

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1. EL RIÑÓN | 10 |
| 1.1. Anatomía funcional e histología | 10 |
| 1.2. Fisiología | 12 |
| 1.3. Patología renal: Fracaso renal agudo de etiología isquémica..... | 14 |
| 2. LA CÉLULA EPITELIAL TUBULAR | 17 |
| 2.1. Ribete en cepillo..... | 19 |
| 2.2. Uniones intercelulares y a membrana basal | 19 |
| 2.2.1. Uniones intercelulares | 19 |
| 1. <i>Uniones estrechas o zónula occludens o tight junctions</i> <i>(TJ)</i> | 21 |
| 2. <i>Uniones adherentes o zónula adherens o adherens</i> <i>juntions (AJ)</i> | 21 |
| 3. <i>Uniones en hendidura o gap junctions</i> | 22 |
| 4. <i>Desmosomas</i> | 22 |
| 2.2.2. Uniones a la membrana basal | 23 |
| 2.3. Citoesqueleto | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4. Rutas de señalización intracelular | 28 |
| 3. LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN MIMETIZADA <i>IN VITRO</i> POR UN SISTEMA DE HIPOXIA/REOXIGENACIÓN..... | 30 |
| 3.1. Estrés oxidativo | 32 |
| 3.2. Niveles de adenosín trifosfato (ATP) | 35 |
| 3.3. Calcio intracelular | 36 |
| 4. FAMILIA PKC | 38 |
| 4.1. Estructura de Proteín Quinasa C (PKC) | 39 |
| 4.2. Regulación de la actividad de PKC | 41 |
| 4.3. PKC en la isquemia renal | 43 |
| OBJETIVOS | 46 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 48 |
| 1. CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS | 49 |
| 2. MODELOS EXPERIMENTALES | 50 |
| 2.1. Modelo <i>in vitro</i> : hipoxia/reoxigenación | 50 |
| 2.2. Biopsias renales humanas | 52 |
| 3. ESTUDIOS DE PÉRDIDA DE INTEGRIDAD DE MONOCAPA POR COLORIMETRÍA | 53 |
| 4. ESTUDIOS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y MODIFICACIONES EN LOS NIVELES | |

| | |
|---|-----------|
| INTRACELULARES DE CALCIO, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO | 54 |
| 5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOBLOT | 54 |
| 6. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR | 57 |
| 7. ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA | 58 |
| 8. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS, DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN TEJIDO PARAFINADO HUMANO: HEMATOXILINA-EOSINA, ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF E INMUNOHISTOQUÍMICA | 59 |
| 9. TINCIÓN CON FALOIDINA EN MUESTRAS HUMANAS PROCESADAS EN CONGELACIÓN | 61 |
| 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 62 |
| RESULTADOS | 64 |
| 1. EL PROTOCOLO DE HIPOXIA/REOXIGENACIÓN INDUCE PÉRDIDA DE ADHESIÓN DE CÉLULAS HK-2 SIN INDUCIR MUERTE CELULAR | 65 |
| 2. EXPRESIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE PKC EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN..... | 67 |

| | |
|--|----|
| 3. ACTIVACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC α EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN | 68 |
| 3.1. Traslocación a membrana estimada mediante inmunofluorescencia | 68 |
| 3.2. Localización subcelular de PKC α en células HK-2 durante hipoxia/reoxigenación | 70 |
| 4. FACTORES RESPONSABLES DE LA ACTIVACIÓN DE PKC α EN CÉLULAS HK-2 DURANTE HIPOXIA/REOXIGENACIÓN | 73 |
| 4.1. Niveles de calcio | 73 |
| 4.2. Activación de ERK1/2 | 75 |
| 4.3. Traslocación de PKC α en presencia de inhibidores de ERK1/2 | 76 |
| 5. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE PKC α EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN | 77 |
| 5.1. Contracción celular | 77 |
| 5.2. Integridad de la monocapa epitelial | 80 |
| 5.3. Disrupción de uniones intercelulares | 82 |
| 6. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC α EN BIOPSIAS CON NECROSIS TUBULAR AGUDA DE ETIOLOGÍA ISQUÉMICA..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| 7. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE UNIONES INTERCELULARES EN BIOPSIAS CON NECROSIS TUBULAR AGUDA DE ETIOLOGÍA ISQUÉMICA | 85 |
| 8. ACTIVACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC ζ EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN | 87 |
| 8.1. Traslocación de PKC ζ a membrana estimada por inmunofluorescencia | 87 |
| 8.2. Localización subcelular de PKC ζ en células HK-2 sometidas a Hipoxia/reoxigenación | 89 |
| 9. FACTORES RESPONSABLES DE LA ACTIVACIÓN DE PKC ζ EN CÉLULAS HK-2 DURANTE HIPOXIA/REOXIGENACIÓN..... | 90 |
| 9.1. Producción de radicales libres de oxígeno en células HK-2 durante hipoxia/reoxigenación | 90 |
| 9.2. Efecto de los antioxidantes en la activación de PKC ζ | 94 |
| 10. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE PKC ζ EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN | 96 |
| 10.1. Contracción celular | 96 |
| 10.2. Integridad de la monocapa epitelial | 97 |
| 10.3. Colapsamiento de citoesqueleto | 99 |
| 11. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PKC ζ EN BIOPSIAS CON NECROSIS TUBULAR AGUDA DE ETIOLOGÍA ISQUÉMICA | 101 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 12. | DISTRIBUCIÓN DE F-ACTINA EN BIOPSIAS RENALES HUMANAS CON DAÑO ISQUÉMICO | 103 |
| | DISCUSIÓN | 106 |
| 1. | REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PKC α Y SUS EFECTOS EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN..... | 111 |
| 2. | REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PKC ζ Y SUS EFECTOS EN CÉLULAS HK-2 SOMETIDAS A HIPOXIA/REOXIGENACIÓN..... | 121 |
| | CONCLUSIONES | 136 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 140 |
| | PUBLICACIONES | 153 |