

Universidad de Alcalá de Henares

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología



**La Proteína Relacionada con la
Parathormona como una Nueva Citoquina
Proinflamatoria Renal. Estudios en un
Modelo Experimental de Nefropatía
Obstruktiva**

TESIS DOCTORAL

DAVID RÁMILA GUTIÉRREZ

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DIRECTORES:

Dr. Pedro Esbrit Argüelles

Dr. Ricardo J. Bosch Martínez

LABORATORIO DE METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO

FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (GRUPO CAPIO)

Don PEDRO ESBRIT ARGÜELLES, Doctor en C.C. Químicas (Bioquímica) por la Universidad Autónoma de Madrid, y Don RICARDO J. BOSCH MARTÍNEZ, Doctor en Medicina y Profesor Titular de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN

Que Don DAVID RÁMILA GUTIÉRREZ, Licenciado en C.C. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en el Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo de la Fundación Jiménez Díaz (Grupo Capio), bajo su dirección, la presente Tesis Doctoral titulada " *La Proteína Relacionada con la Parathormona como una Nueva Citoquina Proinflamatoria Renal. Estudios en un Modelo Experimental de Nefropatía Obstruktiva*" y consideran que reúne las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de optar al grado de doctor.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, 12 de junio de 2007



D. Pedro de la Villa Polo, Director del Departamento de Fisiología y
Catedrático de Fisiología de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral, que lleva por título "*La Proteína Relacionada con la Parathormona como una Nueva Citoquina Proinflamatoria Renal. Estudios en un Modelo Experimental de Nefropatía Obstructiva*", que presenta D. David Rámila Gutiérrez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. Pedro Esbrit Argüelles y el Prof. Dr. D. Ricardo J. Bosch Martínez en la Fundación Jiménez Díaz (Grupo Capió)(Madrid) y que cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública.

Y para que conste donde convenga y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares a 12 de junio del año 2007.

Fdo. D. Pedro de la Villa Polo

Por fin ha llegado el momento que todo doctorando desea, la Tesis escrita a falta de los agradecimientos. Son ya cinco años en esta aventura y espero no dejarme a nadie a última hora.

En primer lugar agradezco a Pedro, mi jefe, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y descubrir cómo funciona el mundo de la investigación. Agradezco a Ricardo, como codirector, sus consejos y ayuda siempre que lo he necesitado.

Muchas gracias a la fundación Conchita Rábago y al Gobierno Vasco por recordar que los becarios también tenemos que comer y pagar facturas.

Por supuesto esta Tesis hubiera sido mucho mas aburrida sin mis compañeros de laboratorio: Carletes, Arantxa y Aranchita que volaron ya del nido; Raul, Juanan y Vero (siempre dispuestos a echar un cable, mucho animo que ya no os queda nada), Dani (que nos va a conseguir piso a todos), Luis (el mejor profe de escalada) e Irene (que ha encontrado su sitio). De todos ellos estoy muy orgulloso ya que no mucha gente tiene la suerte de poder considerar a sus compañeros de curro como amigos. De modo especial quisiera agradecer a Arantxa todo lo que me ha ayudado todos estos años tanto en el plano profesional como personal.

Quisiera dar las gracias, también, a toda la gente del resto de laboratorios a los que he tenido que recurrir en muchas de ocasiones y nunca me han dado un no por respuesta: A los de micro, las chicas de lípidos, los de Caramelo, la tropa de Egido y a todos los de inmuno. Quiero destacar a la ya Dra. Esteban que me enseñó a operar a los pobres ratoncitos y sufrimos juntos la inmuno de F4/80. Gracias Curra por arreglártelas para colarme en el confocal.

Agradecer también a Régula y Encarna por su buen trabajo y que disfruten de ese merecido descanso. Y a Carmen que me ha mantenido en forma estos años intentando esquivar sus collejas (es broma).

Por ultimo, dar las gracias a mi familia y a todos mis amigos, víctimas inocentes de esta Tesis. A Bárbara, que tiene que aguantar todas mis neuras. A Bernardo y Guillermo, que más que casa comparten mi vida. A Ara y Jon con el que me vine a Madrid hace ya casi una década, que se dice pronto. A Paloma, que pueda seguir disfrutando con tu risa siempre. A los hobbits de la comarca y al resto de gente que ha estado a mi lado todos estos años.

