

## La aldosterona en la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda

Norma A. Bobadilla\*

\* Unidad de Fisiología Molecular. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

### CASO CLÍNICO

Paciente masculino de 53 años, con antecedentes familiares de dislipidemia, obesidad y cardiopatía isquémica en padre y dos hermanos y con antecedentes personales patológicos de dislipidemia desde hace quince años. Inicia hace tres años con angor relacionado con el esfuerzo y hace un año presenta dolor precordial continuo, sin mejoría con el reposo. En el servicio de Urgencias, la coronariografía reveló estenosis de 95% de arteria circunfleja y 70% en arteria posterolateral, por lo que se documentó infarto agudo al miocardio anterolateral, que se manejó con trombólisis y con la colocación de dos Stents en arteria circunfleja y uno en la posterolateral. Al presentar mejoría clínica, se dio de alta sin complicaciones con tratamiento a base de clopidogrel, aspirina, metoprolol, captopril, rosuvastatina e isosorbide sublingual. Se mantuvo asintomático hasta hace tres meses, cuando presentó nuevamente un cuadro de angor con actividad moderada con mejoría total con vasodilatadores. Se solicitó nuevamente una coronariografía que mostró re-estenosis en 70% de las arterias arriba señaladas y estenosis de 80% en la arteria coronaria derecha. Es hospitalizado para realización de revascularización coronaria por enfermedad trivascular. Los resultados de los análisis efectuados al ingreso fueron: hemoglobina 12.1 g/dL, leucocitos 7,000/mm<sup>3</sup>, plaquetas 150,000/mm<sup>3</sup>, TP 10.1/10.4, TPT 31/32, glucosa 98 mg/dL, creatinina 1.3 mg/dL, nitrógeno de urea en sangre 18 mg/dL, sodio 137 mEq/L, potasio 4.8 mEq/L, colesterol total 560 mg/dL, triglicéridos 350 mg/dL y depuración de

creatinina 67 mL/min. Se sometió a cirugía de revascularización coronaria con colocación de dos puentes de vena safena. Durante la cirugía presentó episodios repetidos de fibrilación auricular con adecuado control farmacológico con amiodarona, asimismo presentó un sangrado transquirúrgico, que ameritó la transfusión de tres paquetes globulares. Durante su estancia en terapia intensiva desarrolló un evento de taquiarritmia ventricular con hipotensión sostenida que ameritó cardioversión y colocación de marcapaso transvenoso, con lo cual se logró un control adecuado de la frecuencia cardíaca, sin embargo, se mantuvo con hipotensión arterial que ameritó el inicio de aminas vasoactivas (norepinefrina) manteniéndose la TAM promedio en 63 mmHg. Doce horas después de la cirugía desarrolló disminución del volumen urinario que se asoció con un aumento en la creatinina sérica de 1.8 mg/dL, la cual a pesar de las medidas de hidratación, aumentó al quinto día post cirugía hasta 5 mg/dL. En forma similar, la disminución del volumen urinario fue máxima al quinto día del postoperatorio, asociado a una sobrecarga de volumen que provocó congestión pulmonar y aumento de los parámetros de ventilación mecánica. Se interconsultó al Servicio de Nefrología en donde se documentó, una fracción excretada de sodio menor a 1 y un sedimento urinario con presencia de cilindros granulosos, al diagnosticarse insuficiencia renal aguda se decidió iniciar hemodiálisis. La evolución de la insuficiencia renal aguda se asoció con una recuperación paulatina del volumen urinario y de una mejoría cardiopulmonar.

## Insuficiencia Renal Aguda

El daño renal por isquemia-reperfusión (I/R) es la mayor causa de daño renal agudo en riñones nativos y trasplantados.<sup>1</sup> La insuficiencia renal aguda es un síndrome que se desarrolla después de una caída transitoria en flujo sanguíneo renal, produciéndose un incremento abrupto en los niveles de creatinina sérica, como resultado del daño funcional y/o estructural causado al riñón. Aunque la reperfusión es esencial para que sobreviva el tejido isquémico, hay evidencia que la reperfusión por sí misma causa daño celular adicional.<sup>2</sup> Los mecanismos del daño renal inducido por isquemia/reperfusión involucran factores vasculares y tubulares, pero a pesar de los avances en las estrategias preventivas, esta enfermedad continúa con alta morbilidad y mortalidad que no se ha modificado en las últimas cuatro décadas.<sup>3</sup> Se ha reportado que 10% de los pacientes en terapia intensiva desarrollan insuficiencia renal aguda y 50% de ellos fallece por esta causa.<sup>4</sup> Otra consecuencia importante de la insuficiencia renal aguda es que puede incrementar la progresión del daño renal crónico preexistente y el desarrollo de insuficiencia renal crónica terminal.<sup>5</sup> Por esta razón, se han buscado diversas estrategias a nivel experimental para prevenir este síndrome, pero los resultados no han sido trasladados a la práctica clínica.

### La aldosterona como hormona mineralocorticoide

En la década de 1950, se aisló de las glándulas suprarrenales por primera vez una sustancia que era capaz de retener sodio y a la que se le denominó "electrocortina", actualmente conocida como aldosterona.<sup>6</sup> Desde entonces y durante mucho tiempo se consideró a la aldosterona como una hormona mineralocorticoide cuya función principal era el mantenimiento del volumen extracelular a través de aumentar la reabsorción de sal y la secreción de potasio en las células epiteliales del túbulo distal y colector. La aldosterona es sintetizada por la sintasa de aldosterona en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales y es secretada en respuesta a ACTH, angiotensina II y a la elevación en los niveles de potasio sérico. Debido a su liposolubilidad, esta hormona esteroidea difunde fácilmente al interior de las células donde interactúa con su receptor mineralocorticoide intracelular. A pesar de la abundancia de los glucocorticoides y de que poseen la misma afinidad que la aldosterona por los receptores de mineralocorticoides, estos receptores son princi-

palmente ocupados por la aldosterona, debido a que los glucocorticoides se unen a proteínas circulantes como la albúmina, quedando sólo cantidades pequeñas de glucocorticoides libres y también a la presencia de la enzima 11 $\beta$ -deshidrogenasa hidroesteroidea tipo 2 (11 $\beta$ HSD2), la cual convierte el cortisol en cortisona, facilitando así, que sólo la aldosterona se una a su receptor. Por lo tanto, la presencia de la enzima 11 $\beta$ HSD2 es esencial para que la aldosterona ejerza sus efectos. Una vez que el complejo aldosterona-receptor viaja al núcleo se une a diferentes regiones promotoras de diversos genes que contienen elementos de respuesta a mineralocorticoides para ejercer así su función. Los genes más conocidos que son regulados por la aldosterona en el epitelio tubular son los que codifican para el transportador sodio:cloro (TSC), la subunidad alfa del canal de sodio (ENaC), el canal epitelial de potasio (ROMK) y la sodio:potasio ATPasa.<sup>7-9</sup> El aumento en la expresión de estas proteínas produce la acción clásica de la aldosterona, que es aumentar la reabsorción de sodio y la secreción de potasio; este efecto no es inmediato y tarda más de 45 minutos, alcanzando el efecto máximo después de varias horas.

