

Aportes de la biotecnología al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica y comorbilidades frecuentes

Adriana M. Carlucci, Camila P. Cervellera, Caroline M. De Sa Sampayo, Antonella De Vito, Cristian A. Villafañe, Carolina J. Martín, Aída E. Sterin Prynck y Carlos M. Schreck

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo revisar las contribuciones de la biotecnología, en relación con el tratamiento, diagnóstico y la monitorización de la enfermedad renal crónica (ERC) y sus comorbilidades más frecuentes, especialmente la anemia. En relación con los tratamientos, enfocamos el desarrollo de productos biofarmacéuticos como los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA), que fueron los primeros biofármacos utilizados para el tratamiento de la anemia asociada a la ERC; analizamos sus características y utilización actual después de varios años de experiencia clínica, así como también otras alternativas en desarrollo. Revisamos distintos tipos de bioterapias, la utilización de las células estromales mesenquimales de médula ósea (MSC) y tratamientos alternativos con modificaciones dietarias, que se basan en la asociación entre la microbiota intestinal de los pacientes renales crónicos y sus condiciones fisiopatológicas. Finalmente, en relación con el diagnóstico y monitorización, nos referimos al estudio y validación de biomarcadores diagnósticos, predictivos y terapéuticos que han permitido optimizar los resultados clínicos en este tipo de pacientes.

Palabras clave: nefropatías, insuficiencia renal crónica, biofármacos antianémicos, bioterapias, biomarcadores, anemia.

BIOTECHNOLOGY CONTRIBUTION TO THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CHRONIC KIDNEY DISEASE AND FREQUENT COMORBIDITIES

ABSTRACT

The aim of this work is to review the contributions of biotechnology, in relation to the treatment, diagnosis and monitoring of chronic kidney disease (CKD) and its most frequent comorbidities, especially anemia. Regarding the treatment, we focus on the development of biopharmaceutical products such as erythropoiesis stimulating agents (ESA), which were the first biopharmaceuticals used to treat anemia associated with chronic kidney disease (CKD). We analyzed their characteristics and their current use after several years of clinical experience, as well as other alternatives in development. We also review different types of biotherapies, the use of bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) and alternative treatments with dietary modifications, which are based on the association between the intestinal microbiota of chronic kidney patients and their pathophysiological conditions. Finally, in relation to diagnosis and monitoring, we refer to the study and validation of diagnostic, predictive and therapeutic biomarkers that have made clinical results possible to be optimized in this type of patient.

Key words: nephropathies, chronic kidney disease, anti anemia biopharmaceutics, biotherapies, biomarkers, anemia.

Rev. Hosp. Ital. B.Aires 2020; 40(3): 105-116.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal es una causa prevalente de discapacidad y muerte en todo el mundo. En 2014, más del 10% de los adultos en Estados Unidos presentaba algún tipo de enfermedad renal. Las enfermedades renales se clasifican –según el tiempo de evolución– en: lesión (injurias) renal aguda (IRA) y enfermedad renal crónica (ERC); recientemente se ha propuesto una tercera categoría, enfermedad renal aguda, con un tiempo de evolución intermedio entre IRA y ERC¹.

Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica (ERC o CKD, *Chronic Kidney Disease*) se define como la presencia de daño renal o disminución de la función renal por más de 3 meses de duración. El daño renal se refiere a alteraciones presentes en las imágenes renales, la histología renal, el sedimento urinario (hematuria, leucocituria) o el aumento en la excreción de albúmina. La disminución en la función renal se refiere a la concentración elevada de creatinina sérica (Cr_s) y una disminución en la tasa de filtrado glomerular, estimada a través de una ecuación basada en la creatinina sérica (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* CKD-EPI) u otras. La ERC está asociada con un mayor riesgo de morbilidad cardiovascular, mala calidad de vida y muerte prematura. Es frecuentemente asintomática y puede evolucionar a la etapa terminal (ESRD, *end stage*

Recibido: 16/07/19

Aceptado: 10/06/20

Bioquímica (A.S.P., C.P.C., C.M.D.S.S., C.J.M.), Farmacia (A.M.C., A.D.V., C.A.V.). Medicina (C.M.S.). Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.
Correspondencia: aida.sterin@hospitalitaliano.org.ar

renal disease), que requiere reemplazo de la función renal mediante diálisis o trasplante de riñón.

A medida que progresa, la enfermedad se asocia frecuentemente con anemia de origen multifactorial (Cuadro 1), que afecta al 50% de los pacientes con estadios 3 y 4. El déficit en la producción de eritropoyetina (EPO) es una de las causas más importantes de la anemia renal. La producción de EPO a través de la ingeniería de ADN recombinante para tratar la anemia renal es uno de los aportes más importantes de la biotecnología a la nefrología.

Lesión renal aguda

La lesión renal aguda (IRA) es una disminución en la función renal que ocurre muy rápidamente. Las guías “Enfermedad renal: mejora de los resultados mundiales” (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, KDIGO por su sigla en inglés) la definen según los siguientes criterios: 1) aumento de la Crs $> 0,3$ mg% en menos de 48 horas, 2) aumento de la Crs $> 1,5$ veces el valor basal dentro de 7 días, 3) disminución en la diuresis a $< 0,5$ mL/kg/h durante 6 horas. Se produce retención de productos de desecho nitrogenados (urea y creatinina) e incapacidad para manejar adecuadamente el medio interno y el volumen del compartimento extracelular (determinante de la presión arterial). Si bien las causas de lesión al epitelio tubular son múltiples, los mecanismos finales son tres: 1) daño por isquemia/reperfusión, 2) sepsis y 3) daño por toxicidad (moléculas tóxicas endógenas o exógenas). En la isquemia/reperfusión ocurre una disminución de la oxigenación tisular. Esto produce agotamiento de ATP, deterioro metabólico, apoptosis y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Durante el período de reperfusión aumenta el daño oxidativo por el incremento de la producción de ROS, que supera la capacidad de las enzimas antioxidantes del riñón. Otro mecanismo que se produce durante la I/R es la vasoconstricción, que poten-

cia la isquemia e inflamación. El segmento tubular más afectado es S3 (*pars recta* del túbulo proximal).

La IRA por I/R es, a menudo, el resultado de una hipotensión severa y sostenida que puede ocurrir en pacientes que sangran o tienen abundantes pérdidas de sodio (Na^+) por el tubo digestivo o la orina y, en particular, en pacientes susceptibles por patologías que cursan crónicamente con bajo volumen circulante efectivo (pacientes con enfermedad cardíaca y cirrosis hepática).

A continuación, analizamos los aportes que la biotecnología realiza a través de: biofármacos aprobados, tratamientos en evaluación con nuevos enfoques, bioterapias en distintas etapas de ensayos clínicos y posibles biomarcadores que puedan mejorar los diagnósticos y tratamientos actuales^{2,3}.