A mis padres

A Bárbara

*Lo que se ve depende de quien mire
y de quien le enseñó a mirar*

R. Arnheim

SUMMARY

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) has recently shown to promote fibrosis in a model of nephrotoxic acute renal injury by folic acid. Inflammation is a major event associated with fibrogenesis in the damaged kidney. In the present Doctoral Thesis, we assessed whether PTHrP might act as a renal pro-inflammatory factor after unilateral ureteral obstruction in mice, a well characterized model of inflammation. To this aim, we used mice overexpressing PTHrP specifically in the proximal tubule, as well as normal mice with pharmacological modulation of renal PTHrP expression. Furthermore, *in vitro* studies were performed to elucidate the mechanisms implicated in the pro-inflammatory actions of PTHrP in mouse tubuloepithelial cells and macrophages. Our findings demonstrate the critical role of PTHrP on the inflammatory process following kidney obstruction in mice. *In vitro* data indicate that this protein increases the expression of several pro-inflammatory factors in tubuloepithelial cells, and promotes monocyte/macrophage migration. Moreover, sequential activation of extracellular signal-related kinase (ERK) and nuclear factor(NF)- κ B seems to be an important pathway whereby PTHrP may trigger renal inflammation. PTHrP is thus emerging as a new inflammation marker and a putative therapeutic target in the obstructed kidney.

RESUMEN

La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) se ha descrito recientemente como un posible factor promotor de la fibrosis en un modelo de nefrotoxicidad por ácido fólico. La inflamación es uno de las etapas clave en la fibrogénesis asociada al daño renal. En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado el posible papel de la PTHrP en el proceso inflamatorio tras la obstrucción ureteral unilateral en el ratón, un modelo bien caracterizado de inflamación renal. Para ello, utilizamos ratones transgénicos que sobreexpresan la PTHrP de forma constitutiva en las células del túbulo proximal, y ratones normales sometidos a modulación farmacológica de la expresión de esta proteína. Además, para dilucidar los mecanismos implicados en las acciones proinflamatorias de la PTHrP utilizamos cultivos de células túbuloepiteliales y macrófagos de ratón *in vitro*. Nuestros resultados demuestran el papel crucial de la PTHrP en el proceso inflamatorio en el riñón obstruido de ratón. La PTHrP, posiblemente a través del receptor común para PTH/PTHrP tipo 1, incrementa la expresión de varios factores proinflamatorios en las células túbuloepiteliales, y promueve la migración de macrófagos. Además, la activación del factor nuclear(NF)- κ B mediada por *extracellular signal-related kinase* (ERK) parece ser un mecanismo importante a través del cual la PTHrP induce sus efectos proinflamatorios en el riñón. Estos hallazgos sugieren que la PTHrP podría considerarse como un nuevo marcador de inflamación y/o una diana terapéutica en la nefropatía obstructiva.

Abreviaturas

| | |
|-------|--|
| Ac | Adenilato ciclasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| AMPc | Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico |
| AngII | Angiotensina II |
| AP-1 | Proteína activadora 1 |
| AP-2 | Proteína activadora 2 |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| AT1 | Receptor 1 de AngII |
| AT2 | Receptor 2 de AngII |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CCR2 | Receptor de MCP-1 |
| CMV | Promotor del citomegalovirus humano |
| CRE | Elementos de respuesta a AMPc |
| CREB | Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc |
| DAB | 3,3'-diaminobencidina |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| EEM | Error estándar de la media |
| EGF | Factor de crecimiento epitelial |
| EMSA | Ensayo de retardo de movilidad electroforética |
| ERK-1 | Quinasa de respuesta extracelular-1 |
| ERK-2 | Quinasa de respuesta extracelular-2 |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína |
| GDP | Guanidín difosfato |
| GGT | γ -glutamil transpeptidasa |
| GMP | Guanidín monofosfato |
| GTP | Guanidín trifosfato |
| HEPES | Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico] |
| hGH | Hormona de crecimiento humana |