### La aldosterona como una hormona profibrótica

Desde su descubrimiento, se había considerado a la aldosterona como una hormona mineralocorticoide, cuya función principal es el mantenimiento del volumen extracelular, sin embargo, la presencia de los receptores de mineralocorticoides en células no epiteliales como: los miocitos, el cerebro y el endotelio vascular,<sup>10,11</sup> hizo suponer que la aldosterona podría ejercer acciones en otros órganos. En efecto, estudios recientes en humanos y en modelos experimentales de diversas enfermedades han mostrado que la aldosterona juega un papel importante en la fisiopatología del daño cardiovascular y renal.<sup>12-15</sup> En 1999 Pitt, *et al.*<sup>12</sup> publicaron en el New England Journal of Medicine un estudio clínico multicéntrico al que le llamaron RALES (por sus siglas en inglés *Randomized Aldactone Evaluation Study*) donde demostraron que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona mejoró en 30% la sobrevivencia de pacientes con insuficiencia cardíaca. Cuatro años después, este mismo grupo publicó en el mismo journal el estudio EPHEsus (*Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart Failure Study*), nuevamente multicéntrico doble ciego controlado con placebo, en donde observaron que la administración de eplerenona (otro inhibidor selectivo de los

receptores de mineralocorticoides) redujo en 15% la mortalidad de 3,319 pacientes con insuficiencia cardíaca después de un infarto agudo al miocardio complicado con disfunción del ventrículo izquierdo y que estaban recibiendo terapia médica óptima.<sup>13</sup> El efecto protector cardiovascular del bloqueo de los receptores de mineralocorticoides se ha asociado con reducción en la fibrosis y en la inflamación vascular, lo que sugiere que la aldosterona participa en condiciones fisiopatológicas como una hormona profibrótica.<sup>16,17</sup>

### **Aldosterona en la progresión de la enfermedad renal**

El estudio pionero que demostró que la aldosterona participa en la fisiopatología de la enfermedad renal, fue realizado en 1996 por el grupo de Thomas Hostetter,<sup>18</sup> quienes al utilizar el modelo clásico de progresión de daño renal, el de la nefrectomía de 5/6 en la rata, demostraron que el uso combinado de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (enalapril) y un bloqueador de los receptores AT1 (losartan) de angiotensina, reducía –como era de esperarse– la proteinuria y el porcentaje de glomeruloesclerosis. Este efecto renoprotector del enalapril y losartan, no era observado cuando se restablecían los niveles de aldosterona al mismo nivel que el grupo no tratado. Estos resultados probaron por primera vez, que el daño renal en este modelo era mediado en gran parte por aldosterona. De forma similar, en ratas espontáneamente hipertensas (SPHR), que desarrollan nefropatía maligna, Rocha, *et al.*, demostraron que la inhibición selectiva de aldosterona previene la aparición de proteinuria y el desarrollo de glomeruloesclerosis.<sup>19-21</sup> La efectividad del antagonismo de los receptores de mineralocorticoides en mejorar el daño glomerular y túbulo-intersticial se ha documentado también, en varios modelos de nefropatía en la rata, como: el modelo de obstrucción ureteral unilateral,<sup>21,22</sup> en la nefropatía diabética tipo I y II,<sup>23,24</sup> en la hipertensión inducida por angiotensina II o por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico<sup>25</sup> y en las ratas con hiperaldosteronismo.<sup>26</sup> Interesantemente, Juknevičius, *et al.*<sup>27</sup> reportaron que la infusión de aldosterona a ratas normales aumenta la cantidad de TGFβ presente en la orina,<sup>27</sup> lo que sugiere que ésta podría ser una de las vías a través de la cual, la aldosterona promueve procesos fibróticos intrarrenales.

En la práctica médica, tres estudios, dos piloto y uno doble ciego controlado con placebo evidenciaron que el tratamiento con espironolactona reduce de

forma importante la excreción urinaria de proteínas en pacientes con insuficiencia renal crónica,<sup>28,29</sup> en uno de estos estudios se observó además, una correlación significativa entre los niveles de proteinuria y los niveles de aldosterona, es decir, los pacientes que presentaban mayor excreción urinaria de proteínas eran los que tenían mayor aldosterona circulante. En el estudio doble ciego y controlado con placebo, en el que incluyeron 41 pacientes que tenían proteinuria persistente mayor a 1.5 g/día, se demostró que la adición de espironolactona al tratamiento con ramipril o bien, ramipril con irbersatan reducía en 50% la excreción urinaria de proteínas, sin producir hipercalcemia.<sup>14</sup> Estos estudios clínicos indican que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides reduce el daño renal e incluso ofrece un efecto protector adicional sobre el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I y antagonistas de los receptores AT1 en los pacientes con insuficiencia renal crónica.