DESARROLLO

1. Biofármacos

1.1. Agentes estimulantes de la eritropoyesis: farmacodinamia y farmacocinética

La anemia renal, presente en los estadios más avanzados de la ERC, produce morbilidad y disminución en la calidad de vida de los pacientes. El déficit relativo de EPO es una causa principal de esta anemia; por eso, en muchos casos, el tratamiento consiste en la administración de agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESAs por sus siglas en inglés). En la figura 1 se esquematiza el mecanismo de *feedback* \pm de la EPO y otros ESAs².

La EPO es un factor de crecimiento eritropoyético. La glucoproteína natural tiene 166 aminoácidos que se activan al perder una arginina carboxilada terminal por acción de una carboxipeptidasa intracelular, por lo que su forma activa tiene 165 aminoácidos. Es una proteína especie específica, ya que hay diferencias entre la EPO humana, de mono y de ratón, capaces de generar respuesta inmunológica. La EPO humana posee 4 cisteínas ligadas por puentes disulfuro internos entre las posiciones 29-33 y 7-161,

Cuadro 1. Causas más relevantes implicadas en anemia y ferropenia asociadas a la enfermedad renal crónica

Anemi	Ferropenia (déficit de hierro)
Producción insuficiente de eritropoyetina (EPO)	Pérdidas sanguíneas <ul style="list-style-type: none"> . Como consecuencia de la hemorragia gastrointestinal y otras asociadas a la trombopatía urémica
Déficit absoluto o funcional de hierro	Absorción intestinal de hierro disminuida <ul style="list-style-type: none"> . por el uso de antiácidos o de quelantes al fósforo . las restricciones dietéticas prescriptas . la menor apetencia por alimentos ricos en hierro de estos pacientes . o el aumento de los valores de hepcidina, que bloquea su absorción intestinal
Supervivencia reducida de eritrocitos	Aumento de la utilización de hierro durante el tratamiento con Agentes Estimuladores de la Eritropoyesis (ESA)
Deficiencias nutricionales (folato, vitamina B12)	Disminución de la liberación de hierro desde los depósitos tisulares por el aumento de los valores de hepcidina

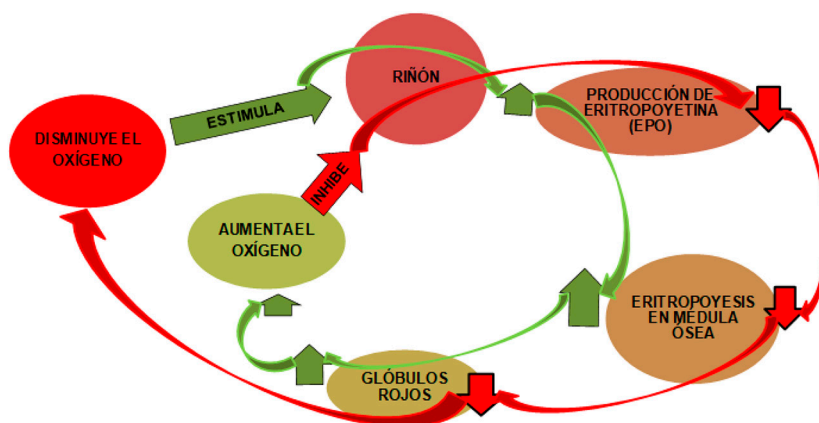


Figura 1. Mecanismo de acción y función de la eritropoyetina (EPO) y demás agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESAs, *Eritropoyesis Stimulating Agents*). El circuito verde –comienza con la disminución de oxígeno– es un *feedback* positivo que aumenta la eritropoyesis, culmina en el aumento de oxígeno en los tejidos, induciendo el *feedback* negativo que disminuye la producción de EPO y la eritropoyesis.

cuya conservación es necesaria para el mantenimiento de la actividad biológica *in vivo*. Está glicosilada principalmente con ácido siálico, hexosas, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico. La estructura proteica es importante para la unión al receptor y su glicosilación con ácido siálico es importante para el metabolismo² ya que disminuye la afinidad por el receptor, lo que impacta en la vida media de esta y por lo tanto en el mantenimiento de la actividad biológica *in vivo* por más tiempo. El peso molecular aparente es de 32 000 a 40 000 daltons². Es producida en un 90% en las células intersticiales de tipo fibroblasto que rodean los túbulos de la corteza del riñón y la médula exterior, donde tiene lugar buena parte del consumo de oxígeno en los riñones; el 10% restante se forma fundamentalmente en el hígado². Es el principal regulador de la producción de glóbulos rojos, participa en todas las fases de desarrollo eritroide, actuando especialmente en los precursores: unidades formadoras de colonias eritroides y unidades formadoras de colonias eritroides de la bursa (BFU-E y CFU-E por sus siglas en inglés). Una vez que se fija a su receptor en la superficie celular, activa vías de transducción de señales que interfieren con la apoptosis y estimulan la proliferación. La hipoxia desencadena un incremento del AMPc en las células productoras de EPO; este mensajero activa a su vez a una proteinquinasa A, la que produce la fosforilación de varias proteínas que son necesarias en la transcripción del ADN y el proceso de traducción para la síntesis final de la molécula de EPO. Regula su propia respuesta celular al modificar el número de receptores de EPO a través de la disminución (“down regulation”) o aumento (“up regulation”) de estos, según el número de moléculas de EPO presentes en el medio extracelular. La vida media de estos receptores fue estimada en 1 a 4 horas².

La producción de EPO se ve afectada en pacientes con ERC constituyendo la causa primaria de su anemia.

Los ESA comercializados son: epoetina alfa, darbepoetina alfa y metoxi-polietilenglicol epoetina beta.

La epoetina alfa es EPO humana recombinante, expresada en células de ovario de hámster chino, con idéntica farmacocinética, actividad biológica y actividad específica que la endógena.

Los tres ESA aprobados para su comercialización pertenecen a 2 generaciones diferentes y tienen distintas propiedades farmacocinéticas^{2,3}:

- Epoetina alfa (primera generación)
Eritropoyetina humana recombinante
Uso por vía subcutánea (SC) o intravenosa (IV)
Tiempo de eliminación: 4 horas en pacientes sanos (IV) y 24 horas (SC)
- Darbepoetina alfa (segunda generación)
Tiene cinco cadenas de azúcares unidos a N, en lugar de tres.
Mayor vida media. Los niveles en la circulación permanecen por encima de la concentración mínima necesaria para estimular la eritropoyesis durante más tiempo. Requiere menos frecuencia de administración.
- Metoxi-polietilenglicol: epoetina beta (segunda generación)

Interacciona con el receptor de eritropoyetina. Es un activador continuo del receptor (asociación más lenta y disociación rápida).

