitis por complejos inmunes y en ratones con autoinmunidad, y se ha comprobado que protege al injerto del daño inmunológico y anula la activación de los linfocitos T del huésped (45). Aun en el caso en que el tratamiento con este derivado de la PGE₁ se postergue por 4 días retiene su efectividad en el mantenimiento de la función del injerto (45).

Se ha demostrado que las PGE₁ inhiben la producción de IL 2 (45). Como las PGE₁ tienen receptores distintos de los glucocorticoides pueden producir un efecto aditivo o más aún, sinérgico sobre la inmunosupresión.

Estos conceptos nos indican la participación que poseen los metabolitos del ácido araquidónico en el rechazo del trasplante renal pero, cabe preguntarse cuál es el desencadenante de la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. Schlondorff y col.(59), sostienen que durante la hipoxia se produce un aumento de la actividad de la fosfolipasa A₂ y liberación de ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Por otra parte, la expresión del grupo II de fosfolipasa A₂ en las células del mesangio renal se desencadena por la exposición de las células a las citoquinas

inflamatorias como la IL 1 o el factor de necrosis tumoral- α y agentes que elevan los niveles de AMPc (60).

I.4 DROGAS INMUNOSUPRESORAS

El rechazo del órgano trasplantado se previene y/o se trata con drogas inmunosupresoras tales como la CsA, un undecapéptido cíclico, hidrofóbico, derivado de un metabolito fúngico capaz de atravesar la membrana celular y unirse a las proteínas intracitoplasmáticas de la familia de las ciclofilinas. Este complejo droga-receptor inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina, la que es necesaria para estimular la activación de los genes Ca^{2+} -dependientes que sintetizan IL 2, IL 3, IL 4, factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos, y el factor de necrosis tumoral- α . Esto trae como consecuencia la disminución de la señal para la activación y la expansión clonal de los linfocitos T citotóxicos, e interferón gamma (61). A pesar de que estos efectos son beneficiosos en el sentido que previenen el rechazo agudo y crónico, la CsA posee efectos adversos tales como nefrotoxicidad (62), hipertrofia gingival (63), hipertensión (64), hiperuricemia (65), hiperpotasemia (66) e hiperlipidemia (67-69). En seres humanos con trasplante renal los resultados de la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia son controvertidos. En general, se observa un aumento más acentuado del colesterol (Col) total del plasma y del que se localiza en la fracción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (68-73). Resultados similares fueron también demostrados en cultivos de células de hepatoma humano tratadas con CsA e hidrocortisona (23). Ambos inmunosupresores reducen la captación de las LDL que realizan normalmente los hepatocitos inhibiendo la expresión su receptor (23, 25). En pacientes con hiperlipidemia postrasplante se han

observado placas de ateroma en el espesor de las capa íntima y media de las carótidas (74). La arteriopatía postrasplante también se comprobó en autopsias a través del estudio de placas ateromatosas de arterias coronarias, las que poseían un alto contenido de C. En todos estos casos la terapia inmunosupresora consistió en CsA y metilprednisona (MP) (75). Varios autores han observado una correlación directa entre los niveles sanguíneos de CsA y el C total del plasma (76). No obstante, sabiendo que el esteroide per se es hipercolesterolémico, el efecto no puede atribuirse únicamente a la CsA cuando la terapia es combinada. En este sentido se ha observado una reducción de los niveles de Col si se suprimen los corticoides (69). Por otra parte, la monoterapia con CsA en pacientes con enfermedades no renales produce un aumento significativo de los niveles de Col y triglicéridos (TG) séricos (77, 78).

Con respecto a la hipertrigliceridemia, varios autores describen que disminuye al incorporar CsA al tratamiento, mientras que otros creen que la hipertrigliceridemia observada en los pacientes en la doble terapia descrita no parece estar relacionada con los inmunosupresores ya que no observaron correlación con los dosajes de estas hormonas y los niveles de triglicéridos plasmáticos (79, 80). Pese a lo controvertido del efecto hiperlipidémico producido por la terapia inmunosupresora, es evidente que los episodios de oclusión vascular son significativamente más comunes en los pacientes hiperlipidémicos que en los no hiperlipidémicos tratados con CsA y MP, confirmando la contribución de la hiperlipidemia en acelerar el proceso aterosclerótico de los receptores de trasplante renal (69). Este hecho destaca la importancia crucial que reviste continuar investigando metabolitos lipídicos como factores de riesgo cardiovascular durante la terapia inmunosupresora.

Se ha demostrado que la administración de CsA y MP a ratas normales produjo una disminución del crecimiento corporal. En los microsomas hepáticos se observó un marcado descenso de la actividad de las enzimas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas acompañado de aumento de los ácidos linoleico y dihomo- γ -linolénico y disminución del ácido araquidónico. Ninguna de las drogas alteró la glucemia ni la composición de AG (AG) de las membranas de eritrocitos (67). En ratas con trasplante renal tratadas con las drogas mencionadas anteriormente, se ha observado a corto plazo (siete días de tratamiento) un aumento del Col plasmático más marcado que en ratas trasplantadas no tratadas. Además, se ha citado un descenso del ácido araquidónico en el riñón trasplantado con un aumento de los AG de mayor longitud de cadena de las series n-6 y n-3, con cambios similares en otros órganos tales como testículo e hígado. Estas modificaciones se han acompañado de un incremento en la movilidad rotacional de los lípidos de membrana medida a través de la anisotropía de fluorescencia, que indica una disminución en la fluidez de las membranas (81).

La era de la CsA en el trasplante renal ha proporcionado excelentes beneficios prolongando la supervivencia renal del trasplante a corto plazo. No obstante, los resultados a largo plazo son inciertos, particularmente en lo que se refiere a la nefrotoxicidad y a la muerte por causa cardiovascular debida al aumento de la incidencia de la aterosclerosis. Aun con el riguroso mantenimiento de la concentración de CsA es difícil predecir y eliminar el rechazo, la nefrotoxicidad o los riesgos de enfermedades cardiovasculares (82). Situaciones similares se producen con el advenimiento de nuevos agentes inmunosupresores como el Sirolimus (SRL), antibiótico macrólido aislado del *Streptomyces bigroscopicus*, inicialmente utilizado por sus propiedades antimicótica y antitumoral (83, 84).

Su actividad inmunosupresora fue demostrada en modelos animales de enfermedades autoinmunes, modelos experimentales de trasplante así como en cultivos celulares (84-86). El SRL, droga liposoluble, atraviesa la membrana celular y se une al receptor citoplasmático inmunofilina. El complejo así formado mTOR inhibe la progresión del ciclo celular de fase G1 a S bloqueando e inhibiendo numerosas vías de señales de transducción en células T, así como de células no pertenecientes al sistema inmunológico (fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos, células de osteosarcoma y células de músculo liso de la pared vascular). Además, inhibe la proliferación celular estimulada por citoquinas y la maduración celular (87). In vitro, el SRL inhibe los linfocitos T activados cuando se agrega la droga al medio de cultivo hasta 12 horas después de haber comenzado la estimulación, mientras que la CsA es efectiva sólo si se adiciona al medio de cultivo sin haber transcurrido más de dos horas de la estimulación (88). En cuanto a su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados, disminuye la incidencia de rechazo agudo en un 7,5% respecto al 32% que ha sido obtenido con el uso de CsA (89). El SRL sería más efectivo que la CsA en prevenir el rechazo crónico ya que disminuye el engrosamiento de la íntima de los vasos que presentan animales trasplantados con rechazo agudo considerados como lesiones pre-ateroescleróticas. También se ha demostrado que una vez producida esta lesión puede ser revertida con el tratamiento con SRL. Además no posee nefrotoxicidad, ni produce hipertensión y sinergiza con otros inmunosupresores (86). Sin embargo, en los pacientes tratados con SRL se observa una disminución en el recuento de plaquetas y leucocitos ya que produce mielosupresión, este efecto es dosis dependiente y reversible con la suspensión de la droga. (90). Respecto a los lípidos séricos, produce un aumento importante en los niveles de Col y TG. La

hipercolesterolemia es más marcada en pacientes tratados con SRL que en los tratados con CsA (84, 87). El impacto de los efectos colaterales que presenta es aún desconocido al igual que los mecanismos que dan por resultado la hiperlipidemia.

I.5. METABOLISMO LIPIDICO

I.5.A. Colesterol, triglicéridos y lipoproteínas

Las (lipoproteínas) LP son macromoléculas complejas que circulan en plasma constituidas por Col, TG y un tipo especial de proteínas, las apolipoproteínas (Apo) que juegan un papel central en la regulación del metabolismo de los lípidos. Cada Apo, participa en el transporte de lípidos desde y hacia los tejidos. Las LP se clasifican de acuerdo a su coeficiente de sedimentación. En plasma se encuentran las LP de muy baja densidad (VLDL), de densidad intermedia (IDL), de baja densidad (LDL), de alta densidad (HDL), los quilomicrones (Qm) y otras de densidad variables, así como las denominadas “partículas residuales”. También pueden diferenciarse de acuerdo a su corrida electroforética en Qm, pre β -lipoproteínas y α -lipoproteínas.

El hepatocito sintetiza Col y TG, los ensambla con apoproteína B-100 (Apo β -100) y forma las VLDL, que son secretadas a la circulación con destino a los tejidos periféricos. Estos son los llamados lípidos endógenos.

El endotelio vascular posee adherido a su superficie la LPL, una enzima lipolítica que hidroliza los TG de las VLDL y de los Qm, estos últimos poseen Apo β -48, son sintetizados por el intestino y transportan TG provenientes de la dieta, es decir exógenos.

La lipoproteínlipasa es activada por la ApoC-II e inhibida por la ApoC-III que se encuentran dentro de las VLDL y de los Qm. Por acción de la lipoproteínlipasa se liberan a la circulación general glicerol y AG, que son utilizados por los tejidos periféricos como fuente de energía o almacenados por los adipocitos previa reesterificación.

Las LP resultantes del catabolismo de las VLDL mediado por la lipoproteínlipasa, son las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Las IDL, junto con los Qm remanentes, provenientes del catabolismo incompleto de los Qm intestinales, son un grupo de LP parcialmente metabolizadas llamadas LP remanentes, que se encuentran relativamente enriquecidas en Col, contienen ApoE entre sus constituyentes y son muy aterogénicas.

Las IDL así formadas, pueden recorrer dos caminos: ser captadas por el hígado a través del receptor de la ApoE o metabolizarse a través de la lipasa hepática, transformándose en LDL. De esta manera las VLDL se van modificando en la circulación y dan origen finalmente a las LDL.

Las partículas circulantes de LDL pueden ser captadas por los tejidos periféricos, que utilizan el Col que aquellas transportan para la síntesis de membrana plasmática y hormonas esteroides. Las LDL también pueden ser captadas por el hígado para su catabolismo final principalmente a través de un receptor localizado en la superficie celular, que reconoce la Apo β -100 presente en las LDL.

Bajo ciertas circunstancias las partículas de LDL pueden ser atrapadas y retenidas tanto por la pared vascular como por las células mesangiales, a través de un proceso similar. De esto surge que la determinación del Col transportado por las LDL (LDL-Col) resulta un índice de la propensión al fenómeno ateroesclerótico.

Las HDL son secretadas por el hígado y el intestino como partículas de HDL nacientes (pre- β -HDL). En presencia de Col acil transferasa (LCAT), toman Col tisular y se transforman en partículas de HDL₃ y luego en HDL₂. Las HDL₂ participan en el transporte reverso de Col (*cholesterol-ester transfer protein, CEPT*), que regula el intercambio de lípidos neutros como los ésteres de Col y TG entre las LP circulantes. Por esta vía, en condiciones normales, alrededor de un 10% del Col que contienen las HDL es intercambiado por TG de las VLDL y de las IDL. Si existe un elevado número de partículas VLDL circulantes, este intercambio ocurre en mayor medida y las HDL se deplecionan en Col, al tiempo que se enriquecen de TG. Las HDL así modificadas, son más susceptibles a la acción de la triglicérido lipasa (la lipopoteín lipasa y la lipasa hepática).

I.5.B. Ácidos grasos en mamíferos. Desaturasas y su regulación

Los AG son los componentes principales de los lípidos complejos. Los fosfolípidos (PL) junto con el Col, constituyen los bloques estructurales de las membranas celulares de mamíferos regulando las propiedades físicas de las mismas. Por este motivo resulta crucial controlar las proporciones relativas de estos lípidos en las membranas biológicas de manera de no alterar el crecimiento o las funciones celulares.

Los AG de los PL de membrana que revisten mayor importancia son los AG monoinsaturados (MUFAs: *monounsaturated fatty acids*), cuya síntesis y regulación se describen a continuación.

Las enzimas que catalizan la adición de una doble ligadura (insaturación) en una cadena de AG son denominadas desaturasas de AG. Esta familia de enzimas, ampliamente

distribuida en casi todos los seres vivos, poseen un rol crítico en la biosíntesis de AG polinosaturados (PUFAs: *polyunsaturated fatty acids*) (91, 92). Los PUFAs actúan como precursores de numerosas moléculas con actividad biológica como eicosanoides, feromonas, reguladores de crecimiento y hormonas. En mamíferos, los eicosanoides como las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, actúan localmente a través de procesos autócrinos o parácrinos sobre receptores de superficie ligados a proteínas G. Esto conduce a la activación de varios mecanismos de señalización que tienen efectos en numerosas funciones celulares incluyendo quimiotaxis, permeabilidad vascular, inflamación y vasoconstricción, entre otras (93). Por este motivo la regulación de la biosíntesis de los PUFAs es un blanco importante en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas como artritis, diabetes, inflamación, neoplasias y enfermedad cardiovascular, por sólo citar algunos ejemplos.

La reacción de desaturación, catalizada por las desaturasas, es un proceso aeróbico que utiliza oxígeno molecular y equivalentes de reducción obtenidos de una cadena de transporte de electrones (94). Existen tres tipos de desaturasas y las únicas presentes en mamíferos son las acil-CoA desaturasas. Se trata de enzimas microsomales unidas a membrana cuyo sustrato son AG esterificados a coenzima A (CoA). En el proceso de síntesis de los PUFAs, las diferentes desaturasas, junto con una familia de enzimas denominadas elongasas, introducen una serie de desaturaciones y elongaciones consecutivas en la cadena de AG para generar PUFAs de cadena más larga como los ácidos araquidónico (AA, 20:4 n-6), eicosapentaenoico (EPA, 22:5 n-3) y docosahexaenoico (DH, 22:6 N-3), Figura 1. Las desaturasas reciben su nombre de acuerdo a la posición en la cual introducen la insaturación en la cadena de acil-CoA,

encontrándose en mamíferos actividad $\Delta 9$, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa. De esta manera, el doble enlace se introduce entre los carbonos 9 y 10, 6 y 7, y 5 y 6 respectivamente (91-93).

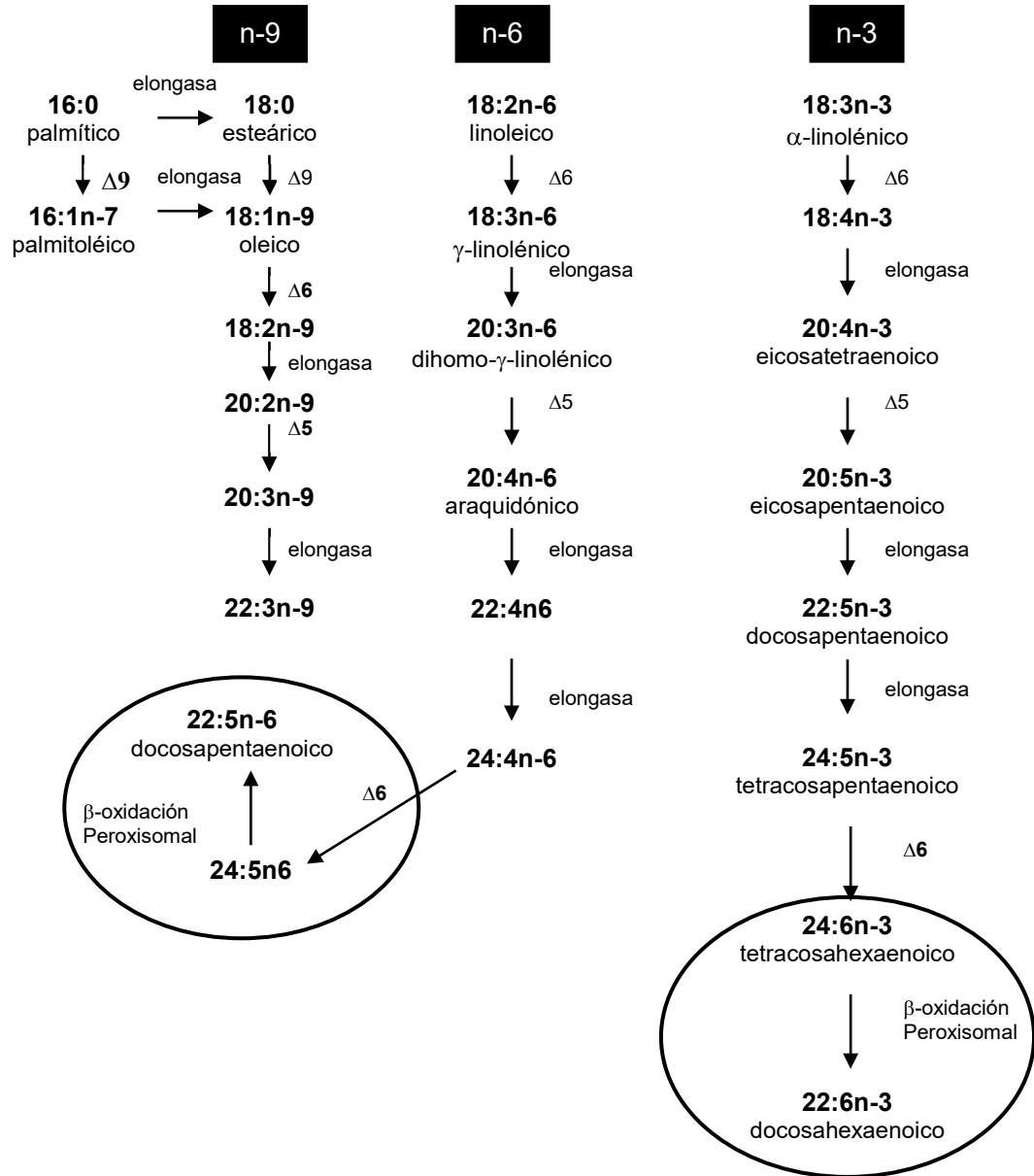
Las células de los mamíferos son capaces de desaturar el ácido esteárico (18:0) a ácido oleico (18:1 n-9) por acción de la estearil-CoA desaturasa (SCD) o $\Delta 9$ desaturasa, sin embargo, carecen de las enzimas necesarias para producir los ácidos linoleico (18:2 n-6) y α -linolénico (18:3 n-3), razón por la cual estos AG son considerados esenciales y deben ser incorporados a través del aporte dietario. Como puede observarse en la Figura 1 estos AG esenciales pueden ser sucesivamente desaturados y elongados dependiendo de la especie animal y de las actividades de $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas en los distintos tejidos (95).

La $\Delta 9$ desaturasa (SCD) es una de las desaturasas más estudiadas hasta la actualidad, es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de MUFAs y juega un papel esencial en el mantenimiento de la fluidez de las membranas celulares. Numerosos factores dietarios, hormonales y ambientales regulan la expresión de la SCD. La insulina, la fructosa y la glucosa, y algunas drogas (fibratos, utilizados como hipolipemiantes) inducen la expresión del gen de la $\Delta 9$ desaturasa en distintos organismos (96). Por otro lado, los PUFAs especialmente los de las familias n-6 y n-3, el etanol, el factor de necrosis tumoral- α , la IL-11, las hormonas tiroideas, el AMPc (o drogas que aumenten sus niveles intracelulares) inhiben la transcripción del ARNm y la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa en hígado (97-99). Los glucocorticoides, mineralocorticoides y corticoides sintéticos aumentan la actividad de la enzima en distintos órganos (100). Los PUFAs reprimen la expresión del gen de la $\Delta 9$ desaturasa a través de un mecanismo dependiente de la SREBP-1 (proteína de unión a elemento regulador de esteroides) que se une al SRE (elemento regulador de esteroides)

presente en el promotor del gen de la $\Delta 9$ desaturasa (101). Los PUFAs reprimen la expresión de la SCD reduciendo la expresión y maduración de la SREBP-1 (102). El Col induce a la enzima por dos mecanismos, uno dependiente de la SREBP-1 y otro del receptor hepático X de tipo alfa (96). Además de los mecanismos fisiológicos o farmacológicos que regulan la actividad de la SCD, varios estados patológicos como la obesidad, arteriosclerosis y diabetes están asociados con una expresión alterada de la enzima (103, 104).

Otras consideraciones importantes en la regulación de la síntesis de los AG en mamíferos se encuentran a nivel de la $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, la actividad de estas enzimas está regulada por la dieta, la edad y distintas hormonas. Además, su expresión se encuentra alterada en algunas enfermedades como la diabetes (105). En general ambas enzimas responden de manera similar a la estimulación hormonal, únicamente la insulina aumenta su actividad mientras que otras hormonas la disminuyen. Los pasos seguidos por las diferentes hormonas para ejercer sus efectos finales sobre las desaturasas no son conocidos en su totalidad. En algunos casos, como el efecto de la insulina sobre la $\Delta 6$ desaturasa, la regulación aparentemente se lleva a cabo controlando la transcripción del ARNm vía SREBP-1. Otras hormonas, como la adrenalina o la ACTH parecen necesitar la estimulación previa de la formación de AMPc para ejercer su control. En el caso de los glucocorticoides la regulación se logra a través de distintos efectos genómicos (91). Aún no es conocido el efecto que producirían otras drogas inmunosupresoras utilizadas en la clínica del trasplante para prevenir o abolir el rechazo sobre la regulación de estas enzimas.

Fig. 1. Biosíntesis de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) en seres humanos y en la rata.



Se indican las tres familias de ácidos grasos principales (n-9, n-6 y n-3)

I.6. DISLIPEMIAS EN EL PACIENTE CON TRASPLANTE RENAL

En pacientes con insuficiencia renal crónica se observan trastornos lipídicos que persisten después del trasplante renal. Estas alteraciones no sólo constituyen un factor de riesgo aterogénico con implicancias en el aumento de la morbi-mortalidad de estos pacientes, sino que contribuyen también a incrementar el desarrollo y progresión de la disfunción del injerto y pérdida del mismo (106). El rasgo más característico del rechazo crónico es la aterosclerosis generalizada con perivasculitis que afecta a todo el árbol arterial del órgano trasplantado (107). En lo que se refiere a la dislipidemia en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal se observa un incremento de los TG y con menor frecuencia del Col plasmático (80, 108, 109). Los TG aumentan en todas las fracciones lipoproteicas y el Col lo hace particularmente en las LDL y VLDL, al mismo tiempo que disminuye en la fracción lipoproteica HDL. La causa de la hiperlipidemia es multifactorial: disminución de la actividad de la lipoproteín lipasa, aumento de inhibidores de la lipoproteín lipasa, hiperparatiroidismo secundario y resistencia a la insulina, entre otras. En la insuficiencia renal crónica se ha observado además, que disminuyen los PUFAs del plasma y aumentan los AG saturados. Estos cambios modifican la fluidez de las membranas de los leucocitos y de los glóbulos rojos y se corrigen con la diálisis; no obstante después de treinta meses en hemodiálisis se observa deterioro en el perfil lipídico que se traduce por un incremento en los TG del plasma y de los glóbulos rojos y una disminución de los PUFAs (108-110). Observaciones realizadas en animales de experimentación y en pacientes con hiperlipidemias genéticas o adquiridas sugieren que las lipoproteínas serían las responsables del daño de las células del mesangio y la enfermedad renal progresiva (43). De manera tal que una terapéutica capaz de reducir y corregir la dislipoproteinemia en los

enfermos renales daría resultados beneficiosos disminuyendo las alteraciones que provoca el mencionado trastorno (43, 111, 112).

El trasplante renal no hace desaparecer el dismetabolismo observado en los pacientes con insuficiencia renal aunque modifica el perfil lipídico que presentan los enfermos no trasplantados. En general se reduce la hipertrigliceridemia, se agrava la hipercolesterolemia y se produce intolerancia a la glucosa (72). En un trabajo previo establecimos el perfil lipídico en ratas con trasplante renal sin tratamiento inmunosupresor. En las ratas trasplantadas se observó un incremento del Col plasmático respecto de las ratas controles no trasplantadas. No se observaron modificaciones en los niveles de los TG plasmáticos ni se alteró la anisotropía de fluorescencia medida en las membranas de los eritrocitos (113).

Como se ha mencionado previamente es frecuente que los pacientes con insuficiencia renal presenten insulinoresistencia. La lipoproteínlipasa es una enzima lipolítica activada por la insulina y los pacientes trasplantados usualmente presentan insulinoresistencia alterando su función (114). Otra característica en común que tienen estos pacientes es la presencia de “estrés carbonílico” que consiste en la modificación no enzimática de proteínas mediada por compuestos carbonílicos derivados de la autoxidación de lípidos y carbohidratos, que afecta desfavorablemente la composición de LP y su metabolismo. Se han hallado alteraciones del contenido de las VLDL propias del síndrome nefrótico con alteración del catabolismo (115).

I.6.A. Mecanismo de daño cardiovascular y mesangial

En los pacientes con disfunción crónica del aloinjerto se encuentran presentes varias anormalidades y todas ellas están asociadas al daño cardiovascular: dislipemias, hipertensión arterial, hipertrofia ventricular izquierda, dilatación ventricular, arritmias, fibrosis miocárdica, isquemia miocárdica e hiperparatiroidismo (116). Como se detalla al principio de la introducción, el infarto agudo de miocardio producido por arteriosclerosis coronaria, es la principal causa de muerte de los pacientes con trasplante renal funcional y además, la nefropatía crónica del aloinjerto que produce pérdida del mismo se manifiesta con arteriosclerosis generalizada que afecta a todo el árbol vascular del implante (13). Se ha descrito la importancia de conocer el perfil de AG de las fracciones lipídicas de la placas ateromatosas desarrolladas en las arterias coronarias. Los AG de la serie n-3 se encuentran involucrados en la prevención de la enfermedad cardiovascular (117). Estos modulan el proceso aterogénico inhibiendo los procesos de activación endotelial y disminuyendo la agregación plaquetaria y la presión sistémica (117-120).

Los artículos más recientes han demostrado que el conocimiento de la composición de AG, y particularmente la sumatoria de AG de la serie n-3: eicosapentaenoico+docosahexaenoico de las membranas eritrocitarias conocido como índice Omega-3, podría ser considerado un nuevo marcador de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (41, 121-123). No obstante, otros AG como los monoenoicos (ácidos palmitoleico, vaccénico y oleico) también se encuentran involucrados en el desarrollo de enfermedad cardiovascular (102).

En pacientes hipertriglicéridémicos hay evidencias de alteración en la función endotelial y una mayor propensión a arritmias mediadas por endotelina. Por otro lado, la acumulación de LP ricas en TG también estaría relacionada con el proceso aterosclerótico (115). Las partículas de LDL, en presencia de hipertriglicéridemia, son en su mayor proporción pequeñas y densas. Esta modificación las hace más susceptibles a la oxidación debido a que son retenidas en mayor medida por el tejido subendotelial y la matriz mesangial (124). Estos fenómenos están involucrados en la aterogénesis y en la progresión del daño renal (43, 108).

Las HDL₂, un subtipo de partículas de HDL que son consideradas cardioprotectoras, se encuentran disminuidas y se alteraría el transporte reverso del C, principal mecanismo antiaterogénico (70).

La LP(a), es una lipoproteína similar al plasminógeno, pero que no puede activarse a plasmina, inhibe competitivamente al plasminógeno en la cascada fibrinolítica y actúa como un factor protrombótico. Además, la Lp(a) es retenida en lesiones ateromatosas en mayor medida que otras partículas ricas en Apo β , favoreciendo así el depósito de C y la formación de las células espumosas. De esta manera la Lp(a) actúa como factor protrombótico y aterogénico (125).

La homocisteína es un aminoácido azufrado producido durante el metabolismo de la metionina. Existen evidencias epidemiológicas de una relación positiva entre los niveles de homocisteína y la enfermedad cardiovascular (126). Los niveles plasmáticos elevados de homocisteína observados en los pacientes con enfermedades renales crónicas podrían tener relación con el daño vascular (127).

La proteína C reactiva está asociada con un incremento del riesgo cardiovascular en la población general. Su determinación tendría valor predictivo. En un estudio transversal en pacientes con insuficiencia renal crónica en etapa predialítica se encontró que niveles plasmáticos elevados de proteína C reactiva se asocian a aumento del espesor carotídeo, que es un fenómeno relacionado con aterosclerosis acelerada (128).

En el tejido renal sano las LP no tendrían efecto sobre las células mesangiales. El riñón trasplantado es un órgano dañado y su grado de alteración depende de varios factores tales como la técnica de ablación en el donante, tipo de donante (cadavérico o vivo), tiempos de isquemia fría y caliente, revascularización, complicaciones quirúrgicas, grado de histocompatibilidad, episodios silentes o evidentes de rechazo agudo previos, no función primaria y nefrotoxicidad de los inmunosupresores, entre otros. Una vez que se inicia el daño renal, independientemente de la etiología, la dislipemia favorece la progresión y perpetúa el mismo. Las lipoproteínas incrementan su unión a la matriz mesangial incorporándose a las células mesangiales, exacerbando el daño renal. Las células mesangiales presentan receptores para LDL. El complejo LDL-receptor desencadena una respuesta inflamatoria con producción de metaloproteinasas, atrayendo macrófagos que se transforman en células espumosas y liberando factores proinflamatorios. Se ha comprobado *in-vitro* que las LDL oxidadas y las LP ricas en TG (VLDL e IDL) estimulan la proliferación de las células mesangiales a través de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa, IL6, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB y factor de crecimiento transformante beta (43, 129).