| | |
|----------------|---|
| ICAM | Molécula de adhesión intercelular |
| I κ B | Subunidad inhibitoria κ B |
| IL | Interleuquina |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IP3 | Inositol trifosfato |
| JNK | Quinasa Jun N-terminal |
| Kf | Coeficiente de ultrafiltración glomerular |
| LLC-PK1 | Línea celular de epitelio renal de cerdo |
| MAPKs | Proteínas quinasas activadas por mitógeno |
| MCP-1 | Proteína quimiotáctica de monocitos-1 |
| MCT | Células murinas de ratón de túbulo proximal |
| MEK1/2 | MAP/ERK quinasas 1 y 2 |
| NAD(P)H | Nicotiamida-adenina dinucleótido (fosfato) |
| NFAT | Factor nuclear de células T activadas |
| NF- κ B | Factor nuclear de transcripción κ B |
| NLS | Dominios de localización nuclear/nucleolar |
| NO | Óxido nítrico |
| OU | Obstrucción ureteral |
| OUU | Obstrucción ureteral unilateral |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFA | Paraformaldehído |
| PGs | Prostaglandinas |
| PI3K | Inositol trifosfato |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PLC β 2 | Fosfolipasa C β 2 |
| PLD | Fosfolipasa D |
| PMSF | Fenil metil sulfonil fluoruro |
| PTH | Hormona paratiroidea |
| PTH1R | Receptor tipo 1 de la hormona paratiroidea |

| | |
|--------|---|
| PTH2R | Receptor tipo 2 de la hormona paratiroidea |
| PTHrP | Proteína relacionada con la hormona paratiroidea |
| RANTES | Corresponde a las siglas: <i>regulated on activation, normal T expressed and secreted</i> |
| RPMI | Corresponde a las siglas: <i>Rapid Prototyping and Manufacturing Institute</i> |
| RT-PCR | Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa |
| SAB | Seroalbúmina bovina |
| SDS | Sodium dodecil sulfato |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SP1 | Factor promotor 1 del virus 40 de simio |
| SRA | Sistema renina angiotensina |
| SV40 | Virus 40 de simio |
| TBE | Tris bórico EDTA |
| tetox7 | Operador de tetraciclina heptamerizado |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| tTA | proteína de fusión transactivadora tet |
| UA | Unidades arbitrarias |
| VCAM | Molécula de adhesión de células vasculares |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. LA PROTEÍNA RELACIONADA CON LA PTH (PTHrP): ESTRUCTURA, PROCESAMIENTO Y ACCIÓN | 3 |
| 1.2. EL SISTEMA DE LA PTHrP Y SUS RECEPTORES EN EL RIÑÓN | 7 |
| 1.2.1 EFECTOS DE LA PTHrP EN EL SISTEMA GLOMÉRULO-VASCULAR | 9 |
| 1.2.2 EFECTOS DE LA PTHrP EN EL TÚBULO RENAL | 11 |
| 1.3. RELACIÓN ENTRE LA ANG II Y LA PTHrP EN EL DAÑO RENAL | 15 |
| 1.4. INFLAMACIÓN | 17 |
| 1.4.1 INFLAMACIÓN Y RIÑÓN | 18 |
| 1.4.2. PAPEL DE LAS CÉLULAS TÚBULOEPITELIALES EN LA INFLAMACIÓN INTERSTICIAL RENAL | 18 |
| 1.4.3 LA PTHrP COMO CITOQUINA PRO-INFLAMATORIA | 22 |
| 1.4.4 ANGIOTENSINA II E INFLAMACIÓN | 24 |
| 1.5. LA OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL COMO MODELO DE NEFROPATÍA INFLAMATORIA | 24 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 31 |
| 3. MATERIAL Y METODOS | 35 |
| 3.1. RATONES TRANSGÉNICOS CON SOBREENPRESIÓN RENAL DE LA PTHrP | 35 |
| 3.2. MODELO EXPERIMENTAL DE OUU | 36 |
| 3.3. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA | 39 |
| 3.4 . CULTIVOS CELULARES | 40 |
| 3.4.1 INMUNOFLUORESCENCIA | 41 |
| 3.4.2 MIGRACIÓN CELULAR | 42 |
| 3.5. TRANSFERENCIA WESTERN | 43 |
| 3.6. ANÁLISIS POR PCR A TIEMPO REAL | 44 |