Mayor actividad y vida media.

A continuación se resumen los principales parámetros farmacocinéticos luego de la administración de metoxi-polietilenglicol epoetina beta por vía subcutánea y intravenosa, en pacientes anémicos con ERC dializados (ERC/D) y no dializados (ERC/ND).

ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA

Pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis

- Concentración máxima: 72 horas
- Área bajo la curva: 62%
- Tiempo de vida media: 139 horas

Pacientes con enfermedad renal crónica no dializados

- Concentración máxima: 95 horas
- Área bajo la curva: 54%
- Tiempo de vida media: 142 horas

ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

Pacientes con enfermedad renal crónica dializados y no dializados

- Aclaramiento: 0,494 mL/h/kg peso
- Tiempo de vida media: 134 horas

1.2 ESA: recomendaciones para seguir para su administración³

Antes de empezar el tratamiento con un ESA, se debe optimizar el perfil ferrocínético y controlar la presión arterial. Sin hierro no se logra la eritropoyesis y la aplicación de ESA produce aumento transitorio en la presión arterial. Durante el tratamiento se debe medir la concentración de hemoglobina (Hb) semanalmente³ hasta lograr la estabilidad y los objetivos de concentración deseada. La respuesta a la presión sanguínea debería seguir siendo monitorizada porque podría aumentar en algunos pacientes; también se recomienda verificar el estado del hierro mensualmente porque se transfiere una gran cantidad desde los tejidos de almacenamiento para el desarrollo eritroide y la inducción de deficiencia de hierro frecuentemente limita la eficacia del tratamiento con ESA. Los principales efectos adversos asociados a los ESA son trombosis, hipertensión arterial (HTA) y eventos cardiovasculares³. La figura 2 resume los conocimientos adquiridos sobre el tratamiento con ESA en pacientes con ERC. Indica beneficios claros para los pacientes con concentraciones de Hb basal menores de 10 g/dL y objetivos de tratamiento moderados (Hb menor de 13 g/dL), utilizando además el criterio clínico para individualizar el objetivo de Hb en función de cada paciente: enfermedades respiratorias, cardiovasculares, trombofilia.

Recomendaciones para seguir durante la elección de la dosis de un ESA

- Evaluar las causas concomitantes de anemia antes de iniciar la terapia.
- Utilizar la terapia ESA con precaución en pacientes que tengan patologías adicionales, como antecedentes de trombosis/trombofilia maligna/severa.
- En pacientes adultos con ERC/ND (ND/CKD), con una concentración de Hb $\geq 10,0$ g/dL, se sugiere no iniciar la terapia con ESA.
- Para pacientes adultos con IRC/ND (ND/CKD), con concentración de Hb $< 10,0$ g/dL, la decisión de iniciar el tratamiento será individualizada según la tasa de caída de la concentración de Hb y el estado clínico del paciente.
- Para todos los pacientes pediátricos con ERC (CKD), la selección de la concentración de Hb en la que se inicia la terapia ESA en el paciente es individual.

1.3 Alternativa de los ESA: fármacos que actúan sobre el sistema del factor inducible de hipoxia

Debido a los efectos no deseados de los ESA, recientemente se han desarrollado nuevos enfoques que se encuentran en fase de ensayos clínicos⁴; estos fármacos actúan sobre las moléculas implicadas en la percepción de la hipoxia tisular, entre ellos el factor inducible por la hipoxia o proteína HIF. Esta proteína es un heterodímero formado por una subunidad alfa y una beta, siendo la alfa la proteína limitante para el reconocimiento del oxígeno. En condiciones normóxicas, las enzimas prolihidroxilasas (PH-HIF) –que son dependientes de oxígeno– actúan sobre la subunidad alfa del factor inducido por la hipoxia degradándolo. En cambio –en condiciones hipóxicas–, al utilizar inhibidores de las enzimas prolihidroxilasas (PH-HIF) se impide su acción, HIF-alfa no es degradada y puede translocarse al núcleo, donde se unirá con la subunidad HIF-beta para activar los elementos de respuesta a la hipoxia, que transcribirán los genes de respuesta hipóxica. En la figura 3 se describe el resultado de la activación de estos genes⁴. Los PH-HIF serían eficaces en el corto y mediano plazo, pero sus efectos todavía deben ser estudiados en el uso a largo plazo.

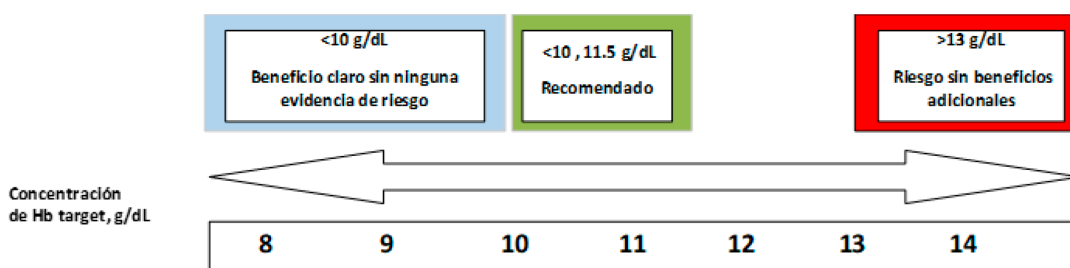


Figura 2. Esquema representativo de riesgo/beneficio considerando la concentración de hemoglobina (Hb) para conseguir (*target*) durante el tratamiento con ESA en distintas situaciones.

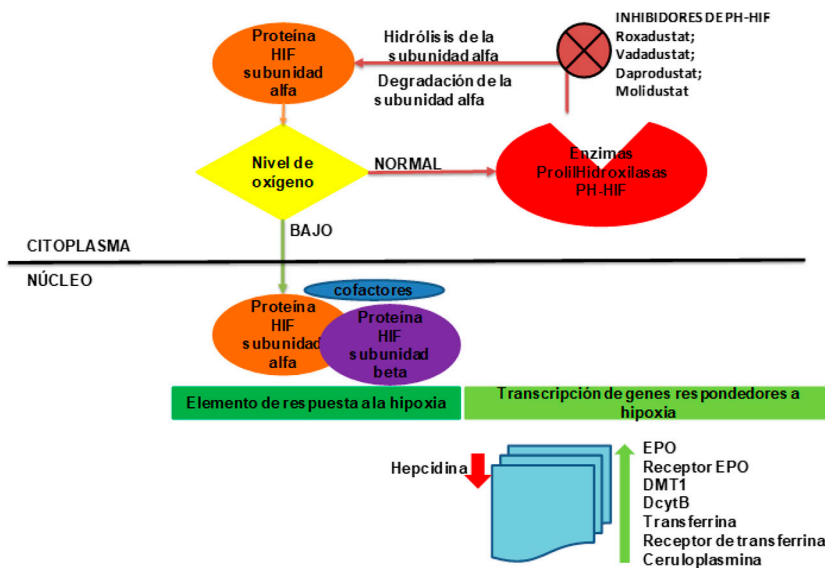


Figura 3. Resumen del sistema del factor inducible de hipoxia (HIF).