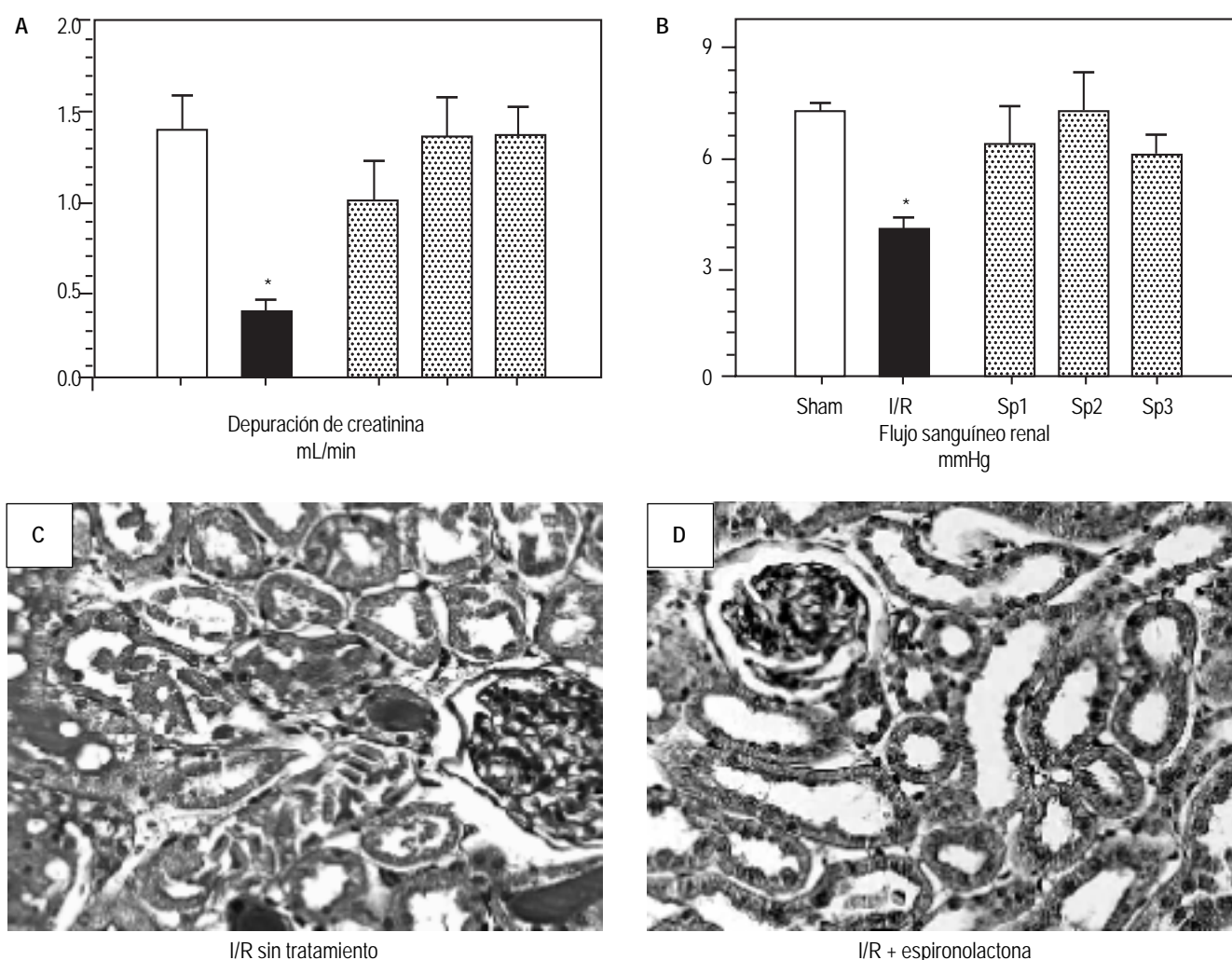
En estudios previos de nuestro laboratorio, también hemos mostrado la participación de la aldosterona en la fisiopatología de la nefrotoxicidad por ciclosporina (CsA). Aunque los beneficios de la inmunosupresión con CsA han sido evidentes, su uso a largo plazo se encuentra limitado por sus efectos secundarios dentro de los que destaca la nefrotoxicidad que produce.<sup>30</sup> Se han descrito dos formas de nefrotoxicidad: la nefrotoxicidad aguda o moderada y la nefrotoxicidad crónica o severa. La nefrotoxicidad aguda se caracteriza por vasoconstricción renal, lo que produce una reducción en la tasa de filtración glomerular. En cambio, la nefrotoxicidad crónica se caracteriza por disfunción renal y por la presencia de lesiones estructurales como arteriopatía y fibrosis túbulo intersticial, siendo esta última lesión irreversible.<sup>31-34</sup> En los roedores se pueden reproducir los dos tipos de nefrotoxicidad que se observan en el humano. El modelo de nefrotoxicidad aguda por CsA se induce al administrar dosis repetidas de CsA.<sup>35</sup> Mientras que el modelo de nefrotoxicidad crónica se obtiene con la administración de dosis repetidas de CsA en conjunto con alimentación con una dieta baja en sodio,<sup>36</sup> la ingesta baja en sodio activa al sistema renina angiotensina aldosterona, lo que aumenta en los roedores, la susceptibilidad a la CsA y la aparición de lesiones estructurales características que se observan en el humano. Debido a que la fibrosis observada en la nefropatía crónica es en parte mediada por un incremento en la expresión del TGFβ, conjeturamos que la aldosterona podría estar involucrada en las acciones deletéreas que produce la CsA en el riñón. En un primer estudio en donde

utilizamos el modelo de nefropatía crónica por CsA, mostramos que la administración de espironolactona evitó la mortalidad que se observa después de 21 días de tratamiento con este inmunosupresor, y estos animales presentaron un menor porcentaje de arteriopatía y del área afectada por fibrosis túbulo-intersticial. Este efecto renoprotector se asoció con una reducción en los niveles de RNAm de TGF $\beta$ , fibronectina, colágena I y colágena IV. Otro hallazgo particularmente interesante de este estudio fue el efecto que ejerció la espironolactona sobre la función renal. Como era de esperarse, la administración crónica de CsA produjo una disminución significativa de la depuración de creatinina, y la inhibición selectiva de los receptores de aldosterona con espironolactona previno la disminución de la función renal en las ratas tratadas simultáneamente con CsA.<sup>37</sup> En un estudio posterior encontramos que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides también previene la nefrotoxicidad aguda por CsA, que sólo se caracteriza por vasoconstricción renal. De tal forma que la espironolactona restableció la tasa de filtración glomerular a valores normales, efecto que fue acompañado por la normalización del flujo sanguíneo renal.<sup>38</sup> En un tercer estudio también mostramos que la administración de la espironolactona evitó la progresión de la disfunción renal y la fibrosis, así como también redujo la muerte celular por apoptosis en las ratas con nefrotoxicidad crónica por CsA preexistente. Estos efectos renoprotectores se asociaron con una reducción en el engrosamiento arteriolar y en la contracción glomerular, lo que sugiere que la inhibición de las acciones de aldosterona reduce la hipoperfusión glomerular en este modelo.<sup>39</sup> Por lo tanto, nuestros resultados previos sugerían que la aldosterona participa en la fisiopatología renal inducida por CsA, y que esta hormona además de ejercer efectos profibróticos también es capaz de producir vasoconstricción renal. En apoyo a nuestros hallazgos, Arima, *et al.*,<sup>40</sup> observaron que la aldosterona induce vasoconstricción dosis y tiempo dependiente en arteriolas aferentes, y eferentes aisladas de conejo. Tres años después, Gross R, *et al.*,<sup>41</sup> encontraron que la exposición a aldosterona induce contracción de las células de músculo liso vascular de humano, a través del aumento en la fosforilación de la cadena ligera de miosina, efecto que fue prevenido con el uso de espironolactona. Asimismo, existe evidencia de que esta hormona es capaz de aumentar los niveles de fosfato inositol y de los receptores de angiotensina II, así como también de alterar la respuesta vasodilatadora a acetilcolina.<sup>42,43</sup>

