

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN WT-1 Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE LA INJURIA RENAL INDUCIDA DURANTE LA NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA

Autores

Luciana Jorgelina MAZZEI^{1,3}, Walter MANUCHA^{2,3}

1-Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo

2-Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad nacional de Cuyo

3-Instituto de Biología y Medicina Experimental de Cuyo IMBECU-CONICET

Resumen

El estudio del desarrollo renal sirve como un paradigma para comprender los mecanismos que son la base de la formación de un órgano. Múltiples genes desempeñan funciones trascendentes en el desarrollo renal temprano, entre los que se destaca WT-1. Se ha comprobado experimentalmente que la proteína WT1 en unos casos reprime y en otros activa la transcripción de numerosos genes, pero sus dianas fisiológicas son poco conocidas. Recientes investigaciones genéticas han permitido caracterizar muchas de las complejas interacciones entre los componentes individuales, sin embargo la concreción de nuevos experimentos bioquímicos, moleculares y funcionales como los propuestos en nuestro y otros laboratorios de investigación, nos permitirán establecer con mayor profundidad el grado de compromiso entre las proteínas participantes y las posibles consecuencias fisiopatogénicas de su desacople.

Abstract

The study of renal development serves as a paradigm for understanding the mechanisms underlying an organ formation. Multiple genes perform transcendental functions in early kidney development, among which stands WT-1. It has been experimentally proven that the WT-1 protein in some cases acts as a transcriptional activator and in others represses the transcription of several genes, but its physiological targets are largely unknown. Recent genetic researches have allowed characterization of many of the complex interactions among the individual components, but the realization of new biochemical, molecular and functional experiments as proposed in our and other research labs, allow us to establish a deeper level of commitment among proteins involved and the potential physiopathogenic consequences of their disengagement.

La enfermedad renal crónica tiene una elevada incidencia en todo el mundo y entre los desórdenes renales más complejos, se destaca la nefropatía obstructiva. Por nefropatía y uropatía obstructiva se describen entidades patológicas que causan hidronefrosis por obstrucción del tracto urinario. Esta enfermedad es frecuente en niños debido a fallas congénitas del tracto urinario sobre todo a nivel de la unión ureteropélvica e involucra respuestas hemodinámicas así como hidrodinámicas, las que conducirían a cambios celulares en todos los compartimientos renales, fibrosis intersticial, apoptosis y atrofia tubular (1).

El riñón como órgano regulador del medio interno es una estructura extremadamente compleja que se ocupa de funciones endocrinas importantes que incluyen la producción de renina, prostaglandinas y eritropoyetina, eliminación de desechos metabólicos, control y regulación del estado ácido-base, el volumen y la composición química del líquido extracelular. La denominada unidad funcional o nefrona, está constituida por aproximadamente unas 10.000 células, y éstas, junto con los túbulos colectores, forman los túbulos uriníferos. Se han caracterizado al menos 14 subtipos celulares diferentes, perfectamente organizados y ubicados en los distintos segmentos de los túbulos. Esto implica que la morfogénesis renal debe estar perfectamente regulada durante el desarrollo, de tal forma que cada tipo celular en particular se sitúe en su correspondiente localización final, en relación a los demás tipos celulares a lo largo de los túbulos.

El desarrollo renal requiere la conversión de células del mesénquima mesodérmico en células epiteliales polarizadas (2), este es uno de los procesos que tienen lugar durante la organogénesis del riñón, gónadas y mesotelio. El número de células maduras en un tejido depende del balance entre la mitosis y la apoptosis (muerte celular programada). En el riñón, las células que permanecen alrededor del mesénquima inducido muestran características morfológicas y bioquímicas de muerte celular programada. En embriones E14-E19 aún se encuentran islotes de células apoptóticas entre las nefronas en desarrollo, indicando así la importancia de este fenómeno en el desarrollo renal (3, 4).

