

## **ABREVIATURAS**

AJ: Adherens junctions, uniones adherentes

ATP: Adenosín trifosfato

BHA: Butil-hidroxianisol

BSA: Albúmina sérica bovina

CC: Células control

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

FAK: Quinasa de adhesión focal

FRA: Fracaso Renal Agudo

H/R: Hipoxia/reoxigenación

HE: Hematoxilina-eosina

HK-2: Células de epitelio tubular proximal humano (Human Kidney-2)

I/R: Isquemia/reperfusión

IB: Inmunoblot

IF: Inmunofluorescencia

IHQ: Inmunohistoquímica

MAPK: Quinasa de proteínas activadas por mitógenos

NTA: Necrosis tubular aguda

OCT: Compuesto de temperatura óptima de corte

PAS: Ácido periódico de Schiff

PKC: Proteína quinasa C

PMA: Phorbol 12-myristate-13-acetate

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS: Dodecil sulfato sódico

TBS: Tris tampón salino

TJ: Tight junctions, uniones estrechas

TTBS: Tris tampón salino con Tween 20

ZO: Zónula occludens

## **RESUMEN**

**Background:** Renal ischemia induces a broad range of cell responses including loss of adhesion and cell death, depending on the cell type and the duration of the ischemic period. Sublethal renal I/R provokes primarily proximal tubular epithelial cell shedding. Using animal models of I/R, loss of epithelial polarity, actin cytoskeleton dynamics alterations and disruption of intercellular junctions have been reported in the proximal tubule. For an appropriate study of the epithelial cell response to I/R, it is important to use *in vitro* systems which closely reproduce the *in vivo* experimental conditions and effects as the one we have established. In the present work, we have used the human proximal tubule epithelial cell line HK2.

The morphology and the correct function of proximal tubular epithelial cells are determined by the structured cytoskeleton, the organized intercellular unions as well as the firm focal contacts with the ECM, where collagen IV is the major component. This anchorage is mediated by the Focal Adhesion Complexes (FAC). Epithelial cell-cell adhesion is established through different structures: tight junctions (TJ), adherens junctions (AJ) and desmosomes.

The ATP and oxygen alterations subsequent to I/R can lead to oxidative stress generation. Indeed, several authors have documented the production of reactive oxygen species (ROS) in animal models of I/R and in chemical hypoxia/ATP depletion *in vitro*

models. Additionally, the administration of antioxidants showed beneficial effects on both *in vivo* and *in vitro* systems.

Calcium is a crucial second messenger capable to activate several intracellular signalling pathways, including PKC signalling. Oxygen deprivation causes an increase in the cytoplasm levels of  $Ca^{2+}$ , which leads to damage in many cells.

PKC is a family of proteins which play a key role in the intracellular signalling. It has been divided in three subfamilies: classical PKCs including  $PKC\alpha$ ; novel PKCs; atypical PKCs including  $PKC\zeta$ . All of them have a catalytic domain which mediate serine-treonine phosphorylation of their effectors and a regulatory domain which is activated by DAG and  $Ca^{2+}$  for classical PKCs and DAG for novel PKCs. Atypical PKCs do not respond to any of these stimuli. All PKCs isoforms when activated translocate to different cell compartments, being the plasma membrane the most common site of translocation. Regarding to the I/R tubular damage, it has been reported that both isoforms translocate to the membrane and contribute to this injury, even though their role remains still poorly understood.

**Objectives:** The main objective of this work is to determine the role of the  $PKC\alpha$  and  $PKC\zeta$  isoforms in the mechanisms mediating the tubular damage caused by I/R, using an *in vitro* model of H/R in

HK2 cells. To assess this, we have studied the activity and the regulation of both isoforms during H/R and the effects of PKC $\alpha$  and PKC $\zeta$  activity in intercellular adhesion and cytoskeleton organization, using specific inhibitors. Additionally, we have determined the localization of both isoforms in human specimens showing acute tubular necrosis (ATN).

**Methodology:** To achieve these objectives we have determined, *in vitro*, the expression of PKC isoforms by western blot; their translocation by immunofluorescence and subcellular fractionation and western blot; the calcium and ROS levels by flow cytometry; the distribution of intercellular adhesion molecules as well as the organization of cytoskeleton components by immunofluorescence; the epithelial monolayer integrity by colorimetry; in human samples, the localization of all the proteins was studied by immunohistochemistry.

**Conclusions:**

1. Several PKC isoforms are expressed in HK2, mainly PKC $\alpha$  and PKC $\zeta$ , no exhibiting changes in expression during H/R.

2. PKC $\alpha$  is transiently activated during reoxygenation due to Ca<sup>2+</sup> increase and ERK1/2 activation and leads to cell contraction, TJ disruption and epithelial monolayer integrity disturbance. In human

samples, PKC $\alpha$  localized in the plasma membrane of damaged tubular cells.

3. PKC $\zeta$  is also transiently activated during reoxygenation due to ROS generation and causes cytoskeleton components disorganization. In human samples, PKC $\zeta$  localization in the membrane correlates with injured cells.

4. Our results strongly suggest that PKC $\alpha$  and PKC $\zeta$  could be identified as prognostic markers of tubular damage after ischemia and could be considered as targets for new and more efficient FRA therapies in future.



## **INTRODUCCIÓN**

## 1. EL RIÑÓN

### 1.1. ANATOMÍA FUNCIONAL E HISTOLOGÍA

Los riñones son órganos retroperitoneales que existen en el cuerpo en número par. Se sitúan a nivel lumbar, a ambos lados de la columna vertebral. Son órganos sólidos, con una morfología en “habichuela”, que se abren en su borde interno donde se localiza el hilio renal, que contiene entre otros, los vasos sanguíneos (arteria y vena renal) y el correspondiente uréter. En continuidad con el hilio existe un sistema de cavidades llamadas *cálices*, aproximadamente tres *cálices mayores* en cada riñón en los que confluyen varios *cálices menores*. Sobre cada uno de los cálices menores se apoya la base de la *pirámide de Malpighi*, que constituye el componente mayoritario de la *médula renal*. Bordeando a ésta, entre la médula y la cápsula renal, se localiza la *corteza renal*.

Distribuidas en la corteza renal se encuentran las ***nefronas*** que son las unidades funcionales del riñón, constituídas por el corpúsculo renal y un sistema tubular. El *corpúsculo renal* está compuesto por el ovillo capilar glomerular y la cápsula de Bowman, y en el sistema tubular se pueden distinguir cuatro porciones: *túbulo proximal*, *túbulo medio o asa de Henle*, *túbulo distal* y *sistema*

*colector*. En cada una de estas porciones a su vez se pueden distinguir además diferentes segmentos.

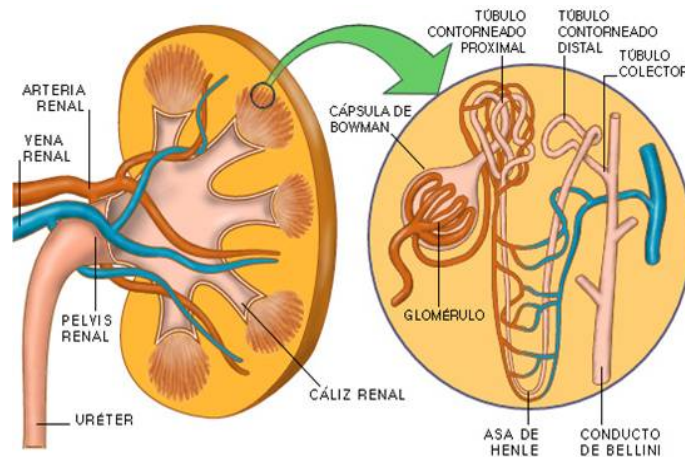


Figura 1. Esquema de la anatomía renal (imagen izqda) con imagen ampliada (dcha) de la estructura de la unidad funcional renal. Imagen obtenida de la web del Ministerio de Educación y Ciencia, proyecto Biosfera.

El túbulo proximal es la porción más larga de la nefrona. Presenta una primera porción contorneada y una porción final recta. Está tapizado por un epitelio cúbico simple que muestra en su cara luminal un ribete en cepillo; las células epiteliales también muestran repliegues membranosos en sus caras laterales y basal, y presentan en su citoplasma un aparato de Golgi muy desarrollado. Estudios de microscopía electrónica permiten distinguir dentro del túbulo proximal tres segmentos con características diferentes en cuanto al epitelio que los reviste: segmento S1, en su porción contorneada

compuesto por células más altas, con más interdigitaciones y más organelas y vacuolas; segmento S2, ocupa la porción contorneada y recta, y las células que lo componen muestran menos interdigitaciones y organelas; segmento S3, situado ya en la porción recta, está revestido por un epitelio cúbico con apenas organelas ni interdigitaciones.

El asa de Henle es mucho más estrecha que el túbulo proximal y esta constituida por un epitelio plano, sin ribete en cepillo.

El túbulo distal es más corto y delgado que el túbulo proximal, se localiza en la médula renal y está formado por células cúbicas. Si bien éstas no tienen ribete en cepillo en su cara luminal, sí que presentan repliegues apicales.

Los túbulos distales desembocan en los túbulos colectores y éstos a su vez en los conductos de Bellini.

Todas las células que constituyen las distintas porciones tubulares de la nefrona, se apoyan en la membrana basal, compuesta mayoritariamente por colágeno tipo IV.

## **1.2. FISIOLÓGÍA**

Los riñones son órganos muy vascularizados y relacionados directamente con la regulación del volumen y la composición del líquido extracelular así como de la eliminación de los productos de

desecho. Además el riñón cumple un importante papel en el control de la eritropoyesis a través de la síntesis de eritropoyetina. Es el órgano que regula la presión arterial mediante su participación en el sistema renina-angiotensina y en el metabolismo de la vitamina D.

Las funciones renales más relevantes son las siguientes:

- Eliminación de metabolitos nitrogenados: urea, creatinina y ácido úrico.

- Regulación del equilibrio ácido-base

- Regulación del equilibrio hidroelectrolítico: volumen, tonicidad, natremia, potasio, calcio, fósforo, magnesio.

- Hormonal: eritropoyetina, 1-25(H<sub>2</sub>)D<sub>3</sub>, eje renina-angiotensina-aldosterona.

La sangre llega al ovillo glomerular y se filtra, resultando un líquido similar al plasma; este filtrado va pasando por las distintas porciones tubulares disminuyendo su volumen y alterando su composición, en virtud de distintos procesos de reabsorción y secreción tubular, hasta formar la orina. El riñón recibe el 20% del gasto cardíaco, aproximadamente 1 litro/minuto, y filtra más de 180 litros de agua y 1 Kg. de ClNa al día de lo cual elimina tan sólo un 1%/24h. (1-2 l orina/día). De todo ello, el túbulo proximal reabsorbe más del 85% del filtrado (WF. Ganong. 1994)

Para la correcta función renal son necesarias:

- Una adecuada perfusión renal
- La adecuada permeabilidad de las vías excretoras
- La integridad del parénquima renal

Así pues, una alteración en cualquiera de estas tres condiciones (hipoperfusión de cualquier etiología, depósitos tubulares, toxinas, etc), pueden provocar una alteración en el filtrado glomerular hasta hacerlo inefectivo. Este inadecuado filtrado glomerular junto a una acumulación de productos nitrogenados, dan lugar a un síndrome clínico que se conoce como fracaso renal agudo (FRA) [2]

### **1.3. PATOLOGÍA RENAL: Fracaso renal agudo de etiología isquémica.**

El 70% de los fracasos renales agudos (FRA) derivan en necrosis tubular aguda (NTA). La NTA es la expresión morfológica común del FRA cuya causa más común es la isquemia, que produce una deprivación del aporte normal de oxígeno y nutrientes a las células epiteliales tubulares. El túbulo proximal y en particular su segmento S3 es la región tubular más sensible a la isquemia [2 y 3].

El grado y la extensión del daño isquémico son dependientes de la duración y severidad de la isquemia: cuando la isquemia es

subletal, se observa mayoritariamente un desprendimiento de células a la luz tubular que aún son viables y fenómenos de apoptosis y necrosis en menor medida; en isquemias prolongadas se observan apoptosis y/o necrosis en el epitelio tubular como daño primario.

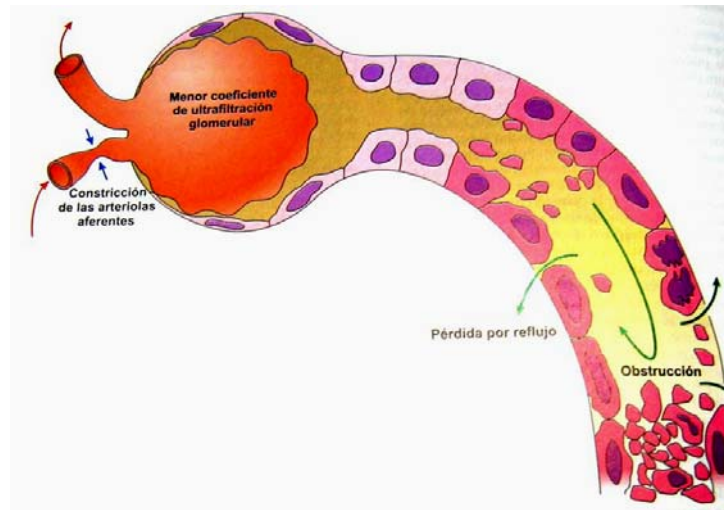


Figura 2. Esquema del proceso de desarrollo de una NTA con obstrucción tubular por causa isquémica. Imagen obtenida del libro Rubin's Pathology, 2004.

Estudios estadísticos indican que el FRA en el medio hospitalario presenta una elevada mortalidad en torno al 50%, que no ha

mejorado a lo largo de varias décadas, en contraste con lo sucedido con otras patologías de etiología isquémica como el infarto agudo de miocardio [6]. En torno al 30% de los casos de FRA se producen en enfermos ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos, donde la mortalidad se eleva al 80% [7].

Hasta el momento no se han diseñado terapias efectivas en el manejo temprano del FRA (diuréticos osmóticos, dopamina "dosis renal", péptido natriurético atrial, factor de crecimiento análogo a la insulina y antagonistas del receptor de endotelina)[2].

En el trasplante renal, la NTA es la causa fundamental del retraso en el funcionamiento del injerto post-trasplante. Además, la NTA contribuye a una mayor incidencia del rechazo agudo, al desarrollo del rechazo crónico y a la disminución de la supervivencia del injerto. Determinar precozmente qué pacientes presentan más factores de riesgo de desarrollar FRA en este contexto y, aumentar y mejorar los cuidados perioperatorios, es lo único que se ha mostrado levemente eficaz para reducir la incidencia y mortalidad del FRA [8].

Por todo ello el desarrollo de aproximaciones terapéuticas capaces de prevenir, acelerar y mejorar la recuperación del FRA, es una necesidad urgente. Además, el conocimiento de factores protectores y promotores de daño renal tendría una gran influencia clínica a la hora de pronosticar la supervivencia del injerto, algo



muy importante hoy en día teniendo en cuenta que la gran demanda de órganos está haciendo que se introduzcan también en los programas de transplante órganos procedentes de pacientes añosos y en asistolia.

## **2. LA CÉLULA EPITELIAL TUBULAR**

Las células que componen el epitelio tubular están asentadas en una membrana basal compuesta por colágeno IV, entre otros componentes de matriz extracelular, y muestran una morfología cúbica sustentada por un complejo y organizado citoesqueleto.

Los tejidos epiteliales como el túbulo renal, no sólo proporcionan una barrera física entre distintos compartimentos biológicos, sino que también median un transporte selectivo de iones, agua y macromoléculas entre la sangre y el medio externo. Estas funciones dependen de la integridad de las uniones intercelulares y la adecuada situación de proteínas de membrana en sus correspondientes dominios apicales y basolaterales, así como de las correctas interacciones entre las células y los sustratos, todo lo cual se ve severamente afectado en situaciones de isquemia-reperfusión. Bajo esta condición, el daño viene mediado fundamentalmente por la depleción de ATP que provoca alteraciones en la membrana celular, alteraciones en polarización

de proteínas apicales y basolaterales, deslocalización y degradación de proteínas de uniones intercelulares, desregulación de la expresión de determinados genes, alteraciones de la adhesión de la célula al sustrato mediada por integrinas, e incluso muerte celular [9].

Estos cambios a nivel molecular en las células epiteliales tubulares proximales, tienen una expresión morfológica: la isquemia subletal provoca una pérdida de vellosidades y formación de vacuolas citoplasmáticas; además, los túbulos pueden hincharse empujando los pequeños vasos adyacentes parenquimatosos y agravando la isquemia. Si esta situación de privación se mantiene, las células se separan de sus vecinas, se desprenden de su membrana basal y caen a la luz tubular, alcanzando el túbulo distal. Este desprendimiento tiene una distribución parcheada, es decir, no se produce una denudación total del epitelio tubular. Allí se mezclan con proteínas urinarias constituyendo auténticos tapones en la luz tubular conocidos como cilindros. Durante la reperfusión las células viables reparan la organización de su citoesqueleto y recuperan sus microvellosidades y su morfología y polaridad; además las células viables que han quedado en el túbulo se extienden por las áreas de membrana basal denudada aplanándose y produciéndose cierta dilatación de la luz tubular (distalización); esta fase de recuperación se acompaña más tarde

de sobreexpresión de determinados genes y sus productos proteicos [10 y 11].

## **2.1. RIBETE EN CEPILLO**

Las microvellosidades apicales aumentan la superficie de absorción de la célula hasta en 20 veces. Están formados por repliegues de membrana citoplasmática, sustentados por filamentos de actina que se insertan en la cara interna de la membrana citosólica por  $\alpha$ -actinina y por el otro extremo se unen al citoesqueleto celular.

## **2.2. UNIONES INTERCELULARES Y A MEMBRANA BASAL**

### **2.2.1. UNIONES INTERCELULARES**

Las uniones célula-célula permiten que las células queden firmemente unidas entre sí, asegurando las propiedades de soporte mecánico y de barrera impermeabilizante que tiene el epitelio, así como de comunicación entre ellas y traspaso de sustancias. Están constituidas por complejos multiproteicos que se ensamblan en los filamentos terminales del citoesqueleto celular. Algunas proteínas como E-cadherina (perteneciente a las uniones adherentes) y la

familia ocludina/cludina (perteneciente a las uniones estrechas), contienen dominios extracelulares que contactan con los mismos de la célula vecina y dominios intracelulares que interactúan con proteínas citoplasmáticas como cateninas ( en el caso de la “zónula adherens”) y “zónula ocludens” (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) y fodrina (en el caso de las uniones estrechas), proporcionando un nexo de unión al citoesqueleto de actina a su vez. Bajo condiciones de deprivación de oxígeno (isquemia-reperfusión o hipoxia-reoxigenación), estas estructuras y sus funciones se ven comprometidos, sucediendo internalización y/o destrucción de estas proteínas, y alterando así las interacciones célula a célula y la impermeabilidad del epitelio. De hecho se ha descrito que durante estadíos intermedios y tempranos de la isquemia, algunos de estos componentes son redistribuidos en la membrana plasmática, internalizados, y se pueden encontrar asociados a los filamentos terminales de actina del citoesqueleto o colapsados, y si la isquemia se prolonga, son degradados [9].

Así, las uniones entre las células epiteliales son estructuras fundamentales en el mantenimiento estructural y el correcto funcionamiento del túbulo proximal. A continuación pasamos a describirlas con más detalle. Se distinguen fundamentalmente cuatro tipos:

**1.- Uniones estrechas o zónula occludens o tight junctions (TJ)**, las situadas en la superficie basolateral y más apical, cuya función fundamental es asegurar la impermeabilidad. Están constituidas por proteínas transmembrana llamadas ocludinas y claudinas, que sirven de lugares de anclaje para el citoesqueleto celular a través de sus interacciones con proteínas citoplasmáticas como zo-1, zo-2 y zo-3, y proteínas de unión a actina como fodrina. En situaciones de privación de oxígeno se internalizan y se acaban degradando. Cuando la situación se restaura, vuelven a unirse para conformar de nuevo los TJ y mantener la estructura del citoesqueleto y morfología celular, mediante síntesis de novo y ensamblaje con componentes citosólicos [12].

**2.- Uniones adherentes o zónula adherens o adherens junctions (AJ)**, constituidas por cadherinas y cateninas. E-cadherina está situada en las AJ pero participa en el ensamblaje de otras uniones intercelulares como gap, desmosomas y TJ. Juega un papel primordial en la polaridad celular [13], y su disfunción también ha sido muy relacionada con carcinogénesis y metástasis [14].

E-cadherina interactúa con las cateninas:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ .

Este complejo E-cadherina /catenina se relaciona con el citoesqueleto de actina celular a través de  $\alpha$ -actinina (Para revisión véase Bracke y col. 2007.[15])

La isquemia no sólo provoca internalización de E-cadherina, sino también una degradación proteolítica en sitios específicos y la disrupción de sus interacciones con cateninas; restablecidos los niveles de oxígeno estas dos proteínas volverían a formar AJ por mecanismos que aún no están muy definidos [6].

**3.- Uniones en hendidura o gap junctions**, constituidas entre otras por conexinas, y encargadas de la comunicación y transporte de sustancias entre células adyacentes.

**4.- Desmosomas**, que son estructuras de morfología similar a botones que se sitúan entre las células y sirven de anclaje para los filamentos intermedios del citoesqueleto [16].

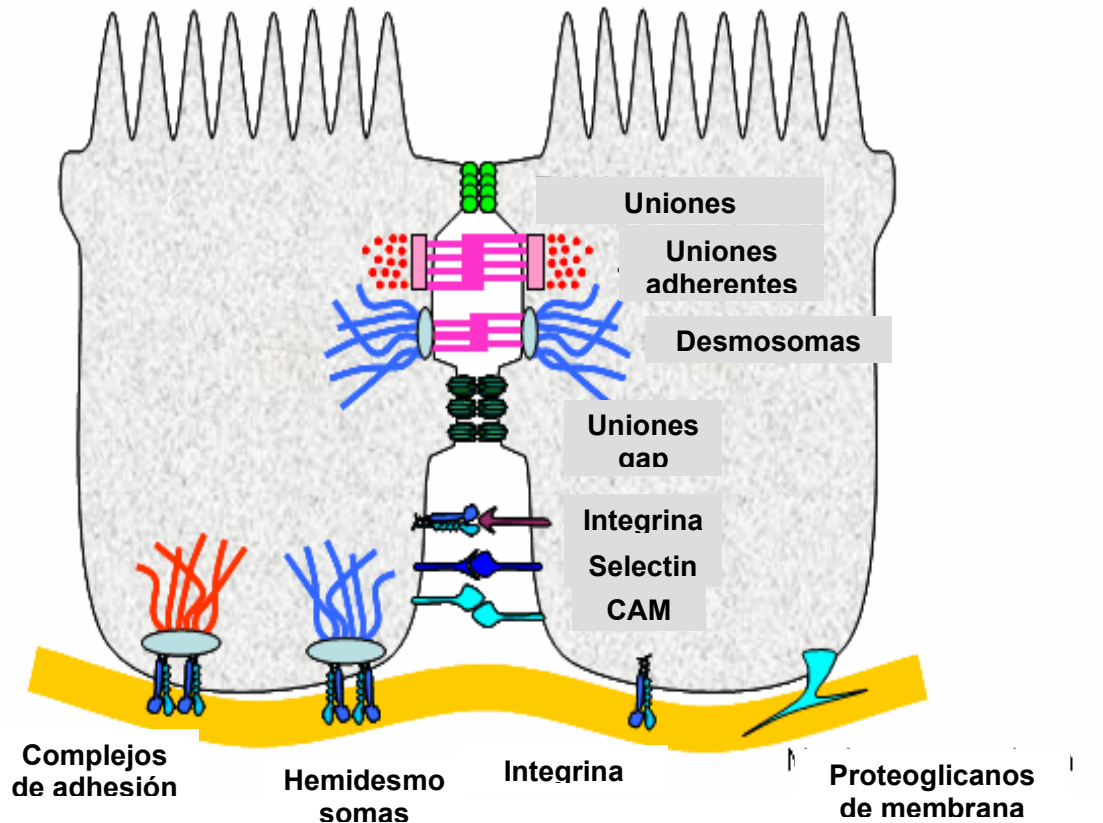


Figura 3. Imagen obtenida de la web: [www.steve.gb.com/science/cell\\_communication](http://www.steve.gb.com/science/cell_communication), que muestra todos los tipos de uniones intercelulares y a su membrana basal.

### 2.2.2. UNIONES A LA MEMBRANA BASAL

Las células se anclan a la membrana basal adyacente a través de complejos multiproteicos llamados **complejos de adhesión focal**, constituidos por proteínas integrales de membrana como las

integrinas, proteínas adaptadoras y señalizadoras como talina, vinculina, paxilina y quinasa de adhesión focal (FAK).

Las integrinas son una gran familia de glicoproteínas transmembrana que en su mayoría son receptores para la matriz extracelular. Son proteínas importantes para la migración y el mantenimiento de la morfología celular, y en situaciones de isquemia-reperfusión se alteran y contribuyen al daño celular y el desprendimiento y podrían mediar también la reparación epitelial. Están situadas en la cara basal de las células epiteliales tubulares renales y tras la isquemia, se redistribuyen hacia las caras laterales de la célula.

Las integrinas interactúan con proteínas intracitosólicas, adaptadoras e integrantes de los complejos de adhesión focal, como talina y vinculina, sobre las que también convergen los filamentos terminales de actina del citoesqueleto. Un correcto ensamblaje de estos complejos es necesario para mantener la morfología celular y asegurar la funcionalidad adhesiva [17].



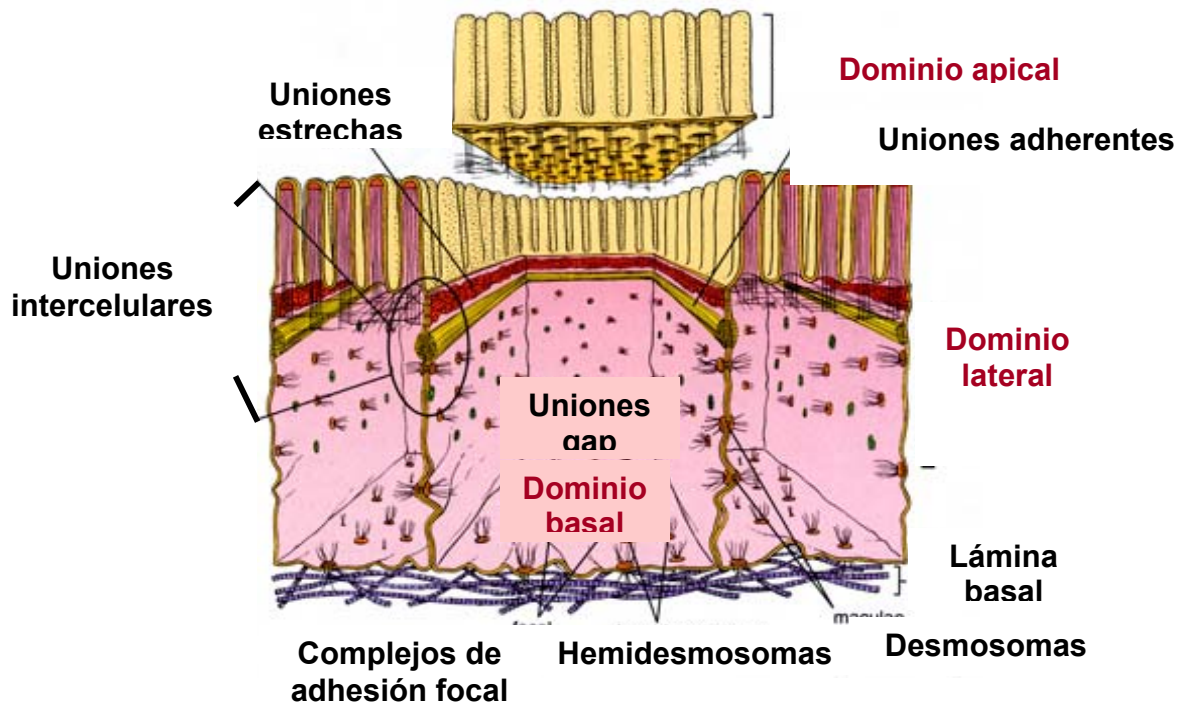


Figura 4. Esta imagen muestra un esquema de los distintos tipos de uniones intercelulares y de las células a la membrana basal, en un modelo de célula epitelial con ribete en cepillo similares a las que recubren el túbulo proximal. Imagen obtenida de la página web: [www.anatomy.iupui.edu](http://www.anatomy.iupui.edu)

### 2.3. CITOESQUELETO

El citoesqueleto de la célula epitelial consiste en una red de varios filamentos que se extienden de la membrana plasmática hasta el núcleo. Además de asegurar la estructura celular, el citoesqueleto juega un papel crucial en el anclaje de las células a sus vecinas y a la matriz extracelular. Está implicado en funciones

como el mantenimiento de la morfología celular, la adhesión celular, el movimiento celular, la apoptosis, la diferenciación o la señalización celulares [18].