2. Bioterapias

2.1 Células madre mesenquimales multipotentes

En los últimos años, el uso de células estromales mesenquimales (MSC, *mesenchymal stromal cells*) ha surgido como una terapia prometedora para varias enfermedades, incluidas las nefropatías⁵. Las MSC son aquellas células multipotentes que provienen del mesodermo, del cual se desarrollan los tejidos de tipo conjuntivo (cartílago, hueso, tejido adiposo, tendones, etc.). Se pueden aislar de: médula ósea, tejido adiposo, periostio, membrana sinovial, pulpa dental, tejido o sangre de cordón umbilical, placenta y líquido amniótico.

En modelos animales, las MSC han demostrado aceleración en la recuperación de la IRA y disminuyen la progresión de la ERC en modelos de diabetes (DBT) tipo 1 y poliquistosis renal. Sus efectos son principalmente paracrinos: inmunomodulación, regulación de la inflamación, secreción de factores tróficos y, posiblemente, diferenciación de precursores renales. Esto muestra la potencia de las MSC para ser usadas en regeneración de tejidos, inmunomodulación o mejora de recepción de trasplante⁵ (véase en Material Suplementario - Cuadro 1. Criterios mínimos para definir células estromales mesenquimales humanas).

Después de su administración sistémica, las MSC se trasladan a sitios de inflamación, lesiones y tumores, pero también pueden quedar atrapadas en diferentes tejidos y órganos (hígado, bazo, pulmones) disminuyendo el número de células en el órgano objetivo⁶.

Las MSC son una bioterapia prometedora para un amplio rango de necesidades médicas no resueltas.

En los pacientes con ERC, esta terapia celular podría contribuir a mejorar el pronóstico de la nefropatía, limitar

la fibrosis gracias al aporte de factores tróficos, promover la angiogénesis, inhibir la apoptosis, atenuar los eventos inflamatorios por su potencial inmunomodulador y contribuir a la regeneración renal⁷.

La inmunomodulación de las MSC genera un entorno inmunotolerante y reduce la respuesta inmunitaria de las células efectoras como monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T o B, y también de las células alogénicas. Expresan HLA/MHC clase I y de forma inducible HLA/MHC clase II, pero presentan un perfil hipoinmunogénico⁸. Los aspectos para considerar en el tratamiento son: número de administraciones, dosis específica e interacción con la supresión inmunológica.

Las MSC secretan varias proteínas y partículas:

- Enzimas
- Citoquinas
- Factores de crecimiento
- Partículas: vesículas extracelulares (EV), microvesículas (MV) o exosomas.

Existen múltiples factores que median los efectos paracrinos y confieren renoprotección por acción sobre la inflamación, la apoptosis y el estrés oxidativo. La fibrosis renal es un depósito de ECM (matriz extracelular) en el parénquima renal que reemplaza al tejido funcional y ocurre por un desequilibrio entre su acumulación y su degradación/restauración. Esto ocurre durante la regeneración del tejido en la IRA y durante la progresión de la ERC y conduce a la enfermedad renal en etapa terminal. Las MSC podrían prevenir/disminuir la fibrosis porque compensarían ese desequilibrio a través de la represión de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP por sus siglas en inglés) que permitiría que la matriz extracelular (ECM) sea degradada por las metaloproteasas

de la matriz (MMP por sus siglas en inglés) y evitar la acumulación de ECM y la fibrosis⁸.

Las MSC y sus EV parecen contrarrestar, también, los principales eventos fisiopatológicos descritos para IRA/R. Sin embargo, se necesitan más estudios antes de trasladar a la clínica esta terapia.

Se realizaron numerosos estudios preclínicos y clínicos usando células MSC para tratar la nefropatía diabética, que incluyeron células madre alogénicas y xenogénicas y también están en curso ensayos clínicos con células madre autólogas y alogénicas⁹. Se utilizaron modelos animales diabéticos, como el STZ (que induce diabetes tipo 1 por acción tóxica de la estreptozotocina sobre los islotes de Langerhans) y modelos con deficiencia de receptor de leptina (diabetes tipo 2) para comprender la progresión que ocurre en los diferentes tipos de pacientes diabéticos¹⁰ (Cuadro 2). Estos ensayos confirmaron los beneficios de BM-MS (MSC de médula ósea) en los modelos de nefropatía diabética resistentes a la insulina y con insuficiencia de insulina, con resultados positivos utilizando no solo células sino también el medio líquido que estuvo en contacto con las células (medio condicionado). Esto indica que podrían ser más relevantes las EV y la liberación de citoquinas que las células¹¹. Estos hallazgos sugieren que sería el microambiente prorregenerativo desencadenado por las MSC lo que conserva la función renal y la estructura en ratones con diabetes.

Actualmente se están llevando a cabo dos ensayos clínicos para estudiar seguridad, viabilidad y tolerabilidad de las intervenciones basadas en hMSC (MSC humanas) alogénicas y la eficacia en pacientes con nefropatía diabética⁵. También se ha estudiado el efecto de la MSC en la nefropatía crónica del injerto. Esta es la principal causa de pérdida del trasplante renal luego del año de realizado. Es una patología compleja y multifactorial, pero el mecanismo más importante es el rechazo crónico. Para tratar el desarrollo de fibrosis intersticial y atrofia tubular, el uso de células madre surge como posibilidad para crear nuevos regímenes en combina-

ción con fármacos inmunosupresores o para minimizar sus dosis necesarias y preservar la función renal⁹⁻¹².

En el Material Suplementario - Cuadro 2 se reúnen los resultados de cuatro ensayos clínicos concluidos utilizando MSC en combinación con fármacos inmunosupresores¹³⁻¹⁶. Queda por resolver cuándo es el mejor momento para la administración y la dosis correspondiente, así como evaluar los posibles efectos sinérgicos o antagonísticos entre las MSC y los fármacos inmunosupresores⁵.

En el Material Suplementario - Figura 1 se resumen los principales mecanismos de acción de las MSC como terapia celular en enfermedades renales, observados en estudios preclínicos y clínicos⁴.