Recientemente, ha sido identificado un gen que parece ser el principal determinante del inicio en la secuencia de transformación mesenquimal a epitelial. Se trata de un gen que se identificó ausente o mutado en el cáncer de células embrionarias renales (tumor de Wilms o WT-1). Este gen se encuentra en el cromosoma 11 (11p13) y codifica una proteína cuyo extremo amino-terminal es rico en prolina y glutamina, además de cuatro dedos de zinc (cis)²-(his)² en el extremo carboxilo-terminal (5-7). Existe evidencia de que WT-1 puede estar directamente implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. Estudios de hibridación "*in situ*" han demostrado que es selectivamente expresado en el blastema metanéfrico y epitelio glomerular durante el desarrollo embrionario y fetal (8). Los patrones de expresión de WT-1 encontrados (9) señalan un importante

papel de este gen no sólo durante el desarrollo urogenital, sino durante la vida fetal y postnatal. Además, usando técnicas de microscopía láser se sub-localizó WT-1 en el núcleo, independientemente del tipo celular y el estadio de desarrollo. Además, se ha concluido que el crecimiento inicial del brote uretérico es dependiente de una señal del blastema metanéfrico y que WT-1 sería indispensable (10-12). Para determinar el efecto de una mutación en el WT-1, se determinó si la deficiencia en éste afecta la expresión del Pax-2 (un posible factor regulador presente durante el desarrollo renal, miembro de la familia Pax) (13) que se encuentra en el tubo de Wolff y el brote uretérico, así como en el mesénquima metanéfrico, cuando comienza a condensarse alrededor de este último (14, 15). Se obtuvieron secciones de embriones E11 mutados y «wild type» para el WT-1 y se incubaron con un anticuerpo policlonal para el Pax-2; se obtuvo una señal en el tubo de Wolff tanto en el mutante como en el «wild type»; sin embargo, no se detectó expresión en el blastema metanéfrico del mutante, lo cual indica la necesidad de WT-1 para la expresión de Pax-2.

Por otro lado, estudios de la última década confirman que la nefropatía obstructiva crónica induce entre las principales alteraciones: respuesta inflamatoria (citoquinas), modulación de sustancias vasoactivas (angiotensina II, óxido nítrico, etc.) y aumento de los procesos apoptóticos y/o necróticos, lo que favorece la aparición temprana de signos de atrofia tubular así como fibrosis tubulointersticial (16). La transición de células epiteliales a miofibroblastos ha sido discutida como posible mecanismo involucrado con la fibrosis renal (17). Por lo tanto inflamación, estrés oxidativo y apoptosis son los principales mecanismos involucrados en la nefropatía obstructiva y permanecen en el centro de atención de muchos investigadores. Al respecto, se demostró en nuestro laboratorio que la corteza renal de rata neonata sometida a obstrucción ureteral unilateral (OUU) manifestaba una sensible disminución de la expresión del intercambiador sodio/hidrógeno isoforma 1 (NHE₁) y que esto sería un evento de señalización que participaría en la inducción de la apoptosis epitelial tubular a través de la regulación de la familia de genes Bcl₂ y la activación de caspasa 3 (18). Se conoce que la disminución del pH intracelular es un factor que favorece la activación de las principales enzimas ejecutoras de la muerte celular programada (caspasas) y nuestros hallazgos contribuirían a intentar explicar esa acidificación mediante la reducción de la expresión del intercambiador de H⁺.

El desarrollo y la función renal durante la nefropatía obstructiva neonatal se ven alterados por la deformación mecánica de células tubulares (19) así como por modificaciones en la expresión temporal/espacial de genes que controlan la nefrogénesis. En tal sentido, estudios recientes dan cuenta que WT-1 y Pax-2 (principales reguladores génicos de transformación mesenquimatosa a epitelial), se encuentran disminuidos durante la nefropatía obstructiva; lo que favorece la apoptosis

por disminución de genes dependientes relacionados a inhibición de la misma (BcL-2, HGF, IGF, BMP7), e incremento en la expresión de genes proapoptóticos tales como Bax y TGF β (20). En acuerdo, nuestro laboratorio mostró disminución del mensajero de WT-1 en cortezas de ratas neonatas sometidas a obstrucción ureteral unilateral completa (21). Además, resultados recientemente publicados también por nuestro grupo, sugieren que el tratamiento farmacológico con Rosuvastatina podría preservar marcadores nefrogénicos como WT-1, Snail, BMP-7 y caderina E durante la injuria neonatal obstructiva (22). Figura 1