Los principales constituyentes del citoesqueleto se pueden agrupar en función de su organización y composición en: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.

Los **microtúbulos** son el componente mayoritario del citoesqueleto. Están constituidos fundamentalmente por tubulina dimérica ( $\alpha\beta$ tubulina) y están implicados en funciones mecánicas de las células como la polaridad, la motilidad y la división celular, entre otras [19]. Los microtúbulos se extienden hasta la punta de las microvellosidades apicales en células epiteliales y también se asocian a desmosomas y uniones adherentes mediante  $\alpha$ -actinina por un lado, y a los complejos de adhesión basales mediante interacción de talina y vinculina con las integrinas, por otro [18].

Los **microfilamentos** son responsables fundamentalmente de la contractilidad celular, aunque al igual que los otros dos componentes de citoesqueleto celular también están implicados en el mantenimiento de la morfología celular. Su constituyente principal es la actina, que interactuando con la miosina hace posible la contracción celular [20]. Para realizar sus funciones la actina

monomérica (G-actina) debe polimerizarse (F-actina) y agruparse en microfilamentos.

Los **filamentos intermedios** constituyen una trama microtrabecular que sustenta las organelas citoplasmáticas, y aunque sus funciones no son aún bien conocidas se sabe que están implicados en desarrollo y diferenciación celulares. Una de sus principales funciones demostradas es la protección de las células frente al estrés mecánico por medio de su asociación con la maquinaria de adhesión celular, a través de los hemidesmosomas y los desmosomas. Están constituidos por vimentina y desmina, entre otros, y su organización está bajo el control de fosfatasas y proteinquinasas [21].

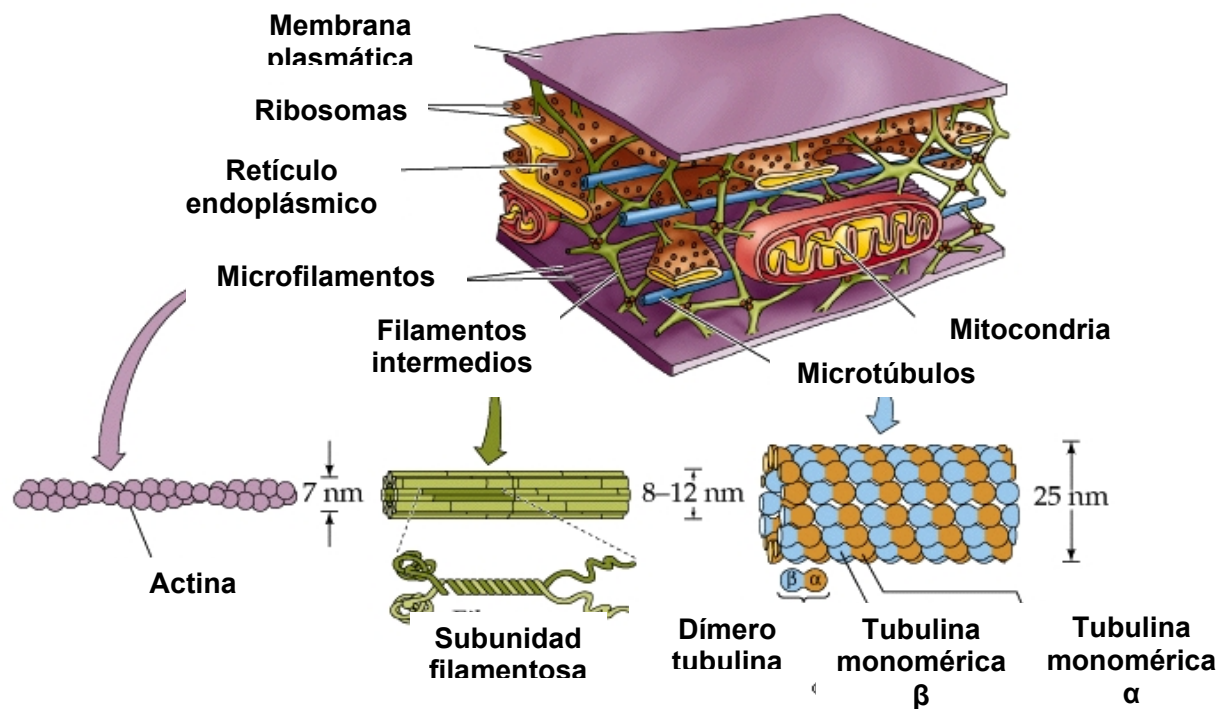


Figura 5. Esquema de la estructura del citoesqueleto celular y su ensamblaje en el interior celular. Imagen obtenida de la web de la Universidad de Medicina de Toronto ([www.mie.toronto.ca](http://www.mie.toronto.ca))

## 2.4. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Durante la respuesta celular a determinados estímulos, endógenos o exógenos, entre los que se incluye la privación de oxígeno y de nutrientes, se producen modificaciones en los niveles de ATP y calcio intracelulares y se altera el balance intracelular de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estas modificaciones implican la activación/desactivación de determinadas proteínas

intracelulares, que a su vez activan o desactivan a otras (efectores), es decir, se disparan cascadas de señalización intracelular. En estas rutas de señalización están implicadas muchas familias de proteínas, con diversas estructuras y funciones, como las quinasas activadas por mitógenos (MAPKinasas), proteínas con actividad GTPasas (RhoGTPasas), los chaperones moleculares (moléculas de choque térmico o HSPs), y otras proteínas con actividad quinasa como la quinasas de adhesión focal (FAK) o la familia de Protein quinasas C (PKCs).

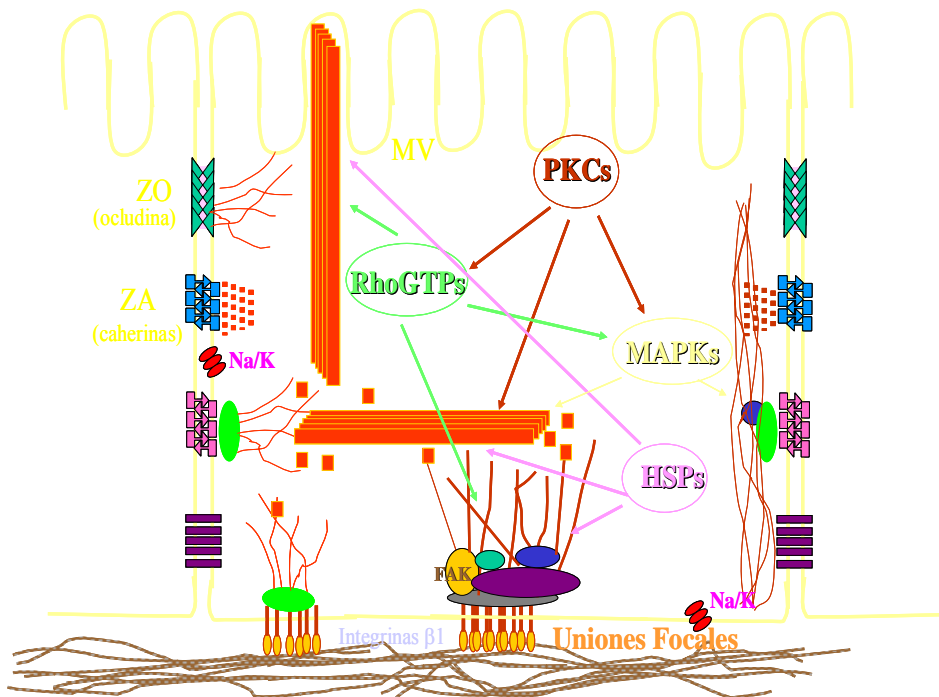


Figura 6. Esquema de algunas de las rutas de señalización intracelular que regulan la estructura y funcionalidad de la célula del epitelio tubular proximal.

### 3. LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN MIMETIZADA *IN VITRO* POR UN SISTEMA DE HIPOXIA/REOXIGENACIÓN

Estudios anteriores de nuestro laboratorio utilizando modelos *in vivo* de isquemia/reperfusión en rata habían caracterizado el daño tubular estudiando parámetros de función renal así como la histopatología [22].

EL modelo habitualmente utilizado en nuestro laboratorio consiste en realizar a la rata laparotomía medial y clampaje bilateral de ambos pedículos vasculares renales durante 45 minutos. Los animales usados son ratas Sprague Dawley machos adultos de hasta 200 grs. de peso.

Sin embargo los modelos experimentales *in vivo* tienen muchas limitaciones a la hora de estudiar alteraciones a nivel celular y molecular. Para salvar estas limitaciones establecimos en el laboratorio un modelo *in vitro* de hipoxia/reoxigenación en células proximales tubulares de rata NRK 52-E que reproduce *in vitro* tanto los estímulos como los efectos de una isquemia/reperfusión observados *in vivo* [23]. Hasta el momento, los modelos *in vitro* utilizados para mimetizar la I/R (a saber: tratamiento con Antimicina A, Cloruro de Cobalto, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Deferroxamina, etc), reproducían o mimetizaban sólo parcialmente la situación de I/R. Nuestro modelo *in vivo* , sin embargo, reproduce de forma más fisiológica la

respuesta de las células tubulares a una privación de oxígeno y nutrientes [24].

La privación de oxígeno y nutrientes *in vivo* produce a nivel celular una serie de alteraciones en el metabolismo y la estructura celulares que comienzan con una importante reducción de los niveles de ATP, generan estrés oxidativo y provocan alteraciones en los niveles intracelulares de calcio. Todo ello a su vez conlleva alteraciones en el citoesqueleto y modificaciones en proteínas de uniones intercelulares y a membrana basal, entre otras [7].

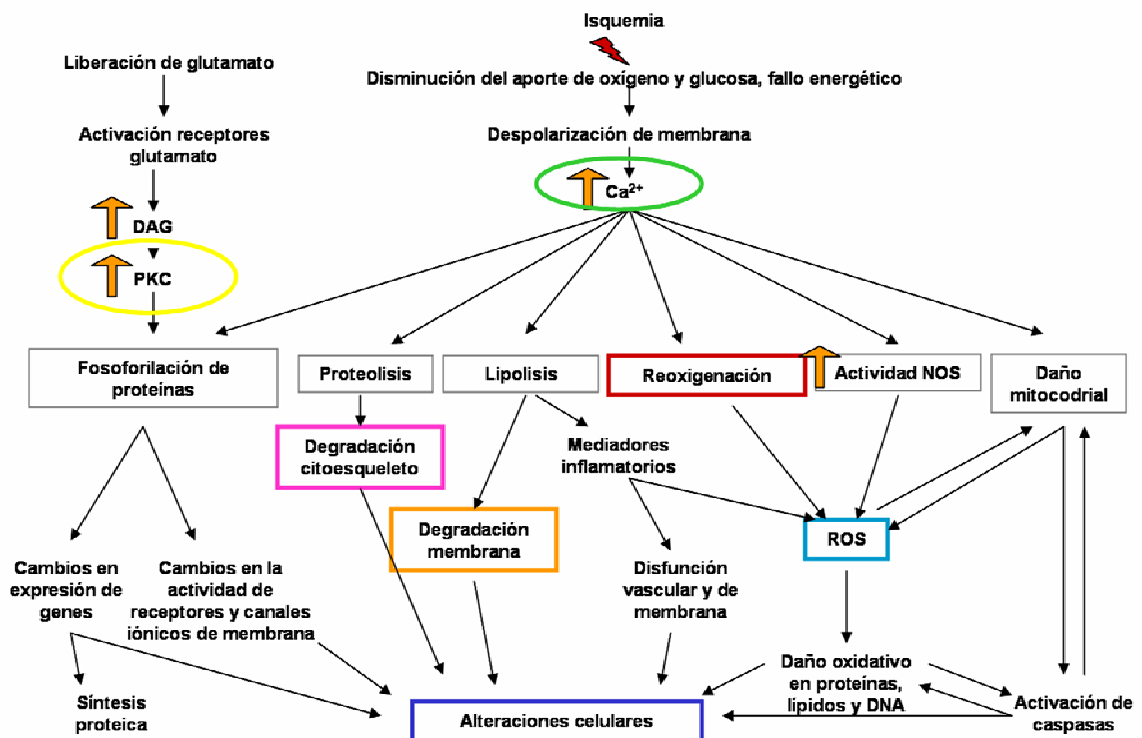


Figura 7. Esquema que muestra los mecanismos de daño celular en situaciones de isquemia. Jackson y col. 2002

### **3.1. ESTRÉS OXIDATIVO.**

Algunos de los eventos celulares y moleculares descritos en modelos *in vivo* de isquemia/reperfusión han sido confirmados en nuestro laboratorio utilizando el modelo de hipoxia/reoxigenación mencionado anteriormente [23].

Durante la hipoxia, por la falta de oxígeno, un gran número de enzimas mitocondriales como la citocromo oxidasa y la manganeso superóxido dismutasa, entre otras, disminuyen su actividad. Estas enzimas son captadoras de aniones por lo que su descenso provoca el aumento intracelular en radicales libres de oxígeno. El exceso de radicales libres de oxígeno provoca daño celular por incrementar la peroxidación de lípidos, entre otros mecanismos. Una fuente adicional de radicales libres de oxígeno (ROS) dentro de la célula, es la actividad de enzimas como la xantina deshidrogenada-oxidasa, la ferrilhemoglobina y la nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. Estas enzimas aumentan su actividad oxidasa durante la isquemia-reperfusión actuando como donadoras de electrones y principales fuentes de producción intracelular de ROS, fundamentalmente  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ .



Los sistemas antioxidantes endógenos pueden ser de dos tipos: de carácter enzimático como la superóxido dismutasa, la manganeso superóxido dismutasa, la peroxidasa y algunas catalasas, entre otras; y no enzimáticos como el glutathione. Todos estos mecanismos de defensa intracelulares frente a la generación de ROS disminuyen en situaciones de isquemia-hipoxia [25].

Estas necesidades antioxidantes se han desarrollado dada la necesidad de los organismos aeróbicos de adaptarse al exceso de ROS en determinadas situaciones. Bajo tensiones normales de oxígeno ( $O_2$ ), éste es reducido a agua ( $H_2O$ ). La cadena de transporte de electrones mitocondrial reduce el 95% del  $O_2$  por uniones tetravalentes a  $H_2O$  sin generar ningún radical libre de oxígeno. A la vez, el 5 % restante de oxígeno se destina a la generación de radicales libres de oxígeno necesarios para el funcionamiento celular. Cuando el oxígeno toma un electrón, se produce el anión superóxido ( $O_2^-$ ), que suele estar equilibrado por la presencia de diversas formas protonadas. Durante la isquemia, la acidosis que se produce favorece la producción de este anión capaz de oxidar los ácidos grasos libres de la membrana celular. Para evitarlo, la célula pone en marcha enzimas como la superóxido dismutasa reduciendo éste a  $H_2O_2$ . Seguidamente, mediante catalasas o por el sistema del glutathione todas estas especies acaban generando  $H_2O$ . La isquemia y la reperfusión alteran esta

homeostasis: con la isquemia las defensas antioxidantes se ven dañadas, se acumula el  $H_2O_2$  y se genera un exceso del radical hidroxilo que es muy destructor [26].

Además, en situaciones de isquemia-reperfusión, los citocromos mitocondriales se reducen y transfieren directamente electrones al oxígeno por medio de la reducción de ubiquinona a ubisemiquinona mediante la ubiquinol citocromo C reductasa [27].

Iones metálicos como el hierro también pueden jugar un papel importante en la generación del radical hidroxilo, de ahí la quelación de los metales durante el estrés oxidativo. Los ROS tienen un papel importante regulando la producción de energía, la activación de quinasas implicadas en la supervivencia celular, la regulación de los canales iónicos, la señalización de la apoptosis, las respuestas inflamatorias o la regulación del tono vascular, entre otros [26].

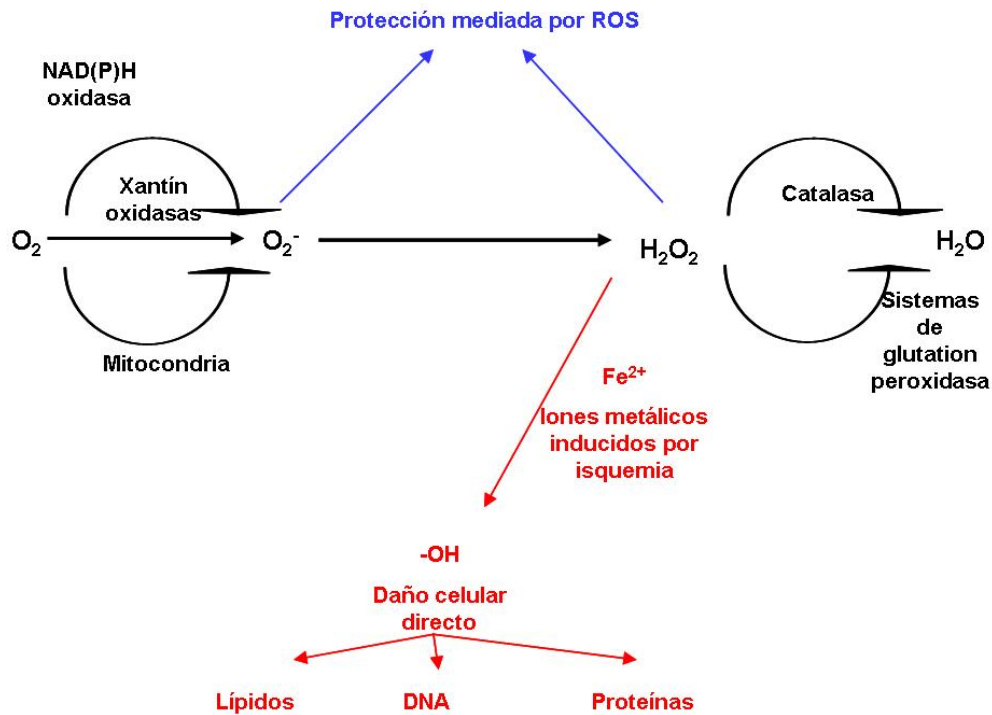


Figura 8. Procesamiento de los ROS; esquema obtenido de Becker. 2004.

### 3.2. NIVELES DE ADENOSÍN TRIFOSFATO (ATP).

El ATP es la molécula encargada de donar energía en todas las funciones celulares que lo requieren. EL ATP es generado en las mitocondrias por fosforilación oxidativa y libera la energía hidrolizándose a ADP cuando es necesario.

En situaciones de privación de oxígeno se altera el metabolismo mitocondrial, disminuye la fosforilación oxidativa y por tanto la producción de ATP, hecho que hemos confirmado en

nuestro laboratorio utilizando el sistema *in vitro* de hipoxia/reoxigenación [23]. Como hemos mencionado anteriormente, la isquemia produce una situación de acidosis con generación de estrés oxidativo y alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial, comprometiéndose así la generación de ATP. El ATP sufre una rápida degradación a ADP y AMP; este AMP es rápidamente metabolizado a nucleótidos de adenina e hipoxantina. Durante la reoxigenación, con el aumento en la tensión de oxígeno y nutrientes, se recuperan los niveles de estos metabolitos precursores de la síntesis de ATP, además de normalizarse el funcionamiento de la mitocondria, lo que finalmente conlleva la restauración de los niveles de ATP [7].

En este sentido, está demostrado que la bajada de ATP durante la isquemia altera la estructura del citoesqueleto y altera las uniones intracelulares [28].

### **3.3. CALCIO INTRACELULAR.**

El calcio en el interior de la célula se encuentra almacenado principalmente en el retículo endoplasmático. Las mitocondrias también son organelas celulares que participan en la homeostasis del calcio intracelular [29]. Por otro lado, el calcio citoplasmático es un importante segundo mensajero, capaz de activar muchas rutas

de señalización intracelular, como las mediadas por proteína quinasa C. Esta señalización regulada por calcio se realiza directamente por unión de este catión a sus dominios de unión en las proteínas o indirectamente a través de proteínas moduladoras como trombomodulina, calmodulina y calpaínas.

La privación de oxígeno produce un aumento del calcio citosólico por movilización a citoplasma del contenido en el retículo e incluso por captación de calcio extracelular. La elevación en la concentración de calcio intracitoplasmático se ha identificado como marcador de daño en la mayoría de las respuestas celulares a insultos agudos, como por ejemplo la isquemia y/o la hipoxia. Así, el aumento de calcio intracitoplasmático es una situación mediadora de muchas patologías de etiología isquémica [30].

En el caso de patologías de origen hipóxico, y más concretamente en la NTA de etiología isquémica, el aumento de calcio intracitoplasmático induce fosforilación de fosfolipasa A2, a través de sus formas calcio-dependientes, se acumulan ácidos grasos libres y se daña la estructura y funcionalidad de la membrana celular [31].

Por otro lado los ácidos grasos libres y sus productos dan lugar a la apertura de poros en la membrana mitocondrial, alterando la función mitocondrial que puede desencadenar muerte celular por apoptosis [27]. Durante la isquemia y los primeros momentos de

reperfusion se produce una situación de acidosis merced al acúmulo de protones de hidrógeno ( $H^+$ ). El aumento de estos  $H^+$  intracelularmente estimula el intercambiador  $Na^+/H^+$  que elimina  $H^+$  de la célula introduciendo  $Na^+$ . Esto implica un aumento de la concentración intracelular de sodio que la célula intenta balancear mediante la activación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , que se localiza tanto en la membrana citoplasmática como en la membrana mitocondrial, y que retira el  $Na^+$  a cambio de internalizar  $Ca^{2+}$ , resultando finalmente en una elevación de la concentración de calcio intracitoplasmático. La elevación del calcio intracitoplasmático va a ser mediador importante en el daño por isquemia/reperfusión a través de la activación de enzimas dependientes de calcio incluyendo proteinaquinasas, fosfatasas y proteasas como la calpaína y endonucleasas, entre otras.

#### **4. FAMILIA PKC**

La Proteína Quinasa C (PKC) es una familia de serina-treonina quinasas clave en los mecanismos de señalización intracelulares. Las 12 isoformas que la componen se agrupan en 3 subfamilias atendiendo a los dominios que contiene su porción reguladora y a los estímulos que las regulan. Las tres subfamilias mencionadas son:

- PKC clásicas que incluyen PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ , que se regulan por calcio y diacilgliceroles (DAG).

- PKC noveles que incluyen PKC  $\delta$  I-III,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ , que unen DAG solamente.

- PKC atípicas como PKC $\zeta$  y  $\lambda$ , que no son reguladas ni por calcio ni por DAG.

#### **4.1. ESTRUCTURA DE PKC**

Todas las isoformas son una cadena polipeptídica que poseen dos dominos estructuralmente bien definidos: regulador y catalítico. El dominio regulador presenta lugares de unión para cofactores lipídicos y calcio y participa en las interacciones proteína-proteína que median la regulación y localización de PKC. El dominio catalítico incluye lugares de unión a ATP y al sustrato. Así mismo, la enzima posee regiones estables bien conservadas en las tres diferentes subfamilias (regiones C1 a C4) y regiones variables (regiones V1 a V5). La región estable C1 está presente en todas las isoformas de PKC y contiene un dominio autoinhibidor o pseudosustrato que mantiene la enzima en forma inactiva en ausencia de cofactores o activadores. Este dominio C es rico en residuos de cisteína implicados en la unión a segundos mensajeros como los diacilgliceroles (DAG) y a otros activadores como los

ésteres de forbol. Cada dominio rico en cisteína puede tener una contribución diferente a la activación de la enzima.

Las isoformas clásicas poseen una region en el dominio C2 para unión a calcio el cual tiene un doble papel en la regulación de la actividad de PKC clásicas, mediando la union a calcio y las interacciones entre proteínas. El dominio catalítico de PKC comprende las regiones C3 y C4: en la región C3 está el lugar de unión a ATP y en la región C4 se encuentra el lugar de unión al sustrato de PKC, lugar ocupado por el pseudosustrato cuando PKC está en forma inactiva (Para revision véase Kazanietz y col.1999 [32]).

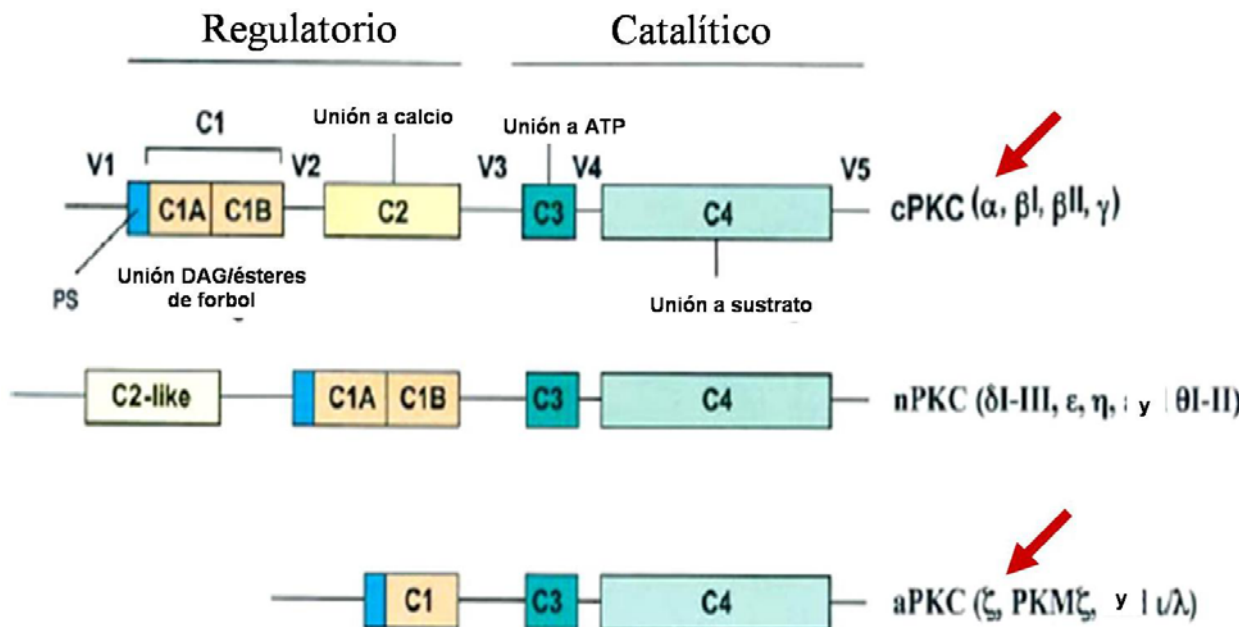




Figura 9. Esquema que muestra la estructura y los dominios reguladores y catalíticos de las distintas subfamilias de proteína quinasa C (PKC) obtenido de Kazanietz y col. 1999.