2.2 Microbiota intestinal

La microbiota intestinal cumple —entre otras funciones— con la catabolización de las proteínas de la dieta. Algunos de los metabolitos generados, como la trimetilamina, el paracresol e indol, se transforman en toxinas en el hígado como indoxil sulfato, P-cresol, óxido de N-trimetilamina (véase en Material Suplementario - Cuadro 3 toxinas urémicas y sus acciones en el organismo). Cuando la comunidad intestinal microbiana se presenta desbalanceada, con cambios cualitativos y cuantitativos en su composición y actividad metabólica (disbiosis), existe una mayor producción de estos metabolitos y las toxinas derivadas de ellos. Varios de estos metabolitos tóxicos se eliminan en la orina, pero se acumulan en pacientes con ERC. Algunos autores han propuesto que, modulando la microbiota en la ERC, se podría llegar a disminuir la concentración de toxinas urémicas derivadas del intestino.

La microbiota intestinal en pacientes con ERC se puede modular mediante el consumo de determinados productos como probióticos, prebióticos, dietas ricas en fibras e inhibidores de la α glicosidasa del intestino delgado, que cumplirían con un potencial efecto terapéutico (véase en Material Suplementario - Cuadro 4)¹⁷.

Cuadro 2. Resumen de resultados obtenidos en estudios preclínicos y clínicos para nefropatía diabética⁹⁻¹¹

Estudios preclínicos y clínicos para nefropatía diabética		
Modelo de ratones diabéticos STZ	Se realizó una infusión intracardíaca de hBM-MS (células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea humana)	Se observó que se redujo la deposición de matriz mesangial y se restauró el daño pancreático (la restauración del tejido secretor de insulina no se ha confirmado en los últimos estudios)
Modelo de ratones similar de STZ	Se administró BM-MS	Se observó una reducción significativa de la glomeruloesclerosis y la deposición de ECM, tanto en presencia como en ausencia de la normalización de la glucosa debido a la regeneración pancreática ⁹
Un ensayo clínico humano completo realizado en 2016	Pacientes tratados con células precursoras mesenquimales derivadas de médula ósea	No reveló efectos adversos abgénicos en comparación con placebo Sin embargo, los resultados respecto a la mejoría de la función renal no fueron concluyentes, lo que sugiere que podrían ser necesarias poblaciones más grandes y estudios a largo plazo ¹¹

3. Biomarcadores

3.1 Marcadores diagnósticos

La deficiencia de hierro es común en los pacientes con ERC por múltiples mecanismos: las pérdidas en el circuito extracorpóreo de hemodiálisis, las pérdidas gastrointestinales y un manejo inadecuado del hierro biodisponible de la dieta. Así, cursan con disminución de las reservas totales de hierro, por lo que la disponibilidad de marcadores diagnóstico validados para ferropenia es una herramienta fundamental en el manejo clínico (véase en Material Suplementario - Cuadro 5. Los analitos que se considera conveniente medir en el laboratorio, características y consideración particulares)¹⁸.

Se han desarrollado biomarcadores de la ferrocinética (sideremia, saturación de transferrina, ferritina) que son de uso cotidiano. Además, se ha examinado el papel biomarcador del receptor soluble de transferrina (sTfR) y la hepcidina. Ambos son prometedores pero requieren más investigación para establecer la mejor forma de uso en la anemia por ERC. También requerirán el desarrollo de plataformas de análisis estandarizadas y de bajo costo¹⁸.

3.2 Marcadores predictivos

La hemoglobina glicosilada (HbA1c) (¹) no es un marcador bioquímico útil en pacientes con ERC ya que:

- la elevada concentración plasmática de urea acorta la vida media de los eritrocitos y también deriva en la formación de hemoglobina carbamylada que interfiere en la glicosilación de la hemoglobina,
- las transfusiones modifican los valores,
- la administración de EPO induce la producción de nuevos glóbulos rojos.

La albúmina glicosilada, en cambio, parece ser un parámetro que predice mejor las fluctuaciones de glucosa en pacientes diabéticos con ERC.

Se requiere investigación adicional para encontrar marcadores de control glucémico alternativos que podrían verse menos afectados por el *milieu* de la uremia.

La anemia también se considera un índice de inflamación crónica y mala nutrición. En pacientes diabéticos con ERC y anemia, los valores más altos de proteína reactiva C se asociaron con un mayor riesgo de enfermedad renal terminal futura¹⁹.

3.3 Marcadores terapéuticos

La conexina 43 (Cx43) es la más expresada dentro de una familia de proteínas que establecen puentes de comunicación intercelulares distribuidos por todos los tejidos²⁰. Estas proteínas participan en la formación de uniones hendidas (*o gap junctions*), que comunican el citoplasma de dos células adyacentes. Así, permiten la comunicación mediante el intercambio de mediadores químicos de bajo peso molecular (iones Ca²⁺, Na⁺, etc.) y segundos mensajeros (AMPc, IP3, etc.). Además, los conexones no acoplados pueden permitir la comunicación entre la célula

y el medio extracelular (véase en Material Suplementario - Cuadro 6).

Las conexinas están implicadas en una amplia variedad de funciones fisiológicas:

- Crecimiento celular
- Secreción glandular
- Homeostasis vascular y angiogénesis
- Proliferación
- Desarrollo óseo
- Morfogénesis cardíaca
- Función glial y migración neuronal
- Respuesta inflamatoria.

La inhibición en la función de las conexinas podría tener un papel antiinflamatorio en algunas patologías. Para prevenir la señalización de Cx43 se usaron, como abordajes terapéuticos, oligonucleótidos antisentido (AS-ODN) y péptidos miméticos de conexina, diseñados para imitar secuencias en bucles extracelulares o intracelulares de proteínas conexina²⁰.

Se demostró que la inhibición de Cx43 por los AS-ODN amortigua las respuestas inflamatorias y promueve reparación tisular en el sistema nervioso central, piel, corazón y endotelio vascular. También inhibió la inflamación renal, la fibrosis y preservó de manera eficaz la función renal en los modelos animales de ERC²⁰.

Los péptidos miméticos de la conexina son bloqueadores específicos; GAP19 (bloqueador del hemicanal) y GAP26 (bloqueador de la unión brecha) dificultaron las respuestas inducidas por el factor de crecimiento tumoral β en las células tubulares y previnieron los cambios en el citoesqueleto y la apoptosis en los podocitos.

Como conclusión, la Cx43 fue identificada como un nuevo mediador de la enfermedad renal involucrado en procesos centrales de inflamación y fibrosis. Su inhibición, incluso después del inicio de la enfermedad, fue capaz de atenuar el daño renal y preservar la función renal en modelos animales de ERC vascular, tubular y glomerular; constituyéndose en un blanco terapéutico promisorio²⁰.

DISCUSIÓN

La ERC es una patología progresiva cada vez más frecuente, a medida que se prolonga la expectativa de vida de la población en general. Entre las comorbilidades asociadas se encuentran anemia, diabetes, hipertensión y obesidad. Su diagnóstico y seguimiento terapéutico se convirtió en un verdadero desafío clínico por su prevalencia. La aparición de la r-HuEPO (eritropoyetina recombinante humana) de primera y segunda generación es un hito biotecnológico en el tratamiento de la anemia asociada a ERC.