I.7. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

I.7.A. Objetivos

La utilización de modelos experimentales de trasplante ha facilitado la investigación y el desarrollo de técnicas, procedimientos y terapéuticas médicas extrapolables a la práctica clínica para dar respuesta a serios problemas médicos. Los trasplantes de órganos en ratas se han constituido en el modelo más utilizado en todo el mundo por el bajo costo de los mismos y la posibilidad de acceder a líneas genéticas definidas. Sin embargo, se realizan con técnicas microquirúrgicas de alta complejidad. En experimentos previos hemos puesto a punto la técnica de trasplante renal en ratas alcanzado una supervivencia del 90% (28). Con el modelo experimental estandarizado y teniendo en cuenta que las complicaciones vasculares y el rechazo crónico son las causas más frecuentes de muerte en pacientes post-trasplante renal, y que en ambos casos la dislipidemia juega un papel preponderante y es en parte consecuencia del tratamiento inmunosupresor, planteamos los siguientes objetivos:

- En general, estudiar desde el punto de vista semiológico, histopatológico y bioquímico-clínico la respuesta de ratas con trasplante renal a la administración de los agentes inmunosupresores más utilizados en la clínica de los trasplantes de órganos.
- En particular, estudiar la influencia de las drogas CsA, SRL y MP sobre el metabolismo lipídico a fin de poder evaluar su capacidad de abolir el rechazo sin incrementar el riesgo cardiovascular.
- Dilucidar el efecto que sobre las enzimas desaturantes ejercen los inmunosupresores CsA y SRL en un modelo in-vitro. La elección de la línea de hepatoma humano

(HepG2) se fundamenta, por un lado en que el hígado es un órgano esencial en el mantenimiento de la homeostasis de los PUFAs y además, en que estas células poseen (en ciertos aspectos del metabolismo de los PUFAs) grandes similitudes con el tejido hepático de otros mamíferos o con otras líneas celulares de origen hepático. Considerando que la célula HepG2 conserva las características morfológicas de un hepatocito maduro “in vivo” y mantiene sus funciones metabólicas, y teniendo en cuenta la dificultad de obtener este tipo de información a partir de tejido hepático normal, hemos empleado este modelo para estudiar el efecto de los distintos inmunosupresores sobre el metabolismo lipídico. La literatura científica describe la utilización de estas células en el estudio de los efectos causados por los inmunosupresores. A dosis terapéuticas los mismos no poseen toxicidad sobre el hepatoma HepG₂ (23, 25, 26).

I.7.B. Hipótesis

- La literatura científica cita a las terapias inmunosupresoras como uno de los principales factores involucrados en el desarrollo y/o persistencia de las dislipidemias postrasplante. Este efecto colateral adverso ha sido atribuido principalmente a los esteroides y es posible hallar numerosos trabajos científicos acerca de su influencia sobre el metabolismo lipídico. Las nuevas drogas inmunosupresoras utilizadas para prevenir y/o tratar el rechazo de los órganos trasplantados han demostrado su superioridad respecto a sus propiedades inmunosupresoras si se comparan con los esteroides. Sin embargo, su influencia sobre el metabolismo de los lípidos es un efecto aún por dilucidar.

Nuestras hipótesis de trabajo fueron:

- Que tanto la CsA como el SRL causan modificaciones menos nocivas en el perfil lipídico que las provocadas por los esteroides, tanto en el modelo "in vivo" como "in vitro".
- Que clínicamente son drogas mejor toleradas a juzgar por la sobrevida de los receptores tratados por las distintas drogas inmunosupresoras.
- Que ambas drogas modifican la composición lipídica y fluidez de las membranas de diferentes tejidos con la consiguiente alteración de las señales intracelulares y su efecto biológico. El conocimiento de estas modificaciones es potencialmente útil para el monitoreo de sus efectos en el trasplante renal clínico.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIALES UTILIZADOS

II.1.A. Drogas radioactivas

Ácido 1 ^{14}C -16:0 (actividad específica: 57,0 mCi/mmol, pureza relativa 98%) Dupont-NEN, Boston MA, USA.

Ácido 1 ^{14}C -18:2 n-6 (actividad específica: 58,0 mCi/mmol, pureza relativa 99%) Dupont-NEN, Boston MA, USA.

Ácido 2 ^{14}C -20:3 n-6 (actividad específica: 55,0 mCi/mmol, pureza relativa 99%) American Radiolabeled Chemicals, INC, St Louis, MO, USA.

La pureza radioquímica y química se controló en cada una de las preparaciones de AG mediante cromatografía y cromatografía gas-líquido (GLC). Asimismo, se efectuaron controles periódicos de la radiactividad mediante centelleo líquido. Las soluciones se conservaron a -20°C en recipientes herméticos con atmósfera de Nitrógeno (cuando fue necesario).

II.1.B. Drogas no-radioactivas

Solventes:

Ácido acético glacial

Ácido clorhídrico

Cloroformo

Etanol absoluto

Éter de petróleo

Éter etílico

Metanol

Hexano

Todos los solventes aquí detallados fueron calidad pro-análisis y adquiridos a Merck Química Argentina.

Sustancias para centelleo líquido:

Fluorescente primario: 2,5-difeniloxazol (PPO)

Centellador secundario: 1,4-bis-(5-t-butilbezooxazol-2-il)-tiofeno (POPOP)

Ambas drogas se adquirieron a Packard Instrument Company, Illinois, USA.

Fases para cromatografía gas líquido:

En cromatografía de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) radioactivos se utilizó como fase estacionaria el relleno “SP-2330” en Chromosorb WAW-DMCS 100 a 200 mallas, compactada.

En cromatografía de EMAG no radioactivos se utilizó como fase estacionaria Omegawax 250, capilar.

Las fases fueron adquiridas a Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA.

Elementos para cromatografía en capa fina:

Para la separación de lípidos neutros se utilizaron placas de vidrio (10 x 20 cm) recubiertas de silicagel G sin fluorescente marca Merck, Alemania.

Las cubas de desarrollo se compraron a Sigma Chemical. Company, St. Louis, MO., USA

Estándares:

Albúmina sérica bovina (fracción V)

Colesterol

Triglicéridos

Los estándares utilizados fueron todos adquiridos a Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA.

Gases

Todos los gases utilizados fueron adquiridos a AGA, La Plata, Argentina.

El Nitrógeno (purísimo), Hidrógeno (purísimo), Helio (purísimo), y Aire (purísimo) empleados en GLC se secaron sobre tamices moleculares de perclorato de potasio activados a 600° C.

Drogas para cultivo celular

La preparación de las soluciones madres empleadas en los medios utilizados en el cultivo de células, mantenimiento y recolección de las mismas se llevó a cabo con drogas provenientes de las siguientes fuentes comerciales:

Sales inorgánicas, sacarosa, glucosa, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), imidazol y rojo de fenol: Mallinkrodt, NY, USA.

Glicerol y aminoácidos: Carlo Erba, Milán, Italia.

Vitaminas: cloruro de colina, ácido fólico, mio-inositol, niacinamida, d-ácido pantoténico, piridoxal ClH, riboflavina, tiamina ClH, pantotenato de calcio, fosfato de piridoxal, vitamina B₁₂, d-biotina. Abbott Lab., Argentina.

HEPES (ácido N-2-hidroxietilpipierazin-N-2-etanosulfónico) y glucosa-6-fosfato: Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA.

Estreptomina (sulfato): Laboratorio Lepetit, Buenos Aires, Argentina.

Suero Fetal estéril: Gen S.A., Buenos Aires, Argentina.

Drogas utilizadas en los protocolos anestésicos:

Ketamina 5%, inyectable. Holiday-Scott S.A. Buenos Aires, Argentina. Diazepan 0,5%, inyectable. Atropina 0,1%, inyectable. Lamar. Buenos Aires, Argentina.

Inmunosupresores:

Sirolimus, Rapamune. Solución oral 1 mg/ml. Ayerst Laboratories Division of Wyeth-Ayerst Pharm Inc, NY, USA.

Ciclosporina, Sandimmune. Solución oral 100 mg/ml. Novartis, Buenos Aires, Argentina.

Metilprednisona, Deltisona B. Comprimidos 40 mg. Lepetit. Buenos Aires, Argentina.

Otros:

Reactivo de Folin-Cicolteau y ácido tricloracético: Merck, Alemania.

II.2. METODOLOGIA

II.2.A. Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, exocriadas, machos, adultos. Los animales se mantuvieron en ambiente climatizado a 20-24C° con ciclo de luz/oscuridad de 12 hs. A los mismos se mantuvieron con ayuno de 24 hs previamente al acto quirúrgico, toma de muestras y sacrificio.

II.2.B. Técnica quirúrgica: modelo microquirúrgico de trasplante renal en la rata

La técnica quirúrgica utilizada es la descrita originalmente por Lee y col. y modificada por otros autores. La misma se ha perfeccionado y actualmente se sigue utilizando en numerosos proyectos de trasplante renal experimental (28, 130-132).

II.2.B.a. Material quirúrgico

Se utilizó instrumental de microcirugía convencional, cauterio oftalmológico, microscopio quirúrgico de 6 a 25 aumentos y, como materiales de sutura, seda 7-0 y nylon monofilamento 3-0, 7-0 a 10-0.

II.2.B.b. Preparación preoperatoria y anestesia

Los donantes y receptores se premedicaron con atropina 0.01 mg/kg, buprenorfina 0.04 mg/kg y diazepam 10 mg/kg. Pasados 10 minutos de la premedicación se realizó la anestesia con ketamina 100 mg/kg.

Alcanzado el plano anestésico, las córneas se protegieron con ungüento oftálmico y se procedió al rasurado del abdomen. Se colocó el animal en posición supina en una tablilla operatoria con manta térmica, fijándolo con tela adhesiva e introduciendo la cabeza dentro de la mascarilla de suministro de O₂ que se mantuvo durante toda la cirugía y recuperación del receptor con un flujo de 2 lts/min. Se realizó la antisepsia de la piel con alcohol 70° y se colocó sobre el abdomen un campo operatorio.

II.2.B.c. Donante

Se realizó la incisión mediana xifopúbica para el abordaje, disección y reparo proximal y distal al pedículo renal de la arteria aorta (AO) y de la vena cava inferior (VCI), Figura 2-A

y 2-B. Se realizó la ligadura y sección de los vasos lumbares, los vasos adrenales izquierdos y la vena testicular. Se ajustó el reparo vascular para provocar la ligadura permanente de la AO proximal y distal al origen de la arteria y vena renal, sólo se obliteró el flujo sanguíneo de la VCI distal al origen de los vasos renales. De esta manera fue posible lavar el riñón por punción de la AO con 3cc de solución de Ringer Lactato a 4°C hasta que se constató que la solución de lavado fluyera a través de la arteria renal lavando el riñón hasta que el órgano se tornó pálido en forma homogénea, Figura 2-C. Se observó el pasaje de la solución de lavado por la vena renal hacia la VCI. Al culminar se ajustó la ligadura proximal de la VCI, se seccionó la vena renal en su origen y la AO distal al origen de la arteria renal, dejando los cabos adecuados para realizar las anastomosis posteriores en el receptor. El uréter se seccionó cercano al polo renal.

II.2.B.d. Preservación

La preservación del riñón extraído del donante fue de 3 horas \pm 0,12 horas, se realizó con Solución de Ringer Lactato a 4°C. A este riñón extraído, que posteriormente será trasplantado en el receptor, lo llamaremos riñón trasplantado (RT).

II.2.B.e. Receptor

Se realizó la incisión mediana xifopubiana para abordar y extraer el riñón derecho. Se retrajo sobre el flanco izquierdo el intestino, el cual se protegió con gasa húmeda y tibia. Se disecaron la VCI y la AO, 1 cm por debajo de los vasos renales. Se realizó la hemostasia de los vasos lumbares. Se obliteraron en forma transitoria con la AO y VCI con dos microclamps de Acland atraumáticos dejando un segmento de 2 cm de distancia entre ellos para realizar la arteriotomía y la venotomía, Figura 2-D. Se colocó el RT en el

abdomen sobre el flanco derecho del receptor protegido con una gasa húmeda y fría. Se realizó la anastomosis término-lateral de la vena renal del RT con la VCI del receptor, Figura 2-E; y la anastomosis término-lateral entre la AO del RT y la AO del receptor, Figura 2-F. Se liberaron los clamps vasculares y se realizó el control de la hemostasia, Figura 2-G y 3-H. El implante se completó con la anastomosis término-terminal de ambos uréteres. Las anastomosis microquirúrgicas se realizaron con nylon monofilamento 8-0 a 10-0. La pared abdominal se suturó en dos planos con suturas continuas utilizando nylon monofilamento 3-0. Al riñón trasplantado lo llamamos (RT). La rata receptora mantuvo su riñón derecho que lo llamamos riñón propio (RP).

1

Fig. 2. Técnica quirúrgica: modelo microquirúrgico de trasplante renal en la rata

2.A. Indica las abreviaturas utilizadas para referenciar las estructuras anatómicas que se observan durante el acto quirúrgico, la flecha negra señala cada estructura anatómica que indica la abreviatura. Arteria aorta (AO), arteria renal (AR), riñón izquierdo (RI), riñón dercho (RD), uréter (UR), vasos adrenales izquierdos (VAI), vena cava inferior (VCI), vena espermática (VE), vasos lumbares (VL) y vena renal (VR). Barra: 5 mm.

2.B. Cirugía del donante. Disección del riñón izquierdo y su pedículo vascular. Las flechas blancas indican los cuatro reparos vasculares proximal y distal al origen de la arteria y de la vena renal. Barra: 5 mm.

2.C. Perfusión del órgano por punción de la AO que se indica con flecha negra. Nótese el cambio de color del RI, respecto a la Figura 2.B. que se torna pálido en forma homogénea al lavar con la solución de perfusión que drena hacia VCI, el sentido de lavado de la solución de preservación se indica con flecha blanca. Barra: 8.5 mm.

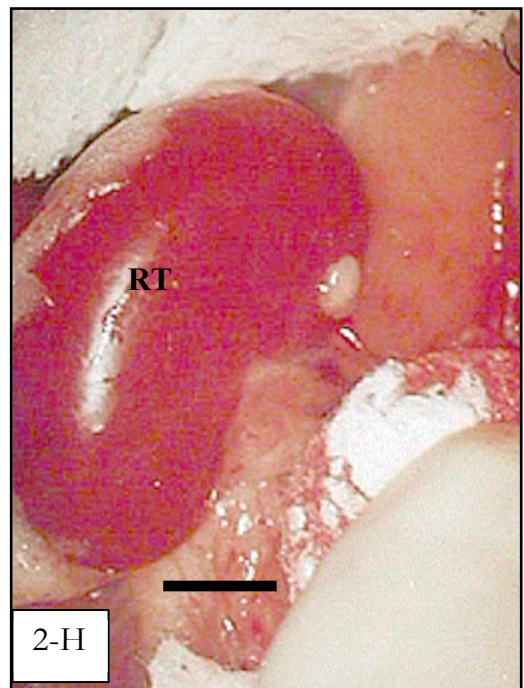
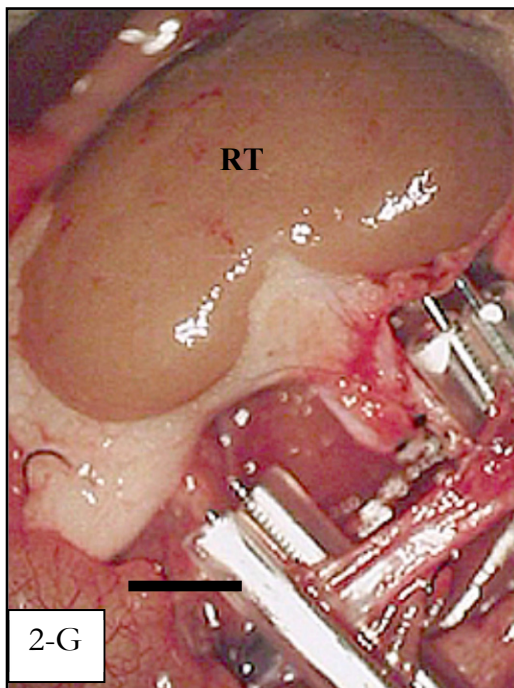
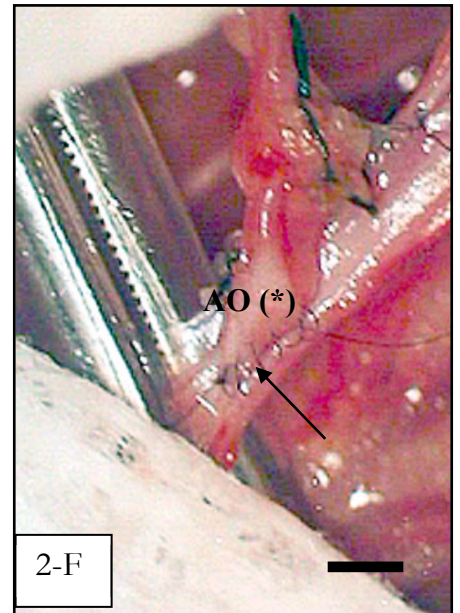
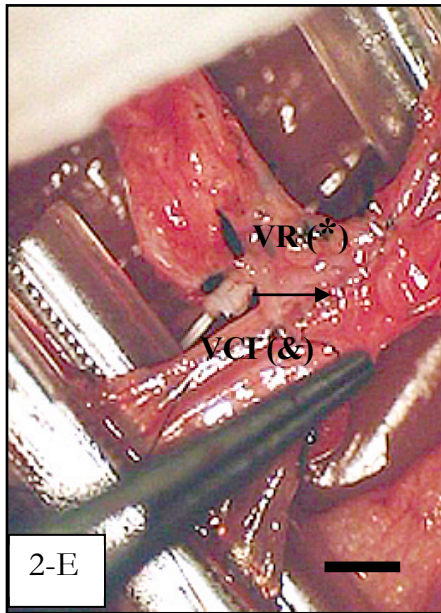
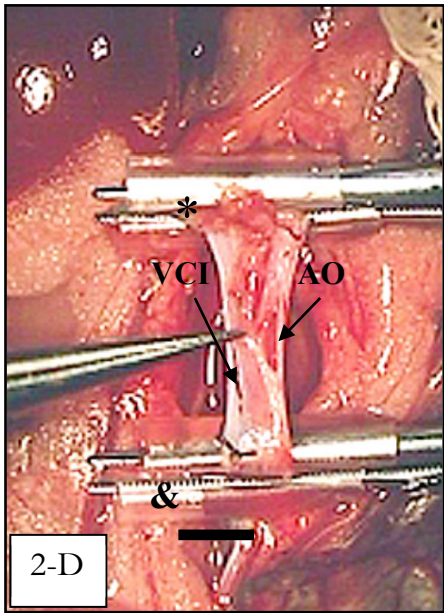
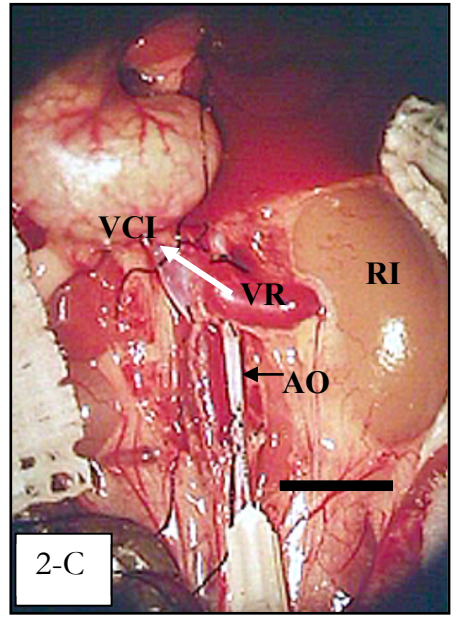
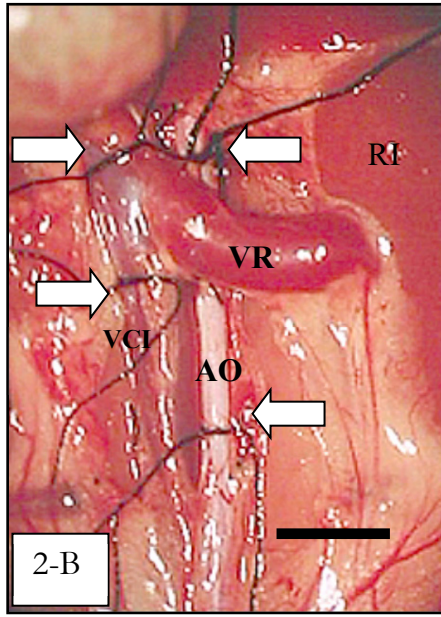
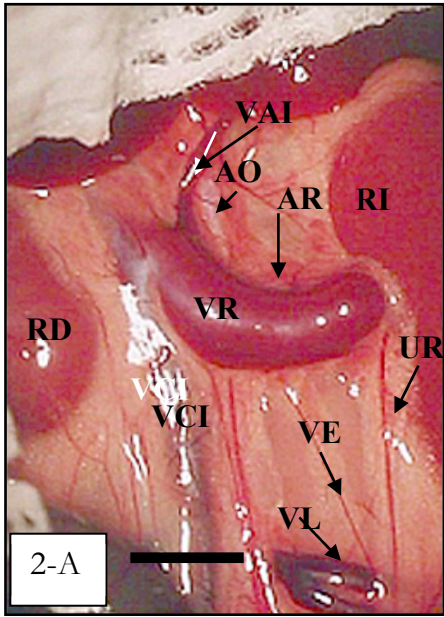
2.D. Abordaje y clampeo de los vasos abdominales del receptor (AO y VCI) por debajo del origen de los vasos renales, clamp proximal (*) y dejando un espacio de aproximadamente 1,5 cm entre ambos se coloca el clamp distal (&) por encima del origen de los vasos ilíacos. Las flechas negras indican la venotomía en VCI y la arteriotomía en AO. Barra: 5 mm.

2.E. Anastomosis término-lateral de la VR del RT con la VCI del receptor . Se observa el pedículo vascular venoso. La flecha negra indica la sutura continua con nylon monofilamento 10-0. Barra: 2,5 mm.

2.F. Anastomosis término-lateral de la AO del RT (*) con la AO del receptor (&). Se observa el pedículo vascular arterial. La flecha negra indica la sutura continua con nylon monofilamento 10-0. Barra: 2,5 mm.

2.G. Cirugía del receptor, RT lavado previamente a ser realizadas las anastomosis vasculares para su implante. Barra:5 mm.

2.H. RT revascularizado tras la apertura de los clamps vasculares. Barra:5 mm.



II.2.B.f. Postoperatorio (p/o)

El p/o tuvo lugar en la sala de recuperación con una temperatura constante de 25°C y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Luego de la cirugía la caja que alojó a la rata trasplantada se colocó bajo una lámpara de 100 Watts por el término de una hora protegiéndola de la luz directa y sobre una manta térmica que permaneció hasta la total recuperación del animal. Se suministró agua y comida ad-libitum desde el p/o inmediato, colocando dentro de la jaula frutas y dulces de fácil acceso.

El examen clínico de los receptores se realizó siguiendo cuidadosamente el p/o durante 30 días. Todo animal que mostraba degradación significativa de los signos vitales se reexploraba quirúrgicamente y luego era sacrificado por sobredosis anestésica. A todo aquel que moría antes del día 30 p/o se le practicó la necropsia, se definió la causa de muerte según el hallazgo macroscópico e histopatológico del RT y se excluyeron del análisis a aquellos que murieron por errores en la técnica quirúrgica. Ver registro de seguimiento p/o que se adjunta a continuación.

Los que alcanzaron la supervivencia esperada fueron sacrificados por decapitación utilizando guillotina.

Tabla 2. Registro postoperatorio diario utilizado en cada animal sometido a cirugía de trasplante

Peso	Comp.	Hidratación	M.F	Orina	P.E	Mucosas	F.R
0: aumentado	0: activa	0: normal	0: normal	0: normal	0: no	0: normal	0: 70-110 latidos/min
1: disminuye un 10%	2: letárgica	1: deshidratación moderada	2: diarrea	2: anuria	2: si	2: cianóticas	2: aumentada o disneica
2: disminuye un 15%		2: deshidratación severa	3: ausencia			2: ictéricas	
3: disminuye más de 15%							

Comportamiento: (comp.); materia fecal (M.F); piloerección (P.E), Frecuencia respiratoria (F.R).

Puntaje:

0: buena salud.

0-5: moderado deterioro de salud, pueden ser corregidos con tratamiento que no interfiera con los resultados experimentales.

6-10: moderado a severo deterioro de la salud, si aun no mejora con tratamiento especial (calor adicional, hidratación, analgesia), se debe considerar su eutanasia.

10-16: la eutanasia es inevitable.

Extraído del Curso: "Cuidados y usos de animales de laboratorio sometidos a cirugía experimental". Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad de Western Ontario, Canadá.

II.2.C. Diseño experimental

En la Figura 2 se representa en forma esquemática el diseño experimental.

- Lote trasplante control (**lote TX**): se realizaron 11 trasplantes ortotópicos renales. Los receptores no recibieron tratamiento inmunosupresor.
- Lote ciclosporina A (**lote CsA**): se realizaron 10 trasplantes ortotópicos renales. Las ratas fueron tratadas con CsA 15 mg/kg, desde el primer día del p/o hasta el momento del sacrificio.
- Lote sirolimus (**lote SRL**): se realizaron 10 trasplantes ortotópicos renales. Las ratas fueron tratadas con SRL 3 mg/kg vía oral desde el primer día del p/o hasta el momento del sacrificio.
- Lote metilprednisona (**lote MP**): Se realizaron 10 trasplantes ortotópicos renales. Las ratas fueron tratadas con metil-prednisona 1 mg/kg vía oral desde el primer día del p/o hasta el momento del sacrificio.
- Lote de ratas sin trasplantar y sin tratar: Se incluyeron 10 ratas de las mismas características las cuales no fueron sometidas a trasplante así como tampoco fueron tratadas con los inmunosupresores para obtener los datos fisiológicos de la cepa. A este lote lo denominamos: **lote control** .

Una semana previa al trasplante se obtuvieron muestras de sangre para determinar:

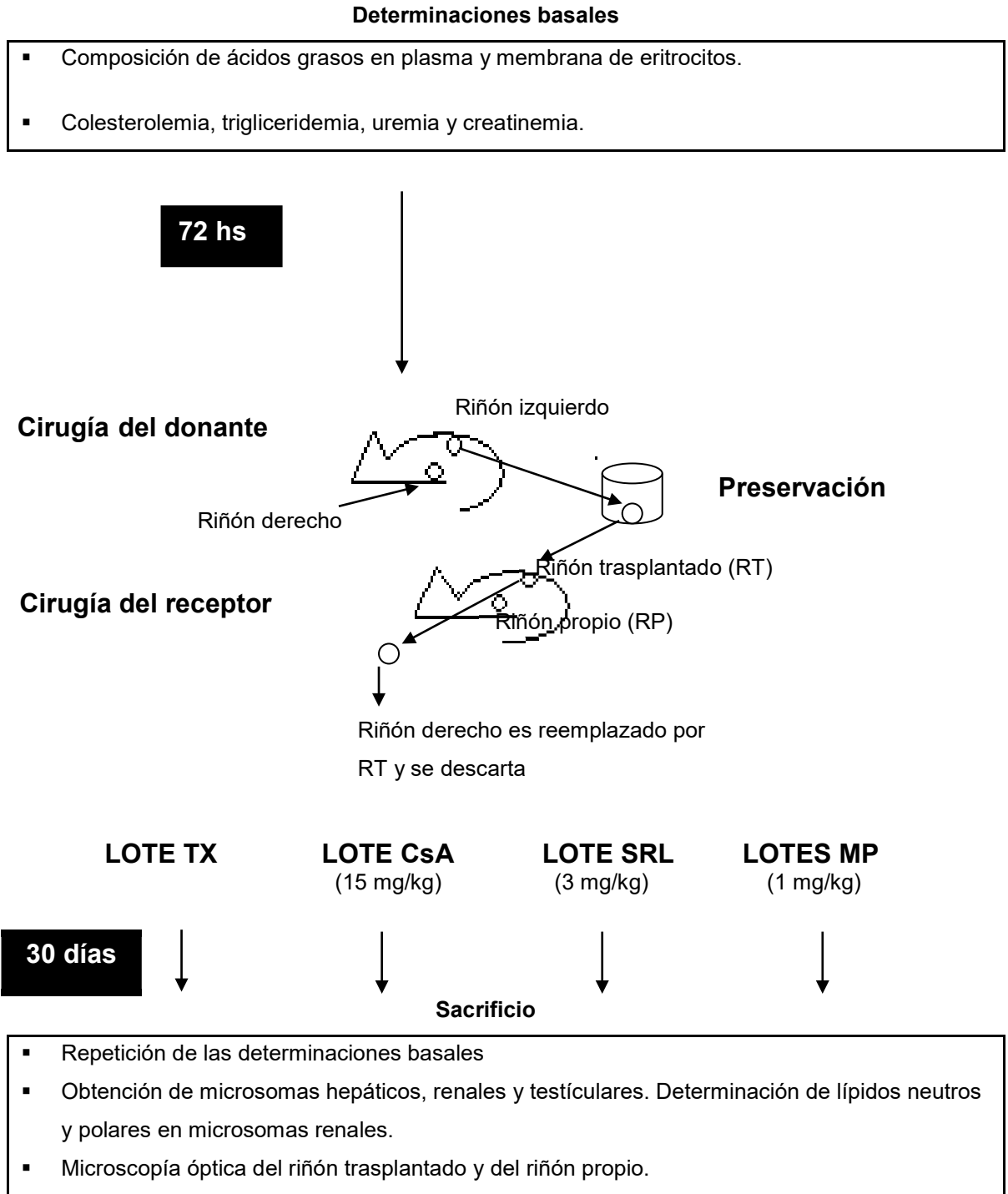
- Composición de AG en plasma.
- Colesterolemia, trigliceridemia, uremia y creatininemia.