## **4.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PKC**

La expresión de las distintas familias de PKC, y dentro de ellas, de las distintas isoformas, varía mucho de un tejido a otro, de una línea celular a otra. Por otro lado, una misma isoforma en líneas celulares distintas puede mostrar funciones y rutas de activación diferentes. En el riñón, PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  (isoformas clásica y atípica respectivamente), tienen una marcada expresión [33].

La activación de todas las isoformas conlleva su traslocación a distintos compartimentos subcelulares, siendo la membrana plasmática uno de sus lugares más comunes de traslocación.

Basado en la regulación de PKC en muchos sistemas se ha diseñado un modelo de activación de las formas clásicas y noveles de PKC por lípidos a través de la unión a diacilglicerol (DAG) (producto de la activación de fosfolipasa C tras un estímulo externo tal y como se muestra a continuación) o por unión directa a ésteres de forbol en presencia de un cofactor fosfolipídico. Otros lípidos pueden estimular la activación de PKC como por ejemplo los ácidos

grasos libres y los derivados de la fosfatidilcolina de cadena corta y los fosfatidilinositoles. El requerimiento de diferentes lípidos para diferentes isoformas de PKC también constituye un potencial mecanismo de control de funciones específicas de cada isoforma en cada tipo celular.

Otro cofactor regulador de PKC es el calcio que como hemos visto posee su propio lugar de unión en los dominios de PKC y que regula la activación de las formas clásicas. Como hemos mencionado, los niveles intracitoplasmáticos de  $Ca^{2+}$  se ven alterados y elevados durante los procesos de isquemia-reperfusión (Para revisión véase Kazanietz y col.1999 [32]).

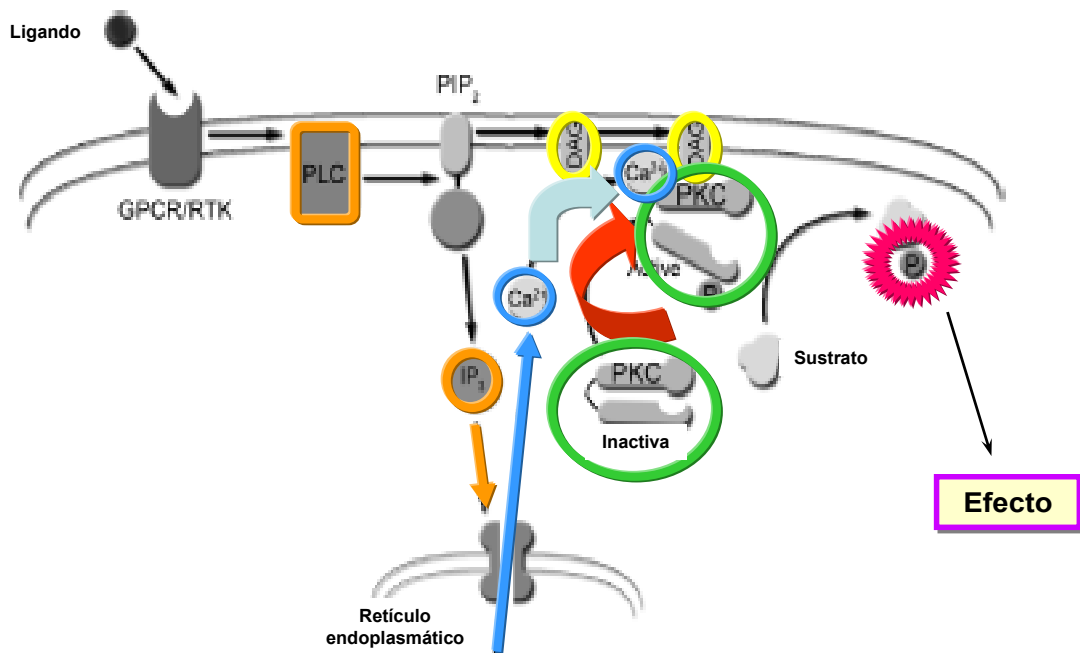


Figura 10. Esquema del mecanismo de activación y acción general de las PKC clásicas y noveles, obtenido de Koivunen y col. 2005.

PKC también puede activarse mediante fosforilación por otras proteínas intermediarias en sus residuos de serina-treonina y de tirosina. La fosforilación de PKC en los residuos de tirosina se ha descrito que puede estar mediada por exceso de radicales libres, en concreto  $H_2O_2$  [32].

Como ya hemos mencionado, la hipoxia implica producción de ROS mitocondriales en el sitio de la ubisemiquinona. Así el  $H_2O_2$  podría actuar como modulador de la fosforilación de los residuos serina-treonina y tirosina en proteínas como PKC, más concretamente esta regulación por  $H_2O_2$  se ha descrito para las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , resultando en su activación de forma independiente a la vía de activación por fosfolipasa C [35].

#### **4.3. PKC EN LA ISQUEMIA RENAL**

Una vez activada por estos diversos mecanismos, las distintas isoformas de PKC sufren un cambio conformacional en su estructura con desligamiento del pseudosustrato inhibitor del dominio catalítico que permite la activación de la enzima.

La familia PKC es un componente crítico en las rutas de señalización intracelular que regulan numerosos eventos y funciones celulares como la homeostasis, la migración, la proliferación, la apoptosis, la remodelación del citoesqueleto, la regulación de los canales de iones, la diferenciación celular y la liberación de hormonas y neurotransmisores [33 y 36].

Algunas isoformas de PKC pueden interactuar físicamente con proteínas del citoesqueleto tales como tubulina o F-actina, y esta asociación parece ser selectiva para cada isoenzima. PKC también puede producir modificaciones en la fosforilación de proteínas asociadas al citoesqueleto tales como la proteína Tau, directa o indirectamente a través de MAPKs, como ERK1/2 [32].

Se ha descrito recientemente que la isoforma PKC $\alpha$  además de promover proliferación, puede estar implicada en la organización de uniones intercelulares [37].

PKC $\zeta$ , cuya función está menos estudiada, ha sido correlacionada con alteraciones en uniones intercelulares y reorganizaciones de citoesqueleto tras daño oxidativo [38].

Sin embargo la contribución de ambas isoformas a la respuesta del epitelio proximal tubular renal a la isquemia no ha sido aún determinada y en ocasiones ofrece resultados opuestos para una misma isoforma de PKC. Así por ejemplo, mientras unos autores demuestran la implicación de las isoformas clásicas de PKC durante

el ensamblaje correcto de las TJ en situaciones de aumento intracitosólico de calcio [37], otros las implican en rotura de uniones intercelulares en similares condiciones [39]. De igual modo algunos trabajos relacionan a PKC  $\zeta$  como molécula clave para el correcto ensamblaje de las TJ [40], y otros aseguran que juega un papel fundamental en el desensamblaje de las mismas [41]. La bibliografía sí coincide en que bajo condiciones de isquemia/reperfusión, distintas isoformas de PKC sufren traslocación de citoplasma a membrana plasmática en distintos tiempos de reoxigenación lo que se relaciona con daño epitelial tras la isquemia [36]. Otros autores han demostrado las traslocaciones de PKC tras isquemia/reperfusión a membrana nuclear relacionando este hecho con un posible papel de PKC mediando reparación epitelial y control de la proliferación celular tras el daño isquémico [42 y 43].

## **OBJETIVOS**

Como objetivo general de este trabajo se plantea estudiar el papel de dos isoformas de PKC, PKC $\alpha$  (clásica) y PKC $\zeta$  (atípica), en los mecanismos que median el daño tubular por isquemia-reperfusión, utilizando un modelo *in vitro* de hipoxia-reoxigenación que mimetiza los estímulos y efectos observados *in vivo*.

Como objetivos parciales, se plantean los siguientes:

1. Determinar la actividad de PKC $\alpha$  durante hipoxia-reoxigenación y los mecanismos que regulan dicha actividad. Estudiar los efectos de la actividad de PKC $\alpha$  en términos de alteración en la integridad de la barrera epitelial, utilizando inhibidores específicos.

2. Determinar la actividad de PKC $\zeta$  durante hipoxia-reoxigenación y los mecanismos que regulan dicha actividad. Estudiar los efectos de PKC $\zeta$  en la morfología y funcionalidad de la célula proximal tubular, utilizando inhibidores específicos.

3. Determinar la expresión y localización de ambas isoformas de PKC en muestras de biopsias humanas con necrosis tubular aguda y su correlación con el daño tubular.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS

Para todo este trabajo se ha utilizado una línea celular de epitelio tubular proximal renal humano llamada HK2, cultivada en medio DMEM-F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina y un 1% de insulina-transferrina-selenio. Las células se mantienen en un incubador regular para cultivo celular a una temperatura de 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Los tratamientos a los que fueron sometidas las células fueron los siguientes

- Tratamiento pro-oxidante: añadiendo al medio de cultivo peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración final de 1mM durante 30 minutos (Merck 8597).

- Tratamiento antioxidante: se ha usado Butil-hidroxianisol (BHA) a una concentración final de 200µM (Sigma: 20021).

- Tratamiento activador de calcio: Ionomicina, a una concentración final de 1µg/ml durante 30 minutos (Sigma: I3909).

- Tratamiento activador de PKC: Esteres de forbol (PMA: Phorbol -12 miristato-13-acetato) a una concentración final de 1µM durante 1 hora. (Sigma. P1585).

- Tratamiento con inhibidores: Inhibidor de PKC $\alpha$ , Gö 6976 (Calbiochem. 365250), a una concentración final de 1 $\mu$ M; inhibidor de PKC $\zeta$ , pseudo sustrato miristoilado (Myr-Ser-Ile-Tyr-Arg-Arg-Gly-Alc-Arg-Arg-Trp-Arg-Lys-Leu-OH. Biosource. 77-748), a una concentración final de 20 $\mu$ M; inhibidor de la fosforilación de ERK1/2, UO126 (Cell Signaling. #9903), una concentración final de 10 $\mu$ M.

## **2. MODELOS EXPERIMENTALES:**

### **2.1. MODELO *IN VITRO*: HIPOXIA / REOXIGENACIÓN**

Las células HK-2 son cultivadas en las condiciones estándares arriba mencionadas en medio completo e incubador regular.

Para semejar condiciones de isquemia/reperfusión *in vitro* las células HK-2 se plantan sobre matriz de colágeno IV (a una concentración final de 5 $\mu$ g/ml, componente mayoritario de la membrana basal. El colágeno IV se polimeriza en tampón carbonato a pH 9,6 durante una hora en el incubador regular, lavando posteriormente la superficie varias veces con PBS 1X y sembrando luego las células sobre la matriz de colágeno IV, en medio completo hasta alcanzar confluencia. Nuestro sistema de hipoxia/reoxigenación se realiza siguiendo el siguiente protocolo: 24

horas antes de someter las HK-2 a la hipoxia éstas se ponen en medio sin suero. Para mimetizar el periodo de isquemia, las células se someten a 6 horas de hipoxia en ausencia de nutrientes (HBSS suplementado sólo con antibióticos), en una cámara húmeda perfundida con una atmósfera de 94% de N<sub>2</sub>, 1% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, y a una temperatura de 37°C. Pasadas las 6 horas de hipoxia, comienza el período que mimetiza la reperfusión, se sustituye el medio hipóxico por medio completo y se reoxigenan las células en el incubador regular con 21% de oxígeno y a 37°C [23]. A continuación se muestra un esquema del protocolo de hipoxia/reoxigenación que acabamos de describir. Por simplificación, lo hemos denominado modelo de hipoxia/reoxigenación, pero es importante insistir en que este modelo tiene en cuenta tanto cambios en tensión de oxígeno como cambios en disponibilidad de nutrientes, tal y como sucede en la isquemia/reperfusión.

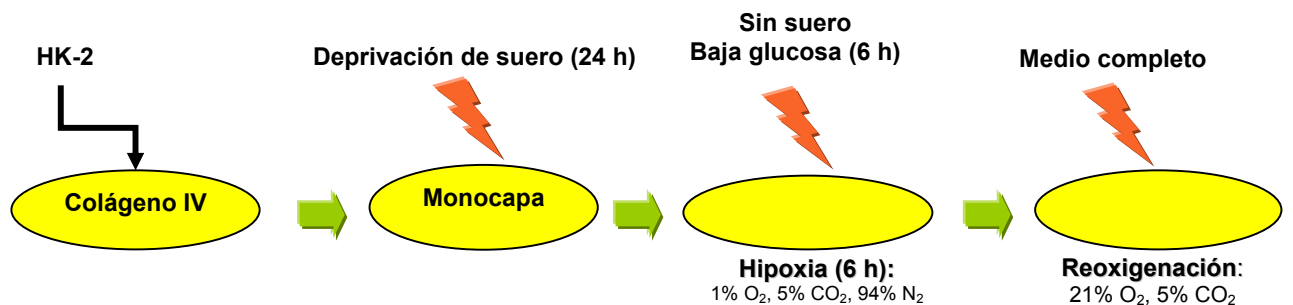


Figura 11: Esquema del protocolo de hipoxia/reoxigenación en células HK-2 utilizado en este trabajo.

En este protocolo se consideran células control (CC) aquellas que han sufrido cambios de medio pero no cambios en la tensión de oxígeno: CC (6h)=control de falta de nutrientes; CC (24h)=control de falta de nutrientes y posterior reposición de los mismos. En este protocolo se toman muestras tras la hipoxia y a distintos tiempos de reoxigenación para distintas determinaciones que se detallan a continuación.

## **2.2. BIOPSIAS RENALES HUMANAS**

Para comprobar la expresión de las distintas proteínas estudiadas a lo largo de este trabajo en casos reales, se ha realizado estudio inmunohistoquímico en diversas biopsias de riñones humanos que mostraban cambios morfológicos atribuibles a falta de riego sanguíneo en los túbulos proximales, cedidas por los servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales Universitarios Ramón y Cajal de Madrid y Virgen del Rocío de Sevilla. Se estudiaron un total de 17 muestras de tejido, de las cuales 2 casos eran necropsias, 12 correspondían a órganos transplantados que desarrollaron necrosis tubular aguda, 1 caso era un riñón previo a injertar proveniente de un donante en asistolia, y 2 casos

correspondían a órganos que desarrollaron necrosis tubular aguda sin relación con un proceso de trasplante o fracaso multiorgánico.

### **3. ESTUDIOS DE PERDIDA DE INTEGRIDAD DE MONOCAPA POR COLORIMETRIA**

Las células HK2 fueron plantadas en “transwells” (insertos para placas con diámetro de poro de  $0.4\mu\text{m}$ ), sobre una matriz de colágeno IV durante 24 horas hasta alcanzar confluencia, en medio DMEM-F12 completo. Posteriormente fueron sometidas a H/R, según el protocolo detallado anteriormente. Se añadió  $1\mu\text{l}$  de colorante no vital azul de tripano a la monocapa y se incubó 30 minutos en cada condición. Posteriormente se recogió el medio del compartimento inferior que no contenía rojo fenol para no interferir en la medida colorimétrica, y se estimó la absorbancia del mismo por colorimetría a  $595\text{ nm.}$ , en un lector de ELISA [23].

Las medidas obtenidas son directamente proporcionales a la cantidad de colorante que había permeado a través de la monocapa e inversamente proporcional a la integridad de la monocapa.

#### **4. ESTUDIO DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y MODIFICACIONES EN LOS NIVELES INTRACELULARES DE CALCIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 60 mm y sometidas a H/R según el protocolo anteriormente detallado. Se incubaron las distintas condiciones durante la hipoxia con sondas fluorescentes, H2DCFDA (Molecular Probes. D399), para medición de producción de ROS (más concretamente peróxidos) [23], y Fluo4AM (Molecular Probes. F14201), para estimar los niveles de calcio [44] intracelulares. Tras dicha incubación las células fueron tripsinizadas, centrifugadas 5 minutos a 1500 rpm y lavadas con PBS 1x, resuspendidas en 200 µl de PBS 1x y estimada la fluorescencia mediante citometria de flujo.

#### **5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS MEDIANTE INMUNOBLOT**

Tras someter las células a H/R se retira el medio de cada condición, se lavan las células dos veces con PBS 1x frío y se congelan a -80°C. Posteriormente se realiza un lisado celular en 500µl de tampón de lisis que contiene TrisClH 50mM a pH7,5, NaCl

150mM, 1% Tritón X100 X-100, 0,5% de deoxycolato sódico, 10% glicerol, suplementado con inhibidores de proteasas [1 mM de leupeptina, 1 mM de aprotinina, 1,3mM de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoruro (AEBSF)] e inhibidores de fosfatasas: 250 mM de fluoruro sódico y 200mM de ortovanadato sódico. Las muestras se incuban durante 20 minutos a 4°C y en agitación, se sonicán 5 minutos y se centrifugan a 8.000g (15.000 rpm) durante 5 minutos, y los sobrenadantes recogidos se guardan a -80 °C hasta su utilización. La cantidad de proteína en cada muestra se cuantifica mediante el método de Bradford. Para el inmunoblot, tras esta cuantificación, se preparan todas las muestras conteniendo la misma cantidad total de proteína (20-40 µg.), añadiendo a la muestra 1% de β-mercaptoetanol, 1% de azul de bromofenol y tampón de lisis hasta igualar volúmenes, se hierven las muestras 5 minutos y se les da un pulso en la centrifuga antes de cargarlas en el gel.

La separación electroforética se realiza en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad) al 10% para el estudio de las distintas isoformas de PKC estudiadas y al 8% para el resto de las proteínas estudiadas, y en tampón de corrida conteniendo TrisGlicina 1X a pH 8.6 y un 0.1% de SDS 10%. Posteriormente la proteínas son transferidas a una membrana de polivinilideno fluorilo (PVDF), utilizando un tampón de transferencia

que contiene de TrisGlicina 1X a pH 8.6, 20% de metanol y 0.02% de SDS.

Las membranas se bloquean con TBS y leche desnatada en polvo al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, son lavadas tres veces de 5 minutos cada una con TBS 1X con un 0,05% de tween 20 (TTBS), y posteriormente se incuban con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios. Las incubaciones con los Ac primarios se realizaron toda la noche en cámara fría (a 4°C) y las incubaciones con los secundarios, durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos fueron preparados en TTBS con un 1% de BSA, los primarios a la concentración indicada en cada caso y los secundarios a una concentración de 1:5000. (Ver tabla de anticuerpos al final de Material y Métodos)

Tras las incubaciones, se lavan las membranas de nuevo tres veces de 5 minutos cada una con TTBS 1X, y se revelan mediante método de quimioluminiscencia utilizando ECL (“Enhanced chemoluminescence method”; Amersham Biosciences). Las membranas se exponen en cámara oscura a películas radiográficas (AGFA, Curi X RP2 Plus Ref. ENKMV) que se revelan en reveladores automáticos.



## 6. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Para estudiar la distribución de las isoformas PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  en compartimentos subcelulares (membranas y citoplasma, fracción insoluble y soluble respectivamente), se lisaron las células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación en hielo añadiendo a cada placa de 100mm 2 ml de tampón de lisis, compuesto por 20mM de Tris HCl, 10mM de HEPES pH 7.5, 0.25M de sacarosa (sucrose), 5mM ácido etilen-diaminotetracético (EDTA), 10mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 4mM de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluoruro (AEBSF), 1mM de leupeptina y 1mM de aprotinina. Tras la lisis, se sonicaron las muestras durante 5 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 8.000g (15.000 rpm) para separar el material nuclear del resto.

Del sobrenadante obtenido se recogieron 200 $\mu$ l que fueron ultracentrifugados durante 30 minutos a 150.000g (75.000 rpm). El sobrenadante así obtenido corresponde a la fracción soluble o citoplasmática.

El precipitado se resuspendió en 200 $\mu$ l de tampón Laemli (TrisHCl 62,5mM pH6,8,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y sds 10%), siendo ésta la fracción particulada o insoluble de la célula [45].

Las fracciones así obtenidas se someten a electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-acrilamida e inmunoblot para PKC $\alpha$

y PKC $\zeta$ , cargándose 20  $\mu$ g de proteínas correspondientes a la fracción citosólica y 40  $\mu$ g de proteínas correspondientes a la fracción particulada en tampón Laemli y separadas en geles de acrilamida al 10%.

## **7. ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEINAS MEDIANTE INMUNOFUORESCENCIA.**

Las células son sembradas en cubres de cristal (AFORA) sobre una matriz de colágeno IV hasta llegar a confluencia. Posteriormente se someten al protocolo de H/R descrito y, tras lavar los cubres con PBS, se fijaban las distintas condiciones, en formaldehído al 3,7 % en PBS 1X, 20 minutos a temperatura ambiente. Tras retirar el formaldehído se añade PBS 1X y se guardan las muestras a 4°C en PBS 1x hasta su utilización.

Para realizar la IF se permeabilizan los cubres con Tritón X100 0,5% en PBS 1X, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan varias veces con PBS 1X y se bloquean con BSA 1% en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se retira el bloqueo y se realiza la incubación con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura.

Posteriormente se lavan los cubres tres veces de cinco minutos cada una con PBS/Tween 20 al 0,05% y se realiza la incubación con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscura.

Los anticuerpos primarios y secundarios para IF se diluyeron en PBS con 1% BSA en una dilución 1:100.

Finalmente, se lavan de nuevo tres veces de cinco minutos cada una con PBS/Tween al 0,05% y se montan los cubres sobre portas utilizando 10µl de Mowiol (Mw 4-88 Reagent. Calbiochem. 475904), conteniendo 2.5mgr/ml de DAPI (Sigma. D9564), por cubre [23].

Las muestras así procesadas son analizadas mediante microscopio de fluorescencia convencional y/o microscopía confocal (Leica TCS-SP2-AOBS-UV y Nikon Eclipse TE 200-U), con los programas Scion Image, Leica lite y NSBR.

## **8. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEINAS EN TEJIDO PARAFINADO HUMANO: HEMATOXILINA-EOSINA, ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF E INMUNOHISTOQUÍMICA**

El material procedente de humanos se fijo en formol tamponado al 10%. Posteriormente las muestras fueron procesadas por el

procedimiento habitual de deshidratación (Procesador Tissue-Tek VIP) e incluidas en bloques de parafina (Parafinador Myr EC350-1), cortadas en microtomo a 4  $\mu\text{m}$  y teñidas de forma habitual con hematoxilina-eosina (HE) (DAKO. AR157) y ácido periódico de Schiff (PAS) (DAKO. AR165).

En el caso de las muestras para inmunohistoquímica, tras cortarlas y desparafinarlas, se sometieron a desenmascaramiento antigénico mediante su inclusión en olla a presión en tampón citrato (0,01 M, pH 6.0) y EDTA (0,001M, pH 8) [46].

La inmunohistoquímica se realizó según el siguiente protocolo: el tejido desparafinado y desenmascarado antigénicamente fue sometido al bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución específica (Peroxidasa blocking solution: tampón fosfato conteniendo peróxido de hidrógeno, 15mmol/l de  $\text{NaN}_3$  y detergente. Dako. S2023), incubando los portas de tejido 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavan los portas tres veces de cinco minutos con PBS-tween, y se bloquea el tejido durante 30 minutos a temperatura ambiente con PBS/BSA 1%. Tras el bloqueo, se incuba con el anticuerpo primario, a una concentración de 1:100, una hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda; luego se lava de nuevo tres veces de cinco minutos cada una con PBS/Tween al 0,05% y se incuban con el anticuerpo secundario, a una concentración de 1:100, una hora a

temperatura ambiente y en cámara húmeda; se vuelven a lavar tres veces de cinco minutos cada una con PBS/Tween al 0,05%, y se revela con kit de revelado de IHQ que contiene: DAB/tampón sustrato (solución tampón Imidazol-HCl a pH 7,5) y DAB/cromógeno (3,3'-diaminobenzidina) (DAKO. K3468). Cuando el tejido empieza a tomar coloración oscura, se para inmediatamente la reacción con agua, y se contrasta tiñendo el tejido con hematoxilina. Finalmente se montan los portas con un cubre utilizando DEPEX (no acuoso) (DPH, 361254D) [47]. Se observan al microscopio óptico (Olympus BX50) y se adquieren imágenes con una cámara digital (Olympus C-7070 wide zoom).

## **9. TINCIÓN CON FALOIDINA EN MUESTRAS HUMANAS PROCESADAS EN CONGELACIÓN**

Las muestras recibidas se incluyeron en medio de preservación OCT Tissue-Tek (Miles Inc.) y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizaron cortes en criostato (Microm HM550) y se dejaron secar sobre el porta durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Una vez secadas se fijan las preparaciones en solución 1:1 v/v conteniendo alcohol etílico/éter dietílico durante 10 minutos a -20°C. Tras la fijación se lavan las preparaciones tres veces con

PBS y se permeabiliza el tejido con Tritón X100x100 0,5% en PBS 1X.

Una vez permeabilizado se incuban los cortes de tejido con Faloidina-Alexa 568 en PBS con 1% BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después se lavan los cubres con PBS 1X frío y se montan en un cubre con Mowiol.

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico ha sido realizado mediante T de Student, considerando significativa una  $p \leq 0.05$ .

## Tabla de Anticuerpos utilizados

ANTICUERPO	ESPECIE	REFERENCIA	DILUCIÓN
Anti-Actina	Cabra	Santa Cruz. Sc-1616	IB 1:1000
Anti-PKC alpha	Rata	Santa Cruz. Sc-208	IB 1:1000; IF 1:100; IHQ 1:100
Anti-PKC zeta	Rata	Santa Cruz. Sc-216	IB 1:1000; IF 1:100; IHQ 1:100
Anti-beta-Tubulina	Ratón	Sigma. T5293	IF 1:100
Anti-Vimentina	Ratón	Sigma. V5528	IF 1:100
Anti-Vimentina	Ratón	Amersham Pharma.	IF 1:100
Anti-ZO-1	Ratón	Zymed Lab. 33-9100	IB 1:1000; IF 1:100; IHQ 1:100
Anti-ZO-1	Rata	Zymed Lab. 61-7300	IB 1:1000; IF 1:100; IHQ 1:100
Anti-p-ERK1/2	Ratón	Calbiochem. 442706	IB 1:1000; IF 1:100
Anti-ERK1/2 total	Rata	Cell Signaling . #9102	IB 1:1000; IF 1:100
Anti-E-Cadherina	Ratón	BD Biosciences. C20820-050	IB 1:1000; IF 1:100; IHQ 1:100
Anti-β-Catenina	Cabra	RD Systems. AF1329	IB 1:1000; IF 1:100; IHQ 1:100
Anti-ratón peroxidasa	Rata	Jackson Inmuno Research. 315-035-003	IB 1:5000; IHQ 1:100
Anti-cabra peroxidasa	Rata	Jackson Inmuno Research. 305-035-045	IB 1:5000; IHQ 1:100
Anti-rata peroxidasa	Cabra	Jackson Inmuno Research. 111-035-003	IB 1:5000; IHQ 1:100
Alexa Fluor 594 anti-ratón	Burro	Molecular Probes. A21203	IF 1:200
Alexa Fluor 488 anti-rata	Cabra	Molecular Probes. A11034	IF 1:200

## **RESULTADOS**



## **1. EL PROTOCOLO DE HIPOXIA/REOXIGENACIÓN (H/R) INDUCE PÉRDIDA DE ADHESIÓN DE CÉLULAS HK-2 SIN INDUCIR MUERTE CELULAR**

Determinamos si en nuestro modelo de hipoxia/reoxigenación en células HK-2 descrito en Material y Métodos, se producía desprendimiento celular y/o muerte celular.

