

Podocituria y amilorida en el síndrome de Alport

Tatiana Rengel¹, Romina Canzonieri², Alexis Muryan², Amalia Schiel², Alicia Araoz³, Matías Paulero¹, José Andrews¹, Mariano Forrester¹, Fernando Lombi¹, Vanesa Pomeranz¹, Romina Iriarte¹, Elsa Zotta³, Hernán Trimarchi¹

RESUMEN

El síndrome de Alport fue descrito por Alport en 1927; quien caracterizó esta entidad en una familia británica cuyos miembros desarrollaban enfermedad renal y sordera. Observó que los varones presentaban signos y síntomas más tempranos y severos que las mujeres. En 1990 se descubrió que tiene una base genética relacionada con una mutación en el gen del colágeno COL4A5, que codifica para la cadena α -5 del colágeno tipo IV, la cual estaría ligada al cromosoma X. Es un síndrome genéticamente heterogéneo ya que puede ser autosómico recesivo o dominante. Dicha alteración ocasiona cambios en el fenotipo y en la función de la membrana basal pudiendo presentar falla renal crónica, sordera neurosensorial bilateral y anormalidades oculares.

Se presenta el caso de un paciente con función renal normal, microhematuria y albuminuria con una podocituria mayor en comparación al grupo control. El paciente recibió tratamiento con amilorida evidenciándose posteriormente una disminución en la albuminuria proponiendo al factor activador del plasminógeno (uPA), su receptor (uPAR) y la plasmina como parte de la patogenia en el síndrome de Alport.

Palabras clave: síndrome de Alport, hematuria, microalbuminuria, podocituria, amilorida.

ABSTRACT

Alport syndrome was described by Alport in 1927; who characterized this entity in a British family whose members developed kidney disease and deafness. He noted that the men showed signs and symptoms earlier and more severe than women. In 1990 it was discovered that it has a genetic basis related to a mutation in the collagen gene COL4A5 encoding chain α -5 type IV collagen which would be X-linked is a genetically heterogeneous syndrome because it can be autosomal recessive or dominant. Such alteration results in changes in the phenotype and function of the basement membrane presenting chronic renal failure, bilateral neurosensory deafness, and ocular abnormalities.

We present a case of a patient with normal renal function, microhematuria and albuminuria. His podocyturia was greater compared with a control group. The patient was treated with amiloride evidencing a decrease of the microalbuminuria proposing the plasminogen activating factor (uPA), its receptor (uPAR) and plasmin as part of the pathogenesis in Alport syndrome.

Keywords: Alport syndrome, hematuria, microalbuminuria, podocyturia, amiloride.

Fronteras en Medicina 2016;XI(3):92-96

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Alport (SA) es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X debida a mutaciones del colágeno tipo IV y asociada a nefropatía progresiva, sordera sensorial, lesiones oculares y pulmonares sin una terapia específica^{1,2}. Fue descrito por primera vez en 1927 por A. Cecil Alport, en una familia con “nefritis hemorrágica hereditaria familiar congénita”, destacando que los miembros del género masculino presenta-

ban tendencia a desarrollar nefritis y sordera, mientras que las mujeres desarrollaban hematuria y sordera pero con una mejor supervivencia a largo plazo. Para la década de los años setenta, se postuló que estas alteraciones podrían encontrarse en el *locus* de algún gen de tipo estructural encargado de la formación de las membranas glomerular, ocular y coclear, y que este *locus* podría determinar la estructura del colágeno de la membrana basal con el desarrollo de glomerulosclerosis³⁻⁷.

La prevalencia del síndrome de Alport es de aproximadamente 1 por cada 5000 nacidos vivos, que corresponde aproximadamente al 0,3-2,3% de casos nuevos de enfermedad renal crónica terminal^{8,9}.