Al día 30 del p/o se sacrificaron las ratas para extraer diversos tejidos (sangre, riñones: RT y RP, hígado y testículos) en los que se realizaron las siguientes determinaciones.

- Separación de plasma y eritrocitos.
- Obtención de membranas de eritrocitos o “fantasmas de eritrocitos”.
- Obtención de microsomas de hígado, riñón y testículos.
- Determinación de la composición de AG de lípidos totales en plasma, membrana de eritrocitos y de microsomas renales, hepáticos y testiculares.
- Determinación de lípidos neutros y polares en microsomas renales.
- Colesterolemia, trigliceridemia, uremia y creatininemia.
- Microscopía óptica del riñón trasplantado y del riñón propio.

En la Figura 3 se representa en forma esquemática el diseño experimental.

Fig. 3. Representación esquemática del protocolo de los experimentos II.2.C.



II.2.D. Obtención del material de estudio

II.2.D.a. Aislamiento de microsomas renales, hepáticos y testiculares

Los animales se sacrificaron por decapitación a los treinta días del p/o. Los riñones, el hígado y los testículos fueron extraídos rápidamente, los riñones fueron descapsulados y se removió la túnica albugínea de los testículos, los tejidos fueron pesados y homogeneizados en solución homogeneizadora fría compuesta por: 0.25 M sacarosa, 62 mM buffer fosfato pH 7,0, 0,15 m ClK, 5 mM Cl₂Mg y 100 mM EDTA. Estos tejidos fueron homogeneizados en homogeneizador rotatorio con émbolo de teflón. El homogenato se centrifugó a 10,000 x g en centrífuga Sorvall RC-2 durante 20 minutos y el precipitado consistente en núcleos, mitocondrias y otros detritos celulares fue descartado. El sobrenadante se filtró por gasa y luego se centrifugó a 40,000 x g en una ultracentrífuga Beckman por 45 minutos (133).

El precipitado (microsomas) se resuspendió en la solución homogeneizadora. Todo el proceso se realizó a 4°C y los microsomas fueron almacenados a (-70°C) hasta su análisis.

II.2.D.b. Obtención de membranas de eritrocitos.

La técnica utilizada para la obtención de “fantasmas” de eritrocitos es la publicada por Dugan y col (134), parcialmente modificada. Esencialmente la técnica consistió en lo siguiente: una vez separados el plasma y los eritrocitos por centrifugación a baja velocidad, la fracción eritrocitaria se lava 4 veces con solución fisiológica (CINa 0,9%). El producto de este lavado son eritrocitos puros. A continuación, se realiza la ruptura de los glóbulos rojos por el agregado de tampón tris (10 mM), pH 7,4 en una relación 40:1 (v:v). Se dejó actuar a esta solución hipotónica durante 20 minutos a 0-4 °C. Posteriormente se

centrífugó a 10,000 x g por un lapso de 15 minutos. Luego se descartó el sobrenadante conteniendo todos los elementos citosólicos del eritrocito principalmente hemoglobina. Esta centrifugación se repitió hasta obtener un sobrenadante límpido (sin hemoglobina). El pellet correspondiente a los fantasmas se resuspendió finalmente en un volumen pequeño de solución buffer y fue separado en alícuotas, las que se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

II.2.D.c. Obtención de plasma.

La sangre obtenida del tronco del animal se recolectó en tubos cónicos con anticoagulante a base de EDTA y fue centrifugada a baja velocidad 500 rpm durante 15 minutos. El plasma se recolectó en tubos Eppendorf. Una alícuota se conservó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el dosaje de C, TG, urea y creatinina. El resto del plasma se preservó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, destinándose a estudios de composición de AG totales.

II.2.D.d. Dosaje de proteínas

La concentración de proteínas de microsomas renales y de las células HepG₂, fue dosada según el método de Lowry y col. (135). Se utilizó seroalbúmina bovina como estándar.

II.2.E. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS DE LÍPIDOS

II.2.E.a. Extracción de lípidos totales de las fracciones subcelulares y del plasma

Los lípidos fueron extraídos a partir de alícuotas de microsomas, de membranas eritrocitarias y de plasma, con cloroformo/metanol (2:1 v/v) siguiendo el procedimiento de Folch y col. (136).

Fundamento

El estudio de los AG por GLC es el método universalmente utilizado para describir estas estructuras (137). Para que los ésteres metílicos de AG puedan ser cromatografiados estos deben encontrarse en forma gaseosa a las temperaturas de trabajo en las columnas de separación. De este modo, una vez volatilizados los compuestos particionan entre la fase móvil gaseosa (gas carrier) y una fase estacionaria líquida de la columna del cromatógrafo. Un soporte de material poroso inerte sostiene la fase líquida. Los distintos coeficientes de partición de los componentes de la muestra les hace moverse a distintas velocidades pudiendo ser individualizados a través de un detector de ionización de llama, amplificación y posterior registro gráfico.

Esterificación:

Para analizar los AG por GLC es necesario transformarlos previamente en ésteres metílicos. Estos son más volátiles y más estables que los AG libres, eluyendo de la columna con una mejor resolución a partir de la mezcla de inyección.

De esta manera, una fracción del extracto lipídico se esterificó con metanol/ClH 3 N, a 64 °C en atmósfera de N₂. El metanol y el ácido clorhídrico se eliminaron por partición con agua y cloroformo. La fase clorofórmica fue evaporada y los ésteres metílicos de AG se resuspendieron en éter de petróleo.

Cromatografía gas líquido:

El equipo analizador consistió en un cromatógrafo Hewlett Packard 5840, equipado con sistema de detección por ionización de llama con un terminal integrador y procesador de datos que indica automáticamente la composición de la muestra. La columna de vidrio utilizada midió 1,80 m de largo por 2 mm de diámetro. El soporte usado fue Sp 2330 10%

sobre Chromosorb WAW 100/120. La temperatura se programó para ser mantenida a 140°C durante el primer minuto y aumentó 3°C por minuto hasta 220°C. El gas carrier empleado fue N₂ puro anhidro a un flujo constante de 20 mL/minuto.

Identificación de los ácidos grasos por tiempo de retención:

El tiempo de retención absoluto expresa el tiempo que demora una sustancia en eluir en una fase estacionaria desde el momento de su aplicación en condiciones estandarizadas.

En GLC se toma como parámetro el tiempo de retención relativo, que es la relación entre el tiempo de retención de un componente determinado y el otro compuesto utilizado como referencia. En la cromatografía de los ésteres metílicos utilizamos el tiempo de retención relativo al éster metílico del ácido esteárico.

En este caso la identificación de los picos se realizó a partir de sus tiempos de retención relativos comparados con estándares bajo las mismas condiciones de medida. Sólo las áreas que superaron el 0,5% del total fueron consideradas dentro del cálculo del perfil de los AG. Las áreas tomadas en cuenta representaron, asimismo, más del 90% del total de los picos registrados.

Cromatografía líquida planar:

La cromatografía en capa fina (TLC) es un método físico que pertenece a las técnicas basadas en reparto entre fases, utilizado con gran éxito en la separación de las distintas especies lipídicas de una muestra. El sistema consta de una fase estacionaria adsorbente (habitualmente gel de sílice) sobre un soporte de vidrio u otros materiales, y de una fase líquida móvil.

Los componentes de la mezcla se adsorben sobre la superficie del sólido con mayor o menor afinidad, por lo que serán arrastrados por la fase móvil líquida con menor o mayor velocidad. De esta manera se separan una amplia gama de compuestos por lo que resulta especialmente útil para la separación de mezclas de lípidos.

Separación de lípidos neutros por TLC:

La separación de las distintas fracciones lipídicas (Col, TG, AG libres y PL) fue realizada sembrando las muestras (10 μ L) en placas de silicagel y fueron corridas en un sistema de solventes en cuba conteniendo: éter de petróleo, éter etílico, y ácido acético glacial (80:20:1 v/v/v). Las especies de lípidos fueron cuantificadas por comparación con corridas cromatográficas de cantidades conocidas de estándares puros desarrollados paralelamente (1-10 μ g). Las manchas correspondientes a Col libre y esterificado y a los AG libres fueron visualizadas por el método de revelado de cloruro férrico de Lowry (138). Después del “revelado” las placas fueron escaneadas y se realizó una cuantificación por densitometría óptica utilizando un software de análisis de imágenes unidimensional (Kodak, Rochester, NY) para exposiciones múltiples.

II.2.E.b. Trigliceridemia

Los valores de TG en plasma se determinaron por método enzimático colorimétrico (139).

II.2.E.c. Colesterolemia

La colesterolemia se determinó mediante método enzimático colorimétrico (140).

II.2.F. Funcionalidad renal. Determinaciones séricas: urea y creatinina

II.2.F.a. Uremia

La urea plasmática se determinó por método enzimático (141).

II.2.F.b. Creatininemia

La creatinina plasmática se determinó por cinética espectrofotométrica (142).

II.2.G. Estudio morfológico del parénquima renal

II.2.G.a. Aspecto macroscópico de los riñones trasplantados y propios.

Una vez sacrificados los receptores se extrajeron ambos riñones, se realizó el análisis macroscópico de superficie, color, tamaño, peso y anastomosis vasculares y ureterales.

Se efectuó la sección sagital para evaluar el aspecto de la corteza, la médula y el sistema calicial.

II.2.G.b. Estudio histopatológico del parénquima renal

Se realizó el análisis histopatológico de los RT y RP de muestras obtenidas al momento del sacrificio. Las mismas fueron fijadas con solución Bouin, procesadas con técnicas histológicas de rutina, realizándose cortes seriados de 4 μm de espesor que fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina y PAS.

El estudio histopatológico se realizó con microscopía óptica convencional confirmando el grado de rechazo utilizando un análisis semi-cuantitativo según los criterios establecidos en la clasificación de Banff, analizando los distintos compartimientos: glomerular, tubular, intersticial y vascular (143-146).

II.2.H. METODOLOGÍA ESPECÍFICA UTILIZADA PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS

II.2.H.a. Cultivos de células tumorales HepG₂ en monocapa

Se trabajó con esta línea tumoral de origen humano. Originalmente se obtuvo a partir de una biopsia tumoral de hígado durante una lobectomía de un niño de 15 años de edad caucásico originario de Argentina en 1975 (147). Los fragmentos del tumor se cultivaron sobre lechos de células de ratón irradiado en medio de William's E con 10% de suero fetal (148). A partir de este cultivo de explantes se originó la línea celular inmortalizada que se continúa empleando profusamente en numerosos laboratorios de todo el mundo. El análisis histopatológico de este tumor en las biopsias fue compatible con carcinoma bien diferenciado con patrón trabecular. Por otro lado se comprobó la capacidad de sintetizar alrededor de 15 de las principales proteínas plasmáticas, entre ellas albúmina y α -fetoproteína. Se trataría de una línea tumoral hepática primaria o hepatoblastoma. El análisis cromosómico es anormal: la cantidad de cromosomas por células varía entre 50 y 55, y contiene una alteración en 1 cromosoma. La inyección de estas células a ratones atímicos no originó tumores (149).

La ultraestructura de estas células en cultivo muestra un patrón de organización normal de los organoides. Existe cierta polarización de la célula con formación de canalículos similares a los biliares que contienen gran cantidad de microvellosidades (150). Estas células no se organizan en trabéculas como lo hacen los cultivos primarios de rata, sino que se acumulan en placas de células que no presentan inhibición por contacto (151).

Esta línea tumoral se obtuvo por gentileza del Dr. De Antueno (Efamol Research Institute, Canadá). Los cultivos de esta línea tumoral se realizaron en botellas cerradas de vidrio blando de 95 cm² de superficie de pegado del tipo Khole.

Las características de cultivo, mantenimiento y recolección de las células se realizó según técnica de Angeletti y Alaniz que se resume a continuación (137, 152).

Todas las operaciones de cultivo se efectuaron en un banco de flujo laminar estéril, marca “Filtrar”, clase 10.000 adquirido en Pregliasco SRL, Buenos Aires, Argentina.

Se sembraron $2,5 \times 10^6$ células por botella conteniendo medio de cultivo Esencial Mínimo de Eagle (MEM, por sus siglas en inglés) con sales de Earle, piruvato de potasio y suero fetal bovino al 10% inactivado (147). El medio de cultivo cuya composición se muestra en la tabla 3 fue preparado en nuestro laboratorio. La esterilización del mismo se realizó por filtración a través de Filtro Sartorius de 0,22 μ M de diámetro de poro, esterilizado previamente por autoclavado a 1,5 atmósferas durante 15 minutos. El suero fetal bovino estéril se obtuvo de la empresa Gen SA. El mismo se inactivó calentándolo a 56 °C en baño termostático durante 1 hora. Una vez inactivado, se agregó al medio estéril y el medio completo se conservó en botellas de vidrio esterilizadas por autoclavado que se conservaron a 4°C.

Los subcultivos se realizaron despegando las células de la pared de la botella con una solución salina isotónica de tripsina estéril al 0,25%. Luego, las células despegadas se resuspendieron en medio MEM y una alícuota (cociente de siembra 1:5) se transfirió a botellas de cultivo estéril. La actividad enzimática de la tripsina se inhibió mediante el agregado de medio de cultivo, el cual contiene suficiente actividad antitripsina, y las

botellas se llevaron a un incubador para cultivo celular marca “Bergman”, Alemania. Las células se incubaron a 37°C y los subcultivos se realizaron cada 7 días. El estado de las monocapas se controló por microscopía y pruebas microbiológicas. Los subcultivos suministraron material para mantenimiento de la línea y experimentación.

El medio de cultivo MEM fue reemplazado por el medio químicamente definido IMEM-Zo durante los períodos de incubación experimental con inmunosupresores. En la tabla 4 se indica la composición del medio IMEM-Zo.

II.2.H.b. Recuento de células y estimación de la viabilidad

Los procedimientos seguidos para la preparación de células HepG₂ suministraron poblaciones homogéneas con elevada viabilidad y reproducibilidad de comportamiento metabólico.

Las suspensiones celulares se contaron en un hemocitómetro del tipo Neubauer, efectuando diluciones apropiadas a la densidad celular de modo tal de obtener alrededor de unas 100 células por cuadrante mayor. La estimación de la viabilidad celular se efectuó por medio del test de azul de tripán (solución isotónica al 0,2%) el que, rutinariamente, indicó que el 90% o más de las células se encontraban en adecuadas condiciones de viabilidad (153).

Tabla 3. Composición del Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle con sales Earle y aminoácidos no esenciales

Componentes	Concentración (gramos / litro)
SALES INORGÁNICAS	
Cloruro de Calcio (Anhidro)	0,26500
Sulfato de Magnesio 7 H ₂ O	0,10000
Cloruro de Potasio	0,40000
Cloruro de Sodio	6,80000
Fosfato Monobásico de Sodio (Anhidro)	0,12500
Bicarbonato de Sodio	2,20000
AMINOÁCIDOS	
L-Alanina	0,00890
L-Arginina HCl	0,12600
L-Asparagina H ₂ O	0,01500
L-Ácido Aspártico	0,01330
L-Cistina 2HCl	0,03130
L-Ácido Glutámico	0,01470
L-Glutamina	0,29200
Glicina	0,00750
L-Histidina HCl H ₂ O	0,04200
L-Isoleucina	0,05200
L-Leucina	0,05200
L-Lisina HCl	0,07250
L-Metionina	0,01500
L-Fenilalanina	0,03200
L-Prolina	0,01150
L-Serina	0,01050
L-Treonina	0,04800
L-Triptofano	0,01000
L-Tirosina (Disódica)	0,05190
L-Valina	0,04600
VITAMINAS	
Cloruro de Colina	0,00100
Ácido Fólico	0,00100
mio-Inositol	0,00200
Niacinamida	0,00100
D-Ácido Pantoténico (Calcio)	0,00100
Piridoxal ClH	0,00100
Riboflavina	0,00010
Tiamina ClH	0,00100
OTROS	
Glucosa	1,00000
Rojo de Fenol	0,01100
Piruvato de Sodio	0,11000

El pH del medio a 25°C es $7,5 \pm 0,3$ y la osmolaridad expresada en mOsm/Kg H₂O es $297 \pm 5\%$

Tabla 4. Composición del Medio IMEM Zo (modificado)

Componentes	Concentración (gramos / litro)
SALES INORGÁNICAS	
Cloruro de Calcio (Anhidro)	0,26500
Sulfato de Magnesio 7 H ₂ O	0,02500
Cloruro de Potasio	0,40000
Cloruro de Sodio	6,80000
Fosfato Monobásico de Sodio	0,15000
Cloruro de Magnesio	0,18500
Cloruro Férrico	0,00050
Sulfato de Zinc	0,00014
AMINOÁCIDOS	
L-Arginina HCl	0,12700
L-Asparagina H ₂ O	0,06000
L-Cistina	0,02400
L-Histidina	0,04190
L-Isoleucina	0,05200
L-Leucina	0,13220
L-Lisina	0,07200
L-Metionina	0,01500
L-Fenilalanina	0,03200
L-Serina	0,04200
L-Treonina	0,04800
L-Triptofano	0,01000
L-Tirosina	0,03600
L-Valina	0,04600
VITAMINAS	
Cloruro de Colina	0,05600
mio-Inositol	0,03600
Pantotenato de Calcio	0,00100
Fosfato de Piridoxal	0,00100
Riboflavina	0,00010
Tiamina	0,01000
Vitamina B ₁₂	0,00136
D-Biotina	0,00010
Niacinamida	0,00100
OTROS	
Glucosa	2,00000
Rojo de Fenol	0,01100
Piruvato de Sodio	0,11000
Ácido Tióctico	0,00020
Putrescina	0,00016
Estreptomicina	010000

Principales modificaciones introducidas a la formulación original: eliminación de las sales de cobalto, disminución de la concentración de calcio y omisión del agregado de ácido linoleico e introducción del HEPES como sistema buffer principal. El pH del medio se ajustó a 7,3-7,4.

II.2.H.c. Efecto de la ciclosporina A y el sirolimus sobre la composición de ácidos grasos celulares de células HepG₂

Una vez obtenida la cantidad deseada de botellas subcultivadas (N=35) y al alcanzar la fase logarítmica de crecimiento se inició el tratamiento con distintas concentraciones de los inmunosupresores cada 24 horas durante 3 días. La dosis de tratamiento se desprende de la literatura consultada, según Rayyes y col. (23, 25) y Sahin y col. (26), iniciando los experimentos con dosis mínimas para por un lado, no afectar la viabilidad y por otro lado, escoger la dosis adecuada para el posterior tratamiento con los AG marcados. Se constituyeron los siguientes lotes:

- **Lote CsA:** (CsA-1 μ g/ μ l), N=7 y (CsA-2 μ g/ μ l), N=7.
- **Lote SRL:** (SRL-10ng/ml), N=7. y (SRL-10ng/ml), N=7.
- **Lote control:** un lote de células se cultivó sin el tratamiento inmunosupresor, N=7.

Pasadas las 24 horas del último día de tratamiento se descartó el medio de incubación y se realizó la recolección de las células en tubos. Las mismas fueron procesadas para el análisis de composición de AG de lípidos totales y contenido proteico como se indicó previamente, Figura 4.

II.2.H.d. Estudio de la incorporación y desaturación (transformación) de distintos ácidos grasos con marcación radioactiva por la línea tumoral HepG₂ bajo el tratamiento con ciclosporina A y sirolimus

Para el tratamiento de las células HepG₂ con las drogas inmunosupresoras y AG marcados se procedió aplicando la metodología descrita anteriormente (II.2.H.c.), adicionando AG marcados para investigar la actividad de diferentes enzimas relacionadas

con la síntesis de AG y su incorporación a la célula. Se utilizaron como sustratos los siguientes AG marcados: palmítico-[1- ^{14}C]; linoleico-[1- ^{14}C] y eicosa-8,11,14-trienoico-[1- ^{14}C] mantenidos en tolueno bajo atmósfera de nitrógeno y a -20°C , según técnica de Marra y col. (154). Los AG se agregan al medio de cultivo IMEM Zo 24 horas antes de finalizar el experimento. La extracción separación y análisis de los lípidos se realizó según la técnica descrita por Marra y col. (154). En la Figura 5 se detalla el protocolo de este experimento.

Fig. 4. Representación esquemática de los experimentos II.2.H.c.

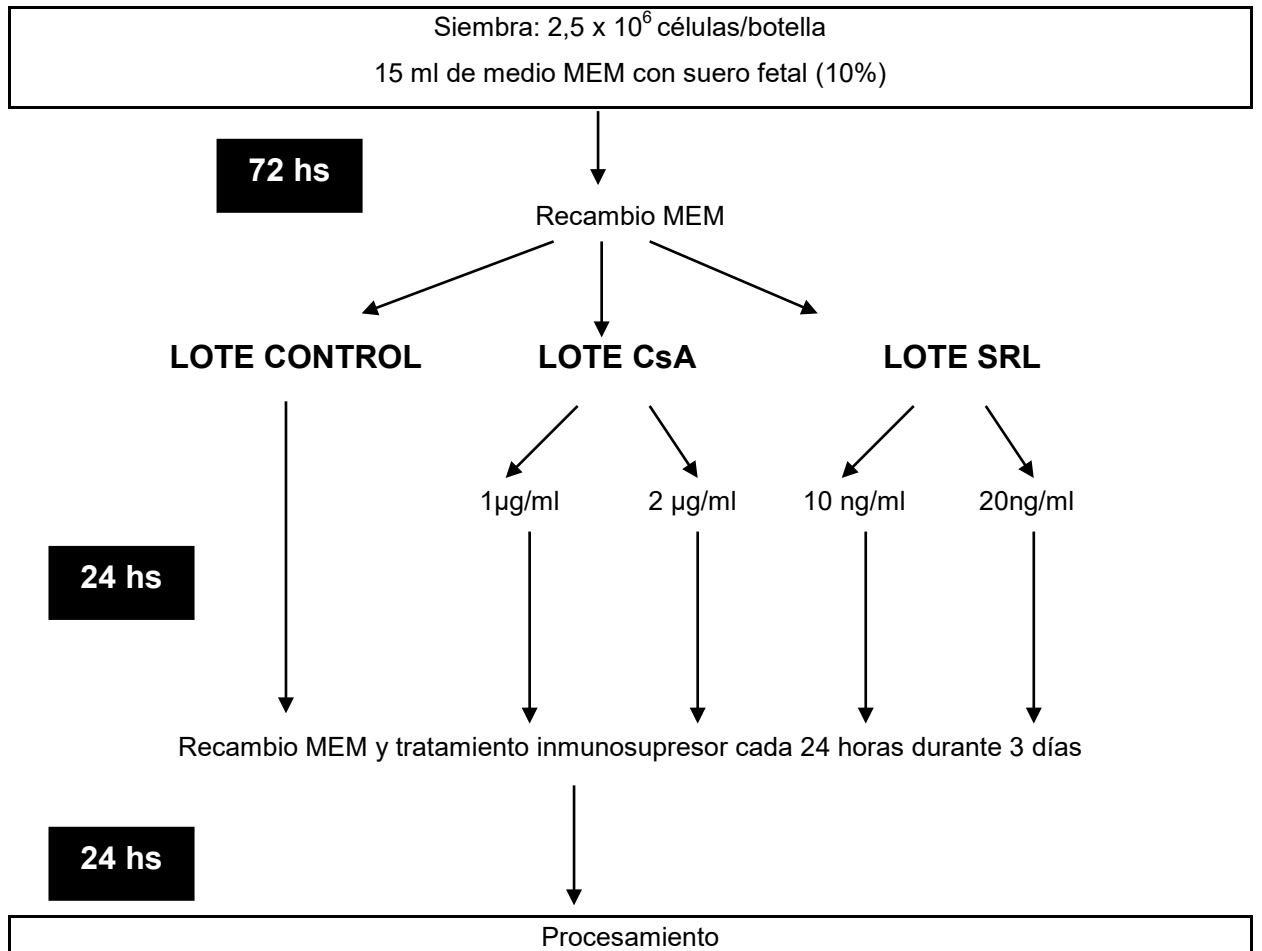
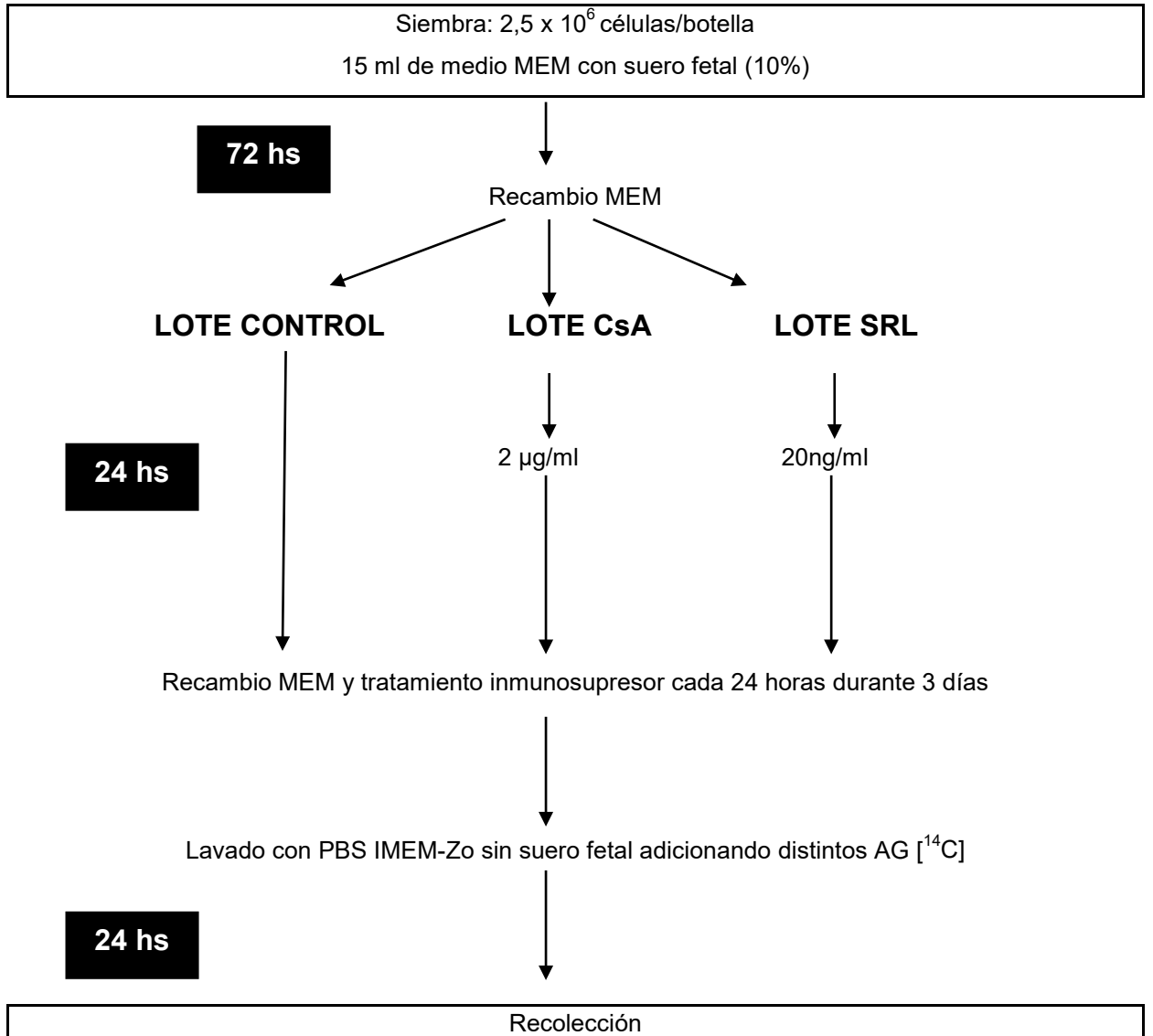


Fig. 5. Representación esquemática de los experimentos II.2.H.d.



II.2.H.e. Cálculo de la incorporación total de los sustratos exógenos radioactivos

El cálculo de la incorporación total de los sustratos exógenos radiactivos se realizó relacionando la radiactividad incubada con la encontrada en el extracto lipídico de las células mediante centelleo líquido en un equipo (Pharmacia, Turku, Finland) con 97% de eficiencia para ^{14}C (dilución isotópica).

Terminada la incubación los EMAG fueron llevados a un volumen apropiado en éter de petróleo (sobre lecho de hielo para evitar su evaporación) a partir del cual se tomaron alícuotas (10 μL) para conteo de radiactividad.

Las alícuotas se transfirieron a viales de plástico con 2,5 mL de solución de centelleo (POPOP, PPO, Tolueno y Tritón).

II.2.H.f. Medición de ácidos grasos por radiocromatografía gas-líquido

Radiocromatografía gas-líquido:

El análisis del perfil de AG de los lípidos totales nos permitió investigar la actividad de las enzimas desaturantes y elongantes y las rutas metabólicas involucradas en el anabolismo de los AG en presencia de drogas inmunosupresoras.

Para el análisis de los EMAG marcados con ^{14}C se recurrió a una combinación de la GLC con un sistema de conteo proporcional y de registro diferencial de la corriente de polarización, inducida por la llegada de emisores β a una cámara de Geiger-Muller.