Para ello, recogimos los sobrenadantes de una cinética de hipoxia/reoxigenación, incluidos los controles, y realizamos, por un lado un conteo de células presentes en los sobrenadantes en cada tiempo, y por otro lado, teñimos las células desprendidas con DAPI para determinar mediante fluorescencia si éstas exhibían signos de apoptosis.

Como se muestra en la figura 12, las células epiteliales no se desprenden en cantidad significativa durante la hipoxia pero si se registra un desprendimiento significativo a las 24 horas de reoxigenación. A dichas 24 horas de reoxigenación no se observa muerte celular de forma significativa, dado que la tinción con DAPI no reveló la presencia de células con fragmentación de cromatina.

Estos resultados indican que nuestro protocolo de hipoxia/reoxigenación no induce primariamente muerte celular sino pérdida de adhesión, como sucede en las isquemias subletales *in vivo* (ver figura 12).

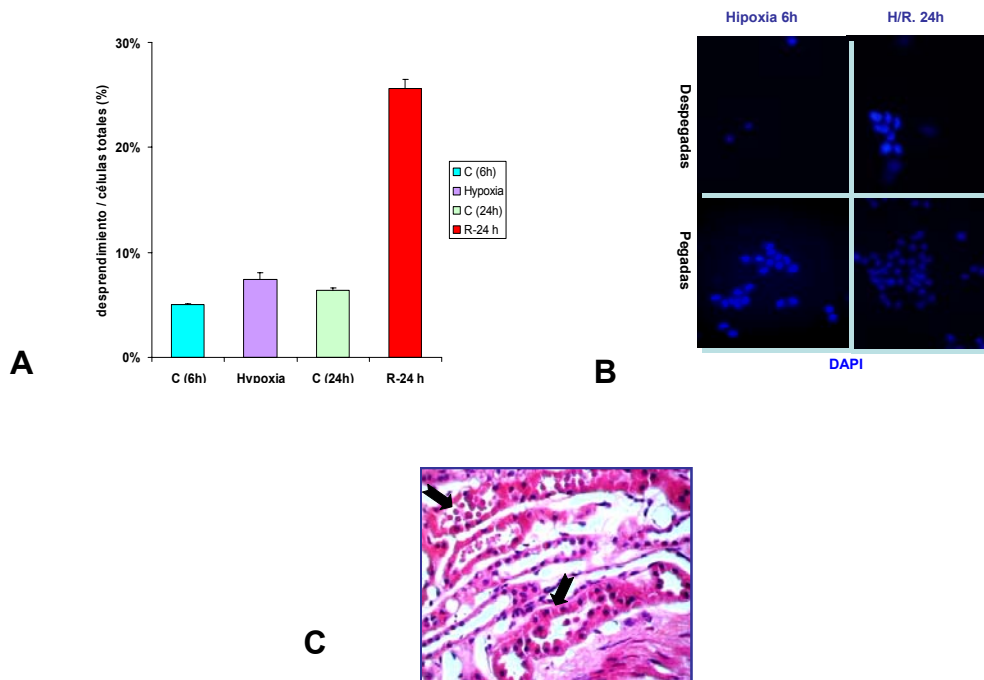


FIGURA 12. A. Porcentaje de células desprendidas estimado por conteo celular. El porcentaje de células desprendidas es significativo a las 24 horas de reoxigenación. B. La tinción con DAPI muestra el aspecto de la cromatina en las células desprendidas, demostrando la ausencia de células en apoptosis. C. Túbulos proximales renales teñidos con hematoxilina-eosina tras un periodo de isquemia subletal donde se observa que, si bien en algunos de ellos existen células desprendidas a la luz tubular que han iniciado un proceso de muerte celular como demuestra su tinción intensamente eosinófila, la mayoría de los túbulos presentan un epitelio viable, aunque con modificaciones morfológicas en las células: se observa rotura de uniones intercelulares y protusión citoplasmática hacia la luz tubular (Magnificación x200).

## **2. EXPRESIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE PKC EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN.**

Mediante inmunoblot determinamos cuáles de las doce isoformas de la familia Proteína Kinasa C (PKC) eran expresadas en las células epiteliales tubulares renales HK-2, usando una amplia batería de anticuerpos específicos. Los anticuerpos reconocen isoformas de las tres subfamilias: PKC $\alpha$  para la subfamilia de PKC clásicas; PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  y PKC $\delta$ , para la subfamilia de PKCs noveles; y PKC $\zeta$  para la subfamilia de PKC atípicas.

La figura 13 muestra los resultados de estos inmunoblot, indicando que todas las isoformas de PKC estudiadas son expresadas en células HK-2 y su expresión no varía durante hipoxia/reoxigenación. Estos resultados también demuestran que la expresión de PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  es mayor que la del resto de isoformas estudiadas.

Basándonos en la bibliografía que sugiere implicación de PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  como mediadores de la adhesión de células epiteliales a sustrato, y en estos resultados, elegimos PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  como isoformas de PKC a seguir estudiando en este trabajo.

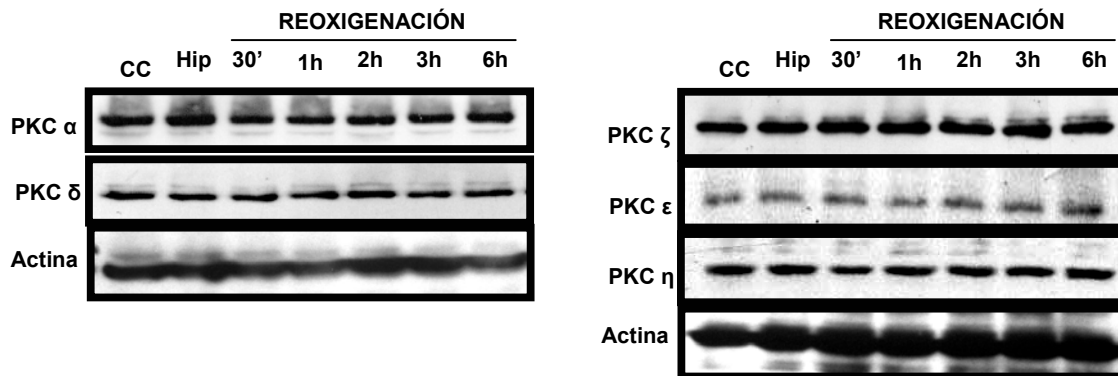


FIGURA 13. Expresión de distintas isoformas de PKC, en células HK-2, pertenecientes a las tres subfamilias de PKC determinada por inmunoblot.

### 3. ACTIVACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC $\alpha$ EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.

#### 3.1 TRASLOCACIÓN A MEMBRANA ESTIMADA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

Como ya se ha descrito en la introducción, PKC $\alpha$  cuando se activa se trasloca a la membrana plasmática, de tal manera que esta traslocación a membrana puede considerarse como una medida indirecta de activación de PKC $\alpha$ . Para estudiar si esta traslocación se producía en nuestras células HK-2 bajo condiciones de hipoxia/reoxigenación (H/R), sometimos las células adheridas a colágeno IV a H/R y estudiamos la localización de PKC $\alpha$  mediante inmunofluorescencia.

Comprobamos que PKC $\alpha$  se trasloca a la membrana plasmática en tiempos muy tempranos de reoxigenación, entre 15 y 30 minutos y hasta 2 horas de reoxigenación, volviendo a localizarse en el citoplasma celular a partir de esas 2 horas de reoxigenación, tal y como se demuestra en la figura 14.

Cuando PKC no está traslocada, las células muestran fluorescencia de forma difusa en todo el citoplasma; en cambio, cuando PKC $\alpha$  está traslocada (activada), el patrón de fluorescencia cambia: se produce un marcaje en membrana muy intenso, un marcaje fluorescente perinuclear también llamativo, y un descenso muy importante de la intensidad de fluorescencia correspondiente al citoplasma.

Utilizamos como control positivo de esta activación un tratamiento con PMA, activador de isoformas clásicas. Como se esperaba, el tratamiento con PMA induce la traslocación de PKC $\alpha$  en la mayoría de las células. El uso del inhibidor específico de esta isoforma (Gö 6976), aplicado junto al tratamiento de PMA, bloqueaba esta traslocación.

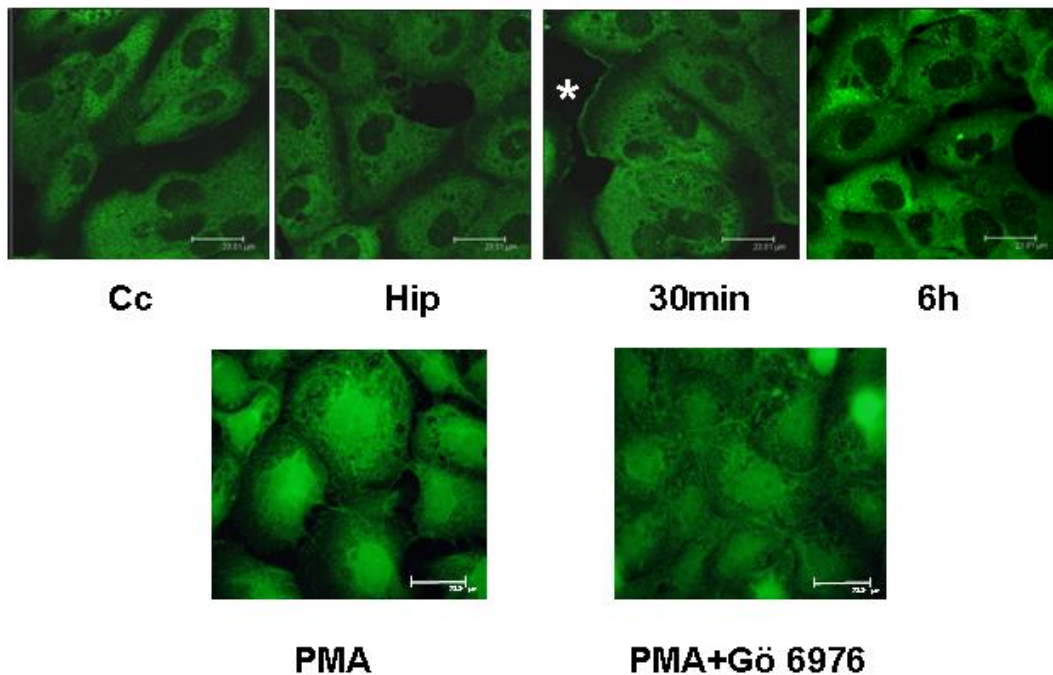


FIGURA 14. Traslocación de PKC $\alpha$  a membrana plasmática (\*) y a zona perinuclear, observada mediante inmunofluorescencia, en células HK-2 a tiempos tempranos de reoxigenación. En los paneles inferiores se muestra la traslocación de PKC $\alpha$  tras tratamiento de las células HK-2 con PMA y el efecto del inhibidor Gö 6976.

### 3.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PKC $\alpha$ EN HK-2 DURANTE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.

Con el fin de cuantificar la traslocación de PKC $\alpha$  a membrana descrita previamente, realizamos un fraccionamiento subcelular mediante lisis celular y ultracentrifugación de células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, que nos permitió separar la

fracción citoplásmica (fracción soluble) de la fracción de membrana (fracción insoluble o particulada).

Realizamos inmunoblot de la fracción soluble y la fracción insoluble de células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación en presencia y ausencia del inhibidor específico de isoformas clásicas de PKC Gö6976, que tiene especial afinidad por PKC $\alpha$ . Además incluimos los controles de células HK-2 tratadas con PMA y PMA más Gö 6976.

El resultado que se muestra en la figura 15, indica que la cantidad de PKC $\alpha$  disminuía en la fracción soluble a tiempos tempranos de reoxigenación (15 minutos-1hora), correlacionándose con una mayor presencia en la fracción insoluble o particulada. En células tratadas con Gö 6976 no se observaban diferencias significativas entre fracción soluble e insoluble. Así mismo, en el control positivo con PMA aumentaba significativamente la cantidad de esta isoforma en fracción insoluble mientras que en células tratadas con Gö 6976, no se observaban diferencias entre ambas fracciones.

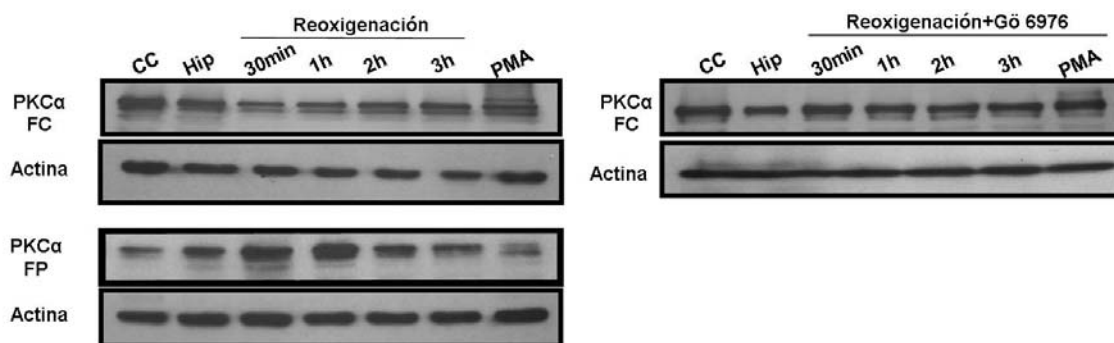


Figura 15. Inmunoblot de fraccionamiento subcelular. En la columna de figuras de la izquierda podemos observar como a tiempos tempranos de reoxigenación disminuye la expresión de PKC $\alpha$  en la fracción citosólica (FC) lo que coincide con un aumento de expresión en la fracción particulada de esta isoforma de PKC (FP). En la columna de la derecha podemos ver como la expresión de PKC $\alpha$  en la FC no se modifica durante la reoxigenación cuando las células HK-2 son tratadas durante la misma con el inhibidor de esta isoforma clásica de PKC.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular demuestran que, en tiempos tempranos de reoxigenación, entre 15 minutos y 2 horas, se produce una activación de PKC $\alpha$ , traslocándose ésta de citoplasma a membrana en células HK-2.



#### **4. FACTORES RESPONSABLES DE LA ACTIVACIÓN DE PKC $\alpha$ EN CÉLULAS HK-2 DURANTE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.**

Como ya hemos comentado en la introducción, uno de los factores que regulan la activación de PKC son los niveles intracitoplasmáticos de calcio. Por otro lado, está descrito que la activación de isoformas clásicas de PKC puede venir mediada por la activación de MAPKs, más concretamente por la activación de ERK1/2. Basándonos en estas premisas, estudiamos si en nuestro sistema de células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación ambos factores podrían estar regulando las modificaciones en la actividad de PKC $\alpha$  descrita en el apartado anterior.

##### **4.1. NIVELES DE CALCIO**

Células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación fueron incubadas con Fluo4AM, y estimamos los niveles intracitoplasmáticos de calcio mediante citometría de flujo.

Tal y como se muestra en la figura 16, observamos que los niveles intracitoplasmáticos de calcio aumentaban ya en hipoxia, alcanzando el máximo en esta condición y hasta 30 minutos de reoxigenación y comenzando a retornar a niveles basales a 1 hora

de reoxigenación. A partir de 2 horas de reoxigenación los valores de calcio intracitoplasmático no eran significativamente diferentes a los de la condición control.

Como control positivo de la técnica utilizamos un tratamiento con Ionomicina, que inducía un aumento en calcio intracelular similar al obtenido en hipoxia y en 30 minutos de reoxigenación.

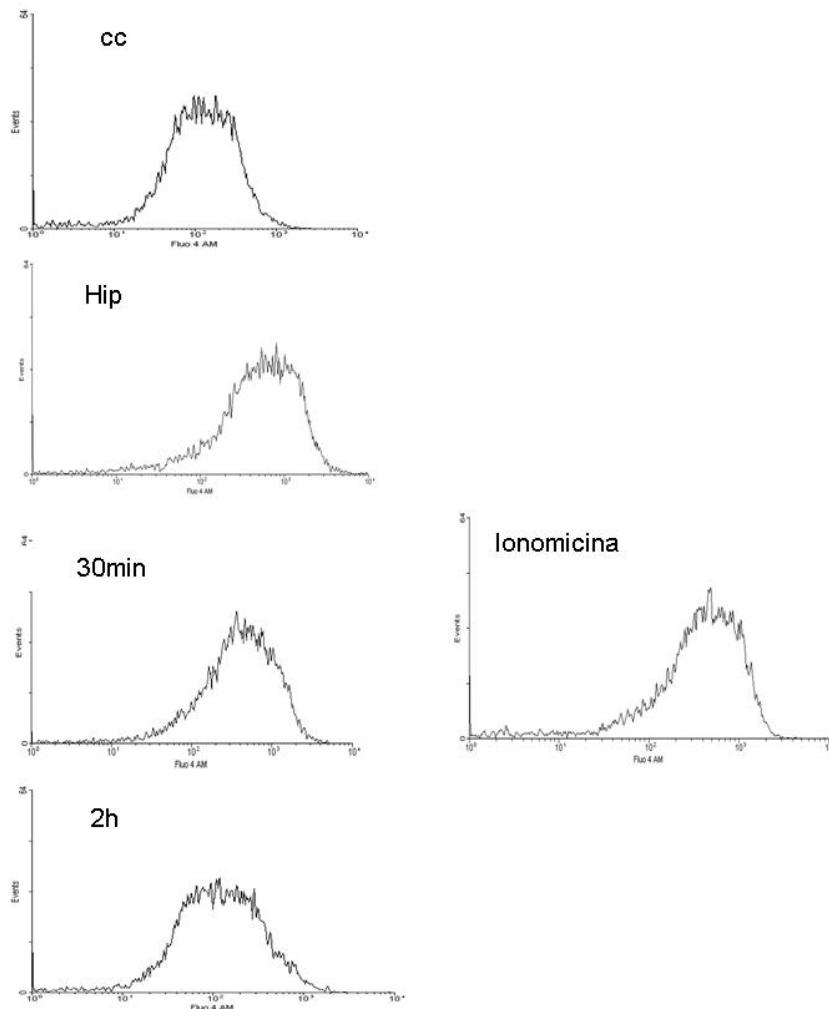


FIGURA 16. Citometría de flujo en células HK-2 sometidas a H/R e incubadas con sonda fluorescente Fluo4AM para estimación de niveles intracitoplasmáticos de calcio. Se observa un aumento máximo de niveles de este catión (curva desplazada a la dcha) en hipoxia y en 30 minutos de reoxigenación. Como control positivo se utilizó un pretratamiento en las células con Ionomicina a una concentración de 1µg/ml durante 30 minutos.

#### 4.2. ACTIVACIÓN DE ERK1/2

Mediante inmunoblot determinamos la activación de ERK1/2 en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente las formas fosforiladas (activadas). Los resultados se muestran en la figura 17 e indican que ERK1/2 se activa tempranamente en reoxigenación, entre 15 minutos y 3 horas. Estos cambios en fosforilación son significativos ya que la expresión total de ambas proteínas se mantiene constante a lo largo de la hipoxia/reoxigenación, tal y como se muestra en dicha figura.

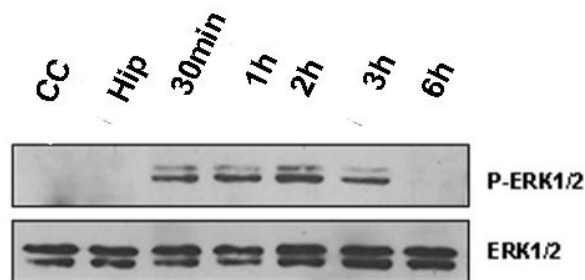


FIGURA 17. Expresión de ERK1/2 total y fosfo-ERK1/2 estimada mediante inmunoblot en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación.

### 4.3. TRASLOCACIÓN DE PKC $\alpha$ EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE ERK.

Para determinar si la traslocación de PKC $\alpha$  está mediada por la activación de ERK1/2, estudiamos por inmunofluorescencia la traslocación de PKC $\alpha$  en HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación en presencia y ausencia de un inhibidor específico de la activación por fosforilación ERK1/2, el UO126, durante la reoxigenación.

Los resultados se muestran en la figura 18 e indican que al inhibir mediante este tratamiento la activación de ERK1/2, la traslocación de PKC $\alpha$  quedaba inhibida en la mayoría de las células.

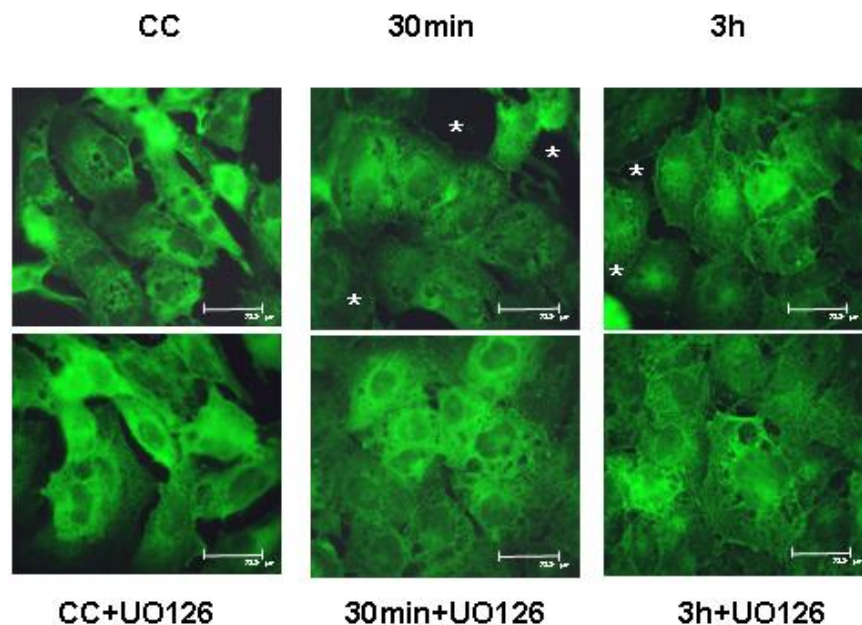


FIGURA 18. Inmunofluorescencia para PKC $\alpha$  en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, en presencia y ausencia de UO126, que demuestra la implicación de la activación de ERK1/2 en la traslocación de PKC $\alpha$ . Barra de escala: 26,3  $\mu$ m.

Estos resultados muestran que la activación y consiguiente traslocación de PKC $\alpha$  en células HK-2 sometidas a H/R está mediada por la activación de ERK1/2 y muy probablemente por el aumento en niveles intracitoplasmáticos de calcio.

## **5. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE PKC $\alpha$ EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.**

### **5.1. CONTRACCIÓN CELULAR**

Observando las células por contraste de fase y tras realizar inmunofluorescencias, comprobamos que las células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación mostraban, durante tiempos tempranos de reoxigenación, cambios llamativos en su morfología en comparación con los controles, más concretamente tenían un tamaño más reducido.

Para cuantificar este efecto realizamos una tinción con Faloidina-Alexa 568, y utilizando un software que permite la cuantificación de

superficies celulares, apropiado para imágenes de microscopía confocal (Leica lite), realizamos mediciones de superficie celular.

Además, para comprobar si este efecto estaba mediado por la activación de PKC $\alpha$  y de ERK1/2, realizamos sendos experimentos de hipoxia/reoxigenación en presencia y ausencia de inhibidores específicos, para PKC $\alpha$  el Gö6976 y para ERK1/2 el UO126.

Los resultados de la cuantificación de las superficies celulares se muestran en la figura 19. Dicha cuantificación confirmó que, a tiempos tempranos de reoxigenación, coincidiendo con la traslocación de PKC $\alpha$ , las células tienen menor superficie, indicando contracción celular. Esta contracción celular se manifiesta también en que las células tienen un aspecto más redondeado, tal y como se ha podido observar en las imágenes mostradas previamente (figuras 17 y 18).

Al tratar las células con UO126 y Gö6976, este efecto de contracción celular se revierte. Es de destacar que el efecto de reversión es más significativo cuando se usó Gö6976, indicando que PKC $\alpha$  es mediador directo de la contracción celular. Este efecto aparece cuantificado en la figura 19 y se muestra en las imágenes de la figura 20.

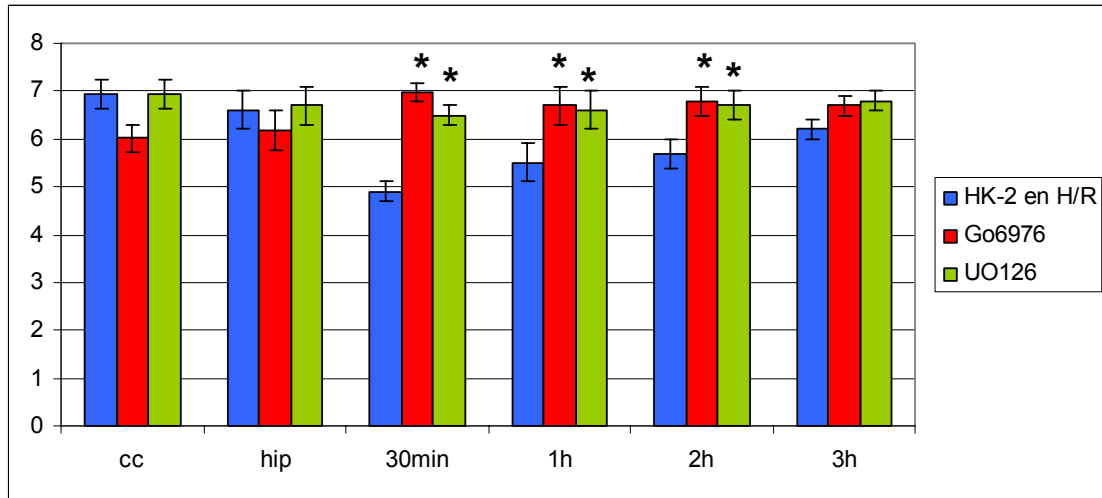


FIGURA 19. Medición del volumen celular en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación. Las barras azules muestran células sin tratamiento sometidas a hipoxia/reoxigenación. Las barras rojas muestran la medida del volumen celular de las células HK-2 sometidas a H/R en presencia de Gö6976, un inhibidor de PKC $\alpha$ . Las barras verdes muestran la medida del volumen celular de las células HK-2 sometidas a H/R en presencia de UO126, un inhibidor de ERK1/2. (\*)  $p \leq 0.05$  respecto a 30 min, 1h y 2h sin inhibidores

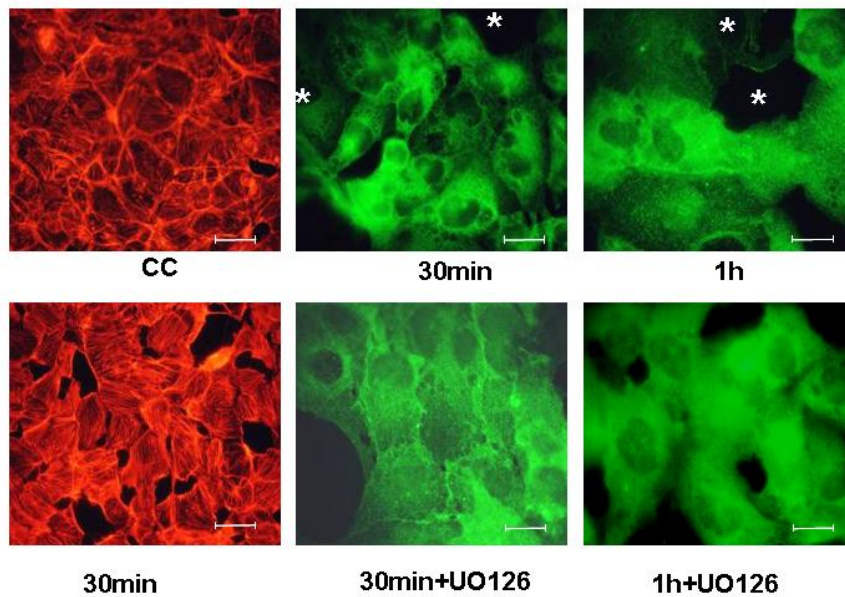


FIGURA 20. Inmunofluorescencia para PKC $\alpha$  en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación. En rojo, tinción con faloidina-alexa 568. Las células tratadas con sendos inhibidores, Gö6976 y UO126, conservan su tamaño y morfología celular en tiempos tempranos de reoxigenación. Barras de escala: tinción con faloidina-alexa 568: 50 $\mu$ m; inmunofluorescencia: 26,3  $\mu$ m

## 5.2. INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA EPITELIAL

Los estudios de inmunofluorescencia nos han permitido observar también que durante la hipoxia-reoxigenación, la monocapa epitelial pierde su continuidad, se abren huecos entre las células, coincidiendo en el tiempo con la contracción celular descrita anteriormente.