Las bioterapias, en especial las MSC, son una alternativa terapéutica biotecnológica para las nefropatías en vías de evaluación. Los estudios en animales han demostrado efectos renoprotectores mediados por las vías paracrinas y tróficas. Los efectos inmunomodulador y antiinflamatorio del tejido afectado serían responsables de los resultados obtenidos.

Otro aporte de la biotecnología al tratamiento de las enfermedades renales –en evaluación– es la manipulación de la microbiota intestinal. Se ha propuesto que la modulación de la microbiota en la ERC podría disminuir la concentración de toxinas urémicas derivadas del intestino; el uso de prebióticos y probióticos y de bacterias genéticamente modificadas mostraron resultados interesantes, para constatare en ensayos más exhaustivos.

Se han desarrollado biomarcadores para guiar las decisiones clínicas en el tratamiento de la deficiencia de hierro y se han ido optimizando según la naturaleza y el estadio de las comorbilidades asociadas en cada paciente. Los pacientes con ERC, diabéticos y con anemia constituyen un grupo de mayor complejidad para seguir su evolución clínica; la albúmina glicosilada parecería ser un mejor parámetro que los marcadores convencionales para monitorizar el comportamiento a largo plazo de las fluctuaciones de glucosa en esos pacientes.

Por último, el conocimiento de la participación de un grupo de proteínas de comunicación intercelular (las conexinas) en la ERC ha llevado a proponer su silenciamiento a través de la administración de oligonucleótidos antisentido y péptidos miméticos, con resultados exitosos en animales.

La Biotecnología es el resultado del conocimiento transdisciplinario que colabora en el estudio de la fisiopatología de las enfermedades, en su diagnóstico y seguimiento y en el tratamiento. Tal es el caso para las enfermedades renales.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Susana Llesuy y al Dr. Miguel Ángel De Cristóforo, por su apoyo y colaboración en la corrección de este artículo.

La revisión fue realizada en la asignatura Biotecnología y Biotecnología Farmacéutica del último año de las Carreras de Bioquímica y Farmacia, del Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Kuo IC, Lin HYH, Niu SW, et al. Anemia modifies the prognostic value of glycated hemoglobin in patients with diabetic chronic kidney disease. *PLoS One*. 2018;13(6): e0199378.
2. Hall, J. E., & Guyton, A. C. *Guyton & Hall Compendio de fisiología médica* (11a. ed.). Barcelona: Elsevier; (2008); 638-639.
3. Fishbane S, Spinowitz B. Update on anemia in ESRD and earlier stages of CKD: Core curriculum. *Am J Kidney Dis*. 2018;71(3):423-435.
4. Gupta N, Wish JB. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *Am J Kidney Dis*. 2017; 69(6):815-826.
5. Torres Crigna A, Daniele C, Gamez C, et al. Stem/Stromal Cells for Treatment of Kidney Injuries With Focus on Preclinical Models. *Front Med*. 2018; 5, 179-204.
6. Iwai S, Sakonju I, Okano S, et al. Impact of ex vivo administration of mesenchymal stem cells on the function of kidney grafts from cardiac death donors in rat. *Transplant Proc*. 2014; 46(5):1578-1584.
7. Peired, AJ, Sisti, A, Romagnani, P. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Kidney Disease: A Review of Clinical Evidence. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:4798639
8. Martin I, De Boer J, Sensebe L. A relativity concept in mesenchymal stromal cell manufacturing. *Cytotherapy* 2016; 18(5):613-620.
9. Betz B, Conway BR. An update on the use of animal models in diabetic nephropathy research. *Curr Diab Rep*. 2016; 16(2):18.
10. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:17438-43.
11. Packham DK, Fraser IR, Kerr PG, et al. Allogeneic mesenchymal precursor cells (MPC) in diabetic nephropathy: a randomized, placebo-controlled, dose escalation study. *EBioMedicine*. 2016; 12:263-269.
12. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, et al. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Sci Rep*. 2016; 6:34842.
13. Trivedi HL, Shah VR, Vanikar AV, et al. High dose peripheral blood stem cell infusion: a strategy to induce donor-specific hyporesponsiveness to allografts in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2002; 6:63-68.
14. Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2:107-111.
15. Tan J, Wu W, Xu X, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants a randomized controlled trial. *JAMA*. 2012; 307:1169-1177.
16. Ciancio G, Sageshima J, Akpinar E, et al. A randomized pilot study of donor stem cell infusion in living-related kidney transplant recipients receiving alemtuzumab. *Transplantation*. 2013; 96:800-6.
17. Nallu A, Sharma S, Ramezani A, et al. Gut Microbiome in CKD: challenges and opportunities. *Transl Res*. 2017;179:24-37.
18. Gaweda AE. Markers of iron status in chronic kidney disease. *Hemodial Int*. 2017; 21 (Suppl 1):S21-S27.
19. Kuo IC, Lin HYH, Niu SW, et al. Anemia modifies the prognostic value of glycated hemoglobin in patients with diabetic chronic kidney disease. *PLoS One*. 2018;13(6): e0199378.
20. Prakoura N, Kavvas P, Chadchris-tos CE. Connexin 43: A new therapeutic target against chronic kidney disease. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 49:998-1009.