Fundamento:

El fundamento de este sistema de análisis por radio GLC fue descrito por James y Piper en 1961 (155). Los EMAG se inyectaron (2 μ L) disueltos en éter de petróleo en un cromatógrafo Varian (Star 3400 Cx), a través de un mecanismo divisor de la corriente de gas, a un sistema de detección de radiactividad de gas GC-RAM (Inus System Inc. Tampa, FL). Las muestras fueron corridas utilizando distintos métodos según el AG marcado utilizado en la incubación de las células. En el caso de palmítico-[1- 14 C] y eicosa-8,11,14-trienoico-[1- 14 C] la temperatura inicial de corrida fue de 175° C que se mantuvo durante 1 minuto. Luego se incrementó 1°C hasta alcanzar 190°C en la que permaneció 1 minuto. La segunda rampa de calentamiento fue de 2°C por minuto hasta 220°C donde permaneció 1 minuto. En el caso de linoleico-[1- 14 C] la temperatura inicial de corrida fue de 175°C que se mantuvo durante 1 minuto para ir aumentando 1°C/minuto hasta 190°C en la que permaneció 1 minuto para ir aumentando a razón de 4°C/minuto hasta 220°C en la que permaneció 10 minutos. Para todos los AG analizados la temperatura del inyector fue de 230°C y la del detector 260°C, y el tiempo de corrida 38 minutos. El flujo de gas carrier (Argón purísimo) fue de 24 mL/minuto mientras que la del gas quencher o extintor (CO₂ puro) de 2,5 mL/minuto.

La inscripción de los picos correspondientes a radiactividad y masa se realizó simultáneamente con un aparato LKB 2210 recorder de 2 canales. Los cálculos de radiactividad encontrada se realizaron identificando los picos a partir de sus tiempos de retención relativos comparados con estándares bajo las mismas condiciones de medida.

II.2.H.g. Determinación de proteína celular total

El dosaje de la proteína celular total en suspensiones de células HepG₂ se llevó a cabo utilizando una alícuota de la suspensión celular la cual se centrifugo a baja velocidad (1500 xg, 5 min.) y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El pellet celular se resuspendió en un pequeño volumen de solución fisiológica (usualmente 200 μ L) y se sometió a digestión con reactivo “C” de Lowry. Se tomaron alícuotas apropiadas y se aplicó la técnica de Lowry (135).

En todos los casos, los cálculos se efectuaron mediante un coeficiente de calibración obtenido de la pendiente de una curva estándar. Como solución standard de proteína se utilizó albúmina sérica bovina (fracción V), a concentración de 0,5 mg/mL.

II.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados utilizando test de Student y análisis de varianza (ANOVA). Los datos fueron transformados a arcoseno para su análisis apropiado cuando se tratara de datos proporcionales.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

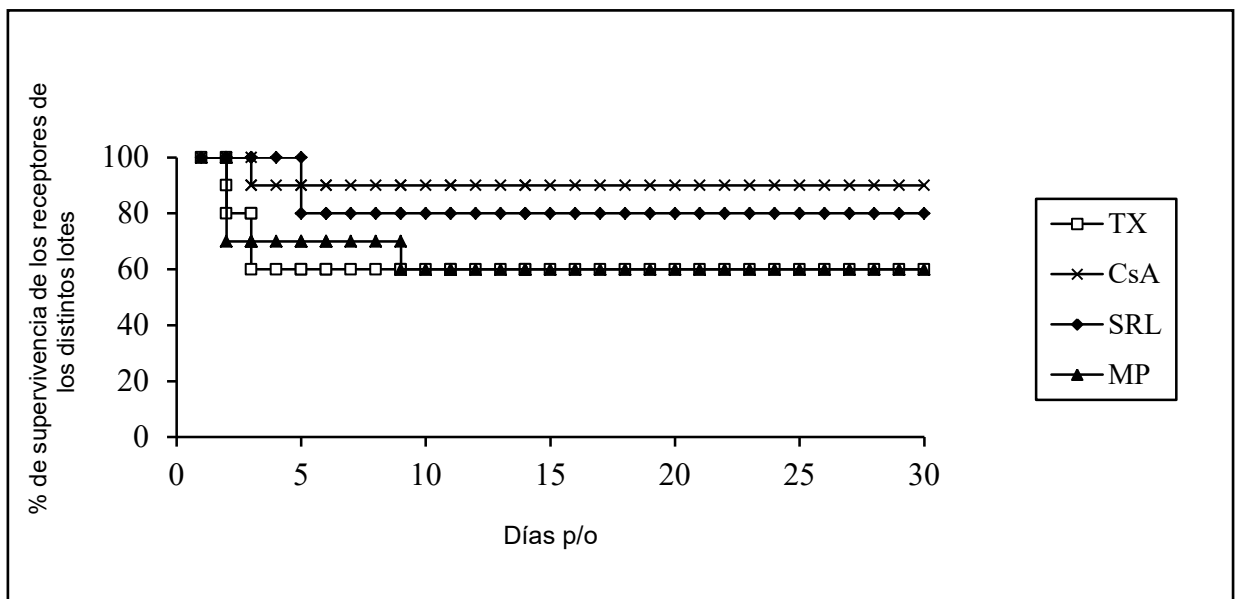
III.1. QUIRÚRGICOS

III.1.A. Supervivencia de las ratas trasplantadas

La supervivencia de las ratas trasplantadas sin tratamiento inmunosupresor y tratadas con CsA, SRL y MP se representa en la Figura 6 (Kaplan-Meier). Se excluyeron los receptores que murieron dentro de las primeras 24 horas del p/o por complicaciones anestésicas (n=5) y asociadas a la técnica quirúrgica durante la disección o el implante renal (n=3). En 3 receptores (lote TX n=2 y lote CsA n=1) al palpar un aumento del volumen del abdomen, entre los días 3 y 7 del p/o se lo exploró quirúrgicamente y se descartaron al observar en estos RT hidronefrosis, ocasionada por estenosis del uréter al realizar la anastomosis. Esta complicación también se asocia a la técnica quirúrgica. En el lote TX se sacrificaron 5 animales y 3 en el lote MP por presentar un deterioro general grado 4 (ver planilla p/o Tabla 2) que consistió en: piloerección, trastornos en la deambulación, anorexia, pérdida de peso, deshidratación y dolor abdominal entre los días 5 y 15 del p/o. A la necropsia revelaron ascitis, y adherencias de la cápsula renal del RT a las asas intestinales. La microscopia de estos RT reveló un abundante infiltrado mononuclear que afectaba glomérulos, vasos, intersticio y túbulos, además de necrosis tubular y edema intersticial, cambios compatibles con rechazo severo. Por este motivo y a pesar de programar lotes con una N de 11 receptores, suspendimos el lote TX, por razones bioéticas, al alcanzar 6 receptores la supervivencia de 30 días, ya que es incompatible la supervivencia prolongada sin tratamiento inmunosupresor. Resultados similares al lote TX fueron obtenidos en el lote MP en el cual también se incluyeron sólo 6 receptores en

el análisis. Además, en el lote MP se sacrificó un receptor a los 7 días del p/o por presentar infección de la herida con compromiso abdominal. En el lote SRL se hallaron muertos 2 animales trasplantados uno a las 48 hs del p/o que a la necropsia reveló una profusa hemorragia originada en la anastomosis arterial, y el otro a los 7 días de supervivencia por dehiscencia del uréter. En el lote CsA a los cuatros días del p/o se halló muerto un receptor que a la exploración abdominal no presentó alteración aparente del injerto y no se pudo establecer la causa de muerte. Finalmente, se alcanzó una supervivencia de: 60% en el grupo control, 60% en el lote MP, 80% en el lote SRL y 90% en el lote CsA.

Fig. 6. Supervivencia de los receptores



Se alcanzó una supervivencia de: 60% en el lote TX, 60% en el lote MP, 80% en el lote SRL y 90% en el lote CsA.

III.2. EVALUACION MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL RENAL

III.2.A. Aspecto macroscópico de los riñones trasplantados y propios sometidos al tratamiento inmunosupresor.

La Figura 7 muestra la macroscopía de los RT y RP al momento del sacrificio de los receptores de los distintos lotes estudiados. Los RT del lote TX presentan alteraciones compatibles con rechazo tales como disminución del tamaño, superficie despulida y dilatación pielocalicial al compararlos con los RP. Cambio similares se observan en los RT del lote MP. En cambio los RT de los lotes CsA y SRL no presentan modificaciones macroscópicas conservando tamaño, peso, forma y consistencia similares a los RP.

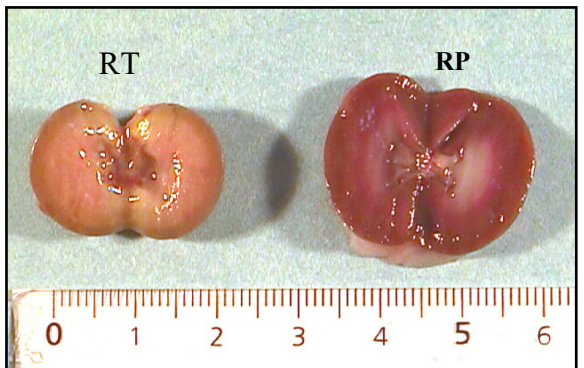
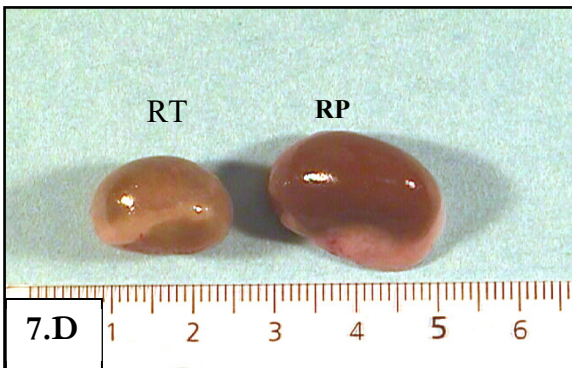
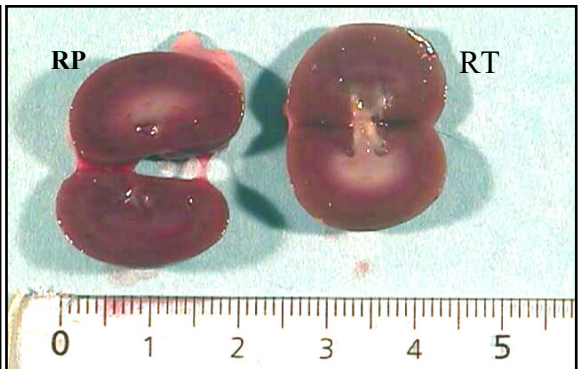
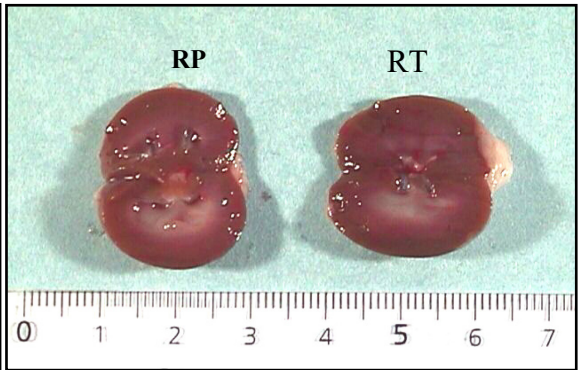
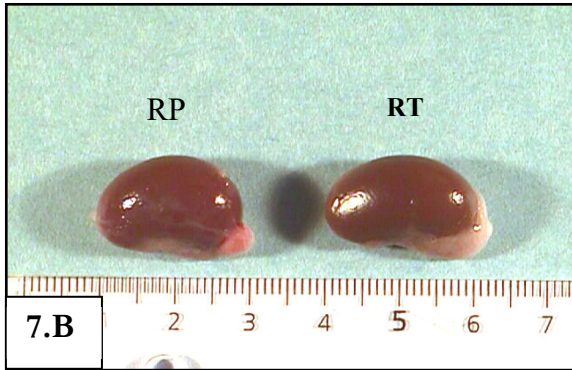
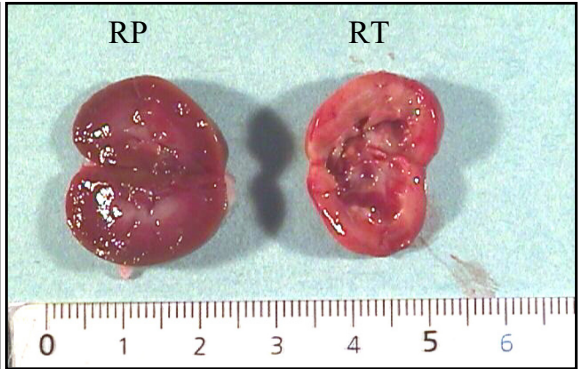
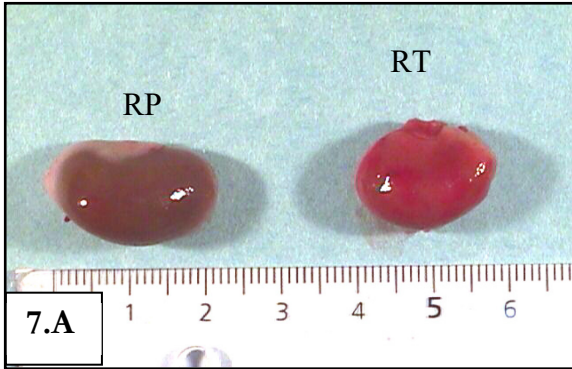
Fig. 7. Aspecto macroscópico de riñones trasplantados y propios

7.A. Lote TX. RP: Riñón de aproximadamente 2,0 x 1,2 x 0,6 cm de tamaño, de 2 gr de peso. Color rojo violáceo, superficie lisa y brillante. Al corte se observa consistencia elástica, corteza de 0,5 cm de espesor, color similar al de la superficie. Médula de 0,5 cm, color rosado-rojizo. **RT:** Riñón de aproximadamente 1,6 x 1,0 x 0,5 cm de tamaño, de 1,0 gr de peso. Color rojizo y superficie ligeramente despulida con áreas congestivas. Al corte, consistencia aumentada respecto al RP, corteza de 0,4 cm de espesor. De color rojo vinoso. Médula de 0,4 cm, intensamente congestiva, sistema pielo-calicial dilatado.

7.B. Lote CsA. RP: Riñón de aproximadamente 2,2 x 1,2 x 0,6 cm de tamaño, de 2 gr de peso. Color rojo violáceo, superficie lisa y brillante. Al corte se observa consistencia elástica, corteza de 0,5 cm de espesor, color similar al de la superficie. Médula de 0,5 cm, color rosado-rojizo. **RT:** Riñón de aproximadamente 1,8 x 1,0 x 0,5 cm de tamaño, de 1,8 gr de peso. Color rojo violáceo, superficie lisa y brillante. Al corte consistencia elástica, corteza de 0,5 cm de espesor de color similar al de la superficie. Médula de 0,5 cm, color rosado-rojizo.

7.C. Lote SRL. RP: Riñón de aproximadamente 1,8 x 1,2 x 0,6 cm de tamaño, de 2 gr de peso. Color rojo violáceo, superficie lisa y brillante. Al corte se observa consistencia elástica, corteza de 0,6 cm de espesor, color similar al de la superficie. Médula de 0,5 cm, color rosado-rojizo. **RT:** Riñón de aproximadamente 1,7 x 1,0 x 0,5 cm de tamaño, de 1,8 gr de peso. Color rojo violáceo, superficie lisa y brillante. Al corte consistencia elástica, corteza de 0,5 cm de espesor de color similar al de la superficie. Médula de 0,5 cm, color rosado-rojizo.

7.D. Lote MP. RP: Riñón de aproximadamente 2,2 x 1,2 x 0,6 cm de tamaño, de 2 gr de peso. Color rojo violáceo, superficie lisa y brillante. Al corte se observa consistencia elástica, corteza de 0,6 cm de espesor, color similar al de la superficie. Médula de 0,5 cm, color rosado-rojizo. **RT:** Riñón de aproximadamente 1,6 x 0,8 x 0,5 cm de tamaño, de 1,4 gr de peso. Color blanquecino amarillento y superficie lisa. Al corte no se distingue claramente el límite entre corteza y médula. Consistencia firme, de color similar al de la superficie.



III.2.B. Estudio morfológico del efecto inmunosupresor de la monoterapia con ciclosporina A, sirolimus y metilprednisona. Grado de rechazo del “graft”.

La Tabla 5 describe el análisis histopatológico semicuantitativo de los RT de los lotes estudiados. El grado morfológico de rechazo del injerto se clasica como ausente (-), leve (+), moderado (++) o severo (+++). El análisis de los RT de los receptores del lote TX y MP reveló un grado de rechazo severo, presentando a nivel intersticial densos infiltrados inflamatorios mononuclear y edema; glomérulos con vasocongestión leve e hiper celularidad; tubulitis moderada, necrosis tubular focal; moderada hialinización y engrosamiento intimal vascular, Figura 8. La terapia inmunosupresora con CsA y SRL atenuó los cambios morfológicos compatibles con rechazo y los RT de los lotes CsA y SRL presentan un grado leve de rechazo con moderada infiltración leucocitaria focal selectivamente en el intersticio, glomérulos con hiper celularidad leve y fibrosis periglomerular. Se observa en ambos lotes preservación de estructuras vasculares; Figura 8.

Tabla 5. Estudio histopatológico de los riñones trasplantados.

	Glomérulo				Intersticio				Túbulos				Vasos			
	TX	Cs A	SR L	MP	TX	CsA	SRL	MP	T X	Cs A	SR L	M P	T X	Cs A	SR L	M P
Necrosis	+	-	-	-/+	-	-	-	-/+	++	-	-	+	-	-	-	-
Vasocongestión	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-/+
Infiltración leucocitaria	+/+	-	-	+/+	+/+/+	+/+	+/+	+/+/+	-/+	-	-	-/+				
Edema	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Engrosamiento intimal													++	-	-	-/+
Proliferación capsular	+	+	+	-												
Fibrosis periglomerular	+	+	+	+												
Hiper celularidad	+++	+	+	++												
Dilatación									++	+	-/+	- /+ +				

Cambios: (-) ausentes; (+) leves; (++) moderados, (+++) severos.

Fig. 8. Estudio morfológico del efecto inmunosupresor de la monoterapia con ciclosporina A, sirolimus y metilprednisona.

8.A. Lote TX. Marcada infiltración leucocitaria intersticial (flecha negra), dilatación tubular (*) y engrosamiento de la íntima de una arteriola (#). Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 25X.

8.B. Lote TX. Marcada fibrosis periglomerular (flecha negra) y proliferación capsular (*). Tinción: PAS, objetivo 25X

8.C. Lote CsA. Infiltración leucocitaria focal (flecha negra) e hiper celularidad glomerular (*). Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 25X.

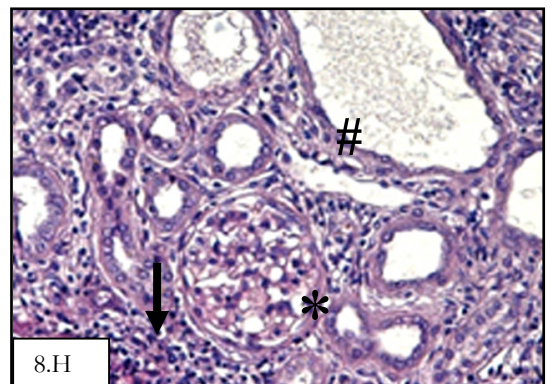
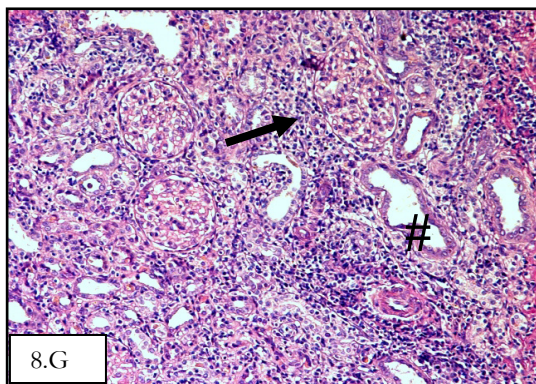
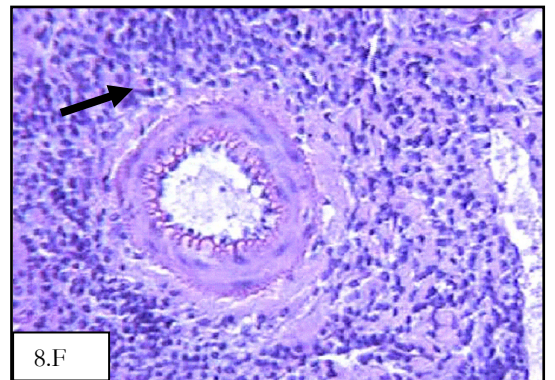
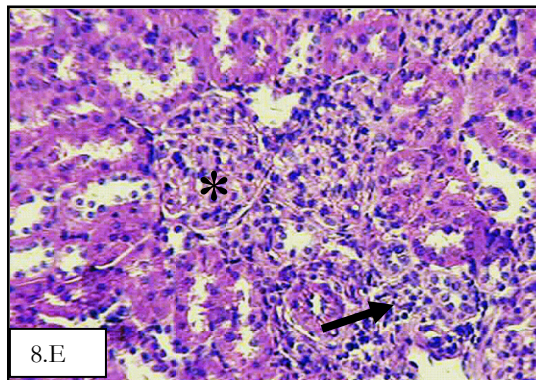
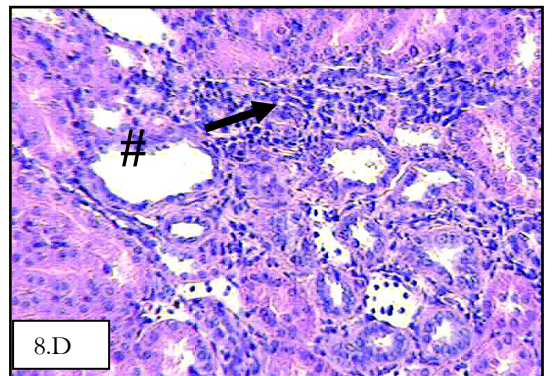
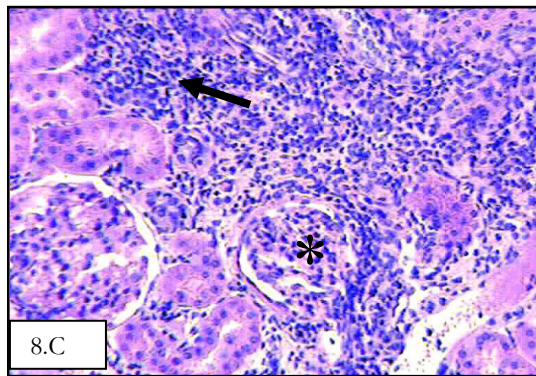
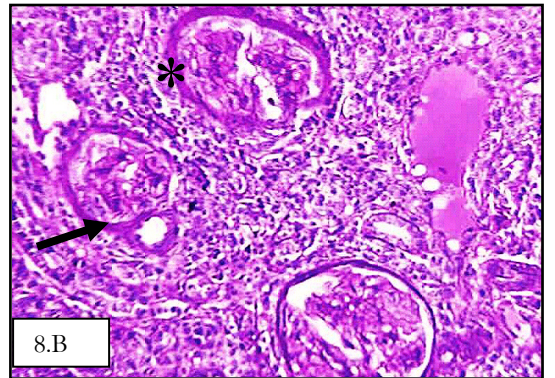
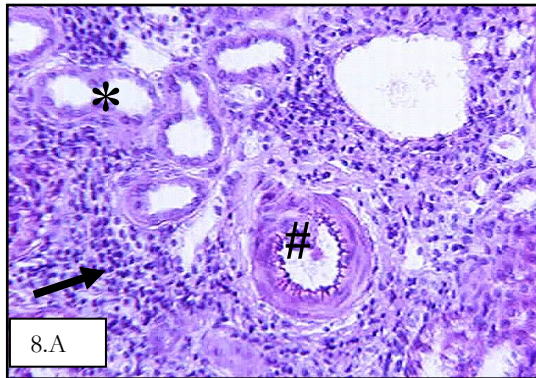
8.D. Lote CsA. Infiltrado leucocitario (flecha negra) y dilatación tubular focales (#). Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 25X.

8.E. Lote SRL. Infiltración leucocitaria intersticial focal (flecha negra). Leve hiper celularidad glomerular (*). Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 25X.

8.F. Lote SRL. Infiltrado leucocitario que respeta la pared vascular. Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 40X.

8.G. Lote MP. Imagen panorámica de los cambios compatibles con rechazo. Infiltrado mononuclear intersticial (flecha negra) y dilatación tubular (#). Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 10X.

8.H. Lote MP. Fibrosis periglomerular (*). Infiltrado mononuclear intersticial (flecha negra) y dilatación tubular (#). Tinción: Hematoxilina-Eosina, objetivo 40X.



III.2.C. Determinaciones séricas: urea y creatinina.

En la tabla 6 se presentan los resultados de urea y creatinina obtenidos al momento del sacrificio. Los valores de creatinina oscilan dentro de los valores fisiológicos de creatininemia de la rata de laboratorio (156), a pesar del deterioro observado en la histología de los RT en los receptores sin tratamiento inmunosupresor (ver III.2.B.). Sin embargo, la uremia presenta un aumento estadísticamente significativo en todos los lotes estudiados respecto a los valores basales.

Tabla 6. Uremia y creatininemia al momento del sacrificio.

	CONTROL (N=10)	TX (N=6)	CsA (N=6)	SRL (N=8)	MP (N=9)
Creatinina (mg/dl)	1,10 ± 0,05	1,05 ± 0,03	0,83 ± 0,06	0,85 ± 0,04	1,19 ± 0,06
Urea (mg/dL)	0,40 ± 0,04	0,65 ± 0,02**	0,68 ± 0,04**	0,66 ± 0,05**	0,69 ± 8,0**

Los datos representan la media ± ES. (**) P<0,01 vs control.

III.3. ANÁLISIS DEL PERFIL LIPÍDICO DE RATAS TRASPLANTADAS

TRATADAS CON DISTINTOS INMUNOSUPRESORES

III.3.A. Lípidos séricos: colesterol, lipoproteínas y triglicéridos.

En la tabla 7 se detallan los valores obtenidos de lípidos séricos de las ratas controles y de los receptores tratados y no tratados al cabo de 30 días del p/o. Se observa un incremento de la trigliceridemia en todos los lotes, siendo más evidente en el lote tratado con MP. Con respecto al Col total y las distintas LP se observa un aumento significativo del Col total en los receptores tratados con las drogas inmunosupresoras, mientras que la fracción

HDL no presenta cambios. Los valores de VLDL se encuentran aumentados de manera altamente significativa en todos los receptores y los de LDL en los lotes tratados con los distintos inmunosupresores.

Tabla 7. Lípidos séricos evaluados al momento del sacrificio

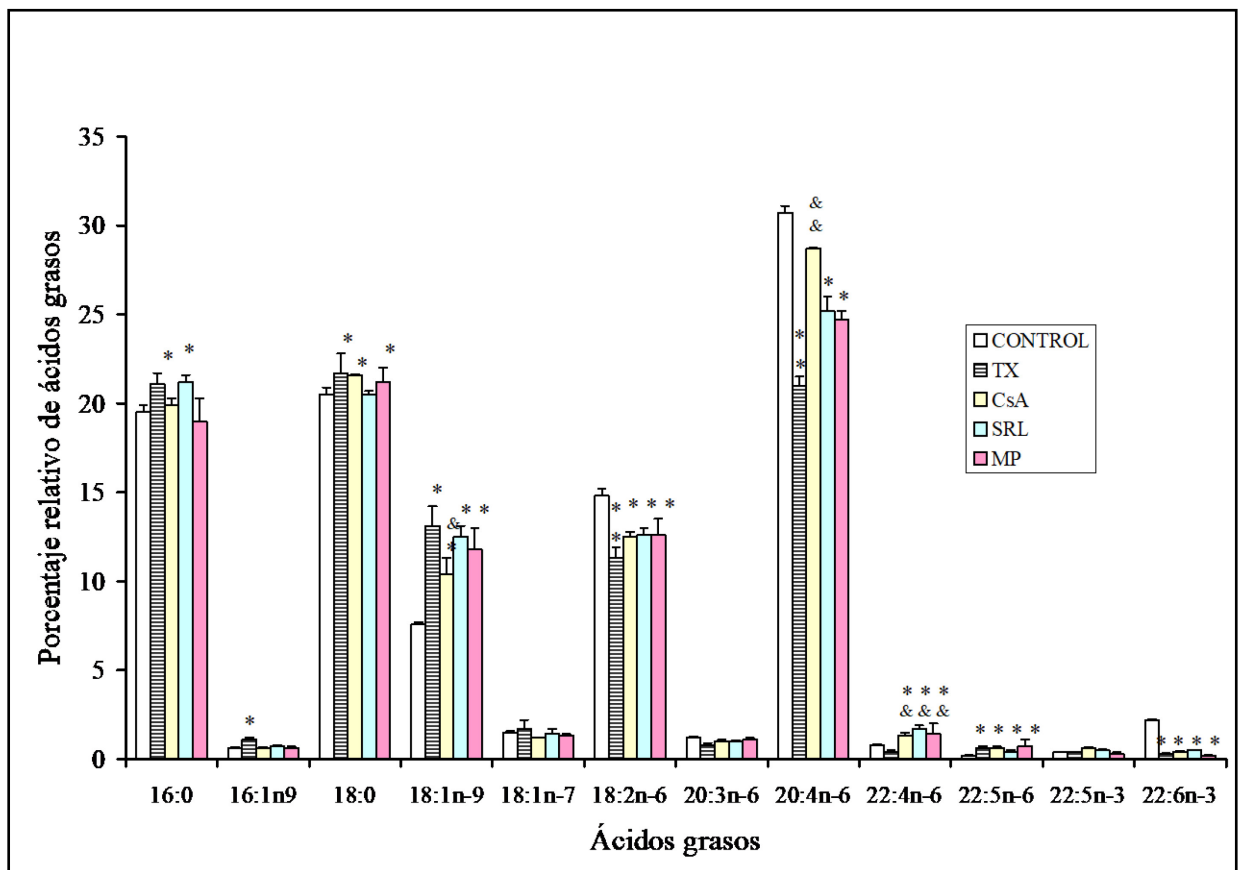
	CONTROL (N=10)	TX (N=6)	CsA (N=9)	SRL (N=8)	MP (N=6)
TG (g/l)	16,7 ± 0,7	63,4 ± 7,8***	61,0 ± 3,0***	56,2 ± 6,2***	97,0 ± 1,0***
CT (mg %)	34,6 ± 0,2	47,6 ± 3,3	76,0 ± 7,0*** &&&	53,2 ± 4,7***	64,0 ± 6,0***
C-HDL (mg %)	24,9 ± 0,2	26,0 ± ,06	28,0 ± 3,0	27,1 ± 1,8	22,3 ± 2,3
C-VLDL (mg %)	3,3 ± 0,1	12,7 ± 1,6***	15,2 ± 1,5***	11,2 ± 1,3***	18,4 ± 1,4***
C-LDL (mg %)	6,1 ± 0,3	8,9 ± 2,5	17,7 ± 3,6*** &&	16,6 ± 2,3*** &&	22,9 ± 5,9*** &&&

Los datos representan la media ± ES. TG triglicéridos, CT colesterol total, C-HDL colesterol-HDL, C-VLDL colesterol-VLDL, C-LDL colesterol-LDL. (***) P<0,001 vs. Control. (&&) P<0,01 y (&&&) P<0,001 vs TX.