Para cuantificar esta observación sometimos las células HK-2 a hipoxia-reoxigenación y realizamos un experimento de permeabilidad no selectiva con azul de tripano y colorimetría, tal y como se detalla en Material y Métodos. Además, para determinar si esta pérdida de integridad de monocapa epitelial va mediada por la activación de PKC $\alpha$  y ERK1/2, utilizamos de nuevo los inhibidores Gö6976 (inhibidor de PKC $\alpha$ ) y UO126 (inhibidor de ERK1/2), durante la reoxigenación.

Los resultados que se muestran en la figura 18 indicaban, que coincidiendo con los primeros tiempos de reoxigenación, cuando se activa PKC $\alpha$ , aumenta la permeabilidad no selectiva de la monocapa epitelial, viéndose restaurada a partir de las dos horas de



reoxigenación. La permeabilidad se reducía cuando las HK-2 habían sido previamente tratadas con inhibidores de PKC $\alpha$  y ERK1/2, siendo ligeramente mayor el efecto protector con el inhibidor de PKC $\alpha$ .

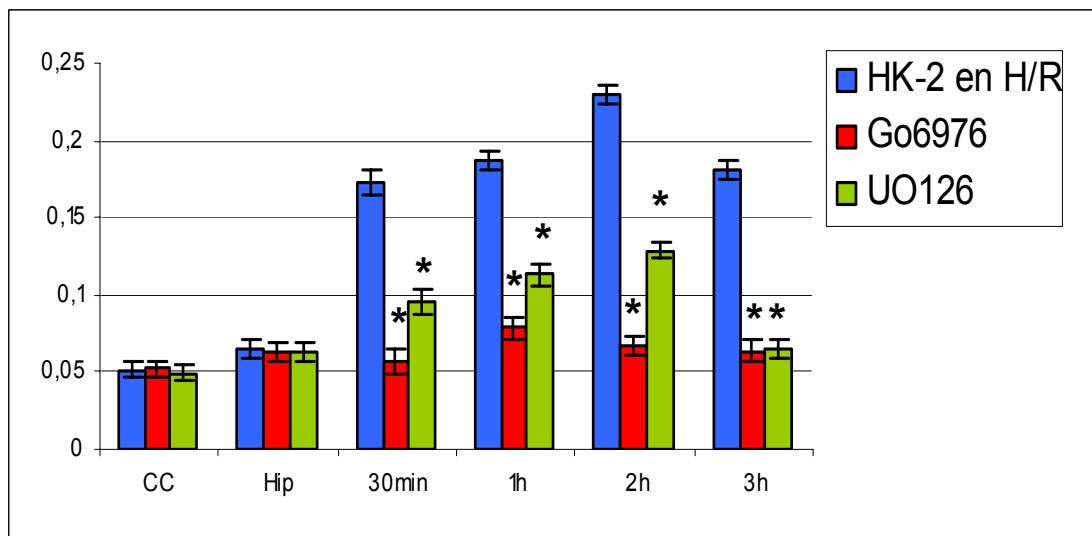


FIGURA 21. Estudio de la permeabilidad de monocapa para azul de tripano en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, mediante colorimetría. Las barras azules muestran células sin tratamiento sometidas a hipoxia/reoxigenación. Las barras rojas muestran la permeabilidad de la monocapa de las células HK-2 sometidas a H/R en presencia de Go6976, inhibidor de PKC $\alpha$ . Las barras verdes muestran la permeabilidad de la monocapa de las células HK-2 sometidas a H/R en presencia de UO126, inhibidor de ERK1/2. (\*)  $p \leq 0.05$  respecto a 30 min, 1h, 2h y 3h sin inhibidores

### 5.3. DISRUPCIÓN DE UNIONES INTRACELULARES

Como ya se comentó en la introducción, la impermeabilidad del epitelio viene asegurada por una correcta estructuración y función de las uniones intercelulares, más concretamente de las uniones estrechas, integradas entre otras proteínas por ZO-1.

Mediante inmunofluorescencia para ZO-1 pudimos comprobar que, en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación, en tiempos tempranos de reoxigenación y correlacionándose con la presencia de PKC $\alpha$  en membrana, ZO-1 pierde su patrón de distribución continua en la membrana plasmática para reubicarse o localizarse en el citoplasma. Estos resultados se muestran en la figura 22.

Al tratar las células con UO126 (inhibidor de ERK1/2) y Gö6976 (inhibidor de PKC $\alpha$ ), el ZO-1 permanece en la membrana celular durante la hipoxia y toda la reoxigenación. Este efecto de reversión de la redistribución de ZO-1 en la membrana celular durante la hipoxia y la reoxigenación, es más pronunciado con Gö6976 que con UO126 (figura 22).

Este patrón uniforme de localización de ZO-1 en membrana plasmática en presencia de ambos inhibidores se correlaciona con la mayor integridad de monocapa epitelial cuantificada y descrita en el apartado anterior.

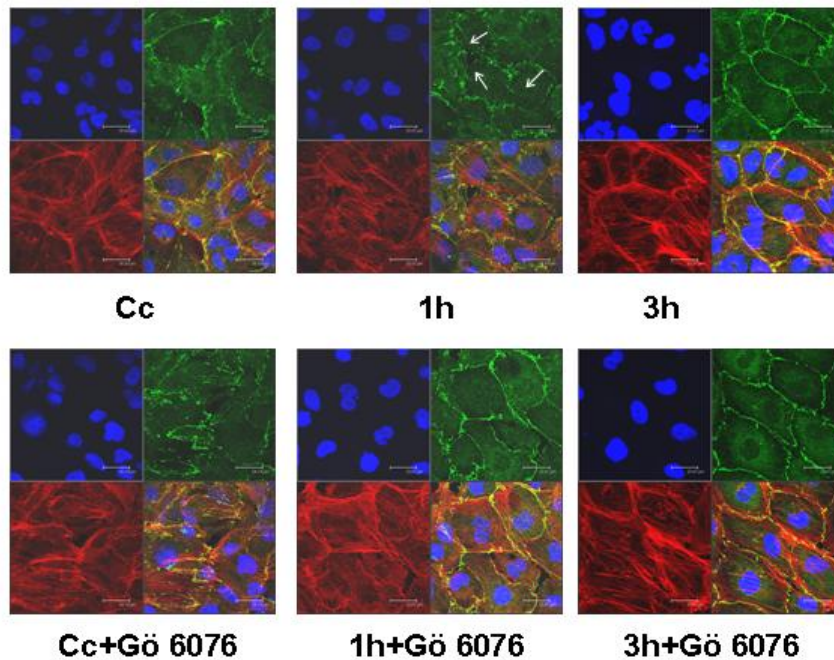


FIGURA 22. Inmunofluorescencia para PKC $\alpha$  (verde) y ZO-1 (rojo) en células HK-2 tras hipoxia/reoxigenación en presencia y ausencia de Gö6976. La cromatina nuclear se visualizó mediante tinción con DAPI (azul). Barra de escala: 26,3  $\mu$ m

Estos resultados indican que la activación de PKC $\alpha$  está mediando cambios en morfología celular en tiempos tempranos de reoxigenación y además mediando rotura de uniones intercelulares. Ambos hechos se traducen en contracción celular, pérdida de adhesión intercelular y apertura de oquedades en la monocapa, resultando en un aumento de la permeabilidad epitelial en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación. Todos estos efectos disminuyen significativamente cuando las células son tratadas con

inhibidores de ERK1/2, y de forma mucho más drástica cuando son tratadas con Gö6976, confirmando que ERK1/2, está por encima de PKC $\alpha$  en la cascada de señalización y que PKC $\alpha$  es la molécula que regula más directamente todas estas alteraciones.

## **6. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC $\alpha$ EN BIOPSIAS CON NECROSIS TUBULAR AGUDA DE ETIOLOGÍA ISQUÉMICA.**

Mediante inmunohistoquímica determinamos la expresión y localización de PKC $\alpha$  en tejido renal humano obtenido por biopsia y nefrectomía, con daño en el epitelio tubular proximal (Necrosis tubular aguda, NTA) atribuible a causa isquémica.

Se realizaron las inmunohistoquímicas en un total de 17 muestras y en todos ellos se correlacionaban de forma directa cambios en la distribución de PKC $\alpha$  con las alteraciones morfológicas observadas en las células epiteliales de túbulo proximal renal humano.

Como puede observarse en la figura 23, aquellas células epiteliales que conservan mejor su morfología muestran inmunorreactividad positiva para PKC $\alpha$  de forma difusa en su citoplasma, mientras que aquellas que protuyen hacia la luz y comienzan a separarse de sus vecinas y a modificar su morfología, redondeándose, muestran una inmunorreactividad positiva para

PKC $\alpha$  más llamativa en la membrana citoplasmática. Estos patrones de distribución se observan en distintas zonas de la misma muestra e incluso en el mismo túbulo de forma no uniforme en toda la sección del tejido, dejando constancia de que no toda la extensión del túbulo proximal se daña por igual, como ya se comentó en la introducción.

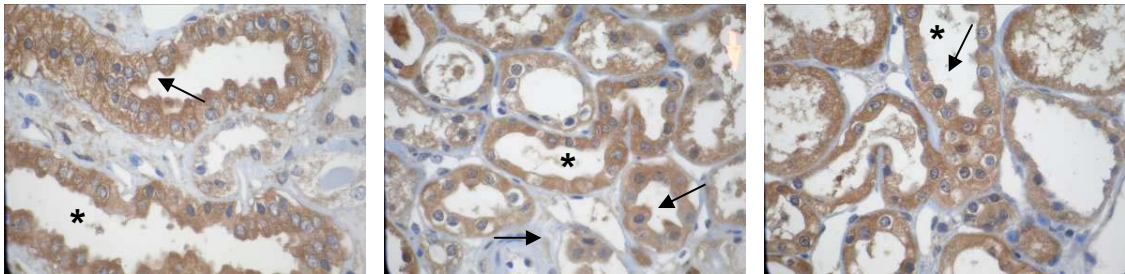


FIGURA 23. Inmunohistoquímica de PKC $\alpha$  en biopsias de riñón humano tras haber sufrido un periodo de isquemia por distintas causas con afectación morfológica del epitelio tubular. En los túbulos conservados se observa una distribución homogénea citosólica de PKC $\alpha$  (\*), y en las células más dañadas se observa un “refuerzo de membrana” (flecha). (Magnificación x400).

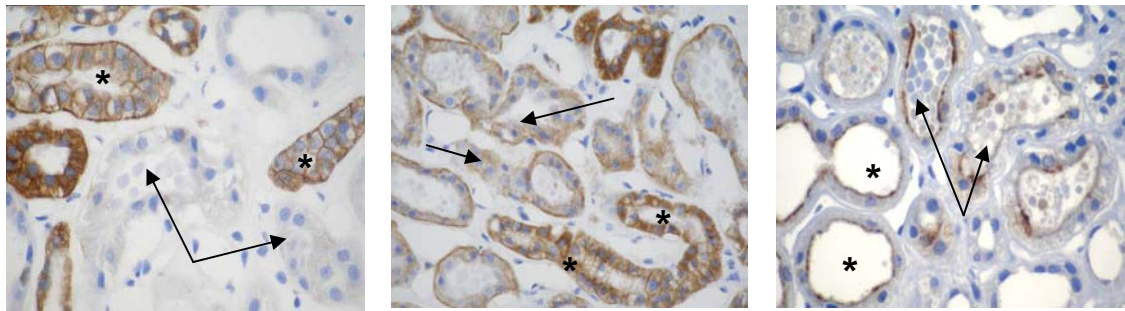
## 7. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIONES INTERCELULARES EN BIOPSIAS CON NECROSIS TUBULAR AGUDA DE ETIOLOGÍA ISQUÉMICA.

Dadas las alteraciones relacionadas con PKC $\alpha$  que habíamos observado en el modelo *in vitro* y que se han detallado en apartados anteriores, quisimos confirmar si similares modificaciones en

proteínas relacionadas con la adhesión célula a célula también se observaban en tejido renal humano con NTA de etiología isquémica.

Mediante inmunohistoquímica, y utilizando el material de riñones (ver Material y métodos) que habían sufrido isquemia como se ha explicado en el apartado anterior, determinamos modificaciones en proteínas de unión intercelular como E-cadherina,  $\beta$ -catenina y ZO-1.

Como muestra la figura 24, los túbulos proximales que presentan morfología conservada muestran un patrón de tinción organizado delimitando la membrana plasmática para E-cadherina y  $\beta$ -catenina, y un patrón lineal en la porción apical de la membrana formando como un refuerzo a modo de botón en los laterales para ZO-1, coincidiendo con la localización de esta proteína en las uniones estrechas. Y en aquellas células epiteliales que muestran cambios morfológicos como expresión del daño isquémico, así como en los túbulos en cuya luz se observan células desprendidas, estos patrones están alterados o incluso dichos túbulos muestran inmunorreactividad negativa.



**E-cadherina**

**$\beta$ -catenina**

**ZO-1**

FIGURA 24. Inmunohistoquímica de distintas moléculas de uniones intercelulares en biopsias de riñón humano tras situaciones de isquemia de distinta etiología. Los túbulos conservados muestran expresión de E-cadherina (\*) en membrana mientras que en aquellos con daño epitelial esta distribución se ha perdido (Flecha). Beta-catenina en los túbulos dañados se internaliza al citoplasma (flecha). ZO-1 en los túbulos conservados muestra un patrón de inmunotinción “lineal y uniforme” en la parte apical de la membrana celular (\*), mientras que en los túbulos dañados se desorganiza, se acumula en la porción apical del citoplasma o incluso desaparece (flecha). (Magnificación x400).

## **8. ACTIVACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC $\zeta$ EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.**

### **8.1 TRASLOCACIÓN A MEMBRANA ESTIMADA POR INMUNOFLUORESCENCIA**

Mediante inmunofluorescencia, determinamos que, en células HK-2 sometidas a H/R, PKC $\zeta$  se trasloca a membrana celular en tiempos tempranos de reoxigenación, entre 1 y 3 horas de reoxigenación, volviendo a localizarse después en el citoplasma. Esta traslocación, que como en el caso de PKC $\alpha$  puede

considerarse como medida indirecta de activación de PKC $\zeta$ , es algo más tardía en el tiempo que la registrada para PKC $\alpha$ , comentada anteriormente. Estos resultados se muestran en la figura 25.

Al igual que en el caso de la traslocación de PKC $\alpha$ , la traslocación de PKC $\zeta$  se manifiesta en inmunofluorescencia como una señal intensa que dibuja la membrana y rodea la zona perinuclear, quedando el citoplasma sin apenas señal.

También por IF comprobamos que el ppseudosustrato miristoilado inhibidor específico de PKC $\zeta$  es capaz de revertir significativamente la traslocación de PKC $\zeta$  a la membrana plasmática.

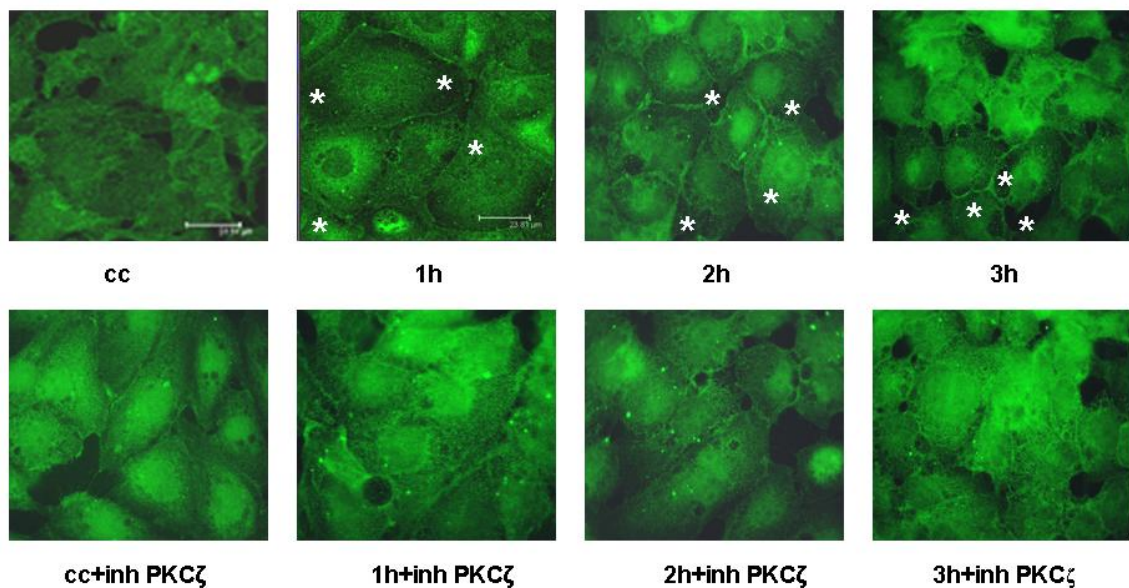


FIGURA 25. Inmunofluorescencia para PKC $\zeta$  en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, en presencia y ausencia de inhibidor de PKC $\zeta$ . Barra de escala: 23,81 μm.



## 8.2 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PKC $\zeta$ EN HK-2 DURANTE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.

Para cuantificar la traslocación transitoria de PKC $\zeta$  en células HK-2 sometidas a H/R realizamos fraccionamiento subcelular por lisis y ultracentrifugación e inmunoblot de ambas fracciones soluble (citósolica) e insoluble o particulada (membrana). En un experimento paralelo, células HK-2 fueron sometidas a hipoxia/reoxigenación y tratadas durante la reoxigenación con el péptido ppseudosutrato miristoilado inhibidor específico de PKC $\zeta$ .

Los resultados que se muestran en la figura 26 confirman que coincidiendo con los tiempos de reoxigenación en que observábamos traslocación de PKC $\zeta$  a la membrana plasmática, la cantidad de esta isoforma disminuye en la fracción soluble para aumentar en la fracción insoluble o particulada. Estas alteraciones no eran observables en el fraccionamiento realizado con las células HK-2 tratadas con el inhibidor de PKC $\zeta$ .

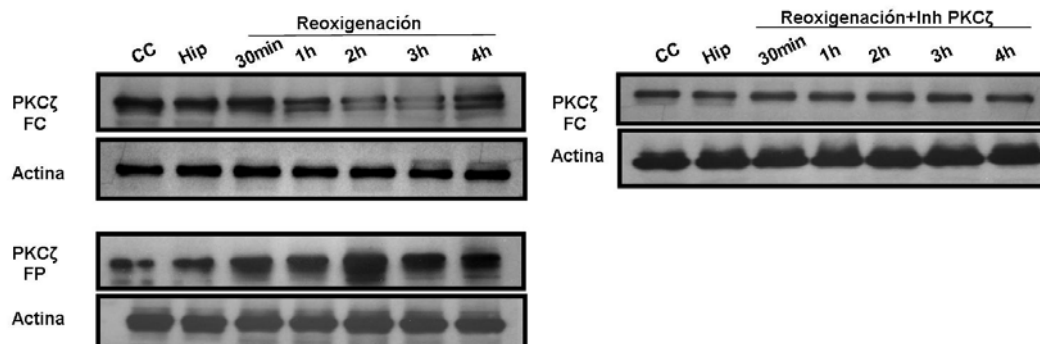


Figura 26. Inmunoblot de fraccionamiento subcelular. EN la columna de figuras de la izquierda podemos observar como a tiempos tempranos de reoxigenación disminuye la expresión de PKC $\zeta$  (FC) que coincide con un aumento de expresión en la fracción particulada de esta isoforma de PKC (FP). En la columna de la derecha podemos ver como la expresión de PKC $\zeta$  en la FC no se modifica durante la reoxigenación cuando las células HK-2 son tratadas durante la misma con el inhibidor de esta isoforma atípica de PKC.

Los resultados obtenidos tanto por inmunofluorescencia como fraccionamiento subcelular e inmunoblot, demuestran que en células HK-2 sometidas a H/R, PKC $\zeta$  se activa y trasloca a la fracción particulada entre 1 y 3 horas de reoxigenación.

## **9. FACTORES RESPONSABLES DE LA ACTIVACIÓN DE PKC $\zeta$ EN CÉLULAS HK-2 DURANTE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.**

### **9.1 PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO EN CÉLULAS HK-2 DURANTE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.**

Dado que los mecanismos de activación de PKC $\zeta$  no están tan estudiados como los de las isoformas clásicas, y en base a la literatura, nos planteamos si la traslocación de PKC $\zeta$  podría estar mediada, al menos en parte, por la producción de radicales libres de oxígeno.

Mediante citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA que mide radicales libres de oxígeno, concretamente peróxidos, determinamos que durante la hipoxia y tiempos muy tempranos de reoxigenación (30 minutos), se produce un aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se normaliza alcanzando niveles similares a los controles a partir de una hora de reoxigenación. Estos resultados se muestran en la figura 27.

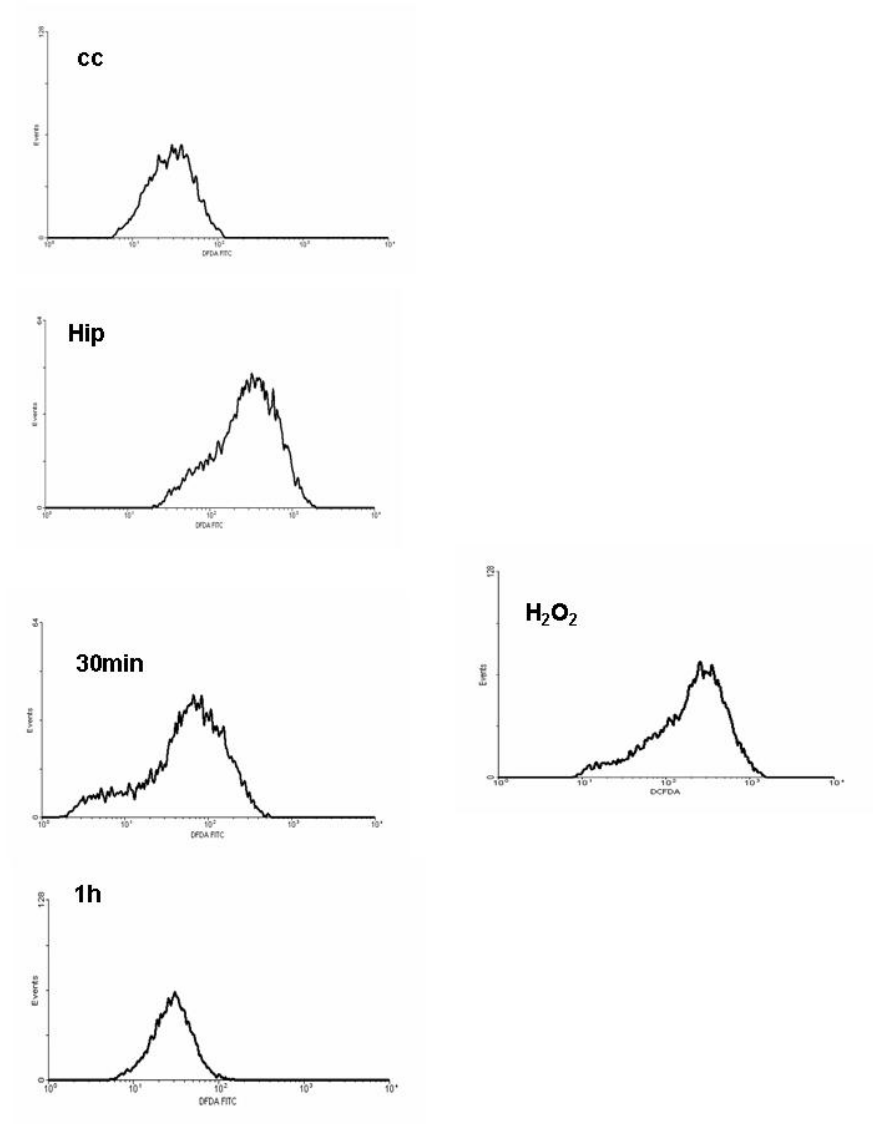


FIGURA 27. Citometría de flujo en células HK-2 sometidas a H/R con sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA para medición de radicales libres de oxígeno (ROS). Se observa un aumento de ROS (curva desplazada a la dcha) durante la hipoxia y tiempos muy tempranos de reoxigenación, habiéndose balanceado a 30 minutos de reoxigenación. Como control positivo se utilizó un tratamiento 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Mediante inmunofluorescencia para PKC $\zeta$ , que se muestra en la figura 28, comprobamos que esta producción de estrés oxidativo se correlaciona en el tiempo con la activación y traslocación de PKC $\zeta$  a la membrana plasmática en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación.

Por otro lado, un tratamiento pro-oxidante como la adición de 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio de cultivo, induce una clara traslocación de PKC $\zeta$  a la membrana, sugiriendo que en células HK-2 la generación de especies reactivas de oxígeno es un estímulo activador de PKC $\zeta$ . Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo puede estar mediando la traslocación de PKC $\zeta$  en nuestro modelo.