Por todo lo anterior, inferimos que si la aldosterona jugaba un papel importante en inducir vasoconstricción renal, entonces el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides podría ser un agente protector contra el daño renal inducido por isquemia/reperfusión.

### **Aldosterona en la fisiopatología del daño renal inducido por isquemia/reperfusión**

En un estudio que publicamos muy recientemente evaluamos el efecto del bloqueo de los receptores de mineralocorticoides sobre el daño renal inducido por isquemia/reperfusión.<sup>44</sup> En este estudio se incluyeron cinco grupos de al menos seis ratas cada uno: el grupo de animales que fue sometido a una cirugía falsa (sham), un grupo de ratas sometidas a isquemia bilateral renal de 20 min y reperfusión de 24 h (isquemia/reperfusión) y tres grupos de ratas que fueron tratadas con espironolactona (20 mg/k por vía oral), uno, dos o tres días antes de inducir isquemia/reperfusión (Sp1, Sp2 y Sp3, respectivamente). Primero nos dimos a la tarea de investigar si el tratamiento profiláctico con espironolactona prevenía el daño funcional y estructural inducido por un proceso de isquemia/reperfusión bilateral renal. Como se muestra en la figura 1, después de 24 horas de reperfusión, las ratas sometidas a isquemia desarrollaron disfunción renal, que se caracterizó por un aumento en los niveles de creatinina sérica de  $0.56 \pm 0.06$  a  $1.64 \pm 0.06$  mg/dL, como una consecuencia de la reducción de la tasa de filtración glomerular (Figura 1A). La caída de la depuración de creatinina observada se asoció con una reducción significativa en el flujo sanguíneo renal en 33%, sin cambio en los valores de presión arterial (Figura 1B). En contraste, en los tres grupos que recibieron tratamiento profiláctico con el bloqueador de los receptores de mineralocorticoides por uno, dos o tres días antes de inducir isquemia/reperfusión, se previno completamente la elevación de la creatinina sérica (sp1:  $0.88 \pm 0.2$  mg/dL, sp2:  $0.66 \pm 0.1$  mg/dL, y sp3:  $0.60 \pm 0.04$  mg/dL), debido a que la espironolactona restableció la función renal y el flujo sanguíneo renal a valores normales como se puede apreciar en la figura 1. Cuando se evaluaron los niveles de aldosterona sérica observamos una elevación significativa en los animales sometidos a isquemia/reperfusión renal, por más de cinco veces comparado con el grupo control. Estos niveles de aldosterona tendieron a ser mayores en los grupos pretratados con espironolactona, muy probablemente debido a que los receptores de mineralocorticoides fueron ocupados por espironolactona, originando así mayor aldosterona circulante.



**Figura 1.** El pretratamiento con espironolactona previno el daño funcional y estructural inducido por la isquemia bilateral y reperfusión renal. **A.** Depuración de creatinina (mL/min) **B.** Flujo sanguíneo renal (mm Hg). Las barras blancas representan el grupo que fue operado en forma simulada; las barras negras los animales sometidos a isquemia bilateral de 20 minutos y reperfusión de 24 h; las barras grises representan las ratas que recibieron espironolactona, 1, 2 o 3 días antes de inducir isquemia/reperfusión. \* $p < 0.05$  vs. todos los grupos. **C** y **D.** Microfotografías representativas de cortes histológicos de riñón teñidos con PAS de ratas sometidas a isquemia/reperfusión sin tratamiento y pretratadas con espironolactona, respectivamente.

Los estudios histopatológicos con microscopia de luz revelaron que la isquemia/reperfusión renal produjo daño tubular severo, caracterizado por pérdida del borde en cepillo, dilatación tubular, colapso y desprendimiento de la membrana basal tubular, como se aprecia en la imagen de la figura 1C, que muestra un corte histológico representativo de un riñón de rata sometida a isquemia/reperfusión bilateral. Todas estas lesiones estuvieron prácticamente ausentes en las ratas que recibieron tratamiento con el bloqueador de los receptores de mineralocorticoides, como es posible observar en la microfotografía representativa de la figura 1D, de un corte histológico de riñón de una rata tratada con espironolactona

24 h antes de inducir isquemia/reperfusión. Estos hallazgos fueron cuantitativamente confirmados por el análisis morfométrico en donde se determinó el porcentaje de área tubular dañada. En el grupo con isquemia/reperfusión no tratado, el porcentaje de área tubular afectada fue de  $66.2 \pm 0.7\%$ , en cambio, este porcentaje fue muy inferior en los grupos sometidos a isquemia/reperfusión que fueron tratados con espironolactona:  $6.1 \pm 1.4$ ,  $9.1 \pm 2.5$  y  $6.6 \pm 2.0$  para los grupos sp1, sp2 y sp3, respectivamente. Los ensayos de los marcadores de daño tubular clásicos apoyaron estas observaciones. En el grupo con isquemia/reperfusión bilateral renal, la excreción urinaria de proteínas y de N-acetil-beta gluco-

saminidasa (NAG) aumentó cinco veces y tres veces respectivamente. De acuerdo con los hallazgos histopatológicos, en las ratas que recibieron pretratamiento con espironolactona, los niveles de estos marcadores de daño tubular fueron similares al grupo de ratas control, que fueron operadas en forma simulada y significativamente diferentes al grupo con isquemia/reperfusión no tratado. De tal forma que, nuestros resultados demostraron que el pretratamiento con espironolactona previene el daño renal inducido por la isquemia/reperfusión, sugiriendo que la aldosterona juega un papel determinante como mediador del deterioro de la función y de la estructura a través de un mecanismo genómico.