III.3.B. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas renales, hepáticos y testiculares.

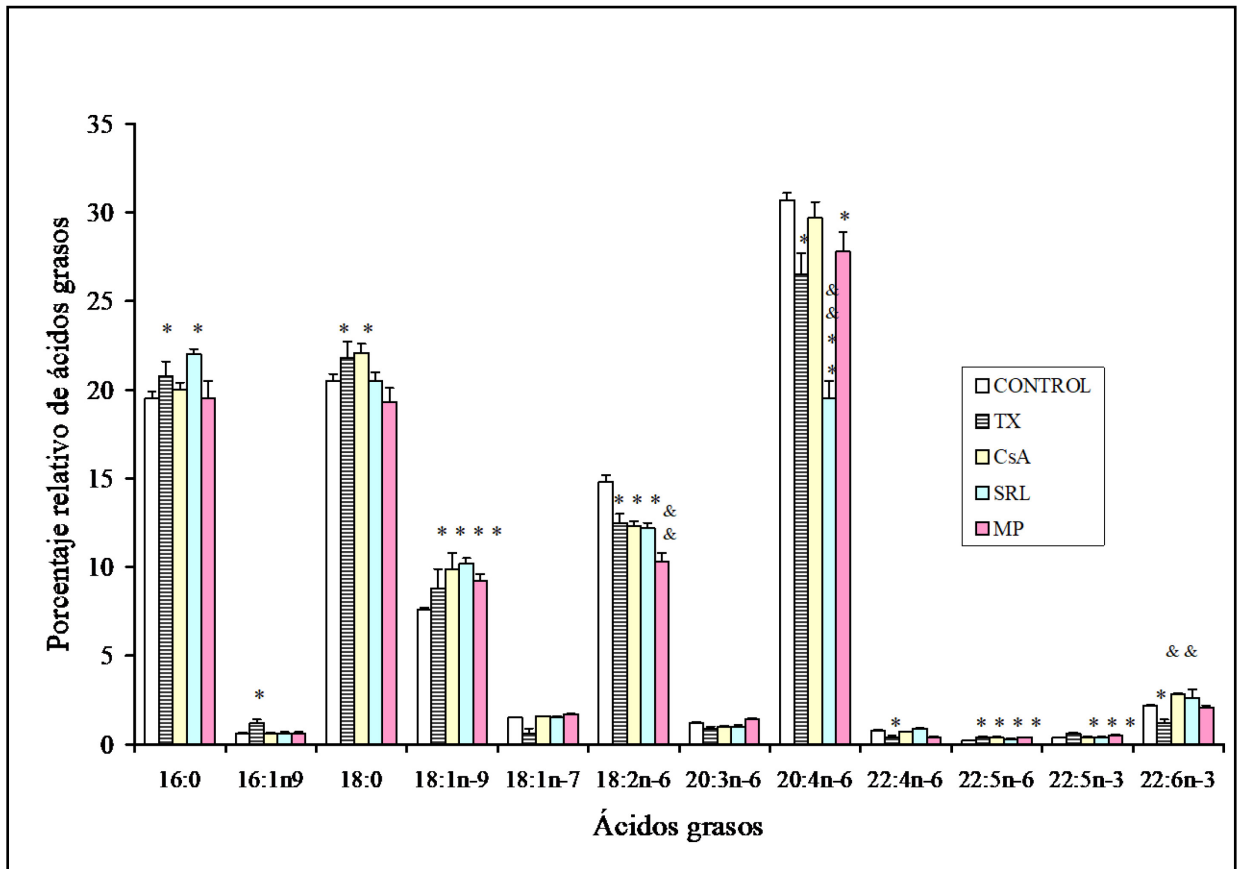
La composición de AG de lípidos totales de microsomas renales se detalla en las Figura 9 y 10. En general, teniendo en cuenta los AG mayoritarios se observa, en ambos riñones (RT y RP), un aumento de los AG saturados y MUFAs (palmítico, esteárico y oleico) y una disminución de los PUFAs linoleico y araquidónico, que es mas marcada aún en los receptores sin terapia inmunosupresora.

Fig. 9. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de riñones trasplantados



Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0,05$ vs control. (&) $P < 0,05$ y (&&) $P < 0,01$ vs TX.

Fig. 10. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de riñones propios



Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$ vs control. (&) $P < 0,05$, (&&) $P < 0,01$ vs TX

La disminución de los MUFAs y PUFAs de los lípidos totales de los micromas renales se ve reflejado en el cociente AG saturados/AG insaturados (Sat/Insat) que se detalla en la Tabla 8. Se puede observar que se pone de manifiesto un significativo incremento de la relación Sat/Insat, tanto en los riñones trasplantados como en los propios de todos los receptores, mantenidos o no con tratamiento inmunosupresor, con respecto a las ratas control. Si analizamos los resultados obtenidos en los PUFAs minoritarios se observa un aumento significativo del 22:4 n-6 y 22:5 n-6 y una disminución significativa del 22:6 n-3 en los RT y un aumento significativo de los ácidos 22:5 n-6 y 22:5 n-3 en los RP.

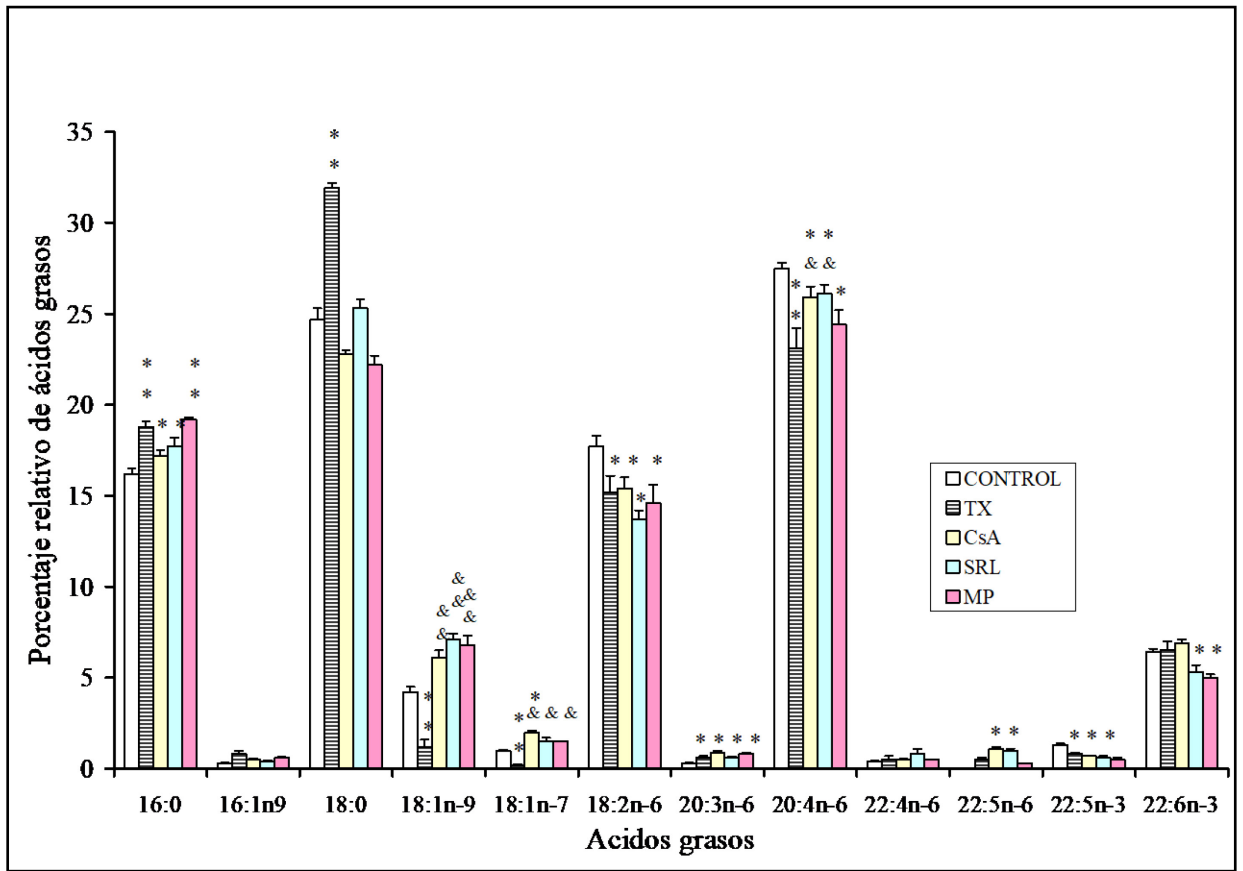
Tabla 8. Cociente saturados/insaturados obtenido de la composición de ácidos grasos de microsomas renales.

	Control (N=10)	Tx (N=6)	CsA (N=9)	SRL (N=8)	MP (N=6)
RT	0,55 ± 0,02	0,75 ± 0,04***	0,71 ± 0,01***	0,67 ± 0,04***	0,68 ± 0,03***
RP	0,55 ± 0,02	0,75 ± 0,04***	0,73 ± 0,01***	0,72 ± 0,01***	0,68 ± 0,00***

Los datos representan la media ± ES. (***) P<0,001 vs control.

Los AG de microsomas hepáticos se grafican en la Figura 11. Se observa un aumento significativo del ácido palmítico en todos los receptores. El incremento del esteárico, el descenso del araquidónico, del 18:1 n-7 y del oleico, son las modificaciones más notorias en el lote TX que se comporta diferente al resto de las ratas trasplantadas. Respecto al resto de los AG el perfil es similar en los lotes tratados con IS presentando un aumento del oleico respecto al lote TX y del 22:5 n-6 respecto al control. El linoleico, araquidónico y el 22:5 n-3 disminuyen en todos los lotes de ratas trasplantadas y selectivamente se observa una disminución del 22:6 n-3 en los receptores tratados con SRL y MP.

Fig. 11. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos



Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$ vs control. (&) $P < 0,05$, (&&) $P < 0,01$ vs TX

El lote TX muestra un deterioro más marcado del perfil de AG que se confirma al analizar el cociente Sat/Insat y el índice de insaturación; del inglés: “unsaturated index” (UI) expresados en la Tabla 9.

$$UI = [(\sum \text{de dobles ligaduras} \times \text{número de moles de AG}) / 100]$$

En los receptores que no fueron sometidos a la terapia inmunosupresora se evidenció un aumento del cociente Sat/Insat que coincidió con un marcado incremento de los ácidos palmítico y esteárico. Esto, sumado a la disminución de los PUFAs mayoritarios determinó una disminución del UI. Los cocientes producto/substrato indicados se

tomaron como marcadores indirectos de la actividad de las enzimas desaturantes, debido a que las etapas de elongación de cadena no constituyen sitios de regulación biosintética en la formación de homólogos superiores. El cociente 16:1 n-9/16:0 y 18:1 n-9/18:0 de la enzima Δ^9 desaturasa, el cociente 20:4 n-6/18:2 n-6 de la actividad de la Δ^6 y Δ^5 desaturasas y el cociente 20:4 n-6/20:3 n-6 de la actividad de la Δ^5 desaturasa. En el grupo TX el cociente 18:1/18:0 se halla fuertemente disminuido, no obstante se ha incrementado en el resto de los lotes. La disminución del cociente 20:4/20:3 implica una disminución de la actividad de la Δ^5 desaturasa en todos los lotes, comparados con el control.

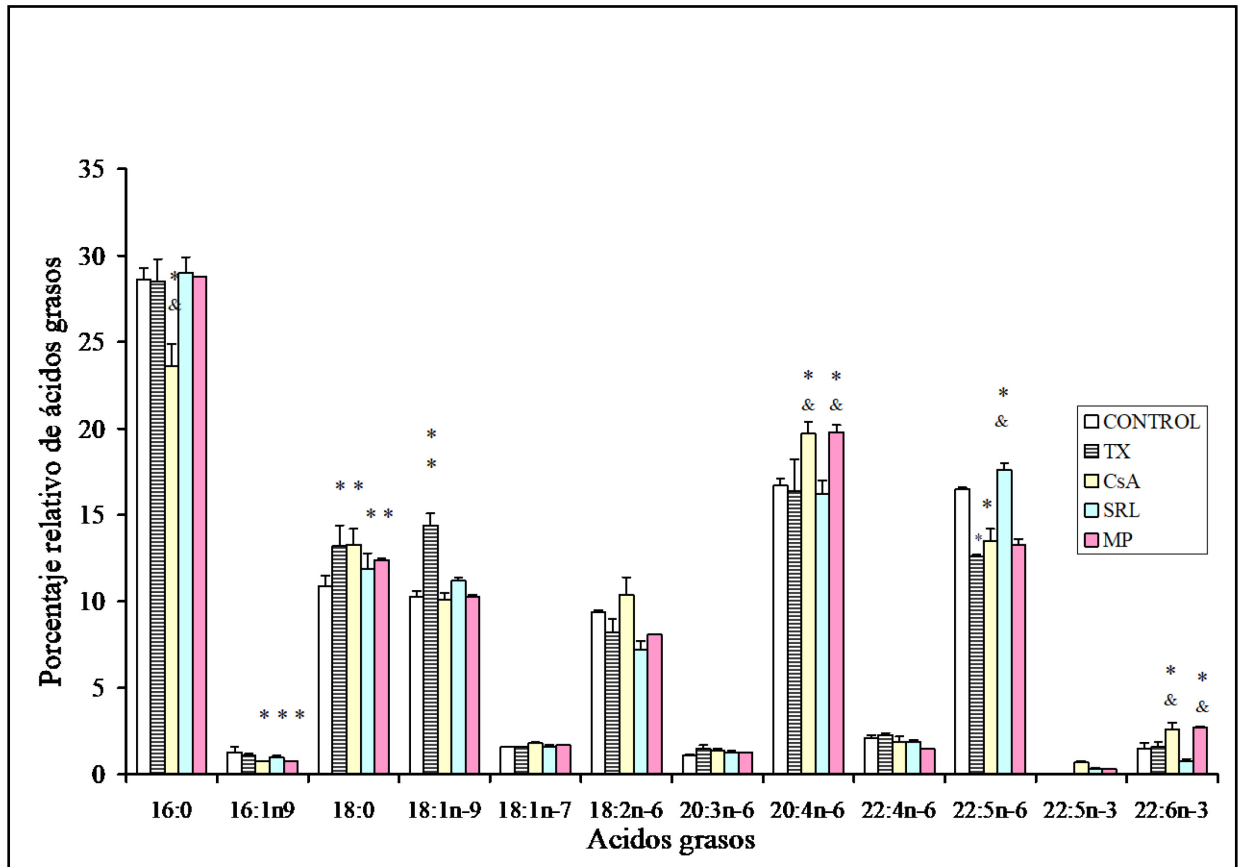
Tabla 9. Cociente ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados e índice de insaturación obtenidos de la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos.

	Control (N=10)	Tx (N=6)	CsA (N=9)	SRL (N=8)	MP (N=6)
Sat/Insat	0,70 ± 0,01	1,10 ± 0,05***	0,67 ± 0,01&&	0,76 ± 0,02&	0,71 ± 0,01&
UI	1,97 ± 0,01	1,67 ± 0,04**	1,95 ± 0,01&&	1,84 ± 0,02	1,92 ± 0,01&
16:1n-9/16:0	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01**	0,03 ± 0,00&	0,02 ± 0,00&&	0,03 ± 0,00&
18: 1n-9/18:0	0,32 ± 0,01	0,07 ± 0,02***	0,47 ± 0,02*,&&&	0,49 ± 0,04*,&&&	0,43 ± 0,02*,&&&
20:4n-6/ 18:2n-6	1,57 ± 0,05	1,57 ± 0,16	1,70 ± 0,08	1,93 ± 0,10	1,69 ± 0,11
20:4n-6/ 20:3 n-6	84,17 ± 4,8	46,43 ± 3,77***	32,80 ± 3,10***	47,64 ± 4,07***	30,72 ± 3,01***

Los datos representan la media ± ES. (*) P<0,05, (**) P<0,01, (***) P<0,001 vs Control.
(&) P<0,05, (&&) P<0,01, (&&&) P<0,001 vs TX.

En los microsomas testiculares se evidencian cambios en la composición de AG con respecto a los controles, Figura 12. El ácido palmítico desciende en los tres lotes tratados y el 18:0 aumenta en todos los receptores. Se observa, además, un marcado incremento del ácido 18.1 n-9 en el lote TX, el araquidónico en los lotes CsA y MP, el 22:5 n-6 en el lote SRL y el 22:6 n-3 en los lotes CsA y MP. Mientras que selectivamente el 22:5 n-6 desciende en el lote TX y en los receptores tratados con CsA.

Fig. 12. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas testiculares

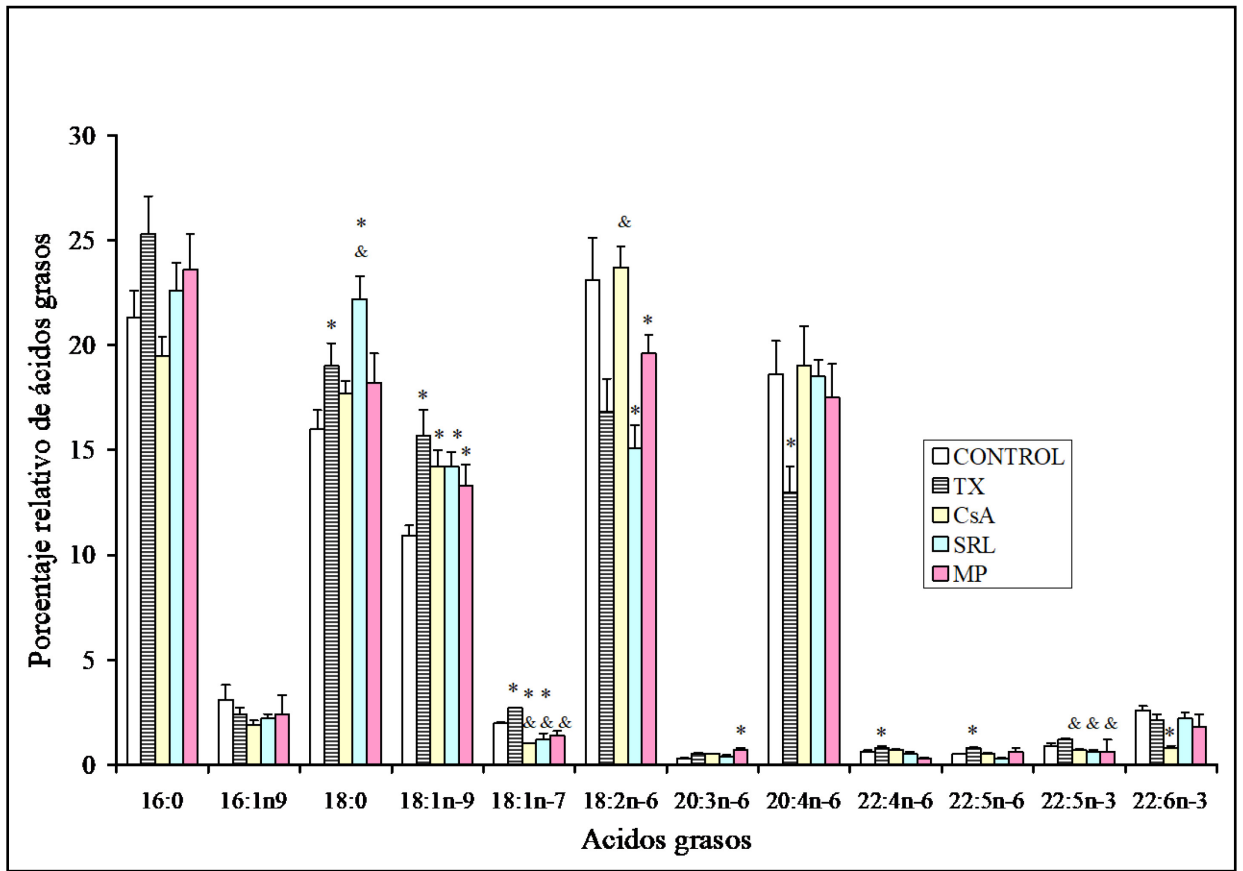


Los datos representan la media ± ES. (*) P<0,05 vs control. (&) P<0,05 vs TX

III.3.C. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de plasma y membrana de eritrocitos.

La composición de AG del plasma se detalla en la Figura 13. Se destaca el aumento significativo del ácido 18:1 n-9 en todos los lotes y un descenso del 18:1 n-7 en los animales que fueron tratados con inmunosupresores; opuestamente el lote TX presenta un aumento significativo de este último AG. La disminución del 22:5 n-3 respecto al lote TX evidencia que este AG regresa a sus valores basales al instaurarse el tratamiento inmunosupresor. Selectivamente se observa un aumento del esteárico en los lotes TX y SRL, y del linoleico en los lotes CsA y MP. En los receptores sin tratamiento inmunosupresor el araquidónico desciende y aumentan el 22:4 n-6 y el 22:5 n-6. En el lote CsA se observa una disminución del 22:6 n-3.

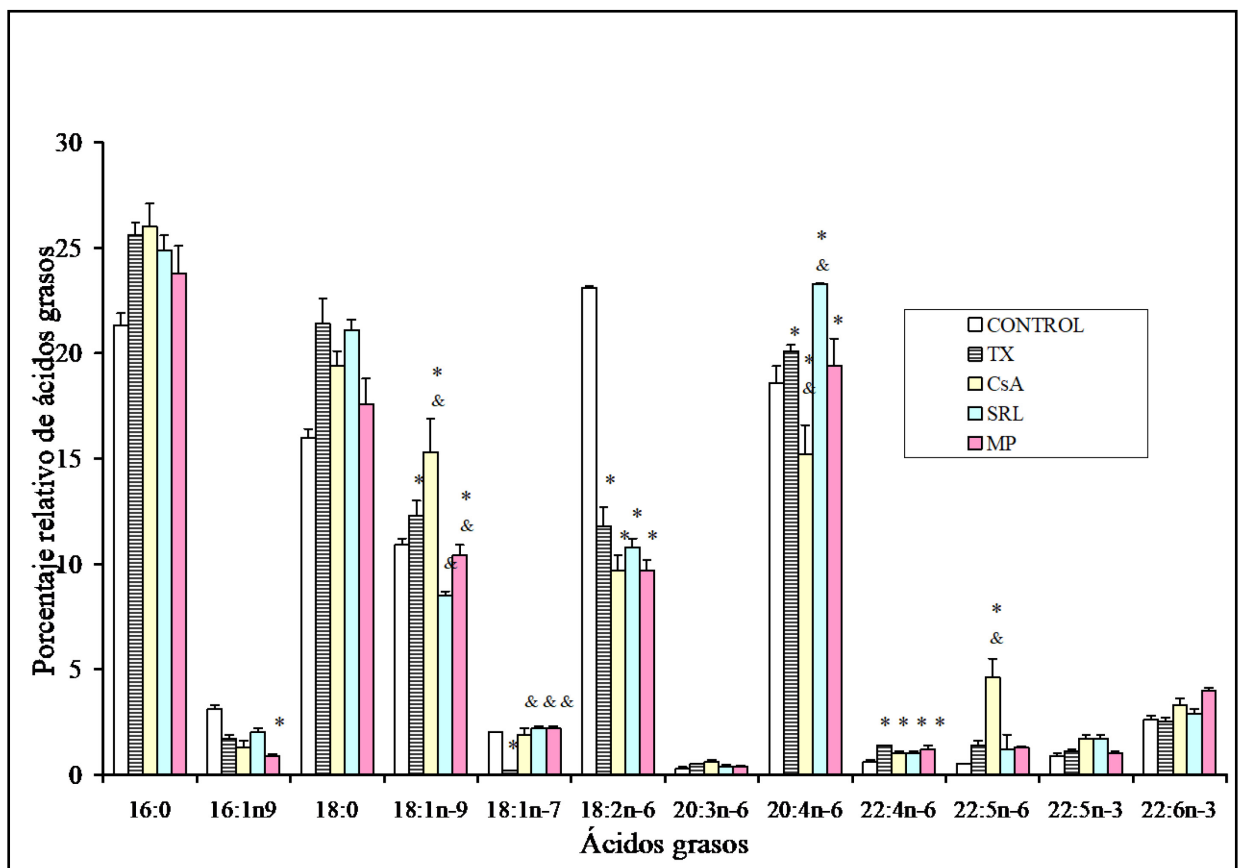
Fig. 13. Composición de ácidos grasos de lípidos totales del plasma



Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0,05$ vs control. (&) $P < 0,05$ vs TX

La composición de AG de las membranas de eritrocitos se grafica en la Figura 14. El descenso del 18:1 n-7 que se observa en el lote TX con respecto al control, regresa a sus valores basales con los diferentes tratamientos inmunosupresores. El aumento del 22:4 n-6 se observa en todos los lotes. Se puede notar además, un aumento del 18:1 n-9 en los lotes TX y CsA, y del araquidónico en los grupos TX y SRL. Los receptores tratados con CsA mostraron un descenso del 20:4 n-6, con respecto al control. La disminución del 18:2 n-6 se pudo detectar en todos los animales trasplantados. Se produce una disminución del palmitoleico en el lote MP y un incremento del 22:5 n-6 en el lote CsA.

Fig. 14. Composición de ácidos grasos de membrana de eritrocitos



Los datos representan la media ± ES. (*) P<0,05 vs Control. (&) P<0,05 vs TX

III.3.C.a. Índice Omega-3

El valor porcentual que surge de la sumatoria de AG de la serie n-3: ($\Sigma = 22:5n-3 + 22:6n-3$) obtenido de la composición de AG totales de membrana de eritrocitos se observa en la Figura 15. Las ratas controles presentan valores similares a los hallados en seres humanos bajo dietas convencionales denominado índice Omega-3 ($\Sigma = \text{eicosapentaenoico} + \text{docosahexaenoico}$) (Harris WS, 2004).

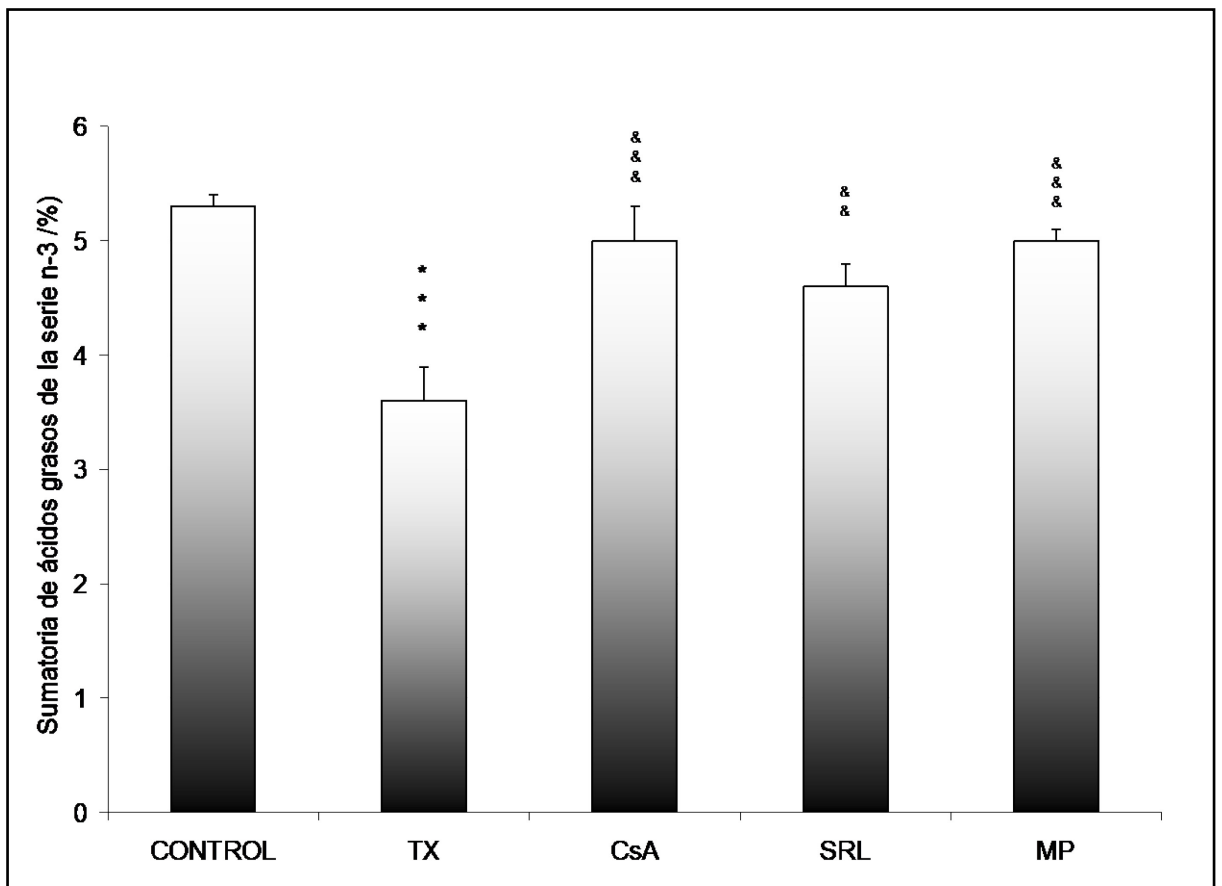


Fig. 15. Sumatoria de ácidos grasos de la serie n-3

Los datos representan la media \pm ES. (***) $P < 0,001$ vs Control. (&&) $P < 0,01$, (&&&) $P < 0,001$ vs TX

III.3.D. Lípidos totales de microsomas renales

Los porcentajes relativos de PL y Col libre de microsomas renales se detallan en la Figura 16. En general se observó un comportamiento similar, con un aumento del Col libre a expensas de la disminución de los PL, tanto en los receptores sin tratamiento como en los tratados con las distintas drogas inmunosupresoras, al compararlos con datos basales. En la Tabla 10 se indica el cociente Col/PL.