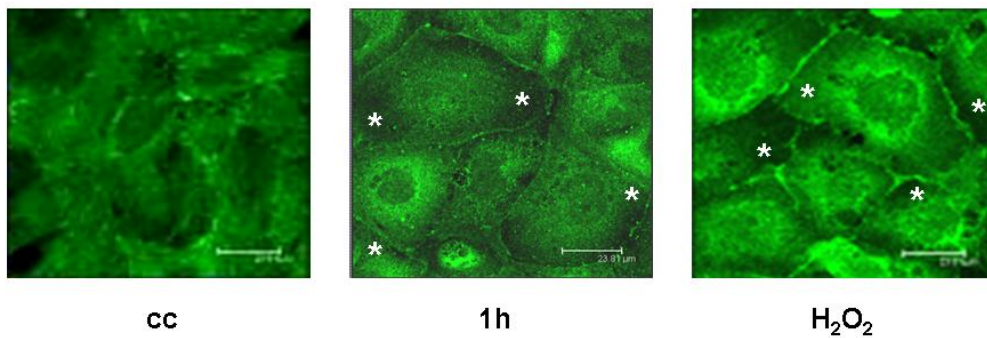


FIGURA 28. Inmunofluorescencia de PKC $\zeta$  con traslocación máxima a 1 hora de reoxigenación y tras tratamiento pro-oxidante en células HK-2. Barra de escala: 23.81 $\mu$ m.

## 9.2 EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA ACTIVACIÓN DE PKC $\zeta$ .

Para demostrar que la traslocación de PKC $\zeta$  estaba mediada por la generación de radicales libres de oxígeno en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación, añadimos al medio de cultivo un antioxidante durante la hipoxia, concretamente BHA, que era el antioxidante que mostraba menor toxicidad en nuestra línea celular.

Mediante inmunofluorescencia determinamos que durante la reoxigenación, desde los 30 minutos a las 3 horas, en las células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación se produce traslocación de PKC $\zeta$  a la membrana plasmática. La adición de BHA al medio de cultivo durante la hipoxia, inhibe significativamente esta traslocación de PKC $\zeta$ . Estos resultados se muestran en la figura 29.

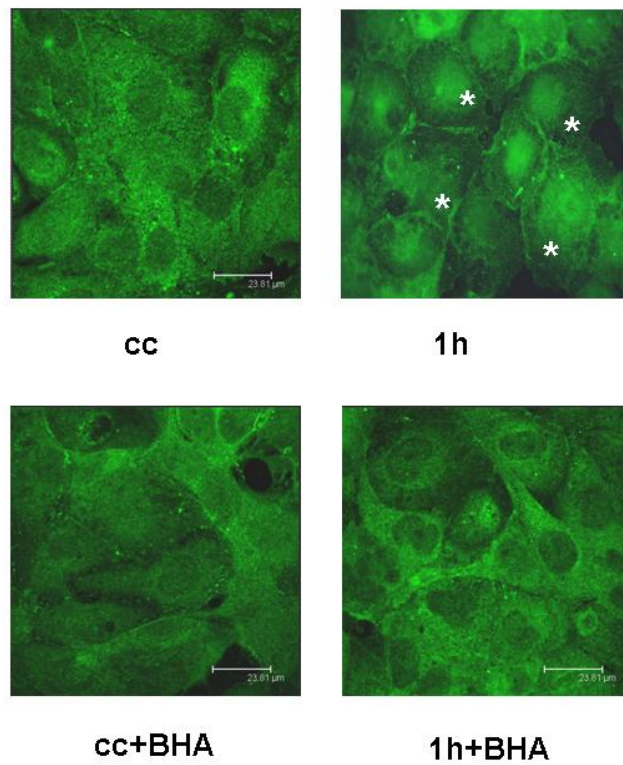


FIGURA 29. Inmunofluorecencia para PKC $\zeta$  en HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación en presencia y ausencia de BHA 100 $\mu$ M. Barra de escala: 23,81 $\mu$ m.

Estos resultados demuestran que en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación se produce una activación y traslocación de PKC $\zeta$  a membrana celular durante reoxigenación, que al menos en parte, viene mediada por la generación de estrés oxidativo durante la hipoxia.

## **10. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE PKC $\zeta$ EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA-REOXIGENACIÓN.**

### **10.1 CONTRACCIÓN CELULAR.**

Como se comentó en el apartado 5.1, mediante la observación de células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación por contraste de fase y por inmunofluorescencia pudimos comprobar que las células sufrían alteraciones morfológicas en términos de contracción y redondeamiento.

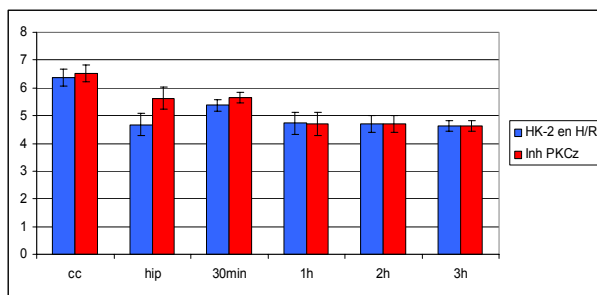
Realizamos una inmunofluorescencia para PKC $\zeta$  y tinción para F-actina (con Faloidina-Alexa 568) que nos permitió determinar la traslocación de PKC y realizar a la vez mediciones de la superficie celular. Estas inmunofluorescencias y tinciones se realizaron en presencia y ausencia del inhibidor de PKC $\zeta$ .

Los resultados que se muestran en la figura 30 A y 30 B demuestran que en presencia del inhibidor de PKC $\zeta$ , se inhibe la traslocación a membrana de esta isoforma, pero no se revierte la disminución de la superficie celular (figura 30A) ni la adquisición de un aspecto redondeado (figura 30B).

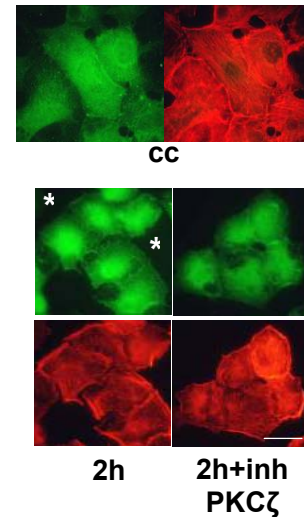
Estos resultados nos indican que, a diferencia de PKC $\alpha$ , PKC $\zeta$  no parece estar mediando de forma directa las alteraciones



morfológicas y de tamaño que se observan en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación.



**A**



**B**

FIGURA 30. A. Medición de la superficie celular mediante software específico en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación. En barras azules se representa la superficie celular de las células sometidas a hipoxia/reoxigenación. En rojo, superficie de células bajo iguales condiciones de cultivo, pero habiendo sido tratadas con el inhibidor específico de PKC $\zeta$ . B. Inmunofluorescencia para PKC $\zeta$  (verde) en células HK-2 tras hipoxia/reoxigenación; tinción de F-actina (rojo) con Faloidina-Alexa 568. Barra de escala: 20 $\mu$ m.

## 10.2 INTEGRIDAD DE LA MONOCAPA EPITELIAL

Al igual que determinamos el papel de PKC $\alpha$  en las alteraciones que sufre la monocapa epitelial en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación, mediante similares ensayos de

permeabilidad no selectiva, hemos estudiado el papel de PKC $\zeta$  en dichas alteraciones utilizando su inhibidor específico (pseudosustrato miristoilado).

Los resultados, que se muestran en la figura 31, indican que la presencia del inhibidor de PKC $\zeta$  en reoxigenación no restaura la pérdida de integridad de la monocapa epitelial. Este resultado sugeriría que la pérdida de integridad de monocapa en células HK-2 sometidas a hipoxia-reoxigenación está mediada directamente por la activación de PKC $\alpha$  pero no de PKC $\zeta$ .

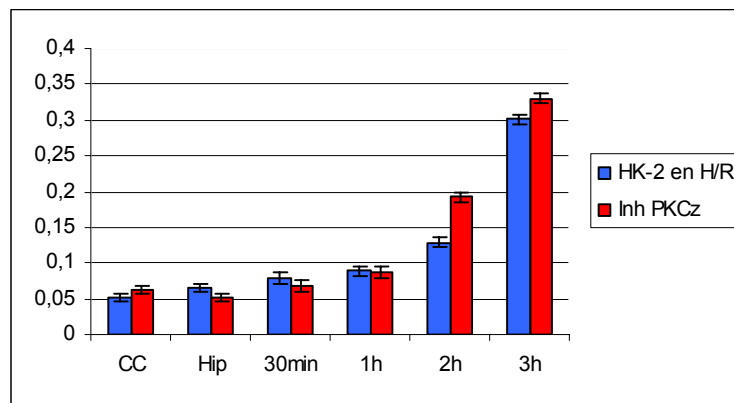


FIGURA 31. Estudio de la permeabilidad no selectiva de monocapa de células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, mediante colorimetría con azul de tripano. Las barras azules muestran la permeabilidad de células sometidas a hipoxia/reoxigenación y en barras rojas se muestra la permeabilidad de la monocapa de células HK-2 tras hipoxia/reoxigenación en presencia del inhibidor específico de PKC $\zeta$ .

### 10.3 COLAPSAMIENTO DE CITOESQUELETO

A pesar de que los resultados mostrados hasta ahora no implicaban directamente a PKC $\zeta$  en la contracción celular o en la pérdida de la integridad de la monocapa, datos de la bibliografía relacionaban esta isoforma de PKC con alteraciones en el citoesqueleto celular, que es responsable del mantenimiento de la estructura y morfología celulares. Por ello realizamos inmunofluorescencias de vimentina y tubulina, como componentes de microtúbulos y filamentos intermedios, combinadas con tinciones de PKC $\zeta$  en células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación, y en presencia o no del inhibidor específico de PKC $\zeta$  y antioxidantes, aplicados durante reoxigenación e hipoxia respectivamente.

Los resultados que se muestran en la figura 32 demuestran que cuando PKC $\zeta$  se activa y se trasloca a membrana celular durante la reoxigenación, se produce una desorganización de la estructura de microtúbulos (tubulina) y filamentos intermedios (vimentina). Ambos componentes de citoesqueleto se colapsan dejando de conformar tramas o redes en el citoplasma.

En el caso de la tubulina, este efecto se ve inhibido significativamente tanto por el uso del inhibidor de PKC $\zeta$  como por el tratamiento antioxidante con BHA. En el caso de los filamentos

intermedios de vimentina, el colapsamiento es inhibido más drásticamente por el inhibidor de PKC que por el BHA.

Estos resultados indican que PKC $\zeta$ , activada por la generación de radicales libres de oxígeno durante la hipoxia, es responsable del colapsamiento de microtúbulos de tubulina y de filamentos de vimentina.

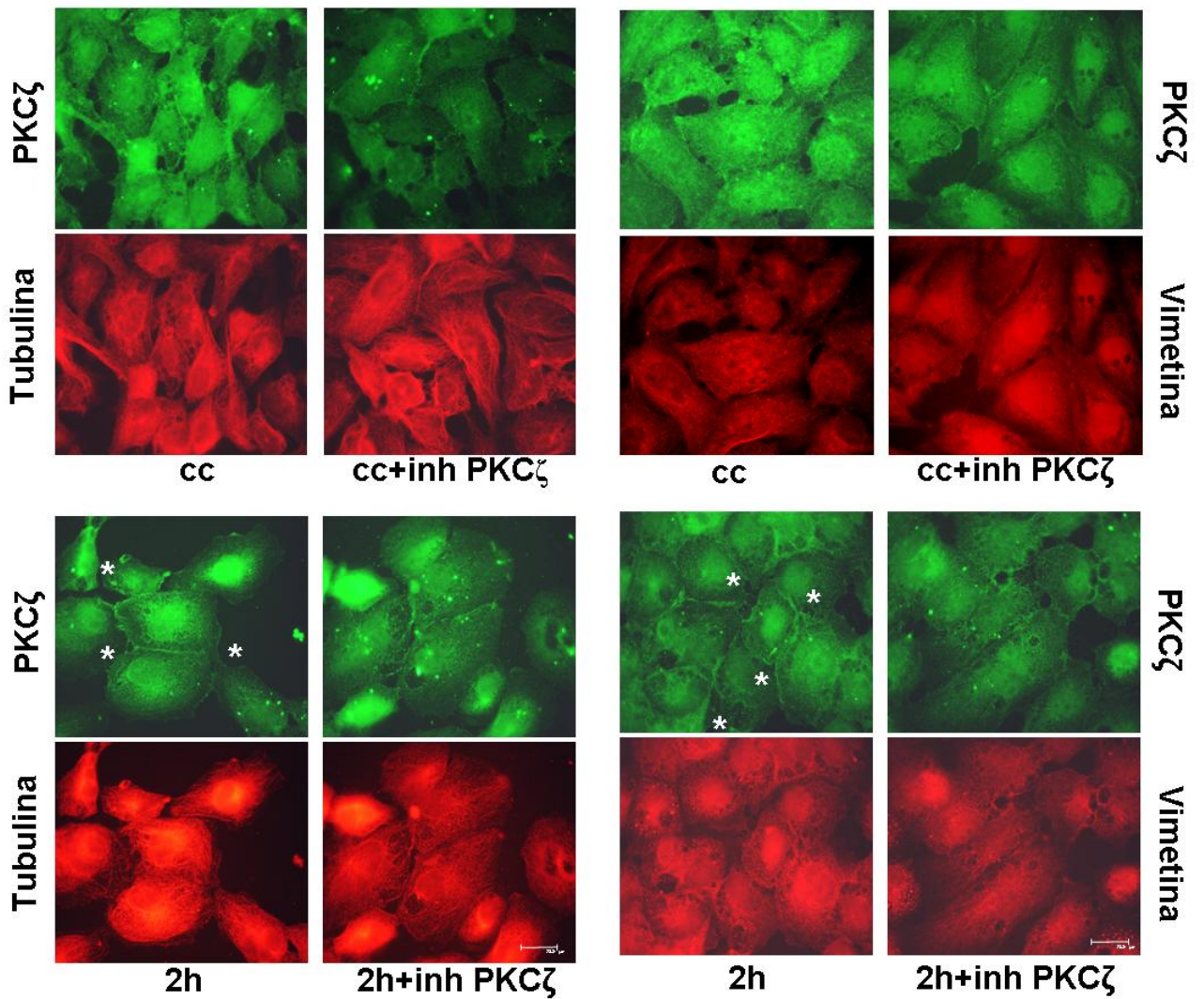


FIGURA 32. Inmunofluorescencia en HK-2 tras hipoxia/reoxigenación en presencia y ausencia del inhibidor específico de PKC $\zeta$  y antioxidantes. PKC $\zeta$  en verde y tubulina y vimentina en rojo. Barras de escala: 23,81 $\mu$ m.

Estos resultados en conjunto indican que en reoxigenación se produce una traslocación de PKC $\zeta$  a la membrana plasmática, mediada en gran medida por la generación de ROS durante la hipoxia. Y si bien la activación de PKC $\zeta$  no estaría directamente relacionada con contracción celular y pérdida de impermeabilidad epitelial, sí que PKC $\zeta$  estaría regulando de forma directa modificaciones importantes en la organización de componentes del citoesqueleto, a saber microtúbulos y filamentos intermedios, tal y como se ha demostrado con el inhibidor específico de esta isoforma atípica de PKC. Así mismo, la activación de PKC $\zeta$  se relaciona en el tiempo con la rotura de uniones intercelulares y aumento de la permeabilidad de la monocapa epitelial. Así, ésta isoforma puede contribuir al aumento de permeabilidad epitelial mediando contracción celular y desorganización del citoesqueleto generando una tracción mecánica que altera el contacto célula-célula.

## **11. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC $\zeta$ EN BIOPSIAS CON NECROSIS TUBULAR AGUDA DE ETIOLOGÍA ISQUÉMICA.**

Al igual que para PKC $\alpha$ , realizamos inmunohistoquímicas en un total de 17 especímenes y en todos ellos era posible correlacionar

las alteraciones en la distribución de PKC $\zeta$  con las alteraciones morfológicas observadas en las células epiteliales de túbulo proximal renal humano en situaciones de privación de oxígeno y nutrientes.

Como puede observarse en la figura 33, aquellas células epiteliales que conservan mejor su morfología muestran inmunorreactividad positiva para PKC $\zeta$  de forma difusa en su citoplasma, mientras que aquellas que protruyen hacia la luz y comienzan a separarse de sus vecinas y a modificar su morfología (se redondean), muestran una inmunorreactividad positiva para PKC $\zeta$  en la membrana plasmática. De nuevo, ambas distribuciones de PKC $\zeta$  pueden observarse en una misma sección del túbulo y en el mismo túbulo por el carácter focal de esta lesión ya comentado.

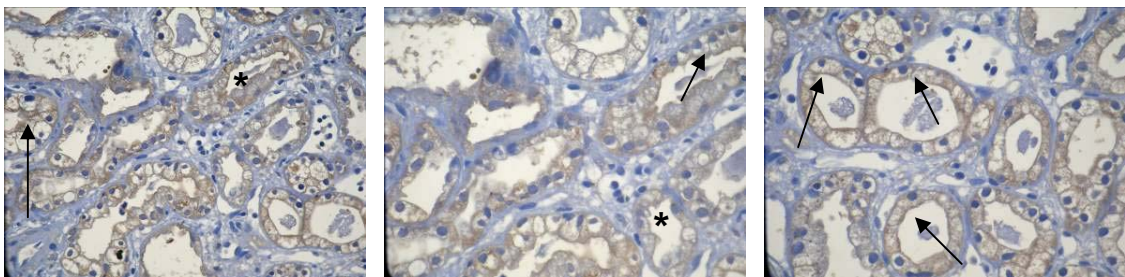


FIGURA 33. Inmunohistoquímica de PKC $\zeta$  en biopsias de riñón humano tras haber sufrido un periodo de isquemia con afectación morfológica del epitelio tubular. En las células no dañadas se observa una distribución homogénea citosólica PKC $\zeta$  (\*), y en las células más dañadas se observa un “refuerzo de membrana” (flecha). (Magnificación x400).

## **12. DISTRIBUCIÓN DE F-ACTINA EN BIOPSIAS RENALES HUMANAS CON DAÑO ISQUÉMICO.**

Como se comentó en la introducción, la actina es el componente mayoritario del citoesqueleto y el componente fundamental de las microvellosidades de las células epiteliales tubulares. Para conformar un citoesqueleto que sustente la célula y funcione correctamente debe estar polimerizada y formar filamentos.

Para determinar si las alteraciones morfológicas observadas en muestras con NTA están asociadas a alteraciones en la polimerización y estructuración de actina, realizamos una tinción con Faloidina-Alexa 568, que reconoce solamente actina polimerizada, en muestras de biopsias humanas procesadas por congelación.

Como se observa en la figura 34, en regiones de tejido en las que no se observa NTA la tinción con Faloidina-Alexa 568 muestra intensa fluorescencia en la porción basal del epitelio tubular y en sus regiones apicales, pudiendo incluso observarse en detalle los filamentos de actina perfectamente ordenados, indicando que la actina está correctamente polimerizada; además, se pueden observar los túbulos bien redondeados u ovalados, perfectamente delimitados, y con un ribete en cepillo continuo; entre la delimitación de la parte basal y las microvellosidades, se observa a

lo largo de toda la luz tubular, una distancia uniforme que equivale a una uniformidad en el tamaño y morfología de las células epiteliales que revisten el túbulo. La tinción de núcleos con DAPI (azul) se utilizó para visualizar las células que componen los túbulos.

Por el contrario, en el tejido renal que muestra daño tubular la tinción con Faloidina-Alexa 568 delimita la basal de cada túbulo renal pero no se identifican vellosidades en la región interna de los mismos, los túbulos presentan un aspecto más redondeado y ligeramente festoneado; además, la actina pierde su disposición en filamentos y se agrupa formando acúmulos con aspecto de colapsamiento y no filamentos ordenados, como ocurría en el tejido renal no afectado. Además, es importante notar que la intensidad de fluorescencia es menor en las secciones de tejido dañado debido a que la Faloidina-Alexa 568 sólo tiñe actina polimerizada, no actina total y no identifica la actina que no se encuentra en esta forma (actina monomérica o G-actina)



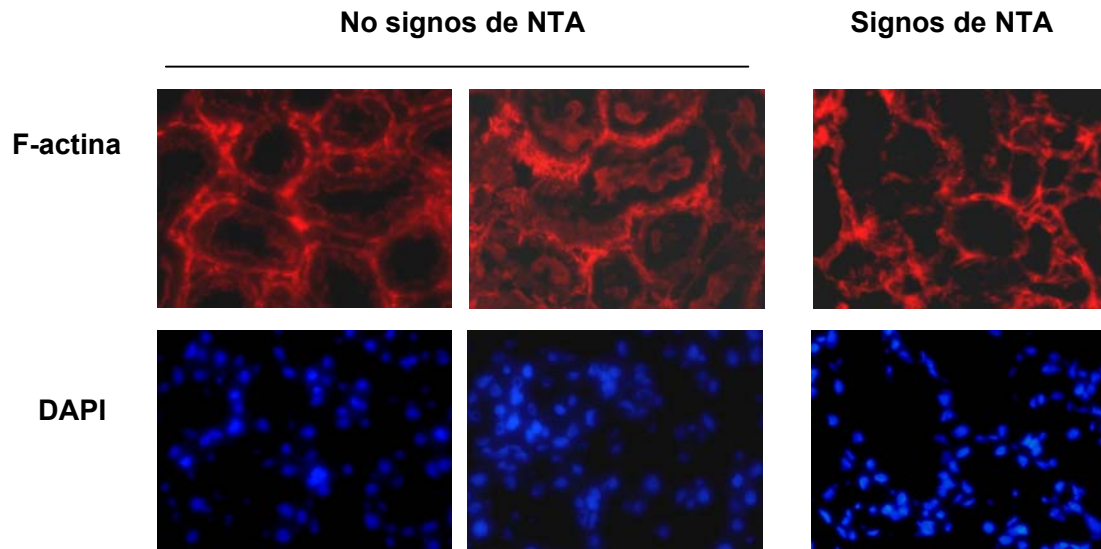


Figura 34. Tinción con Faloidina-Alexa 568 de biopsias renales humanas. A la izquierda podemos observar una buena delimitación tubular y unas microvellosidades uniformes y continuas por una polimerización correcta de actina y su disposición en filamentos, en zonas de tejido renal que no muestran NTA. En la columna central incluso podemos observar en detalle la morfología ordenada y en aguja de los filamentos de actina polimerizada. A la derecha, en otra área de la misma sección de tejido pero que muestra signos de NTA, podemos observar un patrón fluorescence muy diferente, con pérdida de microvellosidades y disposición de la actina colapsada en acúmulos. (Magnificación x400).

## **DISCUSIÓN**

El riñón es un órgano complejo de importancia vital. La principal función renal es la de filtración del torrente sanguíneo, para lo cual es requerida una adecuada vascularización. Cuando existe alguna alteración que disminuya el aporte sanguíneo al riñón, se produce un descenso brusco e importante en la filtración glomerular que tiene como traducción clínica una situación conocida como fracaso renal agudo (FRA) [6].

El FRA afecta a un elevado porcentaje de pacientes hospitalizados y muestra una elevada mortalidad principalmente entre los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos. Además, la supervivencia y recuperación de estos pacientes conlleva un alto costo a los sistemas sanitarios. En los últimos cincuenta años, las características y perfiles de los pacientes que sufren FRA han cambiado mucho. Sin embargo, muy poco se ha avanzado para incrementar la supervivencia de los mismos o en terapias efectivas para su recuperación [48].

Este deterioro de la función renal viene mediado por cambios en el metabolismo, la morfología y la funcionalidad de las células que recubren los túbulos proximales, originados por la disminución del aporte de oxígeno y de nutrientes. Esta alteración en el aporte de nutrientes y oxígeno puede derivarse de situaciones de isquemia u

otras etiologías que resulten en una disminución del aporte sanguíneo.

Entre los cambios metabólicos producidos destacan las alteraciones en los niveles de ATP, la generación de ROS y los cambios en los niveles de calcio intracitoplasmáticos. Los cambios morfológicos incluyen la pérdida de la polaridad celular y de las microvellosidades apicales, modificaciones en uniones intercelulares y a membrana basal y redistribución de los componentes del citoesqueleto. Las alteraciones en la funcionalidad incluyen pérdida de la impermeabilidad del epitelio y pérdida de la regulación del tráfico de sustancias. Todos estos cambios se observan en mayor o menor extensión en función de la severidad y duración de la isquemia [49].

Muchos han sido los estudios realizados en animales en torno a las consecuencias de la isquemia/reperfusión renal [4], utilizando modelos *in vivo* de I/R en rata y ratón similares al disponible en nuestro laboratorio [22].

En estos modelos se han descrito por primera vez la mayoría de las alteraciones morfológicas y funcionales anteriormente mencionadas. Sin embargo, a la hora de realizar estudios a nivel celular y molecular estos modelos presentan limitaciones. Por ello,

para una mejor comprensión de los mecanismos intracelulares que median el daño renal durante la isquemia/reperfusión, en nuestro laboratorio hemos establecido y caracterizado un modelo *in vitro* de hipoxia/reoxigenación, que reproduce lo más fielmente posible tanto los estímulos como los efectos observados durante la isquemia/reperfusión subletal *in vivo* [23].

Mediante este modelo hemos identificado algunas de las rutas de señalización intracelulares iniciadas por falta de oxígeno y nutrientes y responsables de los efectos observados. Entre estas rutas se encuentra la integrada y regulada por isoformas de la familia Proteín Quinasa C (PKC), objeto de estudio de esta tesis [33].

Así, en este trabajo hemos estudiado el papel de dos isoformas de la familia PKC en el daño tubular causado por hipoxia/reoxigenación en células HK-2, la isoforma clásica PKC $\alpha$  y la isoforma atípica PKC $\zeta$ .

Wetsel y col. 1992, demostraron que miembros de la familia de PKC están expresados en todos los órganos y tejidos del organismo, si bien no todas las isoformas están presentes en todos los tejidos. Así mismo, los efectos de las distintas isoformas de PKC

varían para una misma isoforma en diferentes tipos celulares y/o bajo diferentes estímulos [50]. De hecho, estudios recientes demuestran el papel dual de la familia de PKC en el riñón bajo condiciones de isquemia/reperfusión: algunas isoformas median daño mientras otras mediarían protección y/o recuperación [51]. Nosotros determinamos mediante inmunoblot cuales de las isoformas de PKC se expresaban en nuestra línea de células epiteliales tubulares HK-2. El resultado mostró que las tres subfamilias de PKC estaban expresadas en nuestra línea celular, si bien la expresión mayoritaria correspondía a PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$ , y la expresión de ambas isoformas no se alteraba bajo condiciones de H/R. Por el contrario, Wang y col., describieron en células endoteliales (MLEC) que tras la hipoxia/reoxigenación se producía una inducción de PKC y más concretamente de las isoformas PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$ , durante la reoxigenación [52]. Padanilam y col. 2001, comprobaron en riñones de rata, mediante inmunohistoquímica, que la distribución subcelular de estas dos isoformas de PKC se modificaba bajo condiciones de isquemia/reperfusión. Así, todos estos resultados ponen de manifiesto una vez más que la actividad, localización y muy probablemente función de distintas isoformas de PKC es dependiente del tipo celular estudiado.

## **REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PKC $\alpha$ Y SUS EFECTOS EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN**

Una vez demostrado que las células HK-2 sometidas a hipoxia/reoxigenación expresaban de forma notable PKC $\alpha$  estudiamos, mediante inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular, si la hipoxia/reoxigenación producía modificaciones en la distribución subcelular de esta isoforma clásica de PKC.