La nefropatía obstructiva condiciona además, la disminución de genes relacionados al desarrollo vascular renal como renina y receptores AT₂ de angiotensina II, lo cual juega un rol central en el inicio de la fibrogénesis renal. En tal sentido, nuestro laboratorio demostró que el bloqueo selectivo de receptores AT₁ de angiotensina II, disminuye la fibrosis intersticial renal durante la nefropatía obstructiva; dicho efecto estaría asociado a la actividad y expresión de las enzimas óxido nítrico sintasas y ciclooxigenasa (23). Por otro lado, de interés para nuestros hallazgos, Johannesen y colaboradores demostraron interacción funcional entre el gen promotor de la principal fuente productora de óxido nítrico (iNOS) y WT-1 (24). Por su parte, Marcet-Palacios y colegas sugirieron un rol modulador del óxido nítrico en la proliferación de linfocitos T y que WT-1 podría ser un componente importante de la regulación de proliferación y función de los mismos (25). WT-1 funciona como regulador transcripcional y su actividad depende de fosforilación controlada por la proteína kinasa A, dicha fosforilación transloca WT-1 del núcleo al citosol lo que interfiere con su actividad transcripcional. También, un novedoso estudio en isquemia reperusión renal sugiere que el uso de sildenafil (un donante de óxido nítrico) tiene efectos antiapoptóticos mediados por fosforilación de ERK e inducción de iNOS/eNOS así como disminución del índice Bax/BcL-2 (26). La fosforilación de WT-1 y su relación con mediadores génicos relacionados, podría ser uno de los mecanismos regulados por el óxido nítrico en la inducción a la muerte celular. El gen WT-1 presenta extrema complejidad de regulación que involucra a una familia de aproximadamente 24 isoformas proteicas expresadas desde el mismo gen. Diferentes isoformas WT-1 poseen funciones disímiles definidas por los diversos sitios de empalme. De mismo modo, diversos tratamientos pueden afectar la expresión diferencial de isoformas de WT-1 (27).

Muy recientemente, el óxido nítrico ha emergido como inhibidor endógeno de la apoptosis durante la nefropatía obstructiva neonatal (28), destacándose la interacción con Hsp70 y sus efectos antioxidantes así como antiapoptóticos (29). Por otro lado, Hsp70 sería un cofactor importante para la función de WT-1, lo que sugiere un rol determinante durante la diferenciación renal (30). En concordancia, nuestro grupo demostró en ratas neonatas sometidas a obstrucción ureteral unilateral durante 14 días, una marcada apoptosis cortical renal con significativa pérdida de peso renal y

disminución de la expresión de Hsp70 asociado a menor disponibilidad de óxido nítrico (28, 29). Los resultados de nuestro laboratorio así como preliminares observaciones, fortalecerían la hipótesis de nuestro trabajo dado que hemos observado en ratas neonatas sometidas a la injuria renal, una sensible disminución en la expresión del mensajero de WT-1 que podría relacionarse con marcadores de fibrosis y apoptosis (21, 31 y 32). Por otro lado, el uso de rosuvastatina a razón de 10mg/Kg/día, condicionó una importante recuperación de los niveles del óxido nítrico en concordancia con menor grado de apoptosis renal (33). Además, establecimos en el mismo modelo que la disponibilidad del óxido nítrico podría estar asociado a una mayor interacción eNOS/Hsp70 con menor expresión de caveolina 1 contribuyendo a proteger al tubulointersticio de la fibrosis (34) Figura 2. También, resultados preliminares de expresión por western blot para WT-1 realizados en corteza renal de rata neonata sometida a daño obstructivo, y tratadas con donantes de óxido nítrico, nos sugieren una posible recuperación en los niveles de la proteína asociados a disminución de la fosforilación de ERK y p38. Esto resulta muy interesante si se considera que ERK y p38 son factores vitales para el desarrollo renal. ERK parece jugar un papel en la organogénesis mientras que p38 estaría asociado a crecimiento y desarrollo renal (35). Figura 3