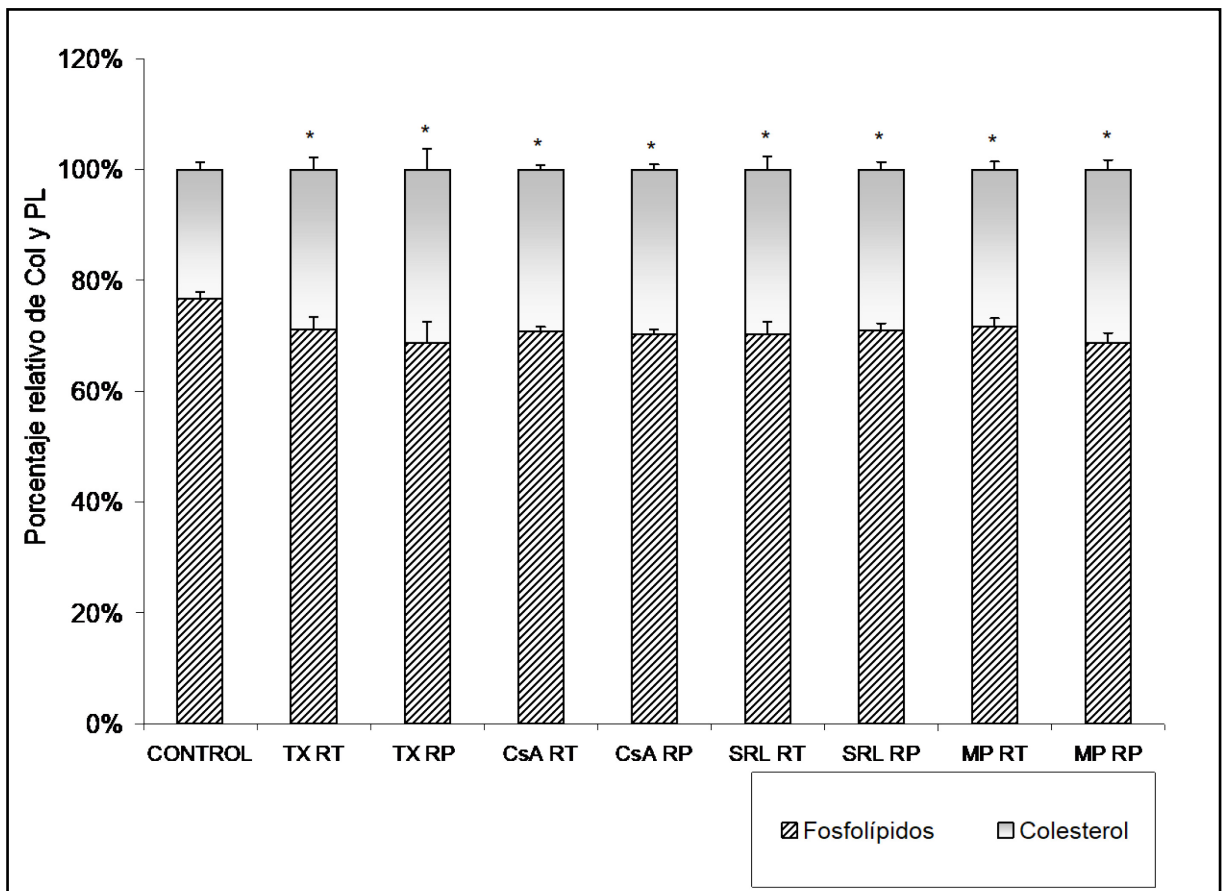


Fig. 16. Lípidos totales de microsomas renales

Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0.05$ vs control.

Tabla 10. Cociente colesterol total/fosfolípidos obtenido de la composición de lípidos totales de microsomas renales.

Control (N=10)	Tx (N=6)		CsA (N=9)		SRL (N=8)		MP (N=6)	
	RT	RP	RT	RP	RT	RP	RT	RP
0,31 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,43 ± 0,05	0,41 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,40 ± 0,01

Los datos representan la media ± ES expresados en $\mu\text{g}\%$

No obstante, que en la comparación de los valores porcentuales todos los grupos presentan una diferencia significativa respecto a los valores de ratas sin trasplantar y sin tratar, al analizar los datos del cociente Col/PL se observa una tendencia al aumento del mismo sin llegar a ser estadísticamente significativo.

III.4. EFECTO DE LAS DROGAS INMUNOSUPRESORAS: CICLOSPORINA A Y SIROLIMUS SOBRE LA COMPOSICIÓN, INCORPORACIÓN Y METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CELULAS HEPG₂.

III.4.A. Efecto de la ciclosporina A y el sirolimus sobre la composición de ácidos grasos en lípidos celulares del hepatoma humano

En la Tabla 11 se observan los cambios producidos en el perfil de AG celulares totales de los lípidos de células HepG₂ en cultivos en monocapa luego de haber sido incubadas en presencia de dos dosis diferentes de los inmunosupresores CsA y SRL como se cita en la sección materiales y métodos. El perfil observado en las células del lote control mostró una alta proporción de AG saturados y MUFAs siendo los mayoritarios el palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico. Dentro de los monoenoicos se identificaron dos isómeros 18:1 n-9 y 18:1 n-7; y el 16:1 n-9 y 16:1 n-7 derivados del palmitoleico. La incubación de

estas células con ambos inmunosupresores durante 72 horas provocó una disminución del porcentaje relativo del 16:1 n-7 en las dos dosis utilizadas. El 18:2 n-6 y araquidónico disminuyeron significativamente en los lotes tratados con las dosis más elevadas de los IS. Los PUFAs 22:4 n-6, 22:5 n-6 y 22:5 n-3 aumentaron con la dosis más alta del tratamiento inmunosupresor respecto al control. No obstante las modificaciones indicadas, no se observaron diferencias significativas tanto en el cociente Sat/Insat, en el cual se evidenció un aumento que no llegó a arrojar diferencias estadísticamente significativas, así como en el índice de insaturación, a pesar que se notó una tendencia a la disminución de este último. Los distintos cocientes producto/sustrato se tomaron como marcadores indirectos de la actividad de las enzimas desaturantes, como se indicó previamente. Tanto el cociente 16:1 n-9/16:0 como 18:1 n-9/18:0 disminuyeron significativamente con ambos tratamientos IS sugiriendo una disminución de la actividad Δ^9 desaturasa. No se observaron modificaciones del cociente 20:4 n-6/18:2 n-6, con lo cual se puede suponer que la actividad de Δ^6 y Δ^5 desaturasas no se encuentra influenciada por los IS en las dosis utilizadas. Al evaluar la relación 20:4 n-6/20:3 n-6 donde selectivamente se infiere sobre la actividad de la Δ^5 se aprecia una disminución en el lote CsA respecto del control. Estas observaciones nos permitieron escoger la dosis apropiada de las drogas IS con las cuales es posible observar su influencia sobre el perfil de AG sin provocar toxicidad celular e intentar dilucidar la influencia de ambos IS sobre la regulación de las enzimas desaturantes.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos celulares totales de la línea HepG₂ tratada con ciclosporina A y sirolimus

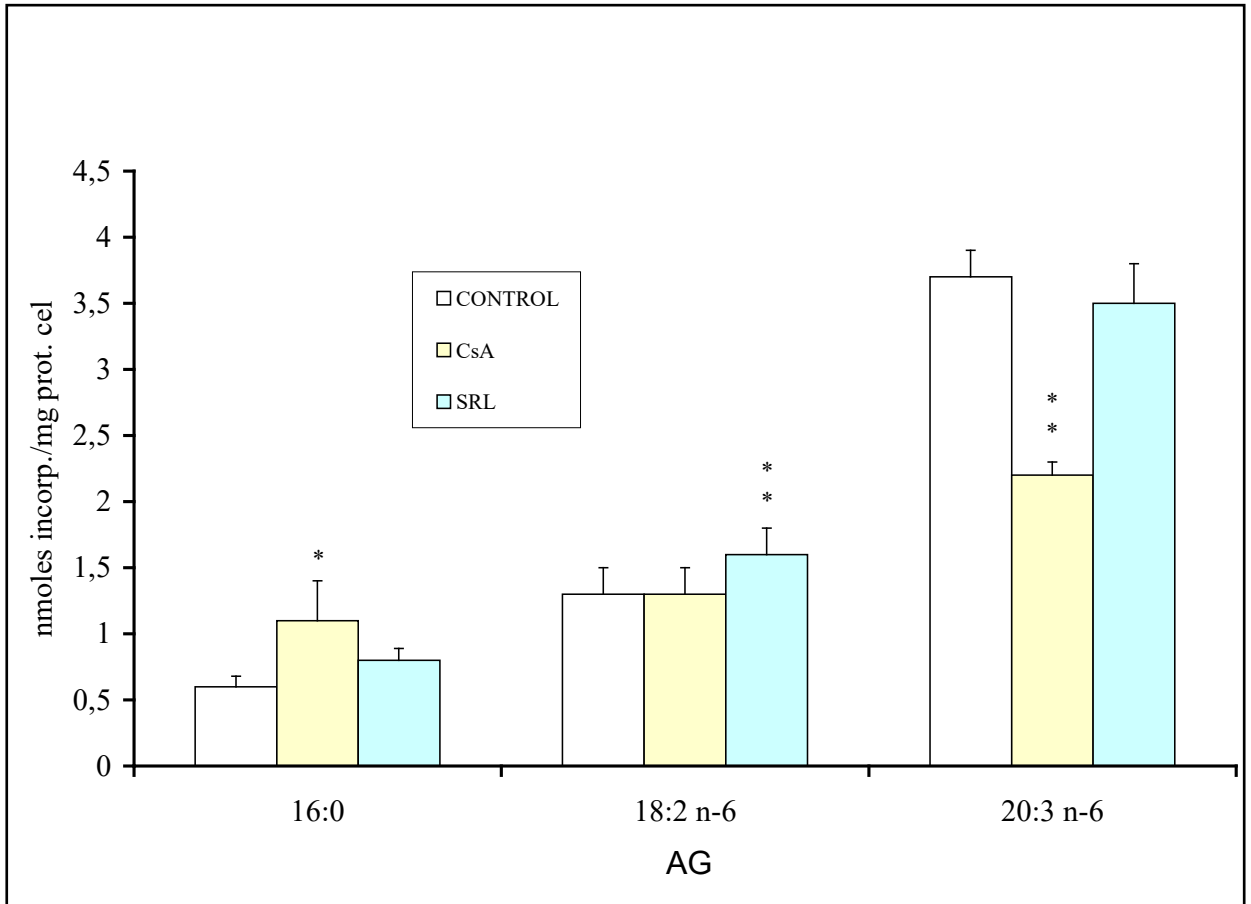
	CONTROL	CsA 1 µg/µL	CsA 2 µg/µL	SRL 10 ng/mL	SRL 20 ng/mL
16:0	22,0 ± 1,3	23,4 ± 1,3	26,0 ± 0,8	24,5 ± 1,8	24,6 ± 0,4
16:1 n-9	16,7 ± 1,4	15,4 ± 1,2	16,0 ± 0,7	14,0 ± 1,2	15,5 ± 0,9
16:1 n-7	2,2 ± 0,01	1,9 ± 0,01*	1,5 ± 0,01*	1,6 ± 0,02*	1,7 ± 0,01*
18:0	12,4 ± 1,2	11,6 ± 0,5	9,6 ± 0,4	12,2 ± 1,0	13,8 ± 1,2
18:1 n-7	17,8 ± 0,5	19,2 ± 1,0	19,0 ± 0,5	18,0 ± 0,7	18,3 ± 1,2
18:1 n-9	21,9 ± 1,2	21,6 ± 1,1	21,5 ± 0,5	22,4 ± 0,9	19,5 ± 0,8
18:2 n-6	3,0 ± 0,02	2,8 ± 0,01	2,2 ± 0,06*	2,6 ± 0,01	2,3 ± 0,1*
20:3 n-6	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,01	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,04	0,9 ± 0,01
20:4 n-6	2,0 ± 0,02	2,1 ± 0,04	1,5 ± 0,01***	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,02**
22:4 n-6	0,1 ± 0,00	0,3 ± 0,06*	0,4 ± 0,00*	1,0 ± 0,06*	0,3 ± 0,01*
22:5 n-6	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,01*	0,4 ± 0,01	0,8 ± 0,04**
22:5 n-3	0,3 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,6 ± 0,01*	0,3 ± 0,01	0,5 ± 0,01*
22:6 n-3	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,01
Sat/insat	0,54 ± 0,04		0,57 ± 0,02		0,63 ± 0,03
UI	0,79 ± 0,04		0,76 ± 0,01		0,77 ± 0,02
16:1n-9/16:0	0,87 ± 0,01		0,69 ± 0,03*		0,70 ± 0,02*
18:1n-9/16:0	1,85 ± 0,01		1,59 ± 0,09*		1,56 ± 0,07*
20:4n-6/ 18:2n-6	0,68 ± 0,05		0,70 ± 0,04		0,79 ± 0,01
20:4n-6/ 20:3	2,11 ± 0,01		1,88 ± 0,01*		2,31 ± 0,08

Los datos representan la media ± ES de 7 determinaciones. (*) P<0,05, (**) P<0,01, (***) P<0,001 vs control.

III.4.B. Estudio de la incorporación y desaturación (transformación) de distintos ácidos grasos con marcación radioactiva por la línea tumoral HepG₂ bajo el tratamiento con ciclosporina A y sirolimus

En la Figura 17 se observan los resultados obtenidos en el estudio de la incorporación de AG vehiculizados como complejos con albúmina sérica bovina delipidada, en el medio de incubación por las células HepG₂. En ella puede verse que estas células captan activamente todos los AG ofrecidos, pero en particular lo hacen más con los de la serie n-6: ácidos linoleico y eicosatrienoico. Respecto a ambos tratamientos inmunosupresores las células tratadas con CsA presentan una mayor incorporación del palmítico y una menor incorporación del eicosatrienoico respecto a las células control. Por otra parte, el lote tratado con SRL presenta una mayor incorporación del ácido linoleico respecto al control, aumento que no se observa con los AG 16:0 y 20:3 n-6.

Fig. 17. Incorporación de [1-¹⁴C] ácidos grasos exógenos en células HepG₂

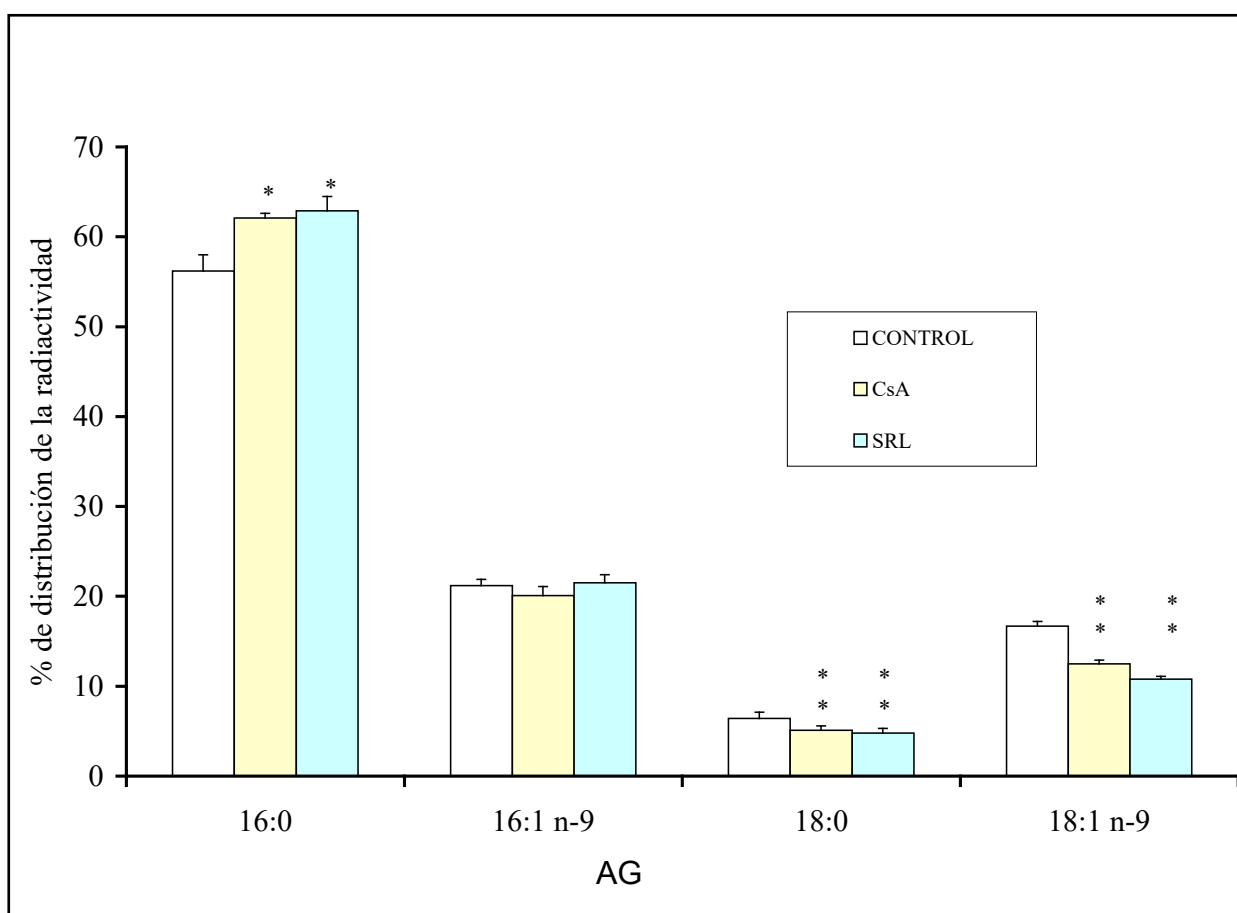


Nmol incorp./mg prot. cel: nanomoles incorporados / mg de proteínas celulares.

Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ vs control.

La transformación del palmítico se detalla en la Figura 18 donde se observa una conversión a palmitoleico de un 20% aproximadamente en los tres grupos estudiados. La actividad elongante a 18:0 disminuye significativamente en los dos grupos tratados y en la etapa posterior, desaturante, evidenciada por la presencia de 18:1 n-9 se muestra una disminución en las células tratadas con ambos inmunosupresores.

Fig. 18. Distribución porcentual de la radioactividad incorporada en células HepG2 incubadas con 16:0 (1-¹⁴C)



Los datos representan la media \pm ES. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ vs control.

Tabla 12. Índice de conversión del AG 16:0 (1-¹⁴C) en células HepG2

	Lote Control	Lote CsA	Lote SRL
IC	0,79 ± 0,05	0.61 ± 0,01**	0.59 ± 0,04*

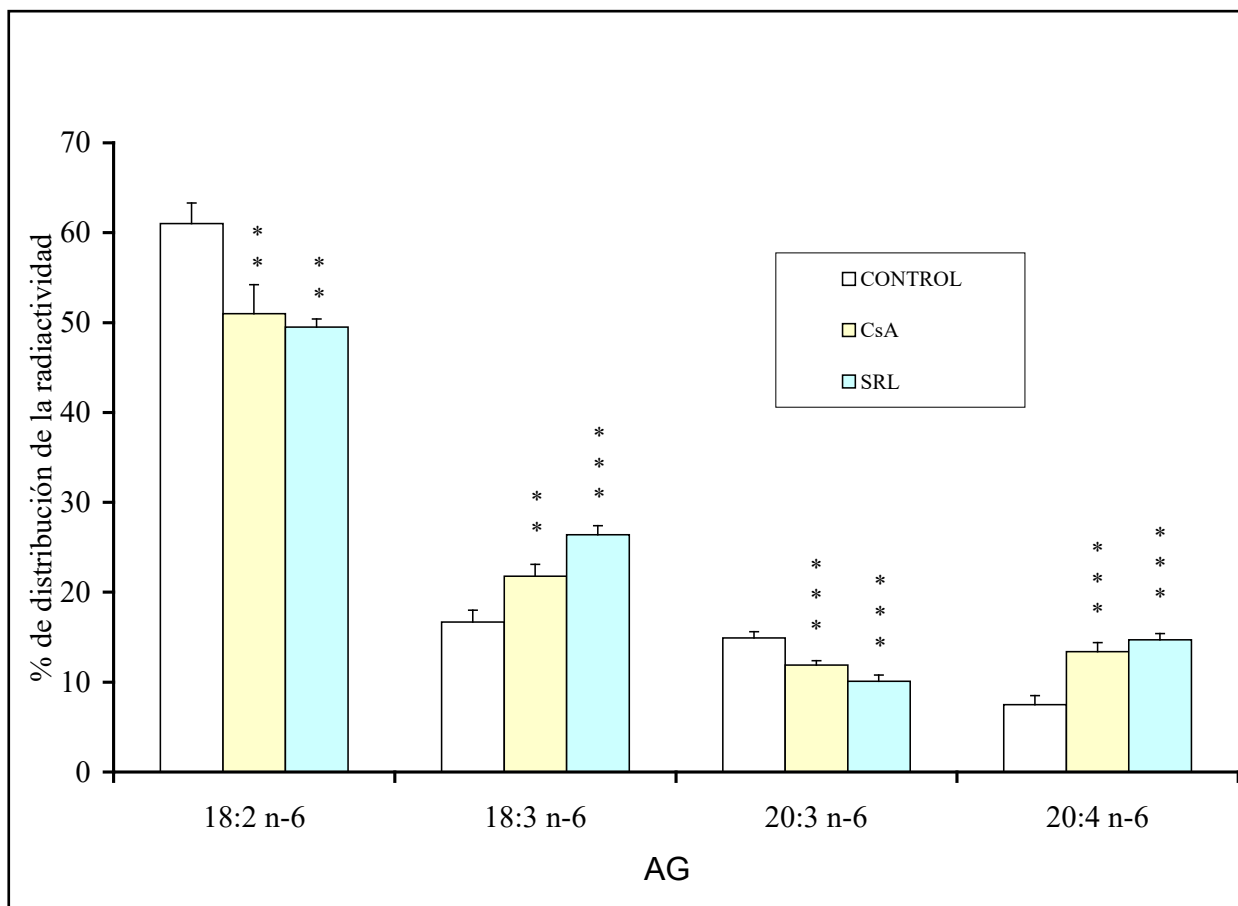
Índice de conversión (IC): producto / sustrato = $\Sigma (16:1 \text{ n-9} + 18:0 + 18:1 \text{ n-9}) / 16:0$

Los datos representan la media ± ES de 7 determinaciones. (*) P<0,05, (**) P<0,01, vs Control.

En la Tabla 12 se observa que en presencia de ambas drogas inmunosupresoras se observa un descenso significativo de los AG que surgen de la incorporación y metabolismo de su precursor el AG palmítico.

El metabolismo del ácido linoleico presenta ciertas particularidades. En la Figura 19 se observa que con ambos tratamientos IS aumentó la distribución de la radiactividad a 18:3 n-6, y disminuyó la elongación a 20:3 n-6. Asimismo, se observó un incremento en la conversión a ácido araquidónico.

Fig. 19. Distribución porcentual de la radioactividad incorporada en células HepG₂ incubadas con 18:2 n-6 (1-¹⁴C)



Los datos representan la media \pm ES. (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, vs Control.

Tabla 13. Índice de conversión del AG 18:2 n-6 (1-¹⁴C) en células HepG₂

	Lote Control	Lote CsA	Lote SRL
IC	0,60 \pm 0,03	0,93 \pm 0,04**	1,02 \pm 0,03**

Índice de conversión (IC): producto / substrato

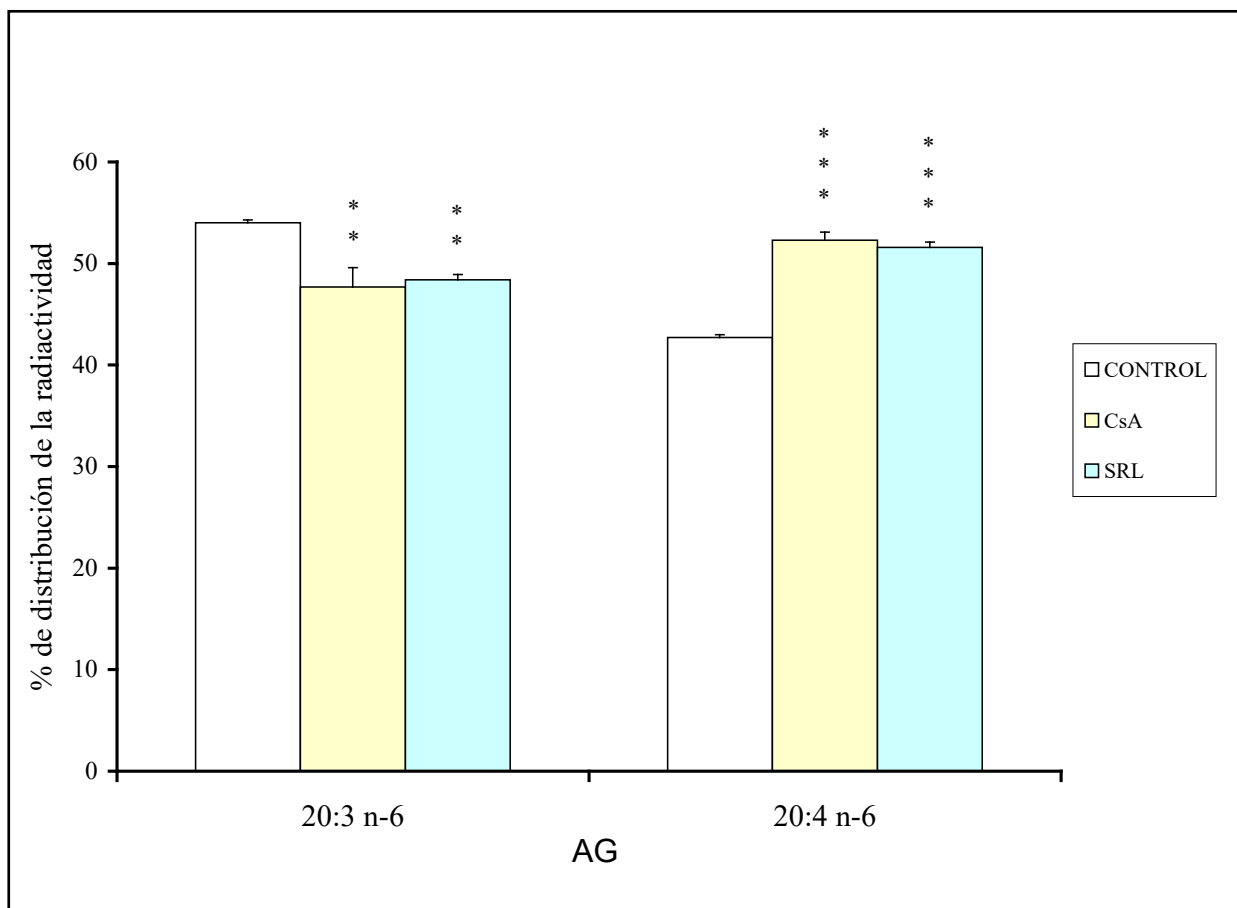
$$= \Sigma (18:3 \text{ n-6} + 20:3 \text{ n-6} + 20:4 \text{ n-6}) / 18:2 \text{ n-6.}$$

Los datos representan la media \pm ES de 7 determinaciones. (**) $P < 0,01$, vs control.

En la Tabla 13 se observa en presencia de ambas drogas inmunosupresoras un aumento significativo de los AG que surgen de la incorporación y metabolismo de su precursor el AG linoleico.

En la Figura 20 se observan los resultados obtenidos al adicionar el ácido eicosatrienoico ^{14}C al medio de incubación. La transformación del ácido 20:3 n-6 a 20:4 n-6 se incrementó significativamente en los lotes tratados con los IS.