Nuestros resultados indicaban una clara traslocación de PKC $\alpha$  del citoplasma a la membrana plasmática en tiempos tempranos de reoxigenación, entre 30 minutos y 2 horas de reoxigenación. Como era esperable, esta traslocación no sucedía cuando se trataban las células durante la reoxigenación con un inhibidor específico para isoformas clásicas de PKC, con especial afinidad para PKC $\alpha$ , el Gö6976. Este inhibidor ha sido ampliamente utilizado en distintos tipos de células, de origen epitelial y no epitelial: caco 2, fibroblastos, Sf9, etc., demostrando siempre su efectividad para inhibir PKC $\alpha$  [53 y 54]. En presencia de Gö6976, PKC $\alpha$  permanece en el citoplasma durante toda la reoxigenación.

En consonancia con estos resultados, Padanilam y col. 2001, demostraron mediante inmunoblot e inmunohistoquímica, utilizando

un modelo *in vivo* de I/R en ratas Sprague Dawley similar al modelo *in vivo* utilizado en nuestro laboratorio pero con un tiempo de isquemia de 60 minutos, que el riñón sometido a isquemia/reperfusión muestra expresión de PKC $\alpha$  en las células epiteliales de sus túbulo proximales, y que esta isoforma modifica su patrón inmunohistoquímico, según el tiempo y severidad del daño isquémico. Así, demostraron que PKC $\alpha$  se expresa en membrana plasmática desde 30 minutos de isquemia y hasta un día post-isquemia, manteniendo esta localización en las células menos dañadas y traslocándose al núcleo al cabo de siete días en las células dañadas. La mayor duración de la traslocación de PKC $\alpha$  a membrana en el tiempo, respecto a nuestros resultados, puede deberse a la estimación en lisado total de riñón y a una severidad mayor del daño tubular, por un tiempo de isquemia más prolongado (60 min. frente a 45 min.).

Como ya se ha mencionado, PKC $\alpha$  es una isoforma de PKC perteneciente a la subfamilia de PKC clásicas. Esta subfamilia de PKC fue la primera descrita y la más extensamente estudiada. El mecanismo de activación y regulación de las isoformas clásicas de PKC definió durante mucho tiempo el mecanismo regulatorio de toda la familia PKC, y ha sido modificado recientemente al determinarse el mecanismo de regulación de isoformas noveles y atípicas.



Es bastante conocido el papel del calcio en la regulación de la activación y traslocación de las isoformas clásicas de PKC (Para revisión véase Kazanietz y col.1999 [32]). Por otro lado se ha descrito que durante la isquemia/reperfusión, en diversos tejidos, se producen alteraciones en los niveles de calcio intracelular, entre otros motivos, como mecanismo regulador de la acidificación del pH intracelular consecuente a isquemia/reperfusión [27, 29, 55, 56 y 57].

Así, nosotros sometimos nuestras células HK-2 a H/R y medimos por citometría de flujo los niveles intracitoplasmáticos de calcio en hipoxia y a distintos tiempos de reoxigenación. El resultado demostró que durante la hipoxia se incrementaban los niveles de calcio intracelular, incremento que se mantenía a los 30 minutos de reoxigenación y comenzaba a retornar a niveles basales a 1 hora de reoxigenación, habiéndolos alcanzado a las 2 horas de reoxigenación. En base a este resultado y al papel demostrado del calcio en la regulación de las isoformas clásicas de PKC, sugerimos que el aumento de calcio intracelular en células HK-2 durante la hipoxia y a tiempos tempranos de reoxigenación, es responsable de la activación y traslocación de PKC $\alpha$  a membrana en células HK-2 sometidas a H/R.

Experimentos con quelantes de calcio (EDTA y EGTA) que demostraran la correlación entre el aumento de calcio intracelular y la traslocación de PKC $\alpha$  en células HK-2 sometidas a H/R no pudieron realizarse por la citotoxicidad que exhibían estos compuestos.

Por otro lado observamos que, a tiempos tempranos de reoxigenación en los que PKC $\alpha$  se traslocaba, se producía una activación por fosforilación de ERK1/2, una proteína de la familia de las MAPK, activación que estimamos mediante inmunoblot con anticuerpo específico anti forma fosforilada (pERK1/2). Muchos autores han relacionado ERK con PKC $\alpha$  en las rutas de señalización intracelular, considerando a ERK1/2 un efector de PKC $\alpha$  [58]. Para elucidar si ERK y PKC estaban relacionadas en nuestro sistema y de qué modo lo hacían, determinamos mediante inmunofluorescencia la traslocación de PKC $\alpha$  en las células HK-2 tras hipoxia/reoxigenación después de haber sido tratadas durante la reoxigenación con UO126, inhibidor específico de ERK1/2. El resultado indicó que en cultivos que habían sido tratados con UO126 se producía una inhibición de la traslocación de PKC $\alpha$  a membrana en la mayoría de las células. Estos resultados sugieren que ERK no sería efector de PKC $\alpha$  como se había propuesto en la literatura y sí sería otro factor regulador de la traslocación de PKC $\alpha$

en células HK-2 durante hipoxia/reoxigenación, entre otros, situándose por encima de esta isoforma de PKC en la cascada de señalización. De hecho, estudios preliminares de nuestro laboratorio no mostrados en este trabajo indican que el tratamiento de células HK-2 sometidas a H/R con Gö6976 no modifica la activación transitoria de ERK1/2 observada en nuestro sistema mediante inmunoblot, confirmando que en nuestro caso ERK1/2 no es efector sino regulador de PKC $\alpha$ .

Ávila-Flores y col 2001, utilizando células epiteliales caninas MDCK y mediante técnicas de inmunoblot y PCR, demostraron que isoformas de la subfamilia clásica de PKC se relacionan con alteraciones en uniones intercelulares y además pueden inducir directamente modificaciones postraduccionales por fosforilación en proteínas de unión a citoesqueleto celular como la  $\alpha$ -actinina e influir así en la contractilidad de los microfilamentos de actina. En base a estas observaciones y dado que en nuestro sistema de células HK-2 sometidas a H/R se producían alteraciones en la morfología celular, decidimos determinar si en nuestro caso PKC $\alpha$  estaba regulando estos cambios morfológicos, estrechamente ligada a rotura de uniones intercelulares y pérdida de impermeabilidad epitelial.

Mediante tinción con Faloidina-Alexa 568, realizamos mediciones de la superficie celular en células HK-2 tras hipoxia y a distintos tiempos de reoxigenación. Nuestros resultados indicaban que desde la hipoxia, las células comienzan a disminuir su superficie celular, alcanzando un máximo de contracción a 30 minutos de reoxigenación y empezando a recuperar su tamaño original a partir de 1 hora de reoxigenación alcanzándolo de nuevo a las 3 horas de reoxigenación. Es importante destacar que los tiempos de contracción celular coinciden con el periodo en que PKC $\alpha$  se encuentra traslocada a la membrana celular. Para confirmar que este efecto se debía a la activación de PKC $\alpha$  y la mediación de ERK en esta activación, realizamos el mismo proceso tras haber tratado las células HK-2 con sus respectivos inhibidores, Gö6976 y UO126. El resultado demostró la eficacia de ambos inhibidores, con mayor eficiencia del Gö6976, impidiendo la contracción celular durante la H/R. De nuevo este resultado confirma que si bien ERK contribuye a la activación de PKC $\alpha$ , no es el único factor implicado en su regulación.

Se ha estudiado extensamente el papel de PKC en relación a las uniones intercelulares, habiéndose encontrado resultados paradójicos que describen la activación simultánea de varias isoformas de PKC con efectos opuestos en el ensamblaje y la

función de las uniones estrechas [59]. En la mayoría de los casos revisados de la literatura, la activación de PKC $\alpha$  se relaciona con rotura de uniones intercelulares, lo que conlleva un aumento de permeabilidad epitelial [60].

Para determinar si en nuestro sistema *in vitro* se alteraba la función de impermeabilidad epitelial realizamos un estudio de la permeabilidad no selectiva de la monocapa epitelial de las células HK-2 tras H/R, por colorimetría, en presencia y ausencia de Gö6976 y UO126. El resultado demostró que la permeabilidad epitelial aumentaba desde los 30 minutos de reoxigenación alcanzando un máximo a las 2 horas. El aumento transitorio de permeabilidad es revertido parcialmente en presencia del inhibidor de ERK, y más significativamente en presencia del inhibidor específico de isoformas clásicas de PKC, demostrando que PKC $\alpha$  está mediando directamente, entre otros factores, la pérdida de integridad del epitelio tubular tras el estímulo isquémico.

Muchos autores han estudiado el papel de PKC $\alpha$  en el desensamblaje de TJ y algunos han propuesto a integrantes específicos de éstas como por ejemplo ZO-1, como dianas específicas de fosforilación para PKC $\alpha$  [59, 61 y 62]. Basándonos en nuestro resultado de permeabilidad epitelial y apoyados en la literatura, nos propusimos demostrar si la rotura de TJ en células

HK-2 sometidas a H/R, implicaba alteraciones en ZO-1 mediadas por PKC $\alpha$ . Para ello realizamos un estudio mediante inmunofluorescencia para PKC $\alpha$  y ZO-1 en células HK-2 tras hipoxia/reoxigenación, de nuevo en presencia y ausencia de Gö6976. Demostramos que durante la reoxigenación y coincidiendo con la traslocación de PKC $\alpha$  a membrana, se producía una discontinuidad en el patrón de tinción de ZO-1 que demostraba una rotura de uniones intercelulares y redistribución de esta proteína. Este efecto era revertido cuando las células eran tratadas con el inhibidor de las isoformas clásicas de PKC. Estos resultados, en consonancia con lo ya publicado, demuestran que la activación de PKC $\alpha$  está regulando la localización de ZO-1 en membrana y por tanto el ensamblaje de TJ, contribuyendo finalmente a la disrupción transitoria de uniones intercelulares descrito en este trabajo.

La rotura de uniones intercelulares contribuye de forma decisiva en el daño producido por la I/R renal en la célula epitelial tubular. Es una de las primeras observaciones morfológicas *in vivo*, junto al aplanamiento celular y la dilatación de la luz tubular. Estos cambios generalmente se van a asociar a rotura de la membrana basal y desprendimiento de las células a la luz tubular en la etapa final. La rotura de las uniones intercelulares supone la pérdida de una de las principales funciones del epitelio tubular, la función de

impermeabilización. El efecto más inmediato de ello es la aparición de un discreto edema en el parénquima renal y la permeación a éste de productos tóxicos desde la luz tubular. Ambos hechos van a contribuir a la atracción de celularidad inflamatoria y a aumentar el daño renal. Además, los cambios en uniones intercelulares va a tener como consecuencia alteraciones a nivel de la comunicación intercelular y del transporte y reabsorción de nutrientes vitales para el organismo a nivel de la célula epitelial tubular proximal.

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran un aumento transitorio en los niveles de calcio intracitoplasmático en células HK-2 durante la hipoxia y tiempos tempranos de reoxigenación. Este aumento intracelular de calcio, junto a una activación de ERK, contribuirían a la activación y traslocación de PKC $\alpha$  del citoplasma a la membrana celular. Esta traslocación coincide en el tiempo con un aumento de la permeabilidad epitelial de la monocapa, debida a la redistribución y retirada de ZO-1 de las TJ mediada por PKC $\alpha$ . Al mismo tiempo, las células sufren modificaciones en su morfología, disminuyendo su superficie celular debido a una contracción celular también mediada por PKC $\alpha$ . Todos estos efectos son revertidos con el uso de UO126 durante la hipoxia, pero se inhiben mucho más eficazmente con el uso de Gö6976, inhibidor específico de PKC $\alpha$ , confirmando que en nuestro

sistema PKC $\alpha$  es efector de ERK1/2 a diferencia de la mayor parte de los trabajos publicados.

El siguiente paso en nuestro estudio era demostrar la correlación de nuestros resultados *in vitro* con casos reales de muestras humanas que presentan NTA. Para ello utilizamos varios casos de biopsias humanas de riñones que mostraban cambios morfológicos de NTA por disminución del aporte sanguíneo renal por diferentes motivos, como se explicó en Materiales y Métodos. El resultado de la inmunohistoquímica mostró un “refuerzo” de membrana positivo para PKC $\alpha$  en las células con alteraciones morfológicas análogas a las descritas anteriormente, a saber, rotura de uniones con las células vecinas y redondeamiento celular. En células con similares alteraciones también observamos una alteración en el patrón uniforme y lineal de distribución de ZO-1, así como con una retirada de la membrana de E-cadherina y  $\beta$ -catenina en células con similares alteraciones. Estos resultados indican una correlación positiva entre la activación y traslocación de PKC $\alpha$  *in vivo* con el desarrollo de daño tubular isquémico. Así, los datos anteriores sugieren que la activación de PKC $\alpha$  podría identificarse como marcador pronóstico de desarrollo de NTA tras isquemia.



## REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PKC $\zeta$ Y SUS EFECTOS EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN

Al igual que para PKC $\alpha$ , Padanilam, 2001, también demostró las alteraciones en la expresión y localización de PKC $\zeta$  en un modelo *in vivo* de I/R en rata tras 60 minutos de isquemia. La expresión de esta isoforma también aumentaba desde los 30 minutos de isquemia y se mantenía elevada hasta un día post-isquemia. PKC $\zeta$  se localizaba basalmente en células epiteliales normales, y se localizaba apicalmente en las células dañadas; tras 7 días de reperfusión su expresión se localizaba en la membrana plasmática de las células con signos de regeneración. En nuestro modelo *in vitro*, PKC $\zeta$  se traslocaba del citoplasma a la membrana entre 1 y 3 horas de reoxigenación, lo que comprobamos mediante Inmunoblot, Inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular. Además esta traslocación era inhibida cuando sometíamos las células a un tratamiento con un inhibidor miristoilado específico de esta isoforma, cuya eficacia para inhibir PKC $\zeta$  ya había sido descrita en la literatura por muchos autores [63 y 64].

Sobre las posibles vías de activación de las isoformas atípicas de PKC se sabe muy poco. Dlugosz y col. 2002, utilizando células mesangiales cultivadas en un medio con niveles elevados de

glucosa, observó que PKC $\zeta$  se asociaba a citoesqueleto y era causante del desensamblaje de actina y alteraciones en la contractilidad de estas células. En este trabajo, utilizando el inhibidor miristoilado de esta isoforma atípica de PKC e inhibidores de PI3K, proponen a esta quinasa como proteína activadora de PKC $\zeta$ . Esta hipótesis también ha sido sustentada por otros autores en la literatura [65 y 66] y datos preliminares de nuestro laboratorio indican que en células HK-2 sometidas a H/R, la ruta de señalización PI3K/AKT se activa tempranamente en reoxigenación (30 minutos-1 hora), correlacionándose en el tiempo con la traslocación de PKC $\zeta$  a membrana aquí descrita [67].

Nuestro modelo *in vitro* de HK-2 sometidas a H/R es un sistema en el que se genera estrés oxidativo, así que propusimos la producción de radicales libres de oxígeno como un factor regulador de esta isoforma de PKC. Para demostrar esta hipótesis realizamos una inmunofluorescencia de células HK-2 sometidas a un tratamiento prooxidante con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y observamos que efectivamente la traslocación de PKC $\zeta$  a membrana celular en estas condiciones era muy llamativa. Más aún, comprobamos que el uso de un antioxidante, BHA, revertía o impedía esta traslocación. El uso de BHA nos demuestra que en nuestro modelo *in vitro* de H/R, la

traslocación de PKC $\zeta$  a membrana celular viene mediada, al menos en parte, por la generación de especies reactivas de oxígeno.

Al igual que para PKC $\alpha$ , también hemos estudiado el efecto de PKC $\zeta$  en las uniones intercelulares. Dodane y col. 1996, utilizando células MDCK y Caco2 observaron que PKC $\zeta$  colocalizaba con ZO-1 en uniones intercelulares; Fleegal y col. 2005, observaron en células endoteliales de la microvasculatura cerebral en ratas, que bajo condiciones de H/R, PKC $\zeta$  modulaba el ensamblaje de TJ y contribuía al aumento de la permeabilidad endotelial; Stuart y col. 1995, describieron resultados similares consistentes con fosforilación de ZO-1 por PKC $\zeta$  en células MDCK bajo condiciones de medio bajo en calcio; Avila-Flores y col. 2001, concluyeron que en células MDCK en medio con niveles bajos de calcio, PKC $\zeta$  fosforila ZO-2 modulando el desensamblaje de TJ. En consonancia con nuestros resultados, Banan y col. 2000 A, demostraron en células Caco2 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la rotura de uniones intercelulares dependiente de PKC $\zeta$ .

*In vivo*, otros autores han propuesto a PKC $\zeta$  además como la principal mediadora del correcto ensamblaje de TJ utilizando embriones de ratón y observando el efecto de la inhibición de esta isoforma de PKC en la formación de la barrera epidérmica [61]. Estas observaciones *in vivo* coinciden con nuestros resultados que

correlacionan la localización de PKC $\zeta$  en membrana de células tubulares con uniones intercelulares alteradas en muestras humanas, tal y como se comentará posteriormente.

Como hemos demostrado en este trabajo, la rotura de TJ conduce a un aumento de permeabilidad en las células en cultivo el cual puede ser cuantificado por colorimetría. Para comprobar si en nuestro sistema PKC $\zeta$  estaba mediando las alteraciones en integridad de monocapa, realizamos estudios de permeabilidad análogos a los realizados para PKC $\alpha$  en células HK-2 sometidas a H/R, en las que determinamos que la ésta aumentaba a tiempos tempranos de reoxigenación. Por ello tratamos las células con el inhibidor miristoilado de PKC $\zeta$  y encontramos que el aumento de permeabilidad de la monocapa no se revierte significativamente por el uso de éste. Estos resultados demuestran que la pérdida transitoria de integridad epitelial descrita en este trabajo no está regulada directamente por la activación de PKC $\zeta$ .

Crean y col 2004, usando células HeLa y provocando modificaciones en los niveles de calcio observaron que se producía un redondeamiento de las células y alteraciones en la superficie celular. Demostraron en su trabajo que las alteraciones en la concentración de calcio intracitoplasmático activaba PLC y ésta a

su vez se traducían en la activación de canales iónicos PKC-dependientes. Una de las PKC implicadas en este efecto era PKC $\zeta$ , la cual además contribuía al redondeamiento de las células por inducir la despolimerización de F-actina del citoesqueleto. En nuestro sistema *in vitro* también observábamos cambios similares en la morfología celular, mediados en parte por PKC $\alpha$ . Para determinar si PKC $\zeta$  también contribuía a estas alteraciones morfológicas, realizamos una tinción de actina con Faloidina-Alexa 568 y medimos la superficie celular, en células HK-2 sometidas a H/R, en presencia y ausencia del inhibidor miristoilado de PKC $\zeta$ . Los resultados demostraron que la contracción celular que se observa en nuestro protocolo de H/R no venía mediada directamente por esta isoforma atípica de PKC.

Muchos son los trabajos que han estudiado la interacción de distintas isoformas de PKC con diferentes componentes de citoesqueleto, responsable del mantenimiento de la morfología celular, observándose distintos resultados en distintas líneas celulares y bajo diferentes estímulos. Una de las primeras alteraciones en la I/R es la pérdida de microvellosidades o ribete en cepillo que se observa en las células epiteliales proximales [28y 72]. En estas vellosidades se reabsorbe la mayor parte del sodio. Kellerman y col. 1992 y Molitoris 2004, han descrito que la pérdida

de las vellosidades se debe a una despolimerización de actina mediada por PKC en un modelo celular con Citocalasina D, compuesto que desorganiza el citoesqueleto de actina. Esta pérdida de ribete en cepillo va a hacer que no se reabsorba el sodio necesario lo que supondrá una hiponatremia importante que puede provocar edemas, hipotensión y alteraciones metabólicas y nutricionales, entre otras. Banan y col. 2002 A y 2002 B, han estudiado el papel de PKC $\zeta$  mediando protección de la integridad de los microtúbulos en dos líneas diferentes de células epiteliales: Caco 2 y HeLa, observando que bajo condiciones pro-oxidantes la activación de PKC $\zeta$  protege la rotura de los microtúbulos de forma EGF-dependiente, manteniendo así la integridad del citoesqueleto y la integridad de la barrera epitelial gastrointestinal. Menard y col 1991, demostraban que la actividad PKC mediaba disrupción de monocapa epitelial en células epiteliales de intestino de cerdo LLC-PK1. Banan y col 2003, postulan que ante el aumento de NOS, PKC $\zeta$  protegía la tubulina de la despolimerización de forma EGF-dependiente en una ruta que implicaba a NF $\kappa$ B como mediador inflamatorio del daño. Este mismo autor implica a PKC $\lambda$  como mediadora de la rotura de microtúbulos y desestabilizadora de tubulina en caco 2 tras daño por estrés oxidativo y en las mismas células y bajo el mismo estímulo, señala a PKC $\theta$  como mediadora de protección de microtúbulos [76 y 77]. Todos estos datos

bibliográficos apoyan el papel de distintas isoformas de PKC atípicas, incluida PKC $\zeta$  en las alteraciones que sufre el citoesqueleto celular bajo estímulos de estrés.

Como se ha mencionado en “introducción”, los microtúbulos son un componente fundamental del citoesqueleto destinados al mantenimiento de la estructura y la integridad celulares, el transporte intracelular y la división celular. Su componente mayoritario es la tubulina. Las unidades de tubulina están en el citoplasma y su ensamblaje y desensamblaje se regula por modificaciones post-traduccionales que incluyen fosforilación y acetilación, entre otras y pueden estar mediadas por actividad PKC [19].

En este trabajo hemos determinado el efecto de la H/R sobre los microtúbulos realizando Inmunofluorescencia para tubulina y PKC $\zeta$  en células HK-2 sometidas a H/R, en presencia y ausencia tanto del inhibidor miristoilado de PKC $\zeta$  como del antioxidante BHA. El resultado fue que coincidiendo con los tiempos de reoxigenación en que se produce traslocación de PKC $\zeta$  a membrana celular, se produce un colapsamiento de la red de tubulina celular y este efecto se revierte en presencia tanto del inhibidor miristoilado como en presencia de BHA.

El desensamblaje de los microtúbulos junto a la rotura de uniones intercelulares mediada por PKC $\alpha$ , tal y como describimos anteriormente, conlleva pérdida de la estructura y muy probablemente de la correcta función epitelial por alterarse el transporte intracelular de los productos de reabsorción y secreción. Estos procesos contribuyen a rescatar sustancias vitales como la glucosa y diversos aminoácidos y aseguran el correcto balance de electrolitos como sodio, potasio, cloro o hidrogeniones, en el organismo, que es una de las funciones más importantes que realiza el riñón para mantener la homeostasis corporal.

La vimentina es otro componente importante del citoesqueleto que forma una trama citoplasmática de filamentos y organiza las organelas citosólicas, mantiene la estructura nuclear e interacciona con los microtúbulos de tubulina y los microfilamentos de actina, para mantener la forma celular. Por todo ello y como se comentó en introducción, participa en los procesos de migración celular, contribuye al mantenimiento de la estabilidad celular en situaciones de estrés mecánico, proporciona un sustento a todo el tráfico de membrana incluyendo las vesículas de secreción y participa en ciclo celular [78]. Además, se ha descrito que interacciona con otras proteínas de señalización como PKC. Su papel en nuestro sistema es importante porque como hemos descrito anteriormente, las células HK-2 sometidas a H/R sufren alteraciones a nivel de uniones



intercelulares, de unión a membrana basal, en el citoesqueleto de actina y alteraciones morfológicas como consecuencia de la pérdida de estabilidad frente a estrés mecánico, en la que juega un papel muy importante el esqueleto de vimentina y su correcta funcionalidad.

Runembert y col. 2001, describen que en riñones normales la vimentina se localiza fundamentalmente en los vasos glomerulares y en las células intersticiales. Durante el desarrollo embrionario se localiza en vasos glomerulares y células intersticiales y además en las células epiteliales tubulares. En las células epiteliales tubulares del riñón adulto sólo se puede observar expresión de vimentina en aquellas que se recuperan tras daño isquémico o tóxico. La vimentina también se expresa en células de carcinoma renal y en las células epiteliales tubulares renales en cultivo. Este grupo observó que cambios en la expresión de vimentina afectaban a la localización y actividad del cotrasportador Na/Glucosa en dominios de membrana específicos denominados “balsas lipídicas o lipid rafts”, aunque estas alteraciones en vimentina no afectan a la morfología celular (Para revisión ver Runembert y col. 2001 [79]).

En este trabajo realizamos inmunofluorescencia para PKC $\zeta$  y vimentina en células HK-2 sometidas a H/R, en presencia y ausencia del inhibidor miristoilado de PKC $\zeta$  y del antioxidante BHA y comprobamos que entre 1 y 3 horas de reoxigenación,

coincidiendo con la traslocación de PKC $\zeta$  a membrana celular, se produce un colapsamiento de la trama de filamentos intermedios de vimentina, efecto que se ve inhibido por el uso de ambos inhibidores. Así, nuestros resultados, situados en el contexto de los estudios realizados por otros autores, sugerirían que el colapsamiento de vimentina dependiente de PKC $\zeta$  y su activación por especies reactivas de oxígeno contribuiría a las alteraciones en uniones estrechas y morfología celular observadas durante H/R, y muy probablemente participarían además en alteraciones funcionales de las células HK-2 en respuesta a isquemia. Las modificaciones en la organización de microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios de vimentina, por un lado afectarían el transporte interno en las células epiteliales haciendo fallar su gran labor reabsortiva, y por otro favorecerían la rotura de las uniones intercelulares mediante tracción mecánica. En este sentido, datos preliminares de nuestro laboratorio indican que en el modelo *in vitro* de H/R en células epiteliales tubulares de rata NRK-52E la captación de BSA del medio (reabsorción de proteínas extracelulares) está disminuída.

El principal y más estudiado componente del citoesqueleto es la actina, principal regulador de la morfología celular y la contractilidad. La actina en su función contráctil interacciona con la

miosina. En su modulación intervienen procesos de fosforilación a cargo de la quinasa de la cadena ligera de la miosina o MLCK, principalmente. Cuando esta enzima se fosforila se activa la cadena ligera de la miosina MLC20 lo que conlleva la activación de una ATPasa miosina-activada que implica la interacción de la miosina con la actina y como consecuencia la contracción celular. (Para revisión ver Dlugosz y col., 2002, [64]).

Dlugosz y col., 2002, demostraron en células mesangiales humanas en cultivo bajo condiciones de altos niveles de glucosa, que la MLC20 es una diana de fosforilación para PKC $\zeta$ , y que PKC $\zeta$  también podía fosforilar directamente actina en estas células provocando así desensamblaje de actina y alteraciones morfológicas. Y que la activación de PKC $\zeta$  en altos niveles de glucosa podría estar mediada por PI3K. Esta quinasa también es propuesta como activador de PKC $\zeta$  por Di Liberto y col 2003, que también señala a PKC $\zeta$  como mediador de contracción en células uterinas, por fosforilación directa de actina por PKC $\zeta$  vía PI3K. En este sentido, ya hemos mencionado anteriormente que en nuestro sistema de H/R en células HK-2 se produce una activación de la ruta PI3K/AKT que se correlaciona en el tiempo con la activación y traslocación de PKC $\zeta$  [67]. Otros autores también han visto traslocación de esta isoforma atípica de PKC a citoesqueleto asociándose con actina en linfocitos Gomez y col. 1995, y en

endotelio de arteria pulmonar Damron y col 1998, en este último caso relacionada con contracción celular. Uberall y col 1999 observó similares acciones de PKC $\zeta$  en fibroblastos (NIH3T3), en presencia y ausencia del ppseudosustrato inhibidor de PKC $\zeta$ , mediando ésta el desensamblaje de actina con participación de la Ras. En este caso la activación de PKC $\zeta$  conducía a una despolimerización de fibras de estrés y a una reorganización de citoesqueleto en filopodio que resultaba finalmente en migración celular.