Finalmente, crecientes evidencias sugieren que la vitamina D retardaría la progresión de la enfermedad renal crónica, resultando muy interesante desde que se conoce que el receptor de vitamina D sería regulado transcripcionalmente por WT-1 (36). Además, los activadores de los receptores de vitamina D tienen un efecto supresor sobre el SRA (37, 38), así como efectos anti-inflamatorios y anti-fibróticos. Por lo tanto, Paricalcitol (inductor de receptores de vitamina D o VDR), podría mejorar la fibrosis intersticial renal en la nefropatía obstructiva. La combinación Paricalcitol/Trandolapril (inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina II o IECA) tuvo una eficacia aditiva en el retraso de la formación de cicatrices renales durante la nefropatía obstructiva (39). En comparación con los ratones de tipo salvaje, los ratones nulos para VDR desarrollan daño renal más grave en el riñón obstruido, con marcada atrofia tubular y fibrosis intersticial. El tratamiento con losartán (inhibidor selectivos de receptores AT₁ de Angiotensina II), eliminó la diferencia en la fibrosis inducida por obstrucción intersticial entre los de tipo salvaje y ratones nulos VDR, lo que sugiere que Angiotensina II contribuye a la fibrosis renal observada en ratones obstruidos -/-VDR (40). Recientemente, ha sido sugerido que los receptores de vitamina D podrían modular la exaltación del sistema renina-angiotensina (SRA) propio de la nefropatía obstructiva y otros modelos de daño renal, cardíaco, etc (37, 38 y 41). En acuerdo, resultados inéditos de nuestro grupo, realizados en ratas obstruidas y tratadas durante 15 días con Paricalcitol (30 ng/Kg/día), dieron cuenta de mejoras en parámetros histológicos, bioquímicos y moleculares durante el

desarrollo de la injuria obstructiva renal (42) sugiriendo por primera vez que la mitocondria podría ser un blanco del efecto citoprotector del inductor de VDR (43). Figura 4

Finalmente, la frecuencia de enfermos renales se incrementa en todo el Mundo, y por lo tanto existe una gran necesidad de comprender con mayor precisión los mecanismos patogénicos de las causas más frecuentes de ingreso a diálisis como la nefropatía vascular, la diabetes, las glomerulopatías primitivas y la nefropatía obstructiva. De ellas, la nefropatía obstructiva congénita es la causa primaria de la enfermedad renal terminal en niños. El rápido diagnóstico e inicio del tratamiento son vitales para preservar la función renal. Los efectos de la nefropatía incluyen: disminución del flujo plasmático renal e índice de filtración glomerular, infiltrado intersticial de leucocitos, disminución de la capacidad de concentrar la orina así como apoptosis y fibrosis. Los mediadores moleculares más estudiados durante la nefropatía obstructiva son la angiotensina II, el factor transformador de crecimiento-beta y el óxido nítrico, entre otros. Sin embargo, resultan escasos los estudios que involucran a la nefropatía obstructiva durante la organogénesis renal y por lo tanto, condicionan a un estado actual de conocimiento limitado en relación a eventos celulares y moleculares alterados durante la nefropatía obstructiva neonatal lo que fortalece y justifica la propuesta de nuestro laboratorio sobre el estudio nuevas vías de señalización moduladoras de apoptosis y fibrosis. Los modelos animales de enfermedad renal aguda y crónica son considerados importantes herramientas experimentales que se utilizan para investigar nuevas vías mecanicistas y validar posibles nuevas intervenciones terapéuticas antes de las pruebas pre-clínicas en seres humanos. En los últimos años, los modelos de ratones con insuficiencia renal crónica han sido ampliamente utilizados para estos fines. Además, y a pesar de sus importantes limitaciones, el modelo de la obstrucción ureteral unilateral esencialmente ha sido empleado con un alto grado de rendimiento como modelo “*in vivo*”, dado que reproduce con mucha aproximación los mecanismos patogénicos fundamentales que caracterizan a todas las formas de enfermedad renal crónica en un lapso de tiempo relativamente corto (Pediatr Nephrol. 2012 Aug;27(8):1233-47).

Bibliografía

1. Chevalier RL. Promise for gene therapy in obstructive nephropathy. *Kidney Int.*, 66 (2004): 1709-1710.
2. Ekblom P: Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium. *FASEB (Fed Am Soc Exp Biol) J* 3(1989):2141-2160.
3. Koseki C, Herzlinger D y Al-Awqati Q: Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 119 (1992):1327-1333.