Como se detalló anteriormente, la disminución del flujo sanguíneo renal es de importancia particular, ya que es el responsable de iniciar y extender la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. El tono vascular es regulado de manera particular por el óxido nítrico (NO) derivado de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Aunque el NO derivado de iNOS contribuye al daño tubular durante la isquemia, se ha propuesto que el NO derivado de eNOS en las arteriolas glomerulares protege contra el daño inducido por la isquemia/reperfusión.<sup>45</sup> De acuerdo con esto, se ha reportado que la disminución de la actividad de eNOS es una de las características de la disfunción endotelial asociada con la insuficiencia renal aguda.<sup>46</sup> A este respecto, se ha mostrado que el preacondicionamiento a isquemia induce un aumento en la actividad de eNOS lo que se asocia con renoprotección frente a un proceso de isquemia/reperfusión.<sup>47</sup> También se ha reportado que la inhibición de la cinasa Rho preserva el flujo sanguíneo renal a través de mejorar la actividad de eNOS en ratas sometidas a isquemia/reperfusión renal.<sup>48</sup> Todos estos estudios indican un papel primordial del NO derivado de eNOS como protector contra el daño renal inducido por la isquemia/reperfusión.

De hecho, en este estudio confirmamos una reducción significativa en la cantidad excretada de los metabolitos estables de la síntesis de NO, los nitritos y nitratos ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ), después de inducir isquemia/reperfusión renal. Interesantemente, el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides previno la reducción de estos metabolitos de NO en la orina. Con el fin de conocer el mecanismo por el cual la espironolactona mejoró la generación de NO, se evaluó la cantidad de eNOS y su estado de fosforilación, ya que se ha descrito previamente que la enzima eNOS se encuentra activa cuando está fosforilada en la serina 1177 e inactiva cuando está fosforilada en la treonina 497, esta última fosforilación además

produce que eNOS genere el radical superóxido en lugar de NO. Cuando se compararon las ratas que fueron pretratadas con espironolactona con el grupo de isquemia/reperfusión sin tratamiento, se observó un aumento en la expresión de eNOS en el riñón y en la cantidad de eNOS fosforilada en el residuo de S1177, junto con una reducción en la fosforilación del residuo T497 de eNOS. En apoyo a nuestros hallazgos, se ha descrito previamente que la aldosterona reduce la generación de NO en células endoteliales de la vena umbilical a través de reducir la fosforilación de la S1177 de eNOS e incrementar la producción de radicales libres.<sup>49</sup> Por lo tanto, el aumento en la expresión de eNOS y de la forma activa de eNOS pueden ser los responsables del aumento de la excreción urinaria de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  y del restablecimiento del flujo sanguíneo renal en los animales con isquemia/reperfusión tratados con espironolactona.

La hipoxia que resulta de la disminución del flujo sanguíneo renal y la subsecuente reperfusión parece ser la responsable de activar procesos en los que se generan especies reactivas de oxígeno y muerte celular del epitelio tubular por necrosis y apoptosis. Por lo que especulamos que el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides, además de mejorar el flujo sanguíneo renal, también podría prevenir la generación de radicales libres y la muerte celular por apoptosis. Para continuar explorando los mecanismos de renoprotección conferidos por espironolactona en la isquemia/reperfusión, se determinaron los niveles de lipoperoxidación en el riñón y los niveles de RNAm de enzimas antioxidantes. El daño tubular inducido por isquemia/reperfusión, se asoció con un aumento de tres veces en la lipoperoxidación renal, lo cual fue prevenido con el pretratamiento con espironolactona desde un día antes de inducir isquemia/reperfusión. La reducción en la lipoperoxidación renal promovida por la espironolactona se acompañó de un aumento significativo en los niveles de RNAm de dos enzimas antioxidantes: la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Estudios publicados previamente han mostrado que la aldosterona induce la generación de ROS en células mesangiales y miocitos en cultivo.<sup>50,51</sup> Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la aldosterona también induce la generación de ROS durante la isquemia/reperfusión e indican que además de prevenir la hipoperfusión renal, el antagonismo de los receptores de mineralocorticoides reduce la producción de ROS y aumenta los niveles de RNAm de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx), lo que resulta en la preservación de la estructura tubular renal como se evidenció por los hallazgos histopatológicos y la normalización de los marcadores de daño tubular.

El daño renal inducido por isquemia se ha asociado tradicionalmente a muerte celular del epitelio tubular por necrosis. Sin embargo, estudios recientes muestran que la apoptosis es una forma importante de muerte celular y del daño asociado a insuficiencia renal aguda.<sup>52</sup> En efecto, en este estudio también observamos un aumento significativo en la tinción *in situ* de los núcleos celulares por el método de TUNEL en los riñones de los animales con isquemia/reperfusión no tratados. Esta observación fue confirmada por la cuantificación de las células apoptóticas por mm<sup>2</sup>, observándose una gran cantidad de muerte celular de este tipo en las áreas yuxtamedulares y subcorticales. El pretratamiento con espironolactona un día antes de inducir isquemia/reperfusión renal, redujo de forma significativa, el número de núcleos positivos en ambas secciones. En cambio, la muerte celular por apoptosis fue prevenida cuando la espironolactona se administró dos o tres días antes de inducir la isquemia/reperfusión renal. De acuerdo con estas observaciones, el daño renal inducido por isquemia/reperfusión produjo un aumento significativo en los niveles de RNAm de pro-caspasa 3, enzima efectora de la muerte celular por apoptosis, efecto que fue revertido por el pretratamiento con espironolactona desde un día antes de inducir isquemia/reperfusión renal. Reportes recientes han puesto de manifiesto que la interferencia del programa apoptótico se traduce en un efecto renoprotector durante la isquemia renal.<sup>53,54</sup> De hecho, el efecto renoprotector conferido por espironolactona también se asoció con la prevención de apoptosis en el tejido renal. Debido a que la hipoxia y la formación de radicales libres son dos factores que inducen muerte celular por apoptosis, es muy probable que la reducción de apoptosis en los animales pretratados con espironolactona resulte del restablecimiento del flujo sanguíneo renal y de la disminución de la lipoperoxidación renal.