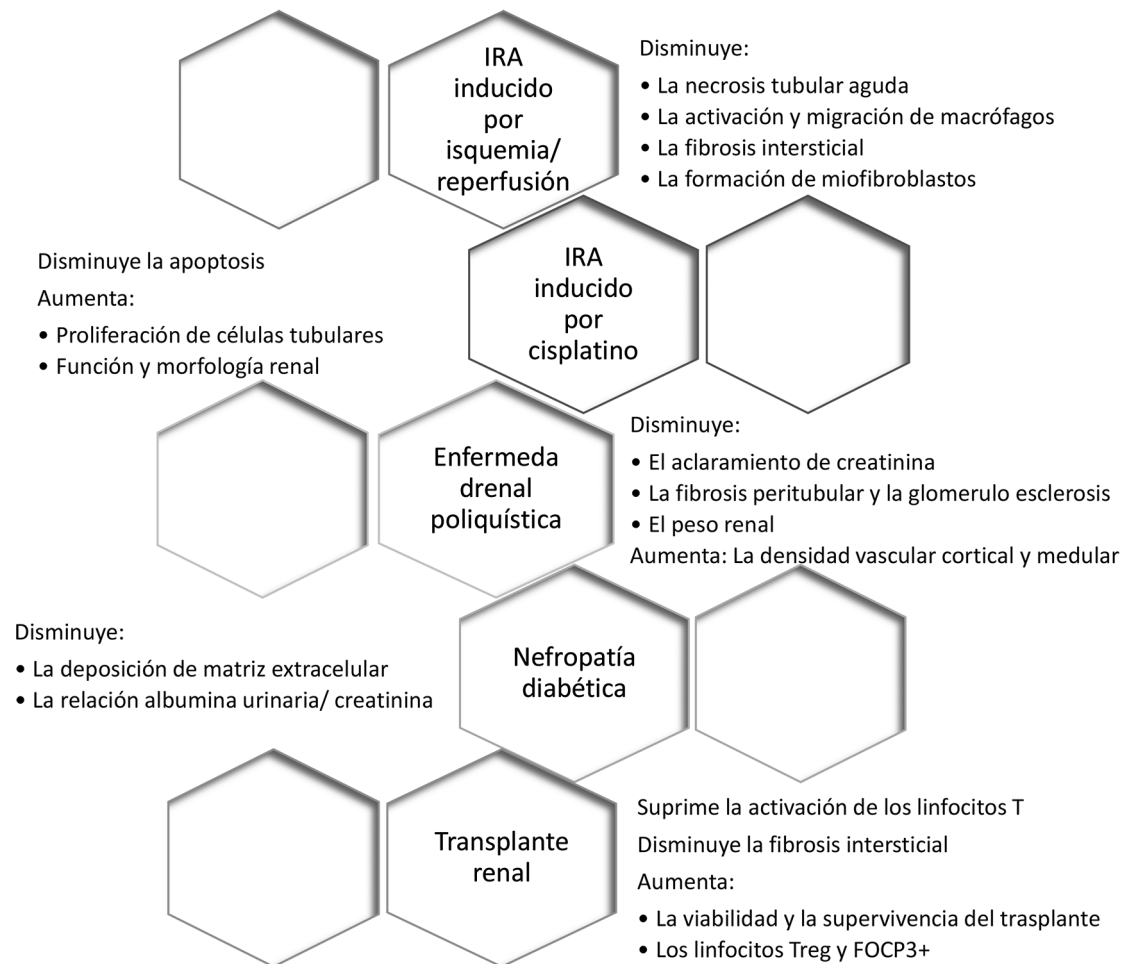
MATERIAL SUPLEMENTARIO**Cuadro Suplementario 1.** Criterios mínimos para definir células estromales mesenquimales humanas¹

Característica	Porcentaje
Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar	100%
Positivos para antígenos ausentes en la mayoría de las células hematopoyéticas, tales como + CD105, + CD73, + CD90	> 95%
+ CD45 (leucocitos), + CD34 (progenitor hematopoyético), + CD14 o CD11b (monocitos y macrófagos), + CD79a o CD19 (células B), + HLA-DR (células y linfocitos presentadores de antígenos)	< 2%
Potencial de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteoblastos	100%

Cuadro suplementario 2. Resumen de estudios clínicos concluidos en trasplante renal²⁻⁵

Estudios clínicos para trasplante de riñón	
1. Se utilizaron altas dosis de células madre de sangre periférica derivadas de donante en receptores pediátricos en combinación con ciclosporina A y prednisolona	Después de 18 meses de observación, hubo 100% de supervivencia del injerto, función renal sostenida y baja incidencia de infecciones oportunistas ²
2. Se administró doble infusión de BM-MSC autóloga a receptores de aloinjertos con rechazo subclínico	Se observó una inhibición de la inmunidad específica del donante en 5 de los 6 pacientes tratados seis meses después de la infusión celular ³
3. Se realizó una infusión de MSC autóloga, junto con dosis estándar y bajas de inhibidores de la calcineurina. Un grupo adicional recibió anticuerpos contra el receptor de IL-2 y dosis estándar de inhibidores de la calcineurina	Los resultados mostraron que los pacientes que recibieron MSC tuvieron menor incidencia de rechazo agudo, menor riesgo de infecciones oportunistas y mejoría de la función renal después de un año, en comparación con los pacientes infundidos con el anticuerpo del receptor IL-2 ⁴
4. Se infundieron las BM-MSC derivadas de donantes en receptores de trasplantes de donantes vivos. Los pacientes fueron tratados adicionalmente con Alemtuzumab sin mantenimiento con esteroides	Esta combinación no pudo inducir tolerancia y mostró una supervivencia subóptima del injerto ⁵

Figura suplementaria 1. Células madre estromales como terapia celular en enfermedades renales, principales mecanismos de acción observados en estudios preclínicos y clínicos⁶



Cuadro suplementario 3. Toxinas urémicas derivadas del intestino y su mecanismo de acción⁷

Toxina	Acción
Indoxil sulfato:	incrementa la expresión de genes relacionados con la fibrosis tubular endotelial, aórtica, calcificación del endotelio vascular, daño celular y disminución en la producción de EPO y el recambio óseo
P-cresol:	genera fibrosis renal, estrés oxidativo, incrementa las citoquinas inflamatorias, inhibe la proliferación del endotelio e incrementa la permeabilidad del endotelio.
Óxido de N- trimetil amina (TMAO del inglés Trimethylamine N-oxide):	está asociado con aumento del riesgo de la mortalidad en los próximos 5 años en pacientes con ERC.

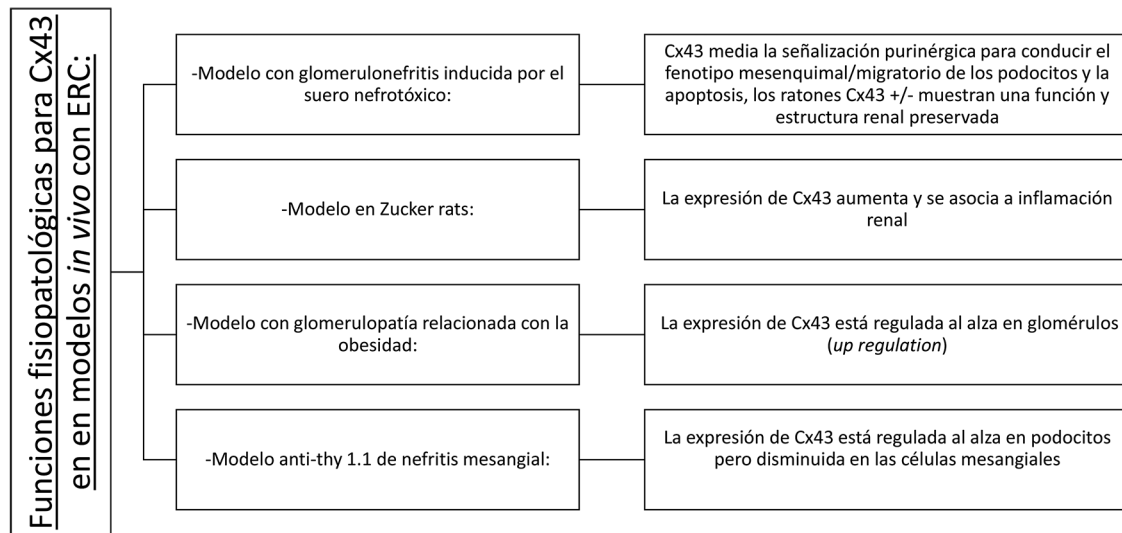
Cuadro suplementario 4. Algunos de los productos que favorecen el crecimiento de la microbiota intestinal y que podrían cumplir con un potencial efecto terapéutico⁷