La membrana basal glomerular está conformada específicamente por colágeno tipo IV, y su estructura está seriamente afectada por los haces anormales de colágeno. Las células endoteliales glomerulares y los podocitos se encuentran unidos constitutivamente a la membrana basal, y los tres componentes funcionan como un complejo histológico que hacen parte de la unidad fisiológica conocida como la barrera de filtración glomerular. Una de las estrategias se centra en recomendaciones nefroprotectoras haciendo hincapié en la reducción de peso corporal, evitar el tabaco, restricción de ingesta de sodio, control de la presión arterial, además del uso de

1. Hospital Británico de Buenos Aires. CABA, Rep. Argentina.

2. Servicio de Laboratorio, Hospital Británico de Buenos Aires. CABA, Rep. Argentina.

3. IFIBIO Houssay, UBA CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 1425 CABA, Rep. Argentina.

Correspondencia: Dr. Hernán Trimarchi | Servicio de Nefrología, Hospital Británico de Buenos Aires. Perdriel 74, C1280AEB CABA, Rep. Argentina | Tel.: (5411) 43096400 | E-mail: htrimarchi@hotmail.com

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 18/05/2016 | Aceptado: 23/06/2016

inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los bloqueantes de los receptores de la angiotensina ya que se ha demostrado su utilidad en la progresión de la enfermedad renal sobre todo cuando se presenta acompañada de proteinuria, principalmente en aquellos que son asintomáticos¹⁰⁻¹².

La pérdida de podocitos a nivel urinario (podocituria) es un fenómeno silencioso que precede a la proteinuria en las enfermedades glomerulares; es un fenómeno irreversible de modo que debería intentar disminuir su pérdida, sobre todo en las primeras fases de las glomerulopatías, por lo que se plantean diversas estrategias con el fin de reducir la proteinuria y así contribuir a retrasar la disminución de la función renal^{13,14}.

Se presenta el caso de un paciente con función renal normal, microhematuria y albuminuria con una podocituria mayor comparada con el grupo control, por lo que recibió tratamiento con amilorida, evidenciándose una disminución de la albuminuria. Los hallazgos de este estudio podrían proponer al factor activador del plasminógeno (uPA), su receptor (uPAR) y la plasmina como parte de la patogenia del síndrome de Alport.

CASO CLÍNICO

Paciente masculino de 25 años de edad con antecedentes de tío materno en hemodiálisis crónica, primo materno con insuficiencia renal crónica (ambos con biopsia compatible con enfermedad de Alport) y abuelo materno fallecido por muerte súbita a los 42 años. Al examen físico se encontraba normotenso (TA: 115/68 mmHg) con un índice de masa corporal de 24. Laboratorio con: hto 44%, glucemia 78 mg/dl, sodio 143 mEq/l, potasio 3,9 mEq/l, albúmina sérica 4,3 mg/dl, creatinina 1,07 mg/dl. Sedimento urinario con microhematuria. Clearance de creatinina de 74 ml/min. Orina en 24 horas con albuminuria de 250 mg/día. Ecografía renal normal.

La podocituria se evaluó de acuerdo a lo reportado por este grupo de trabajo previamente^{8,9}. Brevemente, se recolectó una muestra de orina fresca, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante; se añadió al sedimento formaldehído al 10% en fosfato de pH 7,2-7,4 (PBS: *phosphate-buffered saline*) para conservarlo. El extendido de la muestra se realizó en portaobjetos revestidos de silano al 2%. Las muestras fueron teñidas con la técnica de inmunofluorescencia y observadas por microscopía de epifluorescencia. Los portaobjetos fueron preincubados con *rabbit serum in phosphate-buffered saline* 0,1 M, pH 7,4 (PBS 1:100) a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de incubación con un anticuerpo antisinaptopodina policlonal (1:100, ab109560 Alexa Fluor®, Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante la noche a 4°C. Después de varios lavados en PBS, los portaobjetos se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG

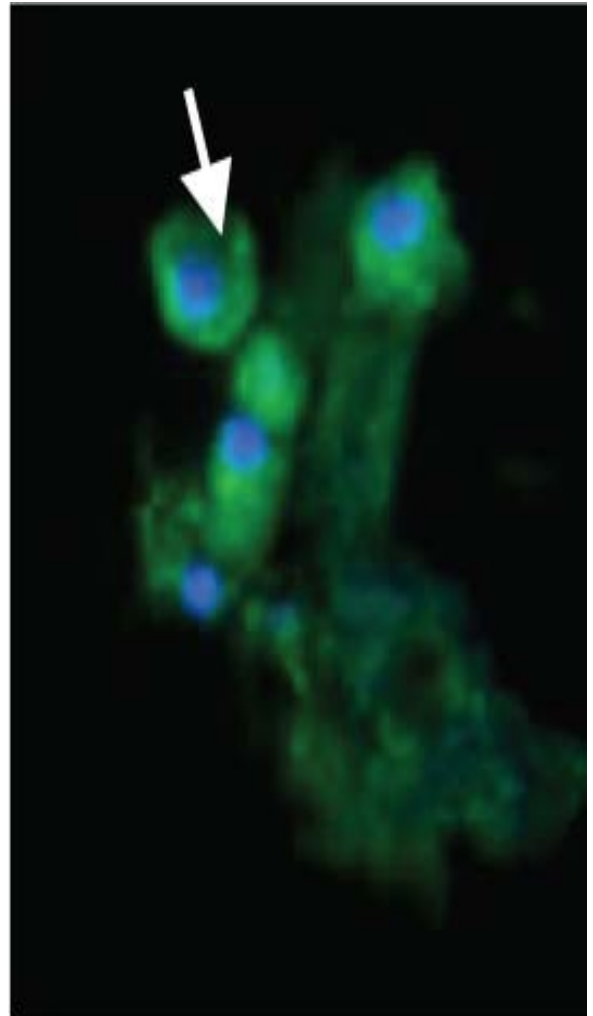


Figura 1. La flecha blanca representa a numerosos podocitos urinarios que aparecen como células fluorescentes brillantes, redondas verdes antes de amilorida en el paciente con síndrome de Alport. Microscopía fluorescente a 200×.

de conejo (1:200 Alexa Fluor 488, Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Por último, todos los portaobjetos se fijaron utilizando Fluoroshield como medio de montaje con DAPI (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y se observaron en un microscopio epifluorescente (Nikon Eclipse E200, Nikon, Tokio, Japón). Los controles negativos se realizaron sin anticuerpos primarios. El recuento de podocitos se realizó contando en los extendidos urinarios el número de células en 10 campos microscópicos a 20× y el número de podocitos por cada 100 ml de orina fue 5,3 (**Figura 1**). Este resultado se comparó con 5 controles (**Figura 2**): 3 hombres y 2 mujeres con edad media de 22,0±7,2 años, sin antecedentes patológicos; clearance de creatinina 108 ml/min; una media de albuminuria de 24 horas de 88±11 mg/día. La media de recuento de podocitos fue de 0,12±0,1 células por campo a 20×, mientras que la media de número medio de los podocitos por gramo de creatinina en orina fue de 10,7 y la media del número de podocitos/100 ml de orina fue 1,1.

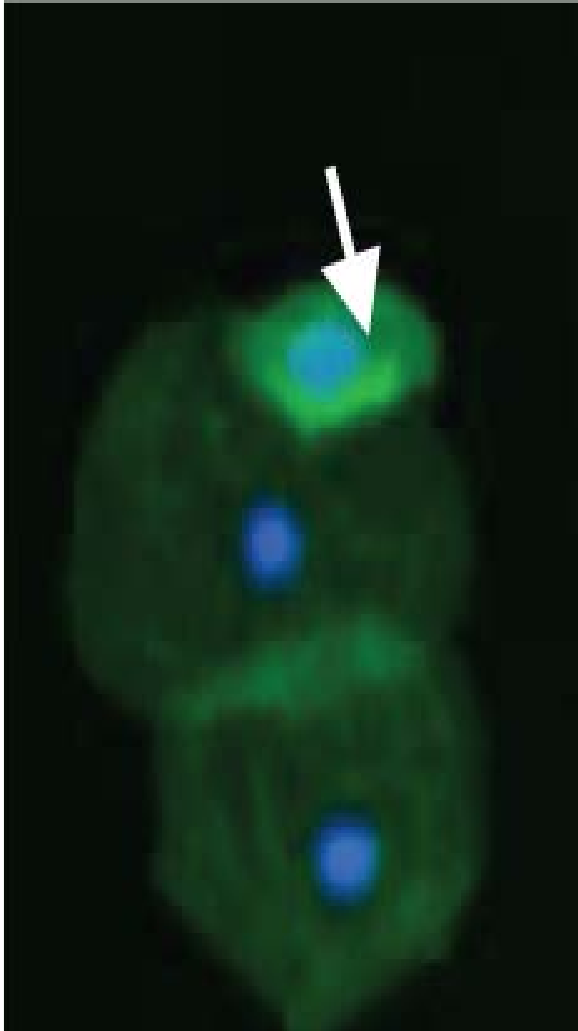


Figura 2. Muestra de orina de un control. Uno de los podocitos (flecha blanca) y principalmente se observan células tubulares. Microscopía de fluorescencia a 200 \times .