En este trabajo realizamos inmunohistoquímica en muestras de tejido renal humano que habían sufrido daño isquémico o disminución del riego habitual de diversa etiología, para demostrar la expresión y localización de PKC $\zeta$  en casos reales. Nuestros resultados demostraron que en aquellas células que se observaba un mayor daño morfológico se expresaba PKC $\zeta$  en la membrana celular. De hecho, realizando una tinción con Faloidina en muestras renales humanas procesadas por congelación y que mostraban signos de NTA, pudimos observar un colapsamiento del citoesqueleto de actina en las células dañadas, siendo muy evidente la pérdida de microvellosidades apicales en los túbulos proximales y la desestructuración de los microfilamentos de actina, confirmando que las alteraciones morfológicas y de citoesqueleto de actina

identificadas *in vitro* y dependientes de PKC $\zeta$  se observan también *in vivo*.

Los estudios de expresión y localización de PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  en biopsias humanas y su correlación con la existencia de NTA descritos en este trabajo, en nuestro conocimiento, son los primeros registrados en la bibliografía.

Estudios más extensos en el número y características de las muestras que hagan posible realizar estudios estadísticos, nos permitirían identificar a estas dos isoformas de PKC, PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$ , como marcadores pronósticos de daño tubular tras un periodo de isquemia. Esta identificación y su valoración de forma rutinaria en biopsias renales puede ser muy útil en el contexto de un trasplante renal, por ser una estimación de la viabilidad, funcionalidad y evolución del órgano, previa a que sea injertado y en periodos iniciales post-trasplante.

Además, aunque no se ha mostrado en este trabajo, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que los cambios morfológicos de rotura de TJ y reorganizaciones de citoesqueleto, correlacionados con la expresión de PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$ , también se observan en biopsias hepáticas humanas de órganos pretrasplante. Así, las aproximaciones experimentales aquí utilizadas y las correlaciones obtenidas, pueden tener aplicabilidad y ser extensibles a otros órganos en los que la isquemia produzca un

daño estructural y morfológico importante. Esta situación la encontraremos siempre en maniobras de transplante.

Todas las alteraciones en las células epiteliales tubulares descritas en este trabajo desembocarían en la situación clínica de FRA que puede ser tan grave como para llevar a la muerte a un paciente con daño isquémico renal de cualquier etiología. Su severidad vendrá determinada por la gravedad de la afectación a nivel tubular y puede variar desde un simple descenso de la filtración glomerular reversible hasta situaciones de gravedad vital como el edema agudo de pulmón, insuficiencia cardiaca, alteraciones neurológicas derivadas de un inadecuado balance en electrolitos como potasio, sodio y calcio, alteraciones del pH sanguíneo, alteraciones nutricionales y hormonales (EPO) y finalmente un fracaso multiorgánico y la muerte.

Estos hechos justificarían el estudio de los mecanismos que median la NTA aquí presentado, con la finalidad de identificar marcadores de daño que puedan constituirse además en nuevas dianas de actuación terapéutica y así mejorar la escasa supervivencia de estos pacientes.

## **CONCLUSIONES**



1.- La I/R subletal en riñón produce desprendimiento de las células del epitelio tubular proximal renal que se identifica en clínica con el término de NTA. Tanto los estímulos como los efectos observados en el epitelio tubular *in vivo* en este proceso pueden ser mimetizados *in vitro* mediante un sistema de H/R que implica cambios en la tensión de oxígeno y disponibilidad de nutrientes y produce desprendimiento celular y pérdida de integridad de la monocapa epitelial.

2.- Distintas isoformas pertenecientes a las tres subfamilias de PKC, a saber: PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , PKC $\eta$ , PKC $\epsilon$  y PKC $\zeta$ , se expresan en todas las células del epitelio proximal tubular humano HK-2, siendo PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  las que presentan mayores niveles. La expresión de estas isoformas no se altera durante la H/R.

3.- En células HK-2 sometidas a H/R, PKC $\alpha$  sufre una activación y traslocación a membrana en tiempos muy tempranos de reoxigenación. Esta activación y traslocación viene mediada por la elevación de los niveles intracelulares de calcio y la activación de ERK1/2, entre otros factores.

4.- La activación y traslocación de PKC $\alpha$  es responsable de la contracción celular, de la rotura de uniones intercelulares y de la

pérdida de integridad de monocapa que se observa en tiempos tempranos de reoxigenación en células HK-2 sometidas a H/R.

5.- En muestras humanas con NTA de etiología isquémica, la traslocación a membrana apical y basolateral de PKC $\alpha$  se correlaciona con las células epiteliales del túbulo que exhiben daño. Estas células dañadas también presentan alteraciones en la distribución de proteínas integrantes de uniones intercelulares (ZO-1, E-cadherina,  $\beta$ -catenina).

6.- PKC $\zeta$  se activa y trasloca a membrana durante la reoxigenación más tardíamente que PKC $\alpha$  en células HK-2 sometidas a H/R. Esta activación y traslocación de PKC $\zeta$  viene mediada, entre otros, por la generación de estrés oxidativo.

7.- La activación y traslocación de PKC $\zeta$  es responsable del colapsamiento de los principales componentes de citoesqueleto celular (filamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios de vimentina). Ello contribuiría de forma indirecta a la disrupción de uniones intercelulares y pérdida de integridad de monocapa.

8.- En muestras humanas con NTA de origen isquémico, la traslocación de PKC $\zeta$  a membrana se correlaciona con alteraciones morfológicas en las células del epitelio tubular proximal. Estas alteraciones serían consecuencia del colapsamiento del citoesqueleto de actina, entre otros componentes, y contribuirían al daño tubular en respuesta a I/R.

9.- Los resultados mostrados en este trabajo sugieren que PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$  podrían identificarse como marcadores pronósticos de daño tubular tras una situación de isquemia renal. Además, los marcadores de daño así identificados, PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$ , podrían constituirse en nuevas dianas para el establecimiento de estrategias terapéuticas más eficaces en situaciones de FRA de etiología isquémica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1]** Fisiología médica. WF. Ganong. 1994. Ed Manual Moderno
- [2]** Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. N Engl J Med. 1996 May 30; 334(22):1448-60.
- [3]** Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. J Clin Invest. 2004 Jul; 114(1):5-14.
- [4]** Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV. Animal models of acute tubular necrosis. Curr Opin Crit Care. 2002 Dec; 8(6):526-34.
- [5]** Rubin's Pathology, 2004. Rubin E., RUBIN R., Gorstein F., Schwarting R., Strayer D. ED Lippincott Williams y Wilkins
- [6]** Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. Am J Physiol Renal Physiol. 2000 Jan; 278(1):F1-F12.
- [7]** Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. Curr Opin Pediatr. 2005 Apr; 17(2):193-9.
- [8]** Liaño F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. Kidney Int. 1996 Sep; 50(3):811-8.
- [9]** Bush KT, Keller SH, Nigam SK. Genesis and reversal of the ischemic phenotype in epithelial cells. J Clin Invest. 2000 Sep; 106(5):621-6.

- [10]** Racusen LC. The histopathology of acute renal failure. *New Horiz.* 1995 Nov; 3(4):662-8.
- [11]** Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun; 14 Suppl 1:S55-61.
- [12]** Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol.* 2006; 248:261-98.
- [13]** Nelson WJ. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science.* 1992 Nov 6; 258(5084):948-55.
- [14]** Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;213:123-61.
- [15]** van Hengel J, Gohon L, Bruyneel E, Vermeulen S, Cornelissen M, Mareel M, von Roy F. Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of alpha-catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes. *J Cell Biol.* 1997 Jun 2; 137(5):1103-16.
- [16]** Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol.* 1998 Jan; 274(1 Pt 2):F1-9.
- [17]** Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol.* 1998 Sep; 275(3 Pt 1):C711-31

**[18]** Ramaekers FC, Bosman FT. The cytoskeleton and disease. *J Pathol.* 2004 Nov; 204(4):351-4.

**[19]** Idriss HT. Phosphorylation of tubulin tyrosine ligase: a potential mechanism for regulation of alpha-tubulin tyrosination. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2000 May; 46(1):1-5.

**[20]** Kumarapeli AR, Wang X. Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Dec; 37(6):1097-109.

**[21]** Izawa I, Inagaki M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 2006 Mar; 97(3):167-74.

**[22]** Molina A, Ubeda M, Escribese MM, Garcia-Bermejo L, Sancho D, de Lema P, Liano F, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Mampaso F. Renal ischemia/reperfusion injury: functional tissue preservation by anti-activated  $\beta_1$  integrin therapy. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Feb; 16(2):374-82. Epub 2004 Dec 8

**[23]** Saenz-Morales D, Escribese MM, Stamatakis K, Garcia-Martos M, Alegre L, Conde E, Perez-Sala D, Mampaso F, Garcia-Bermejo ML. Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress. *Exp Cell Res.* 2006 Nov 15; 312(19):3711-27. Epub 2006 Sep 12.

**[24]** Dagher PC. Modeling ischemia in vitro: selective depletion of adenine and guanine nucleotide pools. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Oct; 279(4):C1270-7.

**[25]** Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Feb; 282(2):C227-41.

**[26]** Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15; 61(3):461-70.

**[27]** Logue SE, Gustafsson AB, Samali A, Gottlieb RA. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Jan; 38(1):21-33. Epub 2004 Dec 13.

**[28]** Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004 Aug; 66(2):871-83

**[29]** Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 1998 Mar; 29(3):705-18.

**[30]** Vanderklish PW, Bahr BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol.* 2000 Oct; 81(5):323-39.

**[31]** Kribben A, Wieder ED, Wetzels JF, Yu L, Gengaro PE, Burke TJ, Schrier RW. Evidence for role of cytosolic free calcium in hypoxia-induced proximal tubule injury. *J Clin Invest.* 1994 May; 93(5):1922-9.

**[32]** Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 1999 Oct;13(13):1658-76.



**[33]** Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol.* 1992 Apr; 117(1):121-33.

**[34]** Koivunen J, Aaltonen V, Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.* 2006 Apr 8; 235(1):1-10.

**[35]** Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest.* 2003 Apr; 111(7):1057-64.

**[36]** Padanilam BJ. Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia. *Kidney Int.* 2001 May; 59(5):1789-97.

**[37]** Perez-Moreno M, Avila A, Islas S, Sanchez S, Gonzalez-Mariscal L. Vinculin but not alpha-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J Cell Sci.* 1998 Dec; 111:3563-71.

**[38]** Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang L, Keshavarzian A. PKC-zeta is required in EGF protection of microtubules and intestinal barrier integrity against oxidant injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 May; 282(5):G794-808.

**[39]** Tirupathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability.

Vascul Pharmacol. 2002 Nov; 39(4-5):173-85.

**[40]** Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby MG, Cameron IT, Fleming TP. Relative contribution of cell contact pattern, specific PKC isoforms and gap junctional communication in tight junction assembly in the mouse early embryo. *Dev Biol.* 2005 Dec 1; 288(1):234-47.

**[41]** Avila-Flores A, Rendon-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, Gonzalez-Mariscal L. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J.* 2001 Dec 1; 360(Pt 2):295-304.

**[42]** La Porta CA, Comolli R. Biochemical and immunological characterization of calcium-dependent and -independent PKC isoenzymes in renal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Mar 31; 191(3):1124-30.

**[43]** Alberti P, Bardella L, Comolli R. Ribosomal protein S6 kinase and protein kinase C activation by epidermal growth factor after temporary renal ischemia. *Nephron.* 1993; 64(2):296-302.

**[44]** Lambert D. Calcium signaling protocols. *Methods in molecular biology.* Human Press. 1999.

**[45]** Caloca MJ, Fernandez N, Lewin NE, Ching D, Modali R, Blumberg PM, Kazanietz MG. Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17; 272(42):26488-96.

**[46]** Salvado-Usach M. T., Matinez-gonzalez S., Alvaro-Naranjo T., Barbera-Marro M. M., Risa-Royo R. M., Suñe-Martin A., Tomas-Arasa B., Bosch-princep R. : Tecnicas de desenmascaramiento antigenico en inmunohistoquimica. Estudio dirigido a anticuerpos con especiales dificultades en inmunodeteccion. *Rev. Esp. Pat* : 255-260, 2001.

**[47]** Rosenberger C, Pratschke J, Rudolph B, Heyman SN, Schindler R, Babel N, Eckardt KU, Frei U, Rosen S, Reinke P. Immunohistochemical detection of hypoxia-inducible factor-1alpha in human renal allograft biopsies. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan; 18(1):343-51.

**[48]** Bellomo R. The epidemiology of acute renal failure: 1975 versus 2005. *Curr Opin Crit Care*. 2006 Dec; 12(6):557-60.

**[49]** Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*. 2004 Jul; 114(1):5-14.

**[50]** Clarke H, Marano CW, Peralta Soler A, Mullin JM. Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Jun 30; 41(3):283-301.

**[51]** Lee HT, Emala CW. Protein kinase C and G(i/o) proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Feb; 12(2):233-40.

**[52]** Wang X, Wang Y, Zhang J, Kim HP, Ryter SW, Choi AM. FLIP protects against hypoxia/reoxygenation-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting Bax activation. *Mol Cell Biol*. 2005 Jun;

25(11):4742-51.

**[53]** Way KJ, Chou E, King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 May; 21(5):181-7.

**[54]** Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem.* 1993 May 5; 268(13):9194-7.

**[55]** Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr; 34(Pt 2):232-7.

**[56]** Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RT, Barritt GJ. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca<sup>2+</sup> and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. *Dig Dis Sci.* 2006 Jun; 51(6):1087-102.

**[57]** Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* 2006 Feb; 273(3):433-50.

**[58]** Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15; 61(3):427-36.

**[59]** Yoo J, Nichols A, Mammen J, Calvo I, Song JC, Worrell RT, Matlin K, Matthews JB. Bryostatin-1 enhances barrier function in T84 epithelia through PKC-dependent regulation of tight junction

proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Aug; 285(2):C300-9.

**[60]** Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*. 2002 Nov; 39(4-5):173-85.

**[61]** Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby MG, Cameron IT, Fleming TP. PKC signalling regulates tight junction membrane assembly in the pre-implantation mouse embryo. *Reproduction*. 2004 Jun;127(6):653-67.

**[62]** Sjo A, Magnusson KE, Peterson KH. Association of alpha-dystrobrevin with reorganizing tight junctions. *J Membr Biol*. 2005 Jan;203(1):21-30.

**[63]** Crean JK, Furlong F, Finlay D, Mitchell D, Murphy M, Conway B, Brady HR, Godson C, Martin F. Connective tissue growth factor [CTGF]/CCN2 stimulates mesangial cell migration through integrated dissolution of focal adhesion complexes and activation of cell polarization. *FASEB J*. 2004 Oct; 18(13):1541-3.

**[64]** Dlugosz JA, Munk S, Ispanovic E, Goldberg HJ, Whiteside CI. Mesangial cell filamentous actin disassembly and hypocontractility in high glucose are mediated by PKC-zeta. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jan; 282(1):F151-63.

**[65]** Di Liberto G, Dallot E, Eude-Le Parco I, Cabrol D, Ferre F, Breuiller-Fouche M. A critical role for PKC zeta in endothelin-1-induced uterine contractions at the end of pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Sep; 285(3):C599-607.

**[66]** Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K. Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase  $\zeta$  during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30; 275(26):19921-7.

**[67]** L. Alegre, MG Martos, D. Sáenz, E. Conde, M. Escribese, F. Mampaso, M. López-Cabrera, R. Selgas, JA. Sanchez-Tomero, and ML. García-Bermejo. HIF-1- $\alpha$  mediates proximal tubule epithelial cell survival during renal Ischemia/Reperfusion. Tipo de participación: Póster. Congreso: American Society of Nephrology, ASN 39<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, CA, USA. Nov. 2006. Publicación: *J Am. Soc Nephrol.* 2006 Vol 17: 713A.

**[68]** Dodane V, Kachar B. Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J Membr Biol.* 1996 Feb;149(3):199-209.

**[69]** Fleegal MA, Hom S, Borg LK, Davis TP. Activation of PKC modulates blood-brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Nov; 289(5):H2012-9.

**[70]** Stuart RO, Nigam SK. Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 20; 92(13):6072-6.

**[71]** Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang L, Keshavarzian A. PKC- $\zeta$  is required in EGF protection of microtubules and intestinal barrier integrity against oxidant injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 A May; 282(5):G794-808.

**[72]** Kellerman PS, Bogusky RT. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int.* 1992 Oct;42(4):896-902.

**[73]** Banan A, Zhang L, Fields JZ, Farhadi A, Talmage DA, Keshavarzian A. PKC-zeta prevents oxidant-induced iNOS upregulation and protects the microtubules and gut barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 B Oct; 283(4):G909-22.

**[74]** Menard D, Pothier P. Radioautographic localization of epidermal growth factor receptors in human fetal gut. *Gastroenterology.* 1991 Sep; 101(3):640-9

**[75]** Banan A, Fields JZ, Zhang LJ, Shaikh M, Farhadi A, Keshavarzian A. Zeta isoform of protein kinase C prevents oxidant-induced nuclear factor-kappaB activation and I-kappaB $\alpha$  degradation: a fundamental mechanism for epidermal growth factor protection of the microtubule cytoskeleton and intestinal barrier integrity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Oct; 307(1):53-66.

**[76]** Banan A, Zhang LJ, Farhadi A, Fields JZ, Shaikh M, Forsyth CB, Choudhary S, Keshavarzian A. Critical role of the atypical  $\lambda$  isoform of protein kinase C (PKC- $\lambda$ ) in oxidant-induced disruption of the microtubule cytoskeleton and barrier function of intestinal epithelium. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Feb; 312(2):458-71.

**[77]** Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Farhadi A, Keshavarzian A. Theta-isoform of PKC is required for alterations in cytoskeletal dynamics and barrier permeability in intestinal

epithelium: a novel function for PKC-theta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jul; 287(1):C218-34.

**[78]** Izawa I, Inagaki M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 2006 Mar; 97(3):167-74.

**[79]** Runembert I, Queffeulou G, Federici P, Vrtovsnik F, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Trugnan G, Friedlander G, Terzi F. Vimentin affects localization and activity of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts. *J Cell Sci.* 2002 Feb 15; 115:713-24.

**[80]** Gomez J, Martinez de Aragon A, Bonay P, Pitton C, Garcia A, Silva A, Fresno M, Alvarez F, Rebollo A. Physical association and functional relationship between protein kinase C zeta and the actin cytoskeleton. *Eur J Immunol.* 1995 Sep; 25(9):2673-8.

**[81]** Damron DS, Nadim HS, Hong SJ, Darvish A, Murray PA. Intracellular translocation of PKC isoforms in canine pulmonary artery smooth muscle cells by ANG II. *Am J Physiol.* 1998 Feb; 274(2):L278-88.

**[82]** Uberall F, Hellbert K, Kampfer S, Maly K, Villunger A, Spitaler M, Mwanjewe J, Baier-Bitterlich G, Baier G, Grunicke HH. Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in Ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1999 Feb 8; 144(3):413-25.



**El desarrollo de esta tesis ha dado lugar a los siguientes trabajos:**

### **Publicaciones**

Autores: D. Sáenz-Morales, M.M.Escribese, K. Stamatakis, **MG. Martos**, L.Alegre, E. Conde, D. Perez-Sala, F. Mampaso, ML. García-Bermejo.

Título: Requirements for tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress

Revista: *Exp. Cell Res.* 312: 3711-3727, 2006

---

Autores: **María G. Martos**, David Saenz-Morales, Laura Alegre, Elisa Conde, María Escibese and M Laura García-Bermejo.

Título: PKC alpha mediates tight junctions disruption and PKC zeta cytoskeleton disorganization, contributing both to renal ischemia/reperfusion injury

Ref. revista / Libro: *J Am Soc Nephrol.* (a ser enviado)

### **Contribuciones a Congresos Internacionales**

Autores: **MG Martos**, D. Sáenz, L. Alegre, E. Conde, K. Stamatakis, M. Escibese and ML. García-Bermejo

Título: PKC-alpha mediates proximal tubule injury during renal I/R involving tight junction disruption

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 39<sup>th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol* Vol 17: 618A, 2006

Lugar celebración: San Diego, CA , USA. Fecha: 14-19 Nov. 2006

---

Autores: L. Alegre, **MG Martos**, D. Sáenz, E. Conde, M. Escribese, F. Mampaso, M. López-Cabrera, R. Selgas, JA. Sanchez-Tomero, and ML. García-Bermejo  
Título: HIF-1-alpha mediates proximal tubule epithelial cell survival during renal Ischemia/Reperfusion.

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 39<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 17: 713A, 2006*

Lugar celebración: San Diego, CA, USA. Fecha: 14-19 Nov. 2006

---

Autores: D. Sáenz-Morales, L. Alegre, **MG Martos**, M. M. Escribese, E. Conde, K. Stamatakis, F. Mampaso and M. Laura García-Bermejo.

Título: Rac1 and ERK 1/2 activation mediate proximal epithelial cells impair in response to ischemia

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 39<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 17: 329A, 2006*

Lugar celebración: San Diego, CA, USA. Fecha: 14-19 Nov. 2006

---

Autores: E. Conde, M. Escribese, **MG Martos**, D. Sáenz, L. Alegre, G. de las Casas, F. Liaño, F. Mampaso and ML. García-Bermejo.

Título: All-trans-retinoic acid (at-RA) reduces endothelial activation and leukocyte extravasations to renal interstitium during ischemia/reperfusion.

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 39<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 17: 709A, 2006*

Lugar celebración: San Diego, CA, USA. Fecha: 14-19 Nov. 2006

---

Autores: **M García-Martos**, L Alegre, M M Escribese, D Sáenz, E Conde, F Mampaso and M L García-Bermejo

Título: "Hypoxia Differential Activation of PKC $\alpha$  and PKC $\zeta$  During Ischemia/Reperfusion in vitro-Mimicking Conditions: Role in the Proximal Epithelial Tubular Damage"

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 38<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 16: 040, 2005*

Lugar celebración: Philadelphia, PA, USA. Fecha: 8-13 Nov. 2005

---

Autores: D Sáenz, M M Escribese, **M García-Martos**, L Alegre, E Conde, F Mampaso and M L García-Bermejo.

Título: "Oxidative Stress Mediates Focal Adhesion Complexes Disassembly but not Adherens Junctions Disruption Induced by Ischemia/Reperfusion in vitro-Mimicking Conditions."

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 38<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 16: 260A, 2005*

Lugar celebración: Philadelphia, PA, USA. Fecha: 8-13 Nov. 2005

---

Autores: L Alegre, **M García-Martos**, D Sáenz, M M Escribese, E Conde, R Selgas, J A Sánchez-Tomero, F Mampaso and M L García-Bermejo.

Título: "HIF-1 $\alpha$ , Regulated by ROS and ERK1/2, is Involved in Both Proximal Tubular Epithelial Injury and Recovery under Ischemia/Reperfusion-in vitro Mimicked Conditions."

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 38<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 16: 313A, 2005*

Lugar celebración: Philadelphia, PA, USA. Fecha: 8-13 Nov. 2005

---

Autores: M M Escribese, D Sáenz, **MG Martos**, E Conde, L. Alegre, S. Al Hussayni, F Mampaso and M L García-Bermejo

Título: "Contribution of hypoxia to the proximal tubular injury induced by Ischemia/Reperfusion in vitro-Mimicking Conditions."

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 38<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol* Vol 16: 089, 2005

Lugar celebración: Philadelphia, PA, USA. Fecha: 8-13 Nov. 2005

---

Autores: M M Escribese, A. Molina, M L García-Bermejo, L. Alegre, **MG Martos**, and F Mampaso.

Título: "All-trans retinoic acid prevents renal damage induced by ischemia/reperfusion"

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 38<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol* Vol 16: 459A, 2005

Lugar celebración: Philadelphia, PA, USA. Fecha: 8-13 Nov. 2005

---

Autores: **MG. Martos**, A. Molina, MM. Escribese, K. Stamatakis, D. Pérez-Sala, F. Mampaso, ML. García-Bermejo.

Título: "Hypoxia/reoxygenation induces kidney tubular epithelial cell detachment involving changes in actin cytoskeleton organization, RhoGTPases activity and focal adhesion complex integrity."

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 37<sup>Th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol* Vol 15: 253A, 2004.

Lugar celebración: St Louis, MO, USA. Fecha: 28 Oct- 2 Nov. 2004

---

Autores: MM. Escribese, **M.G. Martos**, A. Molina, K. Stamatakis, D. Perez-Sala, F. Mampaso, ML. Garcia-Bermejo

Título: "Intracellular signaling pathways involved in kidney proximal tubular epithelial cells response to hypoxia/reoxygenation".

Tipo de participación: Póster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 37<sup>th</sup> Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 15: 449A, 2004*

Lugar celebración: St Louis, MO, USA. Fecha: 28 Oct- 2 Nov. 2004

---

Autores: **M G. Martos**, D Amran, M M. Escribese, A. Molina, F. Mampaso and M. L. Garcia-Bermejo

Título: Establishment of a novel hypoxia/reoxygenation in vitro model that mimics ischemia/reperfusion in vivo: role of cytoskeleton, RhoGTPases and adhesion molecules

Tipo de participación: Poster

Congreso: American Society of Nephrology, ASN 36th Annual Meeting

Publicación: *J Am Soc Nephrol Vol 14: 350A, 2003*

Lugar celebración: San Diego, CA, EEUU. Fecha: 12-17 Noviembre 2003

**Durante esta tesis se ha participado en los siguientes Proyectos de Investigación**

Título del proyecto: Mecanismos moleculares que regulan daño renal provocado por isquemia-reperfusión: implicación de Mapas, Calpaína, PKC y RhoGTPasas.

Entidad financiadora: Inst. Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, FIS 01/3001

Entidades participantes: Hospital Universitario Ramón y Cajal

Duración, desde: 01-02-2002 hasta: 31-01-2005

Investigador responsable: Dra. María Laura García Bermejo

---

Título del proyecto: Estudio de los mecanismos que median sensibilidad/resistencia a la pérdida de adhesión de células tubulares renales sometidas a hipoxia-reoxigenación.

Entidad financiadora: Comunidad de Madrid, CAM 08.3/0001/2003

Entidades participantes: Hospital Ramón y Cajal.

Duración, desde: 2003 hasta: 2004

Investigador responsable: Dra. María Laura García Bermejo

---

Título del proyecto: Estudio de los mecanismos que median sensibilidad/resistencia al daño renal provocado por isquemia-reperfusión

Entidad financiadora: Inst. Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, PI030681

Entidades participantes: Hospital Ramón y Cajal

Duración, desde: 2004 hasta: 2007

Investigador responsable: Dra. María Laura García Bermejo

---

Título del proyecto: Estudio de la expresión del Factor Inducible por Hipoxia (HIF 1 alpha) en modelos experimentales de hipoxia/reoxigenación y riñones transplantados. Efectos de su modulación farmacológica sobre la necrosis tubular post-transplante y la recuperación funcional.

Entidad financiadora: Fundación Mutua Madrileña 185/ 2006

Entidades participantes: Hospital Ramón y Cajal

Duración, desde: 2006 hasta: 2009

Investigador responsable: Dra. María Laura García Bermejo.