PROBIÓTICOS: Son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, le confieren un beneficio saludable al huésped	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Bacterias inteligentes: <i>Escherichia coli</i> DH5, productora de ureasa	El tratamiento vía oral en pacientes con hemodiálisis resultó en una disminución de las concentraciones séricas de dimetilamina, una toxina urémica potente Bacterias genéticamente modificadas que producen determinadas moléculas terapéuticas o que actúan en la remoción de las toxinas del organismo La administración vía micro cápsulas de de <i>escherichia coli</i> DH5, productora de ureasa, redujo el nitrógeno ureico en sangre de ratones urémicos.
PREBIÓTICOS: Son ingredientes de los alimentos que no pueden ser digeridos en el tracto gastrointestinal y tienen un efecto benéfico mediante la intervención selectiva en el crecimiento de determinado tipo de bacterias en el colon.	La inulina El fructo-oligosacárido	La inulina promueve el crecimiento de especies de bifidobacteria, clostridium y enterobacterias y disminuye el crecimiento de bacterias proteolíticas. El uso de prebióticos en la alimentación de ratas urémicas mejoró el aclaramiento de creatinina y redujo la inflamación renal y la fibrosis.
DIETAS RICAS EN FIBRAS: Las dietas altas en fibras restauran la microbiota intestinal.	Oligofruktosa de inulina Almidón resistente	Pequeños ensayos en pacientes en hemodiálisis han demostrado que la suplementación con oligofruktosa de inulina y almidón resistente redujo significativamente los niveles circulantes de sulfato de indoxilo y de p-cresilo. La evaluación de una dieta de control en comparación con una dieta alta en fibra o suplementada con acetato, en ratones tratados con exceso de mineralocorticoides disminuyó la disbiosis intestinal, además de reducir significativamente la presión sistólica y diastólica, la fibrosis cardíaca y la hipertrofia ventricular izquierda. En ratas con ERC se observó que la dieta alta en almidón resistente retarda la progresión de la enfermedad
Inhibidor de la α -glucosidasa del intestino delgado	Acarbosa	El suministro de carbohidratos no digeridos a las bacterias colónicas demostró reducir significativamente los niveles de p-cresol en la orina, plasma y heces.

Cuadro suplementario 5. Analitos que se considera conveniente medir en el laboratorio, características y consideración particulares⁸⁻¹²

Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) Porcentaje de glóbulos rojos hipocrómicos (GRH)	Son eritrocitos con una CCMH inferior a 28 g/dL. Con un umbral de diagnóstico del 6%	Se encontró que el porcentaje de GRH era superior a otros índices de hierro en la detección de la deficiencia de hierro. Pero su utilidad clínica se ve comprometida cuando las muestras se envían a laboratorios centralizados, debido a que los eritrocitos pueden expandirse en el almacenamiento ⁸
Saturación de transferrina (Tsat)	La transferrina es una glicoproteína con dos dominios de unión al hierro y es sintetizada por el hígado. Es el vehículo más importante para transportar hierro a las células y prevenir la toxicidad de los radicales libres mediada por el hierro.	En la atención de pacientes con ERC, el TSat bajo (<20%) combinado con ferritina sérica baja es diagnóstico de deficiencia absoluta de hierro. Un TSat bajo combinado con ferritina sérica normal o elevada es un diagnóstico de deficiencia funcional de hierro ⁹
Contenido de hemoglobina en reticulocitos	En condiciones eritropoyéticas normales, los eritrocitos jóvenes (reticulocitos) se liberan de la médula ósea a la circulación y se convierten en eritrocitos maduros después de varios días. El contenido de hemoglobina (CHR) de los reticulocitos, brinda información sobre un cambio a corto plazo en el estado del hierro ¹⁰	Se realizaron varios estudios y se determinó que la variabilidad biológica y analítica de CHR fue significativamente menor que la de la ferritina sérica y el TSat ⁹
Ferritina sérica	Varios estudios analizaron la variabilidad biológica y analítica ^{9,11} y concluyeron que, debido a su gran variabilidad biológica, las mediciones únicas tienen un valor diagnóstico limitado en la evaluación del estado de hierro en pacientes con ERC y no deben utilizarse para guiar las decisiones clínicas relacionadas con el tratamiento de la deficiencia de hierro.	En la práctica clínica, este marcador se mide a intervalos trimestrales tanto en pacientes con ERC sin diálisis como en pacientes dependientes de diálisis ¹²

Cuadro suplementario 6. Funciones fisiopatológicas descriptas para Cx43 en modelos in vivo de enfermedad renal crónica¹³



BIBLIOGRAFÍA

- Torres Crigna A, Daniele C, Gamez C, et al. Stem/Stromal Cells for Treatment of Kidney Injuries With Focus on Pre-clinical Models. *Frontiers in medicine* 2018; 5: 179-204.
- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 103:17438-43.
- Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2:107-111.
- Tan J, Wu W, Xu X, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants a randomized controlled trial. *JAMA* 2012; 307:1169-1177.
- Ciancio G, Sageshima J, Akpinar E, et al. A randomized pilot study of donor stem cell infusion in living-related kidney transplant recipients receiving alemtuzumab. *Transplantation* 2013; 96:800-6.
- Van Wyck DB, Alcorn H Jr, Gupta R. Analytical and biological variation in measures of anemia and iron status in patients treated with maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2010; 56:540-546.
- Nallu A, Sharma S, Ramezani A, et al. Gut Microbiome in CKD: challenges and opportunities. *Transl Res [Internet]*. 2017; 179:24-37.
- Wish JB. Assessing iron status: Beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006; 1(Suppl 1): S4-S8.
- Ford BA, Coyne DW, Eby CS, et al. Variability of ferritin measurements in chronic kidney disease; implications for iron management. *Kidney Int*. 2009; 75:104-110.
- Chuang CL, Liu RS, Wei YH et al. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and high-fluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:370-37
- Van Wyck DB, Alcorn H Jr, Gupta R. Analytical and biological variation in measures of anemia and iron status in patients treated with maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2010; 56:540-546.
- Gaweda AE. Markers of iron status in chronic kidney disease. *Hemodialysis International*. 2017. S21-27.
- Prakoura N, Kavvadas P, Chadjichristos CE. Connexin 43: A new therapeutic target against chronic kidney disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018; 998-1009.