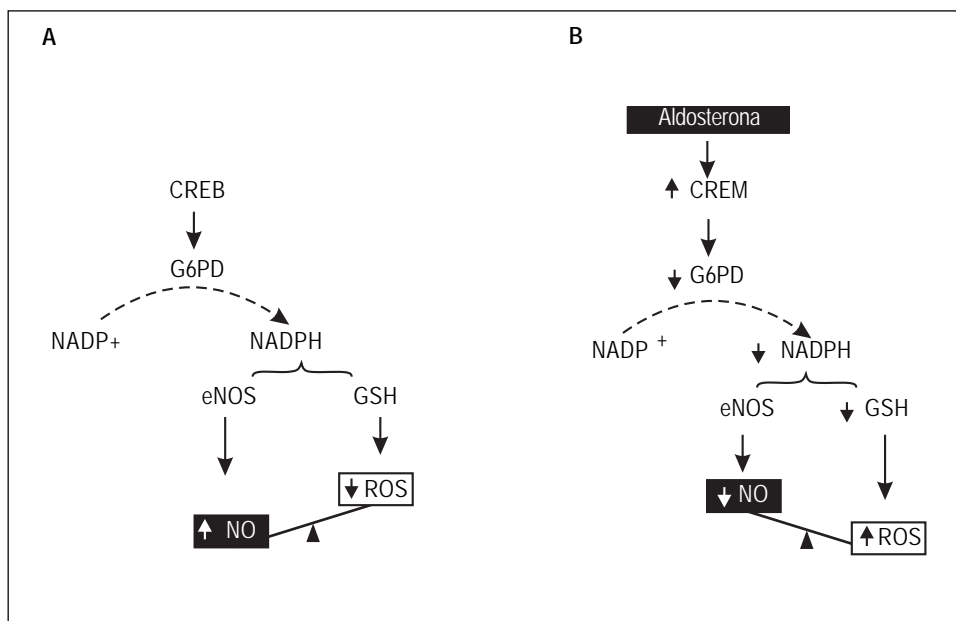
De esta forma, nuestros resultados sugieren que además de sus efectos profibróticos, la aldosterona participa en la vasoconstricción renal que se observa durante la isquemia/reperfusión, efecto que fue revertido con la administración de espironolactona, lo que implica que la aldosterona induce vasoconstricción renal a través de un mecanismo genómico. En apoyo a nuestras observaciones, Leopold, *et al.*<sup>55</sup> publicaron recientemente en Nature Medicine un estudio que fue muy bien diseñado y conducido, en donde primero demostraron que la aldosterona reduce la expresión génica de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenada (G6PD) en células endoteliales de bovino. La G6PD es la primera enzima de la vía de las pento-

sas fosfato y es la principal fuente intracelular de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Se han descrito tres principales funciones intracelulares de esta enzima:

1. Es un agente reductor que limita la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).
2. Mantiene los niveles de glutatión reducido.
3. Es un cofactor esencial para la síntesis de NO.

En las células de los mamíferos, los mecanismos de defensa frente a la formación de productos oxidativos normales del metabolismo celular dependen en gran parte del suministro metabólico de la forma reducida de NADP. Este mecanismo es dependiente del glutatión reducido (GSH), el cual es un tripéptido ( $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina) con gran facilidad para ceder electrones debido a su grupo sulfhidrilo. El GSH no sólo es un importante antioxidante en fase acuosa, sino también es un cofactor esencial de las enzimas antioxidantes. También se conoce que en la mitocondria el GSH confiere protección contra la formación de radicales de oxígeno generados endógenamente. El GSH se encuentra en concentraciones elevadas del orden mM, lo que contribuye a su gran poder reductor, por lo que la reducción en la concentración de GSH puede conducir a la muerte celular. Por lo tanto, el NADPH y la G6PD son moléculas críticas para el mantenimiento del estado de óxido/reducción intracelular, a través de reducir la generación de especies reactivas de oxígeno y de aumentar la síntesis y biodisponibilidad de NO como es esquematizado en la figura 2A. A su vez, se conoce que la transcripción de G6PD es inducida por el factor de transcripción conocido como la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) e inhibida por el modulador del elemento de respuesta a AMPc (CREM). A este respecto, Leopold, *et al.*<sup>55</sup> también describieron que la aldosterona reduce la transcripción de G6PD a través de aumentar la expresión del inhibidor de la transcripción CREM. De tal forma que, en este estudio demostraron a nivel celular que la aldosterona altera el equilibrio de óxido/reducción que resulta por el decremento en los niveles de NADPH, lo que a su vez produjo por una parte, la reducción en la biodisponibilidad de NO y por otra, mayor generación de especies reactivas de oxígeno. Con el fin de demostrar el impacto fisiológico de sus observaciones, llevaron a cabo estudios *in vivo*, para lo cual administraron aldosterona exógena a ratones por medio de la colocación de bombas miniosmóticas subcutáneamente durante 14 días. Estos animales desarrollaron hipertensión arterial,

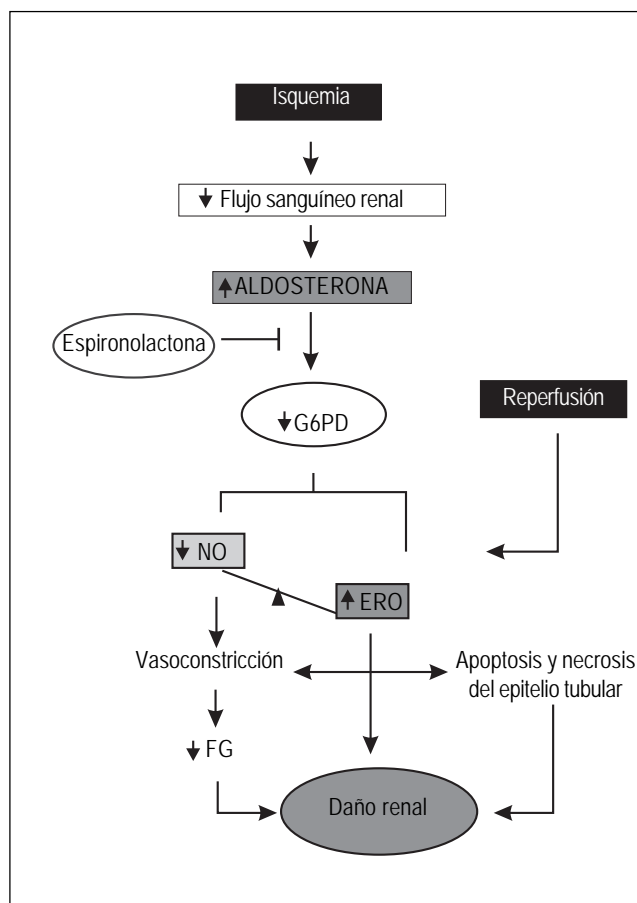




**Figura 2.** Efecto de la aldosterona en el estado de óxido/reducción intracelular y su efecto sobre el tono vascular. A. Relajación. B. Vasoconstricción.