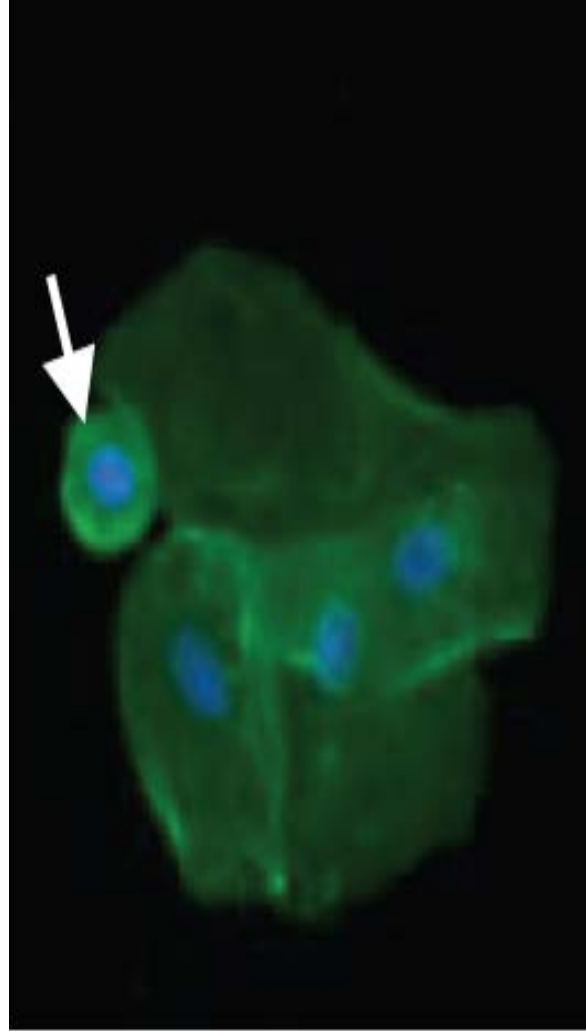


Figura 3. Citología urinaria muestra uno de los podocitos después de amilorida (flecha blanca). Microscopía fluorescente a 200 \times .

El paciente se negó a realizarse biopsia renal e inició tratamiento con amilorida 5 mg/día vía oral. Después de tres meses de tratamiento, el recuento de podocitos fue de 0,2 células por campo a 20 \times ; el número de podocitos por gramo de creatinina en orina fue 9, y el número de podocitos/100 ml de orina fue 1 (**Figura 3**). La presión arterial era de 110/70 mmHg, creatinina sérica de 1,09 mg/dl, *clearance* de creatinina de 79 ml/min, sodio 143 mEq/l, potasio 3,9 mEq/l y albuminuria de 24 horas de 19 mg/día.

DISCUSIÓN

La barrera de filtración glomerular está constituida específicamente por la pared del endotelio capilar, la membrana basal glomerular y los pedicelos de los podocitos, encontrándose perfectamente adaptada para realizar la función de filtración. La membrana basal no rodea como tal toda la superficie del ovillo glomerular, así el espacio que aparece entre dos asas capilares está ocupado por un tejido conectivo especial denomina-

do mesangio¹⁵. Los podocitos tapizan la membrana basal glomerular conformando la superficie externa de los capilares glomerulares. Los podocitos son células altamente diferenciadas con una organización celular y una citoarquitectura complejas. Se encuentran divididos en tres diferentes segmentos: el cuerpo celular, las expansiones principales y los pies de los podocitos. Los pies de los podocitos se encuentran adheridos a la membrana basal y se entrelazan con los pedicelos de las células vecinas formando la hendidura de filtración. Además, la hendidura de filtración está compuesta por el diafragma en hendidura. Los pies de los podocitos no son estáticos sino que contienen un sistema contráctil que se compone de actina^{14,15}. Además de la actina se ha reportado la asociación de la sinaptopodina (proteína rica en prolina) con los filamentos de actina y los pies podocitarios¹⁴⁻¹⁶. La membrana basal glomerular es altamente permeable al agua, a los pequeños solutos y a los iones, pero es impermeable a las proteínas plasmáticas y a otras moléculas de gran tamaño, produciendo así un filtrado glomerular desprovisto de proteínas de alto peso

molecular. Los podocitos son lesionados en muchas formas de enfermedad glomerular pudiendo ser estas de origen inmune, tóxico, metabólico y hemodinámico llevando a anomalías en su estructura y a su pérdida es una respuesta a la injuria, que después de un tiempo se traduce clínicamente en proteinuria^{15,16}.