| | |
|---|------------|
| 3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF-KB MEDIANTE ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA) | 45 |
| 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 47 |
| 4. RESULTADOS | 51 |
| 4.1. EXPRESIÓN DE PTHRP Y SU RECEPTOR PTH1R TRAS LA OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL | 51 |
| 4.2. ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL RIÑÓN OBSTRUÍDO | 53 |
| 4.3. LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS INTERSTICIALES RENALES ESTÁ RELACIONADA CON LA SOBREENPRESIÓN DE PTHRP TRAS LA OBSTRUCCIÓN URETERAL UNILATERAL | 54 |
| 4.4. LA SOBREENPRESIÓN DE PTHRP EN EL RIÑÓN OBSTRUÍDO DE RATÓN SE ASOCIA CON UN INCREMENTO TANTO DE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB COMO DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PROINFLAMATORIAS | 56 |
| 4.5. LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE PTHRP REDUCE EL COMPONENTE INFLAMATORIO EN EL RIÑÓN OBSTRUÍDO DE RATÓN | 59 |
| 4.6. PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB Y DE LAS QUINASAS REGULADORAS DE SEÑALES EXTRACELULARES (ERK) EN LOS MECANISMOS PRO-INFLAMATORIOS INDUCIDOS POR LA PTHRP EN CÉLULAS TÚBULOEPITELIALES DE RATÓN | 65 |
| 4.7. LA PTHRP (1-36) ESTIMULA LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS DE RATÓN RAW 264.7 DIRECTA O INDIRECTAMENTE A TRAVÉS DE LAS CÉLULAS TÚBULOEPITELIALES | 72 |
| 5. DISCUSIÓN | 79 |
| 6. CONCLUSIONES | 91 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 95 |
| 8. ANEXOS | 117 |

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Proteína relacionada con la PTH (PTHrP): Estructura, Procesamiento y Acción

La PTHrP fue identificada en la década de los 80, como el agente responsable de la hipercalcemia tumoral de origen humoral [31;83]. La sobreexpresión de la PTHrP es responsable del incremento tanto de la resorción ósea como de la reabsorción tubular renal de calcio en este síndrome.

El gen de la PTHrP humana se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 12. Contiene 8 exones y presenta, al menos, 3 promotores (dos promotores TATA y, entre ambos, uno GC) [83], así como un silenciador en la región 5'. La presencia de estos 3 promotores indica la complejidad de la regulación génica de la PTHrP. Así, en ratón y en rata aparece solo un promotor TATA y un GC, mientras que la región promotora en pollo solo cuenta con una región TATA [83]. El procesamiento alternativo en el extremo 3' genera tres tipos distintos de ARNm. Las zonas no traducidas en dicho extremo 3' presentan múltiples copias del motivo AUUUA, que confiere inestabilidad al ARNm (Fig. 1A). Este tipo de ARNm codifica factores de crecimiento y citoquinas.

Así pues, la transcripción y traducción del gen de la PTHrP da lugar a tres isoformas (Fig. 1B), de 139, 141 y 173 aminoácidos, que se diferencian en su extremo C-terminal [108]. Cada una de estas isoformas codifica una secuencia N-terminal común en la que se encuentra una región homóloga a la PTH entre los aminoácidos 1-13. Aunque la secuencia aminoacídica 14-34 es diferente en ambas proteínas, su conformación espacial es similar, lo que permite su interacción con el

mismo receptor (denominado tipo 1, PTH1R). Del aminoácido 35 al 111, la secuencia de la PTHrP está muy conservada en las distintas especies (en humanos solo difiere en dos aminoácidos respecto a la de roedores). Las secuencias 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS) similares a los de ciertos factores de transcripción de mamífero y virales [1]. La secuencia 141-173 en la PTHrP humana no está presente en roedores ni presenta homología con otros péptidos conocidos.