lo que se asoció con una reducción en los niveles de RNAm y de la actividad de G6PD y de NADPH. De forma similar a lo observado en el cultivo celular, la reducción en el NADPH produjo en las aortas de estos animales, un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno y una reducción en los niveles de GMPc, segundo mensajero de NO. Estos cambios observados en los animales que tenían niveles elevados de aldosterona trajo como consecuencia una reducción en la relajación dependiente de endotelio en las arterias mesentéricas como se resume en la figura 2B.

Considerando nuestras observaciones previas y los hallazgos publicados por otros autores, me permito proponer el esquema de la figura 3 en el cual enfatizo el papel central de la aldosterona en la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda. La caída del flujo sanguíneo renal, que resulta tras un periodo de isquemia, es un estímulo importante para la liberación de aldosterona. El incremento en los niveles de aldosterona, como revisamos anteriormente, puede reducir la expresión de la enzima G6PD y, por lo tanto, el NADPH reducido, trayendo como consecuencia un desequilibrio en las cantidades de NO y de especies reactivas de oxígeno. A su vez, se ha descrito que la reperfusión también induce la formación de radicales libres, lo cual potencia este efecto adverso. El desequilibrio en la formación del anión superóxido y el radical de NO resulta en el aumento del tono vascular y la consecuente caída de la función renal. El incremento en la formación de radicales libres que se da como resultado de los procesos de hi-



**Figura 3.** La aldosterona es la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda inducida por un proceso de isquemia/reperfusión o por la administración de ciclosporina.



poxia y reperusión, así como por la reducción de la enzima G6PD, forma parte de un mecanismo importante de daño por estrés oxidativo y muerte celular, con la subsecuente perpetuación del daño renal. En cambio, el bloqueo de los receptores de mineralocorticoides con espironolactona previene las acciones deletéreas de la aldosterona sobre la vasculatura y el epitelio tubular durante un proceso de isquemia/reperusión.

Por lo tanto, nuestros resultados no sólo muestran el papel deletéreo que juega la aldosterona en la insuficiencia renal aguda, sino también abren una nueva estrategia terapéutica para la prevención de daño a tejidos en pacientes que se sospecha pueden estar expuestos a isquemia/reperusión renal, tales como pacientes trasplantados y pacientes que serán sometidos a cirugía de alto riesgo, así como también para el tratamiento de isquemia/reperusión de otros órganos.

### AGRADECIMIENTOS

Los trabajos realizados en mi laboratorio y previamente citados fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (28668, 40182, 208602-3 y 48483) y por la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN208602 y IN228206). Se reconoce la entusiasta participación y colaboración de cada uno de los miembros de la Unidad de Fisiología Molecular en la realización de los trabajos citados y al Dr. Rafael Valdez por la transferencia del caso clínico.

### PREGUNTAS Y RESPUESTAS

1. Dr. David Olvera (Residente de 3er año de Nefrología, INCMNSZ). Además de los efectos vasculares y de sus acciones profibróticas ampliamente expuestas. ¿Se conoce si la aldosterona pueda tener efectos adversos sobre la barrera de filtración glomerular y si esto es a través de la inducir estrés oxidativo?
- R. Estudios clínicos realizados con pacientes con nefropatía diabética y tratados con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y/o bloqueadores de los receptores de angiotensina II mostraron que la adición de espironolactona tuvo un efecto adicional en la reducción de la proteinuria. Estos hallazgos sugieren que la aldosterona puede también dañar la barrera de filtración glomerular. De hecho, en un estudio publicado en este año, en donde utilizaron ratas uninefrectomizadas alimentadas con dieta alta en sodio, la infusión continua de aldosterona produjo daño a los podocitos y

desarrollo progresivo de proteinuria, junto con una reducción en la expresión de nefrina y podocina, lo que se asoció con un aumento en el estrés oxidativo. Estas alteraciones fueron prevenidas con el uso de eplerenona o con el antioxidante tempol. Estos resultados sugieren que la aldosterona, a través de inducir estrés oxidativo, puede dañar a los podocitos y con ello a la barrera de filtración glomerular.

2. Dr. Eduardo Carrillo Maravilla (Médico Adscrito a la Dirección de Medicina, INCMNSZ) ¿Se conoce si algunos de estos efectos de la aldosterona son de los llamados efectos no genómicos? Y si la respuesta es sí, ¿cuáles de estos efectos serían mediados por efectos no genómicos?
- R. En efecto, se han descrito dos mecanismos por los cuales la aldosterona puede ejercer sus efectos: el genómico y el no genómico. El primer mecanismo es mediado por la unión de la aldosterona a su receptor intracelular, lo que propicia la transcripción de genes blanco que responden a mineralocorticoides. En cambio, en el segundo mecanismo la aldosterona ejerce acciones rápidas, por lo que se ha propuesto que se une a un receptor de membrana, aún no identificado, que enciende vías de señalización sin transcripción génica. Aunque se ha reportado que la aldosterona puede producir vasoconstricción en arteriolas aferentes y eferentes de conejo de forma dosis y tiempo dependiente, nuestros resultados sugieren que la vasoconstricción renal, en los modelos de nefrotoxicidad por ciclosporina e isquemia/reperusión, es mediada por un mecanismo genómico, ya que este efecto fue completamente revertido con la administración de espironolactona, bloqueador de los receptores intracelulares de mineralocorticoides. También el desarrollo de fibrosis cardíaca y renal es en parte mediada por las acciones genómicas de aldosterona, por lo que se le ha denominado como hormona profibrótica.
3. Dr. Uri Torruco García (Residente de 3er año de Medicina Interna, INCMNSZ). ¿Por qué mecanismo se establece el efecto protector de los antagonistas de la aldosterona?
- R. Se podrían enumerar al menos cuatro mecanismos que son bloqueados con el uso de espironolactona o eplerenona que han sido observados en los estudios realizados en mi laboratorio en modelos de fisiopatología renal y que también han sido descritos por otros investigadores en la fisiopatología cardiovascular: 1) Mediante la reducción de los procesos fibróticos, a través

de reducir la expresión de la citocina profibrótica TGF $\beta$ , 2) Disminuir la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno inducidas por aldosterona, 3) Mejorar la biodisponibilidad y síntesis de óxido nítrico y 4) Disminuir la muerte celular por apoptosis.