Sin embargo, la proteinuria también puede ser causada por la pérdida de los podocitos como se demostró en nuestros hallazgos^{16,17}. Aunque los mecanismos moleculares del desprendimiento de los podocitos en la enfermedad de Alport no han sido explorados, nuestro informe actual muestra una importante reducción en la podocituria después de la prescripción amilorida lo que puede sugerir que existen ciertas moléculas que podrían estar involucradas en la pérdida de podocitos. Se ha propuesto a la amilorida como una droga eficiente para la disminución de la podocituria y proteinuria en pacientes con enfermedad renal crónica estadio II con enfermedad de Alport.

Esta podocitopenia glomerular es crítica ya que perjudica el proceso normal de filtración glomerular y determina la esclerosis y fibrosis del glomérulo en forma irreversible hasta etapas terminales de enfermedad renal^{18,19}.

Tanto en el plasma como en orina existe una elevación de plasminógeno y plasmina en pacientes con proteinuria y síndrome nefrótico²⁰. La conversión de plasminógeno a plasmina es mediada por el factor activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA), una enzima que se une a su receptor específico en la membrana celular del plasma, uPAR. En este sentido, la amilorida inhibe competitivamente la actividad catalítica del uPA con la subsiguiente disminución de los niveles de plasmina. A su vez, la plasmina se ha implicado en la generación de edema en las glomerulopatías y en el síndrome nefrótico por la activación de los canales tipo ENaC a nivel del túbulo distal²¹⁻²³. Además, Zhang et al. demostraron que la amilorida también reduce la expresión de uPAR e inhibe la síntesis de proteínas en los podocitos²⁴. El uPAR interacciona con ciertas integrinas que son parte del anclaje del podocito a la membrana basal. La inducción del uPAR es un acontecimiento clave que interviene en los eventos celulares de la contracción de podocitos mediada por la actina, la ampliación del diafragma en hendidura y el aumento de la motilidad podocitaria, predisponiendo a su desprendimiento y la consiguiente proteinuria²⁴.

Algunos estudios también han demostrado la interacción entre el uPAR y la subunidad $\beta 3$ de las integrinas como parte involucrada en el desarrollo de proteinu-

ria²⁴⁻²⁶. EL uPAR se expresa altamente en la superficie celular de los podocitos enfermos, pero sólo escasamente en podocitos normales²⁴. Además, el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) también presenta acciones pleiotrópicas^{27,28}.

Notablemente el PAI-1 no se expresa en glomérulos normales de riñón, pero está aumentado en situaciones de estrés podocitario. El PAI-1 interacciona con el uPAR acelerando la podocituria a través de la interacción con la integrina $\alpha 3\beta 1$, que es el principal colaborador en la adhesión de los podocitos glomerulares a la membrana basal. Por lo tanto, la activación del uPAR a través de las integrinas resulta en el borramiento de los pies podocitarios a través de la alteración del citoesqueleto²⁹⁻³¹.

Por último la remodelación y desarrollo de la matriz extracelular está orquestada por un proceso altamente regulado por zinc y proteasas dependientes de calcio conocidas como metaloproteinasas de la matriz (MMP). Esta familia de enzimas pueden degradar todas las proteínas estructurales, incluyendo la membrana basal, colágeno (IV), fibronectina, laminina, proteoglicanos y elastina. Las MMP incluyen colagenasas y gelatinasas. Una elevada expresión de MMP-9 se observa en la corteza renal fibrótica de los perros con síndrome de Alport ligadas al cromosoma X. Estos hallazgos sugieren que las MMP pueden jugar un papel importante en la acumulación de matriz asociada con una cicatrización renal progresiva³². Planteamos la amilorida como un inhibidor del uPA y que favorece la disminución de la migración celular, probablemente por la disminución en los niveles de plasmina^{33,34}.

Si bien se necesitan estudios con mayor número de pacientes, los resultados de este informe podrían demostrar que la amilorida podría llegar a ser un fármaco eficaz para disminuir la podocituria y la proteinuria en un paciente con enfermedad renal crónica estadio II con síndrome de Alport.

Para concluir, la disminución de la podocituria presentada en nuestro paciente después de la administración de amilorida puede sugerir que existen diversas alteraciones en las vías moleculares de los podocitos involucrados en la patogenia de la podocituria y el desarrollo de proteinuria en el síndrome de Alport.