4. Ortiz-Arduan A y Neilson EG: Apoptotic cell death in renal disease. *Nefrología* 14(1994):391-407.
5. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T y Housman DE: Isolation, characterization, and expression of the murine Wimls' tumor gene (WT-1) during kidney development. *Mol Cell Biol* 11(1991):1707-1712.
6. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, Jones C y Housman E: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60(1990):509-520.
7. Morris JF, Madden SL, Tournay OE, Cook DM, Sukhatme VP y Rauscher F III: Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT-1 Wilms' tumor locus. *Oncogene* 6(1991):2339-2348.
8. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, Van Heinigen V y Hastie N: The candidate Wilms tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346(1990):194-197.
9. Mundios S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A y Zabel B: Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embrionic and adult tissues. *Development* 119(1993):1329-1341.
10. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D y Jaenisch R: WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74 (1993):679-691.
11. Burrow C y Wilson PD: A putative tumor-secreted growth factor activity required for primary culture of human nephroblast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(1993):6066-6070.
12. Rupperecht HD, Drummond IA, Madden SL, Rauscher FJ III y Sukhatme VP: The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem* 269(1994):6198-6202.
13. Gruss P y Walther C: Pax in development. *Cell* 69(1992):719-722.
14. Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO y Gruss P: Pax-2, a new murine paired box containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109(1990):787-795.
15. Dressler GR y Douglass EC: Pax-2 is a DNA binding protein expressed in embrionic kidney and Wilms' Tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(1992):1179-1183.
16. Manucha W. Biochemical-molecular markers in unilateral ureteral obstruction. *Biocell*. 31 (2007): 1-12. Review
17. Docherty NG, Morales AI, López Novoa JM, Pérez Barriocanal F. The transition of epithelial cells to fibromyoblasts. Mechanisms involved and its possible relationship with renal fibrosis. *Nefrologia*. 27 (2007): 681-8. Review

18. Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Vallés P. Apoptosis induction is associated with decreased NHE₁ expression in neonatal unilateral ureteric obstruction. *BJU Int.* 100 (2007): 191-8.
19. Quinlan MR, Docherty NG, Watson RW, Fitzpatrick JM. Exploring mechanisms involved in renal tubular sensing of mechanical stretch following ureteric obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295 (2008):F1-F11.
20. Liapis H. Biology of congenital obstructive nephropathy. *Nephron Exp Nephrol.* 93(2003):87-91.
21. Mazzei L, García IM, Cacciamani V, Benardón ME, Manucha W. WT-1 mRNA expression is modulated by nitric oxide availability and Hsp70 interaction after neonatal unilateral ureteral obstruction. *Biocell.* 34(2010):121-32
22. Mazzei L, García I, Altamirano L, Docherty NG, Manucha W. Rosuvastatin preserves renal structure following unilateral ureteric obstruction in the neonatal rat. *Am J Nephrol.* 35(2012):103-13.
23. Manucha W, Oliveros L, Carrizo L, Seltzer A, Vallés P. Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction. *Kidney Int.* 65(2004):2091-107.
24. Johannesen J, Karlsen AE, Pociot F, Roenn SG, Nerup J. Strain dependent rat iNOS promoter activity--correlation to identified WT1 transcription factor binding site. *Autoimmunity.* 36(2003):167-75.
25. Marcet-Palacios M, Davoine F, Adamko DJ, Moqbel R, Befus AD. Human lymphocytes express the transcriptional regulator, Wilms tumor 1: the role of WT1 in mediating nitric oxide-dependent repression of lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 363(2007):283-7.
26. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Chung S, Chang YK, Lee SJ, Na KR, Kim SY, Shin YT, Lee KW. Am J Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Physiol Renal Physiol.* 297(2009):F362-70.
27. Muñoz-Chápuli R, Carmona R, González-Iriarte M, Macías D, María J. Las múltiples caras del gen WT-1: funciones en el desarrollo e implicancias clínicas. *Acta Pediátrica Mexicana* 24(2003): 29-38.
28. Manucha W, Vallés PG. Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide.* 18(2008):204-15.
29. Manucha W, Vallés P. Hsp70/nitric oxide relationship in apoptotic modulation during obstructive nephropathy. *Cell Stress Chaperones.* 13(2008):413-20.