Fig. 16. Distribución porcentual de la radiactividad incorporada en células HepG₂ incubadas con 20:3 n-6 (1- ^{14}C)



Los datos representan la media \pm ES. (** P<0.01, (***) P<0.001 vs control.

Tabla 14: índice de conversión del AG 20:3 n-6 (1-¹⁴C) en células HepG2

	Lote Control	Lote CsA	Lote SRL
IC	0,75 ± 0,01	1,12 ± 0,02**	1,07 ± 0,01**

Índice de conversión (IC): producto / substrato = 20:4 n-6 / 20:3 n-6.

Los datos representan la media ± ES de 7 determinaciones. (**) P<0,01, vs control.

En la Tabla 14 se observa que en presencia de ambas drogas inmunosupresoras se observa un aumento significativo del AG araquidónico producto de la desaturación del AG eicosatrienoico.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Actualmente el éxito quirúrgico obtenido en el trasplante renal clínico se encuentra “opacado” o limitado por el sistema inmunológico y la toxicidad de los inmunosupresores (107). En el presente trabajo utilizamos un modelo de trasplante renal con el objetivo de evaluar la influencia que provoca sobre el perfil lipídico la utilización de los inmunosupresores en monoterapia. En el trasplante renal clínico, la terapéutica inmunosupresora es una combinación de esteroides acompañados con otros inmunosupresores tales como tacrolimus, azatioprina, micofenolato-mofetil, CsA y SRL, siendo estos dos últimos los implementados con mayor frecuencia. El trabajo experimental nos permite discernir el efecto que provoca individualmente cada droga sobre los lípidos séricos, efectos que se superponen cuando se trata de pacientes en el tratamiento médico. Además, en el modelo experimental de trasplante en ratas es posible obtener información adicional estudiando los lípidos que forman parte de distintas biomembranas (81, 113).

Del análisis de la supervivencia de las ratas receptoras tratadas y no-tratadas podemos observar las marcadas diferencias entre los animales tratados con MP y no-tratados respecto a los que recibieron CsA o SRL. Tanto en las ratas no tratadas como en las tratadas con MP se confirmó por técnicas histopatológicas el rechazo severo del riñón trasplantado con compromiso abdominal general. Como se explica en la introducción, los alotrasplantes sin tratamiento inmunosupresor o con tratamiento subóptimo desarrollan rechazo severo que conlleva, por un lado al fracaso del injerto con compromiso abdominal de la rata trasplantada, y por otro, a un deterioro general del animal que hizo imprescindible su eutanasia. Con ambas monoterapias SRL y CsA se observó una

marcada disminución de los cambios histopatológicos compatibles con rechazo, sin evidenciarse importantes diferencias morfológicas entre ambos tratamientos. Las dos muertes halladas en el grupo SRL pueden ser atribuidas al retraso de la cicatrización de las anastomosis vasculares y ureterales que es causa de dehiscencias. Este es un efecto colateral adverso del SRL y es el motivo por el cual no se utiliza como droga de primera elección (157-159). Su mecanismo de acción antiproliferativo se ha demostrado en distintas líneas celulares y es el responsable del retraso en los procesos cicatrizales. Este efecto adverso se pone de manifiesto en el trasplante renal clínico con retraso en la cicatrización de la pared abdominal (157), y la producción de linfocel (159). En el grupo tratado con CsA se alcanzó un 90% de supervivencia sin haberse podido establecer la causa que provocó la muerte de un receptor, debido a que no presentó lesiones renales compatibles con rechazo severo ni compromiso abdominal, como así tampoco dehiscencias vasculares o ureterales. La funcionalidad renal medida a través de creatininemia y uremia son datos relativos debido a que en la metodología utilizada en estos experimentos los receptores conservan sus RP. Inferimos que los RP ejercen un mecanismo compensatorio mediante el cual la creatinina sérica se mantiene dentro de valores normales. No obstante, la uremia se incrementa significativamente en todos los receptores. En una comunicación presentada por Rodo y col. (160), se describe un aumento selectivo de la uremia sin estar acompañado de valores incrementados de creatinina sérica, datos que podrían ser considerados como un índice precoz de rechazo del riñón trasplantado.

Analizando los lípidos séricos estos se encuentran más elevados en los lotes tratados con los inmunosupresores coincidiendo con la literatura tanto en los ensayos clínicos como

experimentales. En el lote trasplantado sin tratar se observa un incremento muy marcado de los TG similar a los valores obtenidos en los otros lotes, mientras que el Col total muestra una tendencia a aumentar sin alcanzar significación estadística. La hipertrigliceridemia del lote TX puede explicarse teniendo en cuenta la publicación de Nonogaki y col. (161), quienes realizaron ensayos administrando IL6 endovenosa a ratas y determinando los niveles de colesterolemia y trigliceridemia a varios períodos de tiempo posteriores a la inyección. Los autores demostraron un incremento de 1 a 3 veces del valor de los TG séricos, dosis-dependiente, a la administración de la mencionada citoquina, a través de un mecanismo no mediado por catecolaminas. Otros autores han demostrado que fenómenos de infección, inflamación y traumatismos estimulan la producción de citoquinas que dan por resultado el desarrollo de hiperlipemia (162-164). Por otra parte, se ha descrito que la IL6 disminuye la actividad de la lipoprotein lipasa del tejido adiposo, y por consiguiente la hidrólisis de Qm y VLDL, que son las fracciones lipoproteicas más ricas en TG (165). Otras citoquinas, como la IL1 también producen aumento de la secreción de TG hepáticos porque estimulan la lipogénesis (166, 167). Considerando que el fenómeno de rechazo es netamente inflamatorio con la producción de diversas citoquinas, las consideraciones hechas previamente podrían explicar la marcada hipertrigliceridemia con moderada hipercolesterolemia hallada en las ratas trasplantadas sin IS en el presente trabajo, a los treinta días del trasplante, y la observada previamente a los siete días del trasplante (113). Los linfocitos T “helper” producen IL4, IL5 e IL6 que estimulan la producción de anticuerpos contra el “injerto” (47). Estos hallazgos serían importantes para explicar el deterioro del perfil lipídico que sufren los pacientes trasplantados donde a la toxicidad de los inmunosupresores, que da por

resultado el desarrollo de hiperlipemia postrasplante, padecerían además la hiperlipemia que originarían los episodios silentes o evidentes de rechazo.

Respecto a los lotes tratados con inmunosupresores el perfil de lípidos séricos se encuentra aun más deteriorado ya que se agrava la hipercolesterolemia y además, se observa el aumento altamente significativo de las fracciones lipoproteicas LDL y VLDL, potentes mediadores de daño vascular en general y mesangial en particular (108). La MP es la droga que afecta mas adversamente estos valores. Más aún, la tendencia actual es abolir la utilización de esteroides tanto en la inducción como coadyuvante de la terapia inmunosupresora (159, 168). Las hormonas de tipo esteroide pueden afectar el metabolismo lipídico a través de varios mecanismos. Los esteroides crean un estado de insulinoresistencia, con hiperinsulinemia como secuela. La hiperinsulinemia provoca un aumento de la captación hepática de AG libres que sirven como substrato para la síntesis de TG y VLDL que se traduce en hipertrigliceridemia y elevados niveles de VLDL. Estas VLDL por acción de la triglicérido lipasa hepática se convierten en IDL y LDL provocando un aumento de LDL-C. La resistencia a la insulina también da por resultado la disminución de la actividad de la lipoproteinlipasa (LPL) periférica, responsable del aclaramiento de TG disponibles para la síntesis de VLDL. En cuanto a la CsA, los mecanismos mediante los cuales provoca el aumento de los lípidos séricos son diversos. Markel y col. (72), han propuesto que como la droga es transportada en la sangre unida a LP provoca un trastorno en la configuración de la LDL que conduce a una interacción anómala con su receptor. Dado que el 75% del aclaramiento de LDL tiene lugar a través de la captación hepática de LDL mediada por receptor, y que esta captación de LDL sirve como control de retroalimentación tanto en la biosíntesis hepática del Col como en la

expresión de receptores LDL, la interacción anormal LDL-receptor podría dar como resultado hipercolesterolemia. Además la CsA, al igual que los esteroides, provoca intolerancia a la glucosa a través de la interferencia con las acciones periféricas de la insulina, o por un efecto directamente tóxico sobre las células β pancreáticas (72). Respecto al SRL existe menos información sobre el mecanismo mediante el cual provoca hiperlipemia. En trabajos publicados por Hoogeven y col. (169), se describe que reduce el catabolismo de las Apo100-VLDL mediado por los receptores hepáticos. Yakupoglu y col. (170), describen que la hiperlipemia se hace manifiesta en los pacientes entre los 60 y los 90 días del trasplante renal clínico al retrasar el catabolismo de las LP circulantes LDL, IDL y VLDL, y que la combinación de SRL a la terapia con CsA y esteroides exagera los efectos hipercolesterolémicos e hipertriglicéridémicos de los mismos. Esta diferencia puede ser discutida de la siguiente manera, este efecto ha sido observado a la semana de producido el trasplante renal experimental en ratas tratadas con inmunosupresión (81), y aquí al mes de producida la cirugía de trasplante y de instaurar el tratamiento inmunosupresor. De la revisión bibliográfica publicada recientemente por Davidson (171), se desprende la cronología del desarrollo de la hiperlipemia postrasplante. Según los autores, se observa inmediatamente hipertriglicéridemia con descenso de HDL-C permaneciendo la LDL con valores normales, luego se produce el incremento de LDL-C y se observan tanto LDL-C, C total y TG con valores elevados a la tercer semana del acto quirúrgico. De los inmunosupresores implementados la MP es la que afecta en forma más adversa el perfil de lípidos séricos.

Con respecto a los lípidos de membrana microsomales estudiados, en los lípidos totales de los riñones trasplantados tratados y no-tratados, podemos observar que estos

presentan cambios muy similares con una disminución de los PL a expensas del aumento del Col total. El incremento del Col sérico se corresponde con el incremento observado en los microsomas renales, provocando una modificación del cociente Col total/PL. En la composición de AG de LT de microsomas renales se observa un aumento de SFA a expensas de la disminución de los ácidos linoleico y araquidónico, que provoca un aumento significativo del cociente de AG Sat/Insat levemente más notorio en el lote de receptores sin tratar. El descenso del ácido araquidónico puede ser atribuido a la producción de metabolitos de la ciclo-oxigenasa y de la 5-lipoxigenasa el cual es más marcado en el lote de receptores sin tratar. Este hallazgo podría tener importancia crucial para la evolución del trasplante renal clínico, en función del esquema terapéutico. La nefrotoxicidad de la CsA se ha asociado con alteraciones en el metabolismo del ácido 20:4n-6 debido a que tanto este ácido como sus metabolitos son considerados mediadores importantes en la disfunción renal y el rechazo renal agudo (172). No obstante, los resultados son controvertidos ya que se ha demostrado que la deficiencia de 5-lipooxigenasa acelera el rechazo alógeno en ratones (49). El efecto biológico de los esteroides se ve potenciado por su acción directa como inhibidores de la biosíntesis de araquidonato, lo cual se agrega a la disminución de la actividad fosfolipasa A₂. En este sentido, resulta interesante que sumando ambos efectos los valores porcentuales de araquidonato resulten similares en el lote con terapia MP versus el lote tratado con SRL. Los niveles de ácido araquidónico en el lote tratado con CsA son los que más se acercan a los valores del lote control. Los receptores sin tratar presentan un descenso altamente significativo de este AG. Este efecto se halla parcialmente compensado con el aumento del ácido eicosatetraenoico en los RT.

Se sabe que la terapia con SRL provoca importantes efectos antiproliferativos. Estos efectos serían especialmente evidenciables en tejidos con elevado índice mitótico tales como mucosas y gónadas (173). Por esta razón, se decidió monitorear el impacto de las drogas inmunosupresoras sobre el contenido de araquidonato testicular considerado como un biomarcador centinela en el ritmo de espermatogénesis (174). En la evaluación de los AG de los lípidos totales de microsomas testiculares se observó que se comportaron de manera diferente al resto de los tejidos, pero compartieron el aumento del ácido esteárico. El AG mayoritario del testículo es el 22:5n-6 cuya importancia es vital en el normal funcionamiento del órgano. Los efectos antiproliferativos del SRL podrían haber causado un descenso de este ácido. Sin embargo, no se observan cambios importantes en la composición de AG de lípidos totales testiculares. Se podría inferir que las dosis no son tan elevadas en la cepa de rata utilizada como para provocar toxicidad testicular, tal como se ha reportado en los trabajos de Seethalakshmi y col. (175), y Masuda y col. (176), quienes describen que con dosis de 40 mg/kg de CsA se induce toxicidad testicular.

Actualmente las membranas de eritrocitos se encuentran entre los tejidos que pueden ser evaluados en los pacientes e incluidos en los estudios de rutina. A diferencia del plasma su composición lipídica es más estable y no se modifica inmediatamente con cambios de la dieta o ayunos prolongados, como ocurre en el plasma (177). La sumatoria de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico se denomina índice Omega-3 y se utiliza como un nuevo valor predictivo de padecer enfermedad cardiovascular (122). En los receptores sin terapia inmunosupresora el índice cae por debajo del 4%, nivel considerado de alto riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (123). Con las distintas drogas inmunosupresoras

disminuye el índice respecto al control, este descenso es más marcado bajo la terapia con SRL no llegando a alcanzar valores estadísticamente significativos.

Tanto en plasma como en membrana de eritrocitos hallamos un aumento de los SFA. La literatura cita que medios enriquecidos con SFA en comparación con los suplementados en PUFAs y MUFAs incrementan la expresión de genes involucrados en la lipogénesis hepática, ya que disminuye la expresión de receptores LDL (178). El efecto que se observa en plasma y membrana de eritrocitos, podría influenciar la expresión de receptores hepáticos para LDL tal como se ha descrito que actúan los SFA dietarios. En este caso exacerbarían el efecto hiperlipemiante de las drogas inmunosupresoras y del proceso inflamatorio de rechazo silente o evidente del riñón trasplantado. Además en los microsomas de los RT, hepáticos y en el plasma se observa una importante disminución de los PUFAs de la serie n-3. Según trabajos realizados por Kew y col. (179), los AG de la serie n-3 disminuyen la proliferación linfocitaria y la producción de IL2 y factor de necrosis tumoral- γ en seres humanos. El suplemento con AG de la serie n-3 podría constituirse en coadyuvante de las terapias inmunosupresoras ya que del análisis del perfil de AG de lípidos totales de los tejidos estudiados de los receptores, se desprende que presentan una deficiencia de los mismos. Además, retomando el concepto actual de prevenir la enfermedad cardiovascular y considerando que los pacientes trasplantados presentan altas probabilidades de padecerla, sugerimos en concordancia con artículos recientes que los AG de la serie n-3 constituyen un factor de prevención del infarto agudo de miocardio (180-184). De acuerdo con estos artículos científicos, resultaría de probable utilidad clínica implementar la determinación del índice omega-3 en el seguimiento posquirúrgico de los pacientes trasplantados.

Del análisis de la distribución porcentual de los AG de microsomas hepáticos y a raíz del incremento significativo del ácido palmítico, se deduce que en todos los lotes hay un aumento de la síntesis de novo de AG. La enzima $\Delta 9$ desaturasa es una enzima lipogénica cuya función es desaturar los AG saturados que han sido incorporados con la dieta o derivados de la síntesis hepática para la síntesis de TG, además de su importancia en proveer ácidos monoenoicos para ser exportados como componentes de las lipoproteínas (100). Teniendo en cuenta la actividad de dicha enzima indirectamente a través del cociente $18:1n-9/18:0$, observamos un aumento tanto en los animales transplantados como en aquellos tratados con drogas inmunosupresoras, comparados con el lote control. De Gómez Dumm y col (67), han observado un aumento de la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa en membranas microsomales hepáticas de ratas tratadas con MP en la misma dosis que la utilizada en el presente trabajo. Esta observación coincide con el efecto directo que producen los esteroides sobre el aumento de la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa, demostrado por de Alaniz y col. (185), en células de hepatoma humana (HTC) y en animales enteros. Por otra parte, Ntambi y col. (102), han descrito que dietas ricas en Col inducen la actividad desaturante en hígado de rata, modificando la expresión de los genes que codifican para la síntesis de $\Delta 9$ desaturasa (186, 187). Teniendo en cuenta esta última aseveración, se podría inferir que el aumento de la actividad $\Delta 9$ desaturasa medida indirectamente a través de los cocientes producto/sustrato en microsomas hepáticos y del aumento de los monoenoicos en los microsomas renales, se debería no a un efecto directo de las drogas inmunosupresoras sobre la actividad enzimática, sino que esta elevación podría estar mediada por los efectos del Col sérico. En este sentido, los IS estudiados

podrían ser también los causantes, debido a su efecto hipercolesterolémico, de la elevación de los niveles de ácido oleico en microsomas hepáticos.

Las modificaciones observadas en la composición de AG de lípidos totales de diversos tejidos estudiados en las ratas receptoras bajo el efecto de los inmunosupresores no pueden ser atribuidas sólo a estas drogas y teniendo en cuenta que el trasplante en sí mismo como proceso inflamatorio puede influir sobre estas modificaciones, se utilizó un modelo de células tumorales hepáticas humanas en cultivo. En este caso, utilizamos la línea tumoral hepática HepG₂ que consiste en un hepatoblastoma humano de mínima desviación con las características bioquímicas de una célula hepática normal (149). Se ha demostrado la secreción por estas células de apoproteínas y LP semejantes a las humanas, tales como Apo A-1, Apo A-II, Apo B, Apo C-II, Apo C-III y Apo-E. Las apoproteínas mayoritarias encontradas fueron Apo B y las Apo A-I y Apo-AII. La utilización de estas células ha sido exitosa tanto en el estudio del rol regulatorio de los lípidos, síntesis y secreción de apoproteínas y LP, remoción de varias clases de LP mediadas por receptor, así como en el ensayo de drogas inmunosupresoras (23, 25, 178, 188, 189).

El análisis de la composición de AG de las células HepG₂ reveló un alto contenido de ácido oleico, una de las anormalidades lipídicas más frecuentemente reportadas en neoplasmas, acompañado de valores bajos de PUFAs principalmente ácido linoleico (154). La dinámica de la metabolización de los AG en la célula dificulta la interpretación de la actividad enzimática a través de la relación sustrato producto. Por este motivo, y a fin de circunscribir la influencia de los IS sobre la acción de las enzimas desaturantes se evaluó la habilidad de estas células para incorporar y metabolizar diferentes AG radiactivos en presencia de las drogas estudiadas. Todos los AG ofrecidos fueron

incorporados activamente por las células HepG₂; la incorporación máxima se observó con el ácido eicosatetraenoico, coincidiendo con trabajos realizados por Angeletti y de Alaniz (137). Estos resultados y los antecedentes de trabajos previos demuestran que las células HepG₂ exhiben una amplia capacidad de incorporar tanto los SFA, MUFAs y PUFAs provenientes del medio de cultivo. Esta capacidad de incorporar los AG ofrecidos la convierten en una línea celular conveniente para estudiar la influencia de los inmunosupresores sobre la incorporación y ulterior conversión de los mismos en homólogos superiores, ya que esta actividad se mantiene aún al tratarlas con dosis terapéuticas de las drogas, CsA y SRL.

Los AG incorporados fueron subsecuentemente metabolizados. El ácido palmítico fue desaturado en posición 9 a ácido palmitoleico y elongado a ácido esteárico el cual fue nuevamente convertido en ácido oleico por acción de la misma enzima desaturante. Además se demostró que se produjo elongación del ácido palmitoleico a ácido vaccénico (18:1n-7). Este último representa uno de los AG mayoritarios cuando se analiza la composición de AG totales de estas células. Como se ha demostrado en otros trabajos las células HepG₂ poseen actividad Δ 9 desaturante, y son capaces por lo tanto de sintetizar MUFAs (152). En la distribución porcentual de la marcación del ácido palmítico ofertado a las células, se observa que el porcentaje de ácido esteárico no difiere entre los lotes tratados y que hay una disminución del ácido oleico en los lotes tratados con IS. Estos resultados estarían representando la actividad de la Δ 9 desaturasa. No obstante, esto mismo no se observa en la transformación del ácido palmítico a palmitoleico, ya que este último representa aproximadamente el mismo porcentaje en todos los lotes. Como en este tipo de estudios se trabaja con la célula entera, a la actividad desaturante debe sumársele la

del sistema elongante, por consiguiente, se calculó el índice de conversión. Teniendo en cuenta que la $\Delta 9$ desaturasa que transforma el ácido palmítico a ácido palmitoleico es la misma enzima que opera en la desaturación del ácido esteárico, y que es regulatoria, se infiere que el descenso observado en el índice de conversión en los lotes tratados con inmunosupresores, corresponde a un descenso en la actividad de la mencionada enzima. Esta aseveración está en concordancia con el descenso de los cocientes 16:1 n-9/16:0 y 18:1 n-9/18:0 observados en los lotes tratados con CsA y SRL, respecto del control, que surgen de la composición de AG totales de las células HepG₂. Asimismo, coincide con el descenso observado al analizar el índice de conversión en las células HepG₂ incubadas en presencia de ácido palmítico con marcación radioactiva en los lotes CsA y SRL al compararlos con el lote control. Con los resultados obtenidos de la composición de AG de lípidos totales de las células HepG₂ y al evaluar el cociente de conversión podemos inferir que los inmunosupresores CsA y SRL inducen un descenso en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa. Esto podría tener una importancia clínica radical a la hora de considerar los efectos indeseables de ciertas drogas inmunosupresoras. La disminución en la formación de monoenoatos correlacionaría con un descenso en el índice de insaturación y un incremento del riesgo aterogénico.

La $\Delta 6$ desaturasa es una enzima que se encuentra en el comienzo de la vía metabólica del ácido linoleico y es limitante de flujo. El ácido linoleico radioactivo ofertado a las células HepG₂ fue incorporado en los lípidos celulares y ulteriormente transformado en AG superiores. De esta manera el ácido 18:2 n-6, a través de la $\Delta 6$ desaturación fue convertido en ácido linolénico el cual fue elongado a ácido 20:3 n-6 y luego desaturado a

ácido araquidónico. El aumento de los productos 18:3 n-6 y 20:4 n-6 de los lotes tratados con inmunosupresores parecerían indicar un aumento en la actividad desaturante $\Delta 6$ y $\Delta 5$ coincidiendo con el incremento en el índice de conversión. De manera tal que se puede inferir que existe un aumento de la metabolización del ácido linoleico, más importante en el lote SRL ya que en presencia de este inmunosupresor las células HepG₂ aumentan la incorporación del sustrato.

Respecto a la $\Delta 5$ desaturasa, enzima responsable de la conversión del ácido eicosatrienoico en araquidónico, observamos una situación similar a la acción de $\Delta 6$ desaturasa en el sentido de que aumenta la conversión del precursor a ácido araquidónico con el tratamiento IS respecto al lote control. Mas aún, al analizar el índice de conversión sustrato producto ($20:4 \text{ n-6} / 20:3 \text{ n-6}$) se observa una elevación del mismo con lo que podríamos inferir que tanto la CsA como el SRL provocan un incremento en la actividad $\Delta 5$ desaturante. Este aumento en la actividad de la enzima no coincide con el deducido de la composición de AG de lípidos totales de los microsomas hepáticos. En este caso, en las ratas trasplantadas tratadas y no tratadas se observa un descenso del cociente $20:4 \text{ n-6} / 20:3 \text{ n-6}$. Resulta interesante esta aparente discrepancia entre la actividad biosintética de araquidonato y su contraparte analítica. La explicación podría encontrarse en el hecho que los datos obtenidos de microsomas hepáticos reflejan no sólo las actividades de biosíntesis propias de la ruta n-6 sino también los procesos de catabolización, captación e incorporación de AG provenientes del torrente circulatorio. La extrapolación de los resultados in-vitro debe considerar estos factores y otros tales como el empleo de los PUFAs en las rutas que biosintetizan eicosanoides. Al respecto, debemos tener en cuenta

especialmente la diferencia substancial que involucra la biosíntesis de homólogos n-6 (pro-inflamatorios) (190), de los n-3 (anti-inflamatorios y anti-agregantes plaquetarios) (117).

En síntesis, los resultados obtenidos de los experimentos in-vitro indicarían que los IS CsA y SRL provocarían un descenso en la actividad $\Delta 9$ desaturasa y un incremento de la $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas por efecto directo. Al incrementar la producción de PUFAs también estarían ejerciendo su mecanismo de IS en forma indirecta ya que, como lo citamos previamente los PUFAs intervienen en la disminución de la proliferación linfocitaria y producción de diversas citoquinas. El mecanismo de acción de CsA y SRL es absolutamente opuesto al de la MP demostrado por de Alaniz y col. (185), la cual provoca un incremento de la actividad $\Delta 9$ desaturasa acompañado de un descenso en las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, deduciendo que afecta en forma mas adversa al perfil de AG de lípidos totales de diversas membranas. No obstante, en el estudio de los IS in-vivo, (animales receptores de trasplante renal), podemos observar que influyen otros factores tales como el rechazo del injerto y la hipercolesterolemia asociada a las terapias inmunosupresoras, sobre el desarrollo de la hiperlipidemia postrasplante.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- La supervivencia de los animales trasplantados tratados con CsA fue mayor respecto al resto de los lotes al no afectar la cicatrización de las heridas tal como se observó en el lote tratado con SRL.
- Con ambas monoterapias SRL y CsA se observó una marcada disminución de los cambios histopatológicos compatibles con rechazo, no observándose importantes diferencias morfológicas entre ambos tratamientos. Las lesiones histopatológicas compatibles con rechazo del riñón trasplantado fueron similares entre los lotes TX y MP.
- Todos los receptores exhibieron un perfil adverso de lípidos séricos con un incremento altamente significativo de TG y LDL-C acompañado del descenso de HDL-C, respecto al control. Estas diferencias fueron más acentuadas en el lote MP.
- El impacto del dismetabolismo lipídico de los animales trasplantados se extendió a los lípidos totales de los microsomas renales. El aumento de C acompañado del descenso significativo de los PL respecto al lote control, se puso de manifiesto tanto en los RT como en los RP. De manera tal que no es posible discernir si es una modificación provocada por las drogas inmunosupresoras o un síndrome de repercusión sistémica causado por rechazo al injerto.
- La composición de AG de lípidos totales de microsomas renales de las ratas trasplantadas, reveló un aumento de los AG saturados y MUFAs a expensas de

una disminución de los PUFAs que se puede corroborar a través del cociente Sat/Insat en todos los lotes.

- En la composición de AG de lípidos totales de microsomas hepáticos de los receptores que no están sometidos a la terapia IS se evidencia un aumento del cociente saturados/insaturados que coincide con el marcado incremento de los ácidos palmítico y esteárico que, sumado a la disminución de los AG polinosaturados mayoritarios, determina una disminución del índice de insaturación. Respecto al resto de los AG el perfil es similar en los lotes tratados con IS.
- A pesar del impacto de la dislipemia postrasplante que provoca modificaciones en la composición de AG de lípidos totales de membrana de glóbulos rojos, el descenso de los AG de la serie n-3 que se encuentra disminuido significativamente en los receptores no tratados regresa a valores aceptables bajo el tratamiento inmunosupresor. Lo cual demuestra una vez más la importancia del diagnóstico precoz de episodios de rechazo.
- Los inmunosupresores, CsA y SRL, provocarían un descenso de la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa acompañado de un incremento de la actividad de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas demostrado en los experimentos in-vitro. La MP presenta un efecto opuesto sobre el sistema desaturante ya demostrado por otros autores.
- El deterioro del perfil de lípidos séricos, y el descenso de los AG de la serie n-3 observado bajo el tratamiento con MP coinciden con la tendencia actual de excluir a los esteroides en los protocolos de inmunosupresión postrasplante.

- El conocimiento del impacto que, sobre las enzimas desaturantes, ejercen los nuevos inmunosupresores puede ser utilizado para establecer estrategias en el manejo del paciente trasplantado y así brindar más información con el objetivo de prevenir el infarto agudo de miocardio, principal causa de fallecimiento de los pacientes trasplantados y la pérdida de riñones trasplantados por aterosclerosis generalizada de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Norrie KM. Human tissue transplants: legal liability in different jurisdictions. *Int Comp Law Q.* 1985 Jul;34(3):442-69.
2. Langer R, Perner F. [Autotransplantation of the kidney 100 years after Imre Ullmann's pioneering operation]. *Orv Hetil.* 2003 Jun 8;144(23):1115-9.
3. Andreu J, Torregrosa JV. [The transplantation age]. *Med Clin (Barc).* 1993 May;100 Suppl 1:32-4.
4. Carrel A, Guthrie CC. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. 1906 [classical article]. *Yale J Biol Med.* 2001 Jul-Aug;74(4):243-7.
5. Carrell. Results of the transplantation of the blood vessels, organs and limbs. *JAMA.* 1980;51:16-62.
6. Mirskii MB. [The pioneer of clinical transplantology (to the 110th anniversary professor Yu. Yu. Voronoi)]. *Klin Khir.* 2005 Jun(6):60-4.
7. Toledo-Pereyra LH, Palma-Vargas JM. Searching for history in transplantation: early modern attempts at surgical kidney grafting. *Transplant Proc.* 1999 Nov;31(7):2945-8.
8. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc.* 1956 Jan 28;160(4):277-82.
9. Navidad L. Historia de la actitud y conducta en la obtención y extracción de órganos y tejidos para trasplantes. Barcelona: Springer Verlag Ibérica; 1997.
10. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, et al. Cyclosporin A in clinical kidney grafting from cadaver donors. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1979;16:305-9.
11. Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU, Pearl MA, Pearce CW, Dewitt CW, et al. Renal Heterotransplantation in Man. *Ann Surg.* 1964 Sep;160:384-410.
12. Cox A, Zhong R. Current advances in xenotransplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005 Nov;4(4):490-4.
13. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int.* 2000 Jan;57(1):

307-13.