Debido a la falta de tratamientos específicos, la amilorida podría resultar una herramienta útil y no costosa para emplearse en el síndrome de Alport, para retrasar la progresión de la enfermedad renal, principalmente por la conservación de la población de podocitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kashtan CE. Alport syndrome: an inherited disorder of renal, ocular and cochlear basement membranes. *Medicine (Baltimore)* 1999;5:338-60. Review.
2. Kashtan CE. Familial hematuria due to type IV collagen mutations: Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Curr Opin in Pediatr* 2004;16:177-81.
3. Thorner PS. Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c82-8.
4. Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. *Kidney Int* 1996;50:1445-63.
5. Grünfeld JP. The clinical spectrum of hereditary nephritis. *Kidney Int* 1985;27:83-92.
6. Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. *Kidney Int* 1996;50:1445-63.
7. Massella L, Muda AO, Faraggiana T, Bette C, Renieri A, Rizzoni G. Epidermal basement membrane $\alpha 5$ (IV) expression in females with Alport syndrome and severity of renal disease. *Kidney Int* 2003;64:1787-91.
8. Levy M, Feingold J. Estimating prevalence in single gene kidney diseases progressing to renal failure. *Kidney Int* 2000;58:925-43.
9. Heidet L, Gubler MC. The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1210-15.
10. Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 2013;158:825-830.
11. Floege J, Feehally J, Johnson R. *Comprehensive Clinical Nephrology*. Fourth Edition. Ed Saunders; 2010 pp. 270-281.
12. Webb NJ, Shahinfar S, Wells TG, Massaad R, Gleim GW, McCrary Sisk C, Lam C. Losartan and enalapril are comparable in reducing proteinuria in children with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2013;28:737-43.
13. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F40-8.
14. Trimarchi H. Podocyturia. What is in a name. *J Transl Int Med* 2015;3:51-6.
15. Arias M, Aljama P, Egido J. *Nefrología Clínica*. Cuarta Edición. Ed. Panamericana, 2014. p. 15.
16. Trimarchi H, Canzonieri R, Muryan A, et al. Copious podocyturia without proteinuria and with normal renal function in young adult with Fabry disease. *Case Rep Nephrol* 2015;2015:257628. doi: 10.1155/2015/257628.
17. Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2013;24: 2081-95.
18. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1379-83.
19. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:342-8.
20. Vaziri ND, Gonzales EC, Shayestehfar B, Barton CH. Plasma levels and urinary excretion of fibrinolytic and protease inhibitory proteins in nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 1994;124:118-24.
21. Trimarchi H. Plasmin, urokinase plasminogen activator receptor and amiloride in the nephrotic syndrome. In: Mubarak M, editor. *Nephrotic Syndrome. Etiology, Pathogenesis and Pathology*. New York, NY: Nova Biomedical; 2015.
22. Vassalli JD, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator; urokinase. *J Cell Biol* 1985;100:86-92.
23. Trimarchi H, Forrester M, Lombi F, et al. Amiloride as an alternate adjuvant antiproteinuric agent in Fabry disease. The potential roles of plasmin and uPAR. *Case Rep Nephrol* 2014;2014:854521.
24. Zhang B, Xie S, Shi W, Yang Y. Amiloride off-target effect inhibits podocyte urokinase receptor expression and reduces proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1746-55.
25. Wei C, Möller CC, Altintas MM, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 2008;14:55-63.
26. Wei C, El Hindi S, Li J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011;17:952-60.
27. Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 2005;93:631-40. Review.
28. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 35-45. Review.
29. Kobayashi N, Ueno T, Ohashi K, et al. Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via uPA-mediated $\beta 1$ -integrin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015;308:F14-26.
30. Regoli M, Bendayan M. Alterations in the expression of the $\alpha 3\beta 1$ integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997;40:15-22.
31. Sachs N, Sonnenberg A. Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:200-10.
32. Rao VH, Lees GE, Kashtan CE, et al. Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS). *Kidney Int* 2003;63:1736-48.
33. Thomas GJ, Poomsawat S, Lewis MP, Hart IR, Speight PM, Marshall JF. $\alpha v\beta 6$ integrin upregulates matrix metalloproteinase 9 and promotes migration of normal oral keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2001;116:898-904.
34. Chapman HA, Wei Y. Protease crosstalk with integrins: the urokinase receptor paradigm. *Thromb Haemost* 2001;86:124-9. Review.