30. Maheswaran S, Englert C, Zheng G, Lee SB, Wong J, Harkin DP, Bean J, Ezzell R, Garvin AJ, McCluskey RT, DeCaprio JA, Haber DA. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70. *Genes Dev.* 12(1998):1108-20.
31. Mazzei, L.; García, M.; Manucha, W. (2010) Patrón génico de fibrosis y apoptosis en nefropatía obstructiva experimental: modulación por rosuvastatina. *Revista Médica Universitaria.* 6(2010).
32. Mazzei, L.; García, M.; Manucha, W. Moduladores de fibrosis y apoptosis asociados a la biodisponibilidad de ON: Efecto de Rosuvastatina en nefropatía obstructiva neonatal. *Bioanálisis.* 2010 6(34); (2010).
33. Manucha W, Kurbán F, Mazzei L, Benardón ME, Bocanegra V, Rinaldi Tosi M, Vallés P. eNOS/Hsp70 interaction on rosuvastatin cytoprotective effect in neonatal obstructive nephropathy. *European Journal of Pharmacology* 650(2-3) (2011):487-95.
34. García IM, Mazzei L, Benardón ME, Oliveros L, Cuello-Carrión FD, Gil Lorenzo A, Manucha W, Vallés PG. Caveolin-1-eNOS/Hsp70 interactions mediate rosuvastatin antifibrotic effects in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric Oxide.* 27(2012):95-105.
35. Hida M, Omori S, Awazu M. ERK and p38 MAP kinase are required for rat renal development. *Kidney Int.* 61(2002):1252-62.
36. Maurer U, Jehan F, Englert C, Hubinger G, Weidmann E, DeLuca HF, Bergmann L. The Wilms' tumor gene product (WT1) modulates the response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 by induction of the vitamin D receptor. *J Biol Chem.* 276(2001):3727-32.
37. Husain K, Suarez E, Isidro A, Ferder L. Effects of paricalcitol and enalapril on atherosclerotic injury in mouse aortas. *Am J Nephrol.* 32(2010):296-304.
38. Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E. Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *Am J Nephrol.* 29(2009):465-72
39. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 76(2009):1248-57.
40. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol.* 21(2010):966-73.
41. Ferder M, Inerra F, Manucha W, Ferder L. The world pandemic of Vitamin D deficit could possibly be explained by cellular inflammatory response activity induced by the renin angiotensin system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013 Jan 30. [Epub ahead of print]

42. Ferder L, Manucha W. Cyto-protector effect of a VDR activator at the mitochondrial level in an obstructive nephropathy model. American Society of Nephrology, Abstract Number: 1703. Renal Week 2010, Denver CO. November 16 -21. Advancing Science and Medicine to Improve Kidney Health, 43rd Annual Meeting & Scientific Exposition, Colorado Convention Center, Denver, CO.
43. García IM, Altamirano L, Mazzei L, Fornés M, Cuello-Carrión FD, Ferder L, Manucha W. Vitamin D Receptor-modulated Hsp70/AT1 Expression May Protect the Kidneys of SHR's at the Structural and Functional Levels. J Hypertension. submitted april 2013 (JH-D-13-00332).
44. Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol.* 27(2012):1233-47.

Pie de Figuras

Figura 1

A-Expresión del mensajero WT-1 por RT-PCR y β -Actina de cada muestra. Semicuantificación en Unidades Densitométricas Relativas.

B-Expresión de la proteína WT-1 por western blot y β -Actina de cada muestra. Semicuantificación en Unidades Densitométricas Relativas.

CC= Corteza Control, CCRos= Corteza Control tratada con Rosuvastatina, CO= Corteza Obstruida y CORos= Corteza Obstruida tratada con Rosuvastatina.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$

Figura 2

A- Coinmunoprecipitación de las proteínas Caveolina 1, Hsp70 y eNOS. Revelado por western blot.

B- Semicuantificación de las relaciones Caveolina 1/eNOS y Hsp70/eNOS.

Figura 3

A- Expresión de proteínas p38 y pErk (fosforiladas y no fosforiladas) por western blot.

B- Semicuantificación de las relaciones fosforilada/defosforilada correspondientes a p38 y pErk

* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$

Figura 4

Microscopía electrónica de corteza renal sometida a nefropatía obstructiva por obstrucción ureteral unilateral durante 15 días. Puede apreciarse daño mitocondrial masivo en el área cortical con espacios en crestas.