14. Peddi VR, Whiting J, Weiskittel PD, Alexander JW, First MR. Characteristics of long-term renal transplant survivors. *Am J Kidney Dis.* 1998 Jul;32(1):101-6.
15. Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med.* 1988 Jun;84(6):985-92.
16. Kasiske BL. Cardiovascular disease after renal transplantation. *Semin Nephrol.* 2000 Mar;20(2):176-87.
17. Kasiske BL, Chakkerla HA, Roel J. Explained and unexplained ischemic heart disease risk after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Sep;11(9):1735-43.
18. Mailloux LU, Levey AS. Hypertension in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S120-41.
19. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int.* 1998 Jan;53(1):217-22.
20. Ligtenberg G, Hene RJ, Blankestijn PJ, Koomans HA. Cardiovascular risk factors in renal transplant patients: cyclosporin A versus tacrolimus. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Feb;12(2):368-73.
21. Danovitch GM. Choice of immunosuppressive drugs and individualization of immunosuppressive therapy for kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 1999 Dec;31(8A):2S-6S.
22. Thiede A, Gassel HJ. Experimental Microsurgery as an Educational Concept and Scientific Basis for a Research Group: Principles of the Technical Development of Animal Models in Transplantation Research. In Timmermann W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R., Thiede A, editores. *Organ Transplantation in Rats and Mice.* Heidelberg: Springer-Verlag Press; 1998. p. 17-24.
23. Al Rayyes O, Wallmark A, Floren CH. Additive inhibitory effect of hydrocortisone and cyclosporine on low-density lipoprotein receptor activity in cultured HepG2 cells. *Hepatology.* 1997 Oct;26(4):967-71.

24. Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, et al. Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res*. 2004 Oct 15;300(1):65-71.
25. Rayyes OA, Wallmark A, Floren CH. Cyclosporine inhibits catabolism of low-density lipoproteins in HepG2 cells by about 25%. *Hepatology*. 1996 Sep;24(3):613-9.
26. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8421-5.
27. Fritsche L, Einecke G, Fleiner F, Dragun D, Neumayer HH, Budde K. Reports of large immunosuppression trials in kidney transplantation: room for improvement. *Am J Transplant*. 2004 May;4(5):738-43.
28. Lausada NG, G. Lamonega, R. Durante, E. Dreizzen, E. Raimondi, J. Entrenamiento en modelos de trasplante de órganos en la rata. *Trasplantes*. 2000;6(2): 15-22.
29. Sayegh MH, Milford EL. Renal Transplantation in the Rat. In: Cramer DV, Podesta LG, Makowka L. *Handbook of Animals Models in Transplantation Research*. 1 ed. Los Angeles, California: CRC Press; 1994. p. 3-10.
30. Ahmad N, Pratt JR, Potts DJ, Lodge JP. Comparative efficacy of renal preservation solutions to limit functional impairment after warm ischemic injury. *Kidney Int*. 2006 Mar;69(5):784-5.
31. Treska V, Molacek J, Kuntscher V, Liska V, Kobr J, Racek J, et al. Immunosuppressive agents have an influence on ischemia-reperfusion injury in kidneys procured from a non-heart-beating donor: experimental study. *Transplant Proc*. 2004 Dec;36(10):2931-4.
32. Coulson MT, Jablonski P, Howden BO, Thomson NM, Stein AN. Beyond operational tolerance: effect of ischemic injury on development of chronic damage in renal grafts. *Transplantation*. 2005 Aug 15;80(3):353-61.
33. Salomon S, Steinbruchel D, Nielsen B, Kemp E. Hamster to rat kidney transplantation: technique, functional outcome and complications. *Urol Res*. 1996;24(4):211-6.

34. Hammerman MR. Windows of opportunity for organogenesis. *Transpl Immunol.* 2005 Oct;15(1):1-8.
35. Pollard S, Nashan B, Johnston A, Hoyer P, Belitsky P, Keown P, et al. A pharmacokinetic and clinical review of the potential clinical impact of using different formulations of cyclosporin A. Berlin, Germany, November 19, 2001. *Clin Ther.* 2003 Jun;25(6):1654-69.
36. Schroeder TJ, Hariharan S, First MR. Variations in bioavailability of cyclosporine and relationship to clinical outcome in renal transplant subpopulations. *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):837-9.
37. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G, et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med.* 2006 Jan 26;354(4):343-52.
38. Oh CK, Lee BM, Jeon KO, Kim HJ, Pelletier SJ, Kim SI, et al. Gender-related differences of renal mass supply and metabolic demand after living donor kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2006 Mar-Apr;20(2):163-70.
39. Araki M, Fahmy N, Zhou L, Kumon H, Krishnamurthi V, Goldfarb D, et al. Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation.* 2006 Mar 15;81(5):783-8.
40. Wanner C. Importance of hyperlipidaemia and therapy in renal patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15 Suppl 5:92-6.
41. Wanner C. Lipoproteins and vascular changes in chronic kidney failure. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 2000;30:215-20.
42. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, Gonzalez-Espinoza L, Gonzalez-Tableros N, Martin-del-Campo F, Correa-Rotter R, et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation.* 2005 Jul 15;80(1):47-51.
43. Avram MM. Similarities between glomerular sclerosis and atherosclerosis in human renal biopsy specimens: a role for lipoprotein glomerulopathy. *Am J Med.* 1989 Nov;87(5N):39N-41N.
44. Avram MM. Cholesterol and lipids in renal disease. *Am J Med.* 1989 Nov;87(5N):1N-2N.

45. Strom TB, Carpenter CB. Prostaglandin as an effective antirejection therapy in rat renal allograft recipients. *Transplantation*. 1983 Apr;35(4):279-81.
46. Bradley JA, Mason DW, Morris PJ. Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors. *Transplantation*. 1985 Feb;39(2):169-75.
47. Wardle EN. Eicosanoids and renal allograft rejection. *Nephron*. 1995;70(2):151-4.
48. Vie H, Bonneville M, Cariou R, Moreau JF, Soulillou JP. Interleukin 2 production by peripheral blood lymphocytes in allograft recipients during acute rejection episodes. *Kidney Int*. 1985 Sep;28(3):553-7.
49. Goulet JL, Griffiths RC, Ruiz P, Mannon RB, Flannery P, Platt JL, et al. Deficiency of 5-lipoxygenase accelerates renal allograft rejection in mice. *J Immunol*. 2001 Dec 1;167(11):6631-6.
50. Saumweber DM, Bergmann R, Gokel M, Hammer C. Hyperacute rejection in an ex vivo model of renal xenografting. Role of the mediator response and its pharmacologic manipulation by the specific platelet-activating factor antagonist WEB 2086BS. *Transplantation*. 1994 Feb;57(3):358-63.
51. Coffman TM, Ruiz P, Sanfilippo F, Klotman PE. Chronic thromboxane inhibition preserves function of rejecting rat renal allografts. *Kidney Int*. 1989 Jan;35(1):24-30.
52. Tonshoff B, Busch C, Schweer H, Scharer K, Seyberth HW. In vivo prostanoid formation during acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 1993;8(7):631-6.
53. Fischer DB, Badr KF. Arachidonate and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993 Jan;2(1):61-6.
54. Fagugli RM, Buoncristiani U, Selvi A, Cozzari M, Fedeli L, Bini V, et al. Reduction of renal functional reserve in kidney transplant recipients: a possible role of arachidonic acid metabolism alterations. *Clin Nephrol*. 1998 Jun;49(6):349-55.
55. Brent LB. The immunobiology of transplantation. *Int Surg*. 1999 Oct-Dec;84(4):275-8.
56. Spurney RF, Ibrahim S, Butterly D, Klotman PE, Sanfilippo F, Coffman TM. Leukotrienes in renal transplant rejection in rats. Distinct roles for leukotriene B4 and

- peptidoleukotrienes in the pathogenesis of allograft injury. *J Immunol.* 1994 Jan 15;152(2):867-76.
57. Gibbons CP, Wiley KN, Lindsey NJ, Fox M, Beck S, Slater DN, et al. Cortical and vascular prostaglandin synthesis during renal allograft rejection in the rat. *Transplantation.* 1987 Apr;43(4):472-8.
58. Ruiz P, Coffman TM, Klotman PE, Sanfilippo F. Association of chronic thromboxane inhibition with reduced in situ cytotoxic T cell activity in rejecting rat renal allografts. *Transplantation.* 1989 Oct;48(4):660-6.
59. Schlondorff D, Satriano JA, Hagege J, Perez J, Baud L. Effect of platelet-activating factor and serum-treated zymosan on prostaglandin E2 synthesis, arachidonic acid release, and contraction of cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 1984 Apr;73(4):1227-31.
60. Walker G, Kunz D, Pignat W, van den Bosch H, Pfeilschifter J. Suppression by cyclosporin A of interleukin 1 beta-induced expression of group II phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol.* 1997 Jun;121(4):787-93.
61. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000 May;47(2-3):119-25.
62. Perez-Rojas JM, Bobadilla NA. [Novel action of aldosterone in CsA nephrotoxicity]. *Rev Invest Clin.* 2005 Mar-Apr;57(2):147-55.
63. Ramalho VL, Ramalho HJ, Cipullo JP, Burdmann EA. [Ciclosporine A-induced gingival hyperplasia]. *Rev Assoc Med Bras.* 2003 Apr-Jun;49(2):210-3.
64. Pascual J, Fernandez AM, Marcen R, Ortuno J. Conversion to everolimus in a patient with arterial hypertension and recurrent cutaneous neoplasia--a case report. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Jul;21 Suppl 3:III38-41.
65. Tumgor G, Arikan C, Kilic M, Aydogdu S. Frequency of hyperuricemia and effect of calcineurin inhibitors on serum uric acid levels in liver transplanted children. *Pediatr Transplant.* 2006 Sep;10(6):665-8.
66. Takami A, Asakura H, Takamatsu H, Yamazaki H, Arahata M, Hayashi T, et al. Isolated hyperkalemia associated with cyclosporine administration in allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma. *Int J Hematol.* 2005 Feb;81(2):159-61.

67. Gomez Dumm IN, Raimondi C, Touceda L, Fassit JC. Effect of methylprednisone and cyclosporine on the lipid pattern and polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the rat. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1999;49(3):124-33.
68. Markell MS, Brown CD, Butt KM, Friedman EA. Prospective evaluation of changes in lipid profiles in cyclosporine-treated renal transplant patients. *Transplant Proc*. 1989 Feb;21(1 Pt 2):1497-9.
69. Vathsala A, Weinberg RB, Schoenberg L, Grevel J, Goldstein RA, Van Buren CT, et al. Lipid abnormalities in cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 1989 Jul;48(1):37-43.
70. Brown JH, Anwar N, Short CD, Bhatnager D, Mackness MI, Hunt LP, et al. Serum lipoprotein (a) in renal transplant recipients receiving cyclosporin monotherapy. *Nephrol Dial Transplant*. 1993;8(9):863-7.
71. Brown JH, Murphy BG, Douglas AF, Short CD, Bhatnagar D, Mackness MI, et al. Influence of immunosuppressive therapy on lipoprotein(a) and other lipoproteins following renal transplantation. *Nephron*. 1997;75(3):277-82.
72. Markell MS, Friedman EA. Hyperlipidemia after organ transplantation. *Am J Med*. 1989 Nov;87(5N):61N-7N.
73. Morales JM, Dominguez-Gil B. Cardiovascular risk profile with the new immunosuppressive combinations after renal transplantation. *J Hypertens*. 2005 Sep;23(9):1609-16.
74. Jogestrand T, Fehrman-Ekholm I, Angelin B, Berglund L, Gabel H. Increased prevalence of atherosclerotic wall changes in patients with hyperlipidaemia after renal transplantation. *J Intern Med*. 1996 Feb;239(2):177-80.
75. McManus BM, Horley KJ, Wilson JE, Malcom GT, Kendall TJ, Miles RR, et al. Prominence of coronary arterial wall lipids in human heart allografts. Implications for pathogenesis of allograft arteriopathy. *Am J Pathol*. 1995 Aug;147(2):293-308.
76. Kuster GM, Drexel H, Bleisch JA, Rentsch K, Pei P, Binswanger U, et al. Relation of cyclosporine blood levels to adverse effects on lipoproteins. *Transplantation*. 1994 May 27;57(10):1479-83.

77. Ballantyne CM, Podet EJ, Patsch WP, Harati Y, Appel V, Gotto AM, Jr., et al. Effects of cyclosporine therapy on plasma lipoprotein levels. *Jama*. 1989 Jul 7;262(1):53-6.
78. Stiller MJ, Pak GH, Kenny C, Jondreau L, Davis I, Wachsman S, et al. Elevation of fasting serum lipids in patients treated with low-dose cyclosporine for severe plaque-type psoriasis. An assessment of clinical significance when viewed as a risk factor for cardiovascular disease. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Sep;27(3):434-8.
79. Aakhus S, Dahl K, Wideroe TE. Hyperlipidaemia in renal transplant patients. *J Intern Med*. 1996 May;239(5):407-15.
80. Walli AK, Grone E, Miller B, Grone HJ, Thiery J, Seidel D. Role of lipoproteins in progressive renal disease. *Am J Hypertens*. 1993 Nov;6(11 Pt 2):358S-66S.
81. Lausada N, de Gomez Dumm Nelva T, Georgina L, Gisela C, Clemente R. Effect of different immunosuppressive therapies on the lipid pattern in kidney-transplanted rats. *Transpl Int*. 2005 May;18(5):524-31.
82. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989 Dec 21;321(25):1725-38.
83. Cosenza C.A. Cramer DV, Makowka L. The use of immunosuppressive agents in animals models o experimental transplantation. In: Cramer DV, Podesta LG, Makowka L. *Hanbook of animal models in trasplantation research*. Boca raton, Florida.: CRC Press; 1994. p. 329-36
84. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl*. 2001 Jun;7(6):473-84.
85. Dias VC, Yatscoff RW. Investigation of rapamycin transport and uptake across absorptive human intestinal cell monolayers. *Clin Biochem*. 1994 Feb;27(1):31-6.
86. Wasowska BA, Zheng XX, Strom TB, Kupieck-Weglinski JW. Adjunctive rapamycin and CsA treatment inhibits monocyte/macrophage associated cytokines/chemokines in sensitized cardiac graft recipients. *Transplantation*. 2001 Apr 27;71(8):1179-83.
87. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem*. 1998 Jul;31(5):335-40.

88. Wu J, Palladino MA, Figari IS, Morris RE. Comparative immunoregulatory effects of rapamycin, FK 506 and cyclosporine on mitogen-induced cytokine production and lymphoproliferation. *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 1):238-40.
89. Kahan BD, Podbielski J, Napoli KL, Katz SM, Meier-Kriesche HU, Van Buren CT. Immunosuppressive effects and safety of a sirolimus/cyclosporine combination regimen for renal transplantation. *Transplantation.* 1998 Oct 27;66(8):1040-6.
90. Desai DM, Kuo PC. Perioperative management of special populations: immunocompromised host (cancer, HIV, transplantation). *Surg Clin North Am.* 2005 Dec;85(6):1267-82.
91. Brenner RR. Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Feb;68(2):151-62.
92. Brenner RR, Bernasconi AM. [Essential fatty acids of the n-6 and n-3 series supplied to human diet by edible fish from the Parana river]. *Medicina (B Aires).* 1997;57(3):307-14.
93. Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2002 Mar 15;277(11):8755-8.
94. Enoch HG, Catala A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem.* 1976 Aug 25;251(16):5095-103.
95. Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Feb;68(2):97-106.
96. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000 Nov 15;14(22):2819-30.
97. Boney CM, Fiedorek FT, Jr., Paul SR, Gruppuso PA. Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation. *Endocrinology.* 1996 Jul;137(7):2923-8.

98. Storlazzi A, Maresca B, Gargano S. CAMP is involved in transcriptional regulation of delta9-desaturase during *Histoplasma capsulatum* morphogenesis. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999 Sep-Dec;2(3):172-7.
99. Waters KM, Miller CW, Ntambi JM. Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Apr 28;233(3):838-43.
100. Kasturi R, Joshi VC. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 1982 Oct 25;257(20):12224-30.
101. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001 Apr;2(4):282-6.
102. Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res.* 1999 Sep;40(9):1549-58.
103. Miyazaki M, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Feb;68(2):113-21.
104. Rahman SM, Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):11110-5.
105. Rimoldi OJ, Finarelli GS, Brenner RR. Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 4;283(2):323-6.
106. Dimeny E, Fellstrom B. Metabolic abnormalities in renal transplant recipients. Risk factors and predictors of chronic graft dysfunction? *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Jan;12(1):21-4.
107. Turvey SE, Wood KJ. Immunobiology of solid organ transplantation. *Int Surg.* 1999 Oct-Dec;84(4):279-90.
108. Avram MM, Fein PA, Antignani A, Mittman N, Mushnick RA, Lustig AR, et al. Cholesterol and lipid disturbances in renal disease: the natural history of uremic

- dyslipidemia and the impact of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Med.* 1989 Nov;87(5N):55N-60N.
109. de Gomez Dumm NT, Giammona AM, Touceda LA, Raimondi C. Lipid abnormalities in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. *Medicina (B Aires).* 2001;61(2):142-6.
110. Kaysen GA. Hyperlipidemia of chronic renal failure. *Blood Purif.* 1994;12(1):60-7.
111. Martens JS, Lougheed M, Gomez-Munoz A, Steinbrecher UP. A modification of apolipoprotein B accounts for most of the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1999 Apr 16;274(16):10903-10.
112. Martens JS, Reiner NE, Herrera-Velit P, Steinbrecher UP. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):4915-20.
113. Lausada NR, de Gomez Dumm IN, Camihort G, Raimondi JC. Lipid pattern in kidney-transplanted rats without immunosuppressive therapy. *Transplant Proc.* 2002 Feb;34(1):380-3.
114. Ibels LS, Alfrey AC, Subryan V, Weil R, 3rd. Hyperlipidemia following renal transplantation. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1976;22:46-53.
115. Lee DM, Knight-Gibson C, Samuelsson O, Attman PO, Wang CS, Alaupovic P. Lipoprotein particle abnormalities and the impaired lipolysis in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2002 Jan;61(1):209-18.
116. Rostand SG, Brunzell JD, Cannon RO, 3rd, Victor RG. Cardiovascular complications in renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1991 Dec;2(6):1053-62.
117. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003 Feb 8;361(9356):477-85.
118. De Caterina R, Spiecker M, Solaini G, Basta G, Bosetti F, Libby P, et al. The inhibition of endothelial activation by unsaturated fatty acids. *Lipids.* 1999;34 Suppl: S191-4.
119. von Schacky C. The role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2003 Mar;5(2):139-45.

120. von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 Mar;7(2):131-6.
121. Harris WS. Are omega-3 fatty acids the most important nutritional modulators of coronary heart disease risk? *Curr Atheroscler Rep*. 2004 Nov;6(6):447-52.
122. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med*. 2004 Jul;39(1):212-20.
123. Sands SA RK, Windsor SL, Harris WS. The Impact of Age, Body Mass Index, and Fish Intake on the EPA and DHA Content of Human Erythrocytes. *Lipids*. 2005;40(4):343-7.
124. Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000 Oct;11(5):503-9.
125. Liu J, Rosner MH. Lipid abnormalities associated with end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2006 Jan-Feb;19(1):32-40.
126. Bostom AG, Selhub J. Homocysteine and arteriosclerosis: subclinical and clinical disease associations. *Circulation*. 1999 May 11;99(18):2361-3.
127. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*. 1999 Jan 5-12;99(1):178-82.
128. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999 May;55(5):1899-911.
129. Schlondorff D. Cellular mechanisms of lipid injury in the glomerulus. *Am J Kidney Dis*. 1993 Jul;22(1):72-82.
130. Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery*. 1961 Oct;50:668-72.
131. Pahlavan PS, Mehrabi A, Kashfi A, Soleimani M, Fani-Yazdi SH, Schemmer P, et al. Guidelines for prevention and management of complications following kidney transplantation in rats. *Transplant Proc*. 2005 Jun;37(5):2333-7.
132. Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome. *Microsurgery*. 2003;23(4):387-94.

133. Castuma JC, Catala A, Brenner RR. Oxidative desaturation of eicosa-8,11-dienoic acid to eicosa-5,8,11-trienoic acid: comparison of different diets on oxidative desaturation at the 5,6 and 6,7 positions. *J Lipid Res.* 1972 Nov;13(6):783-9.
134. Dugan JM, Dise CA, Goodman DB. Preparation of inside-out vesicles from erythrocyte membranes inactivates the pathway for oleic acid incorporation into phospholipid. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Jun 11;816(1):93-101.
135. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
136. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957 May;226(1):497-509.
137. Angeletti C, de Alaniz MJ. Effect of ethanol on glycerolipid and fatty acid metabolism in Hep G2 human-hepatoma cells. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 1996;46(2):57-69.
138. Lowry RR. Ferric chloride spray detector for cholesterol and cholesteryl esters on thin-layer chromatograms. *J Lipid Res.* 1968 May;9(3):397.
139. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982 Oct;28(10):2077-80.
140. Consensus conference. Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. *Jama.* 1985 Apr 12;253(14):2080-6.
141. Stegemann H, Loeschcke V. [Microdetermination of nitrogen as indophenol blue by chloramine-T oxidation.]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1962 Nov 15;329:241-8.
142. Bartels H, Bohmer M. [Micro-determination of creatinine]. *Clin Chim Acta.* 1971 Mar;32(1):81-5.
143. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):713-23.
144. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int.* 1993 Aug;44(2):411-22.

145. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, Croker B, Demetris AJ, Drachenberg C, et al. Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc.* 1996 Feb;28(1):441-4.
146. Solez K, Racusen L, Rayner D, Olsen S, Halloran P. The Banff schema four years later. *Transplant Proc.* 1996 Feb;28(1):450-2.
147. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* 1979 Dec 6;282(5739):615-6.
148. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Apr;72(4):1441-5.
149. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science.* 1980 Jul 25;209(4455):497-9.
150. Thrift RN, Forte TM, Cahoon BE, Shore VG. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J Lipid Res.* 1986 Mar;27(3):236-50.
151. Wanson JC, Drochmans P, Mosselmans R, Ronveaux MF. Adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. Ultrastructural characteristics of intercellular contacts and cell membrane differentiations. *J Cell Biol.* 1977 Sep;74(3):858-77.
152. Angeletti C, de Alaniz MJ. Fatty acid uptake and metabolism in Hep G2 human-hepatoma cells. *Mol Cell Biochem.* 1995 Feb 23;143(2):99-105.
153. Philips HJ. In: Dye exclusion test for cell viability in tissue cultures. Nueva York: Academic Press; 1973. p. 406.
154. Marra CA, de Alaniz MJ. Incorporation and metabolic conversion of saturated and unsaturated fatty acids in SK-Hep1 human hepatoma cells in culture. *Mol Cell Biochem.* 1992 Nov 18;117(2):107-18.
155. James A, Piper E. *Journal of Chromatography.* 1961;5:265.
156. Bartosikova L, Necas J, Benes L, Janostikova E, Bartosik T, Klusakova J, et al. Influence of antioxidant effect of stobadine derivative in condition of kidney ischemia-

- reperfusion in a pre-clinical experiment (effect in therapy). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec;149(2):377-80.
157. Dean PG, Lund WJ, Larson TS, Prieto M, Nyberg SL, Ishitani MB, et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation.* 2004 May 27;77(10):1555-61.
158. Kahn D, Spearman CW, Mall A, Shepherd E, Engelbrecht G, Lotz Z, et al. The effect of rapamycin on the healing of the ureteric anastomosis and wound healing. *Transplant Proc.* 2005 Mar;37(2):830-1.
159. Rogers CC, Hanaway M, Alloway RR, Alexander JW, Boardman RE, Trofe J, et al. Corticosteroid avoidance ameliorates lymphocele formation and wound healing complications associated with sirolimus therapy. *Transplant Proc.* 2005 Mar;37(2):795-7.
160. Rodo E RJ, Tanus E, Depine S, Creperula M, Yeyat N. Manejo renal de la urea por el riñón trasplantado, estudio retrospectivo en 17 pacientes. *Congreso Latinoamericano de Trasplantes, Lima Perú 1979.* p.36.
161. Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology.* 1995 May;136(5):2143-9.
162. Grunfeld C, Adi S, Soued M, Moser A, Fiers W, Feingold KR. Search for mediators of the lipogenic effects of tumor necrosis factor: potential role for interleukin 6. *Cancer Res.* 1990 Jul 15;50(14):4233-8.
163. Grunfeld C, Dinarello CA, Feingold KR. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interferon alpha stimulate triglyceride synthesis in HepG2 cells. *Metabolism.* 1991 Sep;40(9):894-8.
164. Grunfeld C, Soued M, Adi S, Moser AH, Fiers W, Dinarello CA, et al. Interleukin 4 inhibits stimulation of hepatic lipogenesis by tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6 but not by interferon-alpha. *Cancer Res.* 1991 Jun 1;51(11):2803-7.
165. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 1992 Aug 1;52(15):4113-6.

166. Feingold KR, Soued M, Adi S, Staprans I, Neese R, Shigenaga J, et al. Effect of interleukin-1 on lipid metabolism in the rat. Similarities to and differences from tumor necrosis factor. *Arterioscler Thromb*. 1991 May-Jun;11(3):495-500.
167. Feingold KR, Soued M, Adi S, Staprans I, Shigenaga J, Doerrler W, et al. Tumor necrosis factor-increased hepatic very-low-density lipoprotein production and increased serum triglyceride levels in diabetic rats. *Diabetes*. 1990 Dec;39(12):1569-74.
168. Lerut JP. Avoiding steroids in solid organ transplantation. *Transpl Int*. 2003 Apr;16(4):213-24.
169. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Pownall HJ, Opekun AR, Hachey DL, Jaffe JS, et al. Effect of sirolimus on the metabolism of apoB100- containing lipoproteins in renal transplant patients. *Transplantation*. 2001 Oct 15;72(7):1244-50.
170. Yakupoglu YK, Kahan BD. Sirolimus: a current perspective. *Exp Clin Transplant*. 2003 Jun;1(1):8-18.
171. Davidson M. Considerations in the treatment of dyslipidemia associated with chronic kidney failure and renal transplantation. *Prev Cardiol*. 2005 Fall;8(4):244-9.
172. Mangino MJ, Anderson CB, DeSchryver K, Tyler JD, Sicard GA, Turk JW. Arachidonic acid metabolism and renal allograft rejection. *Transplant Proc*. 1987 Feb;19(1 Pt 1):444-5.
173. Clemann N, Bechter R. Effects of rapamycin and FK 506 on rat Sertoli cells in vitro. *Adv Exp Med Biol*. 1998;444:67-70; discussion -1.
174. Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci*. 2004 Sep;66(9):1119-24.
175. Seethalakshmi L, Menon M, Malhotra RK, Diamond DA. Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats. *J Urol*. 1987 Oct;138(4 Pt 2):991-5.
176. Masuda H, Fujihira S, Ueno H, Kagawa M, Katsuoka Y, Mori H. Ultrastructural study on cytotoxic effects of cyclosporine A in spermiogenesis in rats. *Med Electron Microsc*. 2003 Sep;36(3):183-91.

177. Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, et al. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation*. 2004 Sep 21;110(12):1645-9.
178. Jackson KG, Maitin V, Leake DS, Yaqoob P, Williams CM. Saturated fat-induced changes in Sf 60-400 particle composition reduces uptake of LDL by HepG2 cells. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):393-403.
179. Kew S, Wells S, Thies F, McNeill GP, Quinlan PT, Clark GT, et al. The effect of eicosapentaenoic acid on rat lymphocyte proliferation depends upon its position in dietary triacylglycerols. *J Nutr*. 2003 Dec;133(12):4230-8.
180. Leaf A. Do n-3 polyunsaturated fatty acids prevent atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting surgery? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005 Dec;2(12):626-7.
181. Leaf A, Kang JX, Xiao YF. Omega-3 fatty acids and ventricular arrhythmias. *World Rev Nutr Diet*. 2005;94:129-38.
182. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation*. 2003 Jun 3;107(21):2646-52.
183. Leaf A, Xiao YF, Kang JX, Billman GE. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Ther*. 2003 Jun;98(3):355-77.
184. Leaf A, Xiao YF, Kang JX, Billman GE. Membrane effects of the n-3 fish oil fatty acids, which prevent fatal ventricular arrhythmias. *J Membr Biol*. 2005 Jul;206(2):129-39.
185. de Alaniz MJ, Marra CA. Steroid hormones and fatty acid desaturases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Feb;68(2):163-70.
186. Garg ML, Snoswell AM, Sabine JR. Influence of dietary cholesterol on desaturase enzymes of rat liver microsomes. *Prog Lipid Res*. 1986;25(1-4):639-44.
187. Landau JM, Sekowski A, Hamm MW. Dietary cholesterol and the activity of stearyl CoA desaturase in rats: evidence for an indirect regulatory effect. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Apr 21;1345(3):349-57.
188. Hall EA, Ren S, Hylemon PB, Redford K, del Castillo A, Gil G, et al. Mitochondrial cholesterol transport: a possible target in the management of hyperlipidemia. *Lipids*. 2005 Dec;40(12):1237-44.

189. Yu-Poth S, Yin D, Kris-Etherton PM, Zhao G, Etherton TD. Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells. *J Nutr.* 2005 Nov;135(11):2541-5.
190. Schlondorff D, Ardaillou R. Prostaglandins and other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int.* 1986 Jan;29(1):108-19.