

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