#### REFERENCIAS

- Kelly KJ, Molitoris BA. Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* 2000; 20: 4-19.
- Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia—reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-70.
- Kelly KJ. Acute renal failure: much more than a kidney disease. *Semin Nephrol* 2006; 26: 105-13.
- Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66: 486-91.
- Druml W. Long term prognosis of patients with acute renal failure: is intensive care worth it? *Intensive Care Med* 2005; 31: 1145-7.
- Tait SA, Tait JF. The correspondence of S.A.S. Simpson and J.F. Tait with T. Reichstein during their collaborative work on the isolation and elucidation of the structure of electrocortin (later aldosterone). *Steroids* 1998; 63: 440-53.
- Kim GH, Masilamani S, Turner R, et al. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 14552-7.
- Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, et al. Aldosterone-mediated regulation of ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999; 104: R19-R23.
- Seok JH, Hong JH, Jeon JR, et al. Aldosterone directly induces Na, K-ATPase  $\alpha$  1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 251-4.
- Ngarmukos C, Grekin RJ. Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1122-E1127.
- Yoshimoto T, Hirata Y. Aldosterone as a cardiovascular risk hormone. *Endocr J* 2007; 54: 359-70.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-17.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348: 1309-21.
- Chrysostomou A, Pedagogos E, MacGregor L, et al. Double-Blind, Placebo-Controlled Study on the Effect of the Aldosterone Receptor Antagonist spironolactone in Patients Who Have Persistent Proteinuria and Are on Long-Term Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy, with or without an Angiotensin II Receptor Blocker. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 256-62.
- Chrysostomou A, Becker G. Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with chronic renal disease. *N Engl J Med* 2001; 345: 925-6.
- Hostetter TH, Ibrahim HN. Aldosterone in chronic kidney and cardiac disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2395-401.
- Joffe HV, Adler GK. Effect of aldosterone and mineralocorticoid receptor blockade on vascular inflammation. *Heart Fail Rev* 2005; 10: 31-7.
- Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996; 98: 1063-8.
- Rocha R, Chander PN, Khanna K, et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 451-8.
- Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003; 63: 1791-800.
- Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33: 232-7.
- Trachtman H, Weiser AC, Valderrama E, et al. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 2004; 172: 1590-4.
- Han SY, Kim CH, Kim HS, et al. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1362-72.
- Guo C, Martinez-Vasquez D, Mendez GP, et al. Mineralocorticoid receptor antagonist reduces renal injury in rodent models of types 1 and 2 diabetes mellitus. *Endocrinology* 2006; 147: 5363-73.
- Rocha R, Stier CT, Jr., Kifor I, et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000; 141: 3871-8.
- Hollenberg NK. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int* 2004; 66: 1-9.
- Juknevičius I, Segal Y, Kren S, et al. Effect of aldosterone on renal transforming growth factor- $\beta$ . *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F1059-F1062.
- Sato A, Hayashi K, Saruta T. Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. *Am J Hypertens* 2005; 18: 44-9.
- Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 45-51.
- Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 162-79.
- European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(Suppl. 7): 1-85.
- de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 333-46.
- Li C, Yang CW, Kim WY, et al. Reversibility of chronic cyclosporine nephropathy in rats after withdrawal of cyclosporine. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F389-F398.
- Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int Suppl* 1995; 52: S63-S69.
- Perico N, Benigni A, Bosco E, et al. Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin Nephrol* 1986; 25(Suppl. 1): S83-S88.
- Rosen S, Greenfield Z, Brezis M. Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat. A medullary ray and inner stripe injury. *Transplantation* 1990; 49: 445-52.
- Feria I, Pichardo I, Juarez P, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003; 63: 43-52.
- Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, et al. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F1020-F1030.
- Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, et al. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 292: F131-F139.
- Arima S, Kohagura K, Xu HL, et al. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2255-63.

41. Gros R, Ding Q, Armstrong S, et al. Rapid Effects of Aldosterone on Clonal Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 292: C788-C794.
42. Schiffrin EL, Gutkowska J, Genest J. Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptors in rats. *Am J Physiol* 1984; 246: H608-H614.
43. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33: 981-6.
44. Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, et al. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F78-F86.
45. Schrier RW, Wang W, Poole B, et al. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114: 5-14.
46. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology. *Semin Nephrol* 2004; 24: 316-23.
47. Yamasawa H, Shimizu S, Inoue T, et al. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 153-9.
48. Versteilen AM, Korstjens IJ, Musters RJ, et al. Rho kinase regulates renal blood flow by modulating eNOS activity in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F606-F611.
49. Nagata D, Takahashi M, Sawai K, et al. Molecular Mechanism of the Inhibitory Effect of Aldosterone on Endothelial NO Synthase Activity. *Hypertension* 2006; 48: 165-71.
50. Miyata K, Rahman M, Shokoji T, et al. Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2906-12.
51. Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 2005; 46: 555-61.
52. Kaushal GP, Basnakian AG, Shah SV. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66: 500-6.
53. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, et al. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3115-23.
54. Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, et al. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104: 541-9.
55. Leopold JA, Dam A, Maron BA, et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med* 2007; 13: 189-97.

*Reimpresos:*

**Dra. Norma A. Bobadilla**

Unidad de Fisiología Molecular  
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas  
 y Nutrición Salvador Zubirán  
 Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan  
 14000 México, D.F.  
 Tel.: 52 5485-2676  
 Fax: 52 5655-0382  
 Correo electrónico: nab@biomedicas.unam.mx  
 nabs@quetzal.innsz.mx

*Recibido el 26 de septiembre de 2007.*

*Aceptado el 23 de noviembre de 2007.*