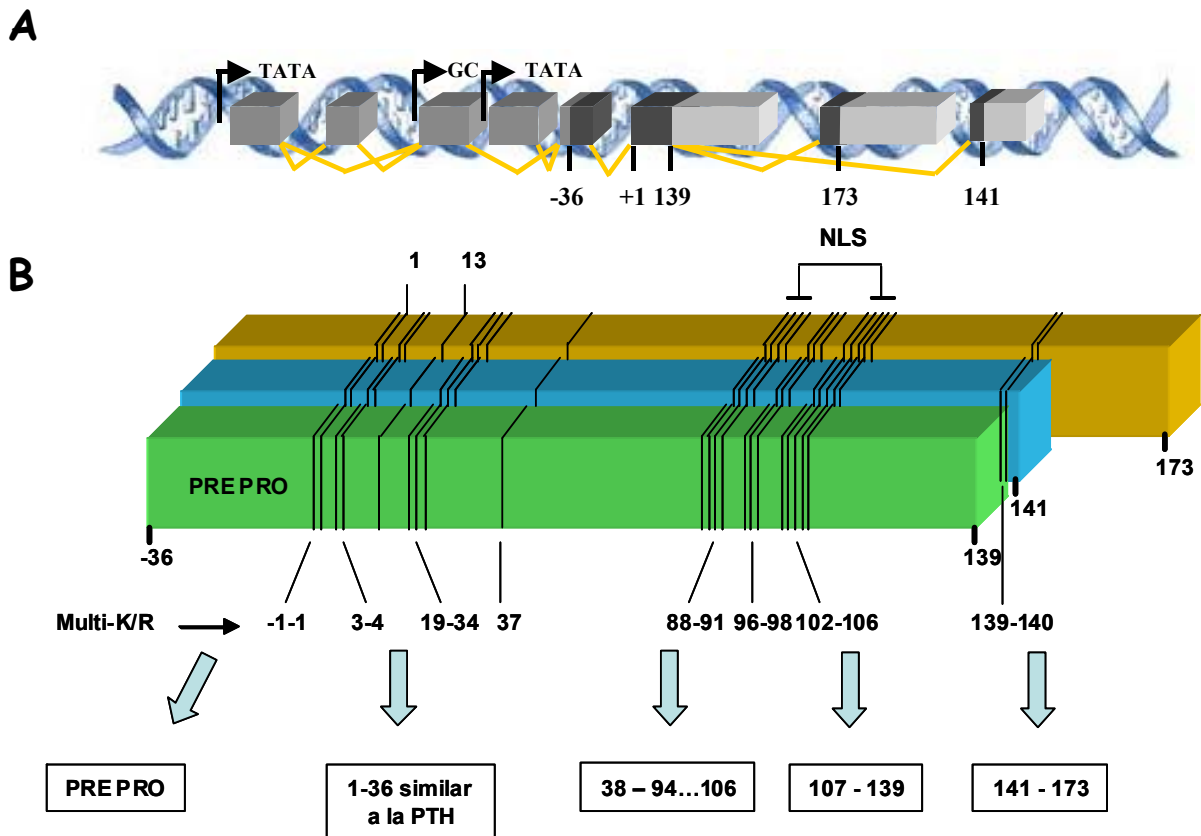


Fig. 1. Esquema del gen de la PTHrP humana y su procesamiento post-traduccional. El gen de la PTHrP se localiza en el brazo corto del cromosoma 12 humano. Contiene 8 exones y presenta, al menos 3 promotores y un silenciador en la región 5' (A). La transcripción y traducción del gen da lugar a 3 isoformas peptídicas, de 139, 141 y 173 aminoácidos. Cada una de estas isoformas codifica una secuencia N-terminal común que contiene la región homologa a la PTH. Las secuencias 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS). La secuencia 141-173 está presente en humanos pero no en roedores.

El procesamiento post-traducciona l de la PTHrP deriva de su estructura, que contiene: 1) una secuencia con un núcleo de 10 a 15 aminoácidos hidrofóbicos constituido por leucina, valina, fenilalanina, alanina y tirosina (péptido-señal); y 2) múltiples aminoácidos básicos organizados en pares, tripletes y cuatripletas, reconocibles por proteasas de tipo furina [23;108].

Como consecuencia, el procesamiento proteolítico de la PTHrP genera: 1) un fragmento 1-36 en el extremo N-terminal; 2) un fragmento medio cuyo extremo C-terminal podría estar entre los aminoácidos 88-106, una región rica en residuos multibásicos; y 3) uno (o varios) fragmento(s) C-terminal(es) a partir del aminoácido 107.

Un estudio de la región promotora del gen de la PTHrP humana revela la existencia de sitios de unión para factores de transcripción tales como SP-1, AP-1 y AP-2, Ets; dos regiones homólogas al elemento consenso de AMPc (CRE); y seis secuencias idénticas a un sitio de respuesta a hormonas esteroideas.

El único receptor clonado para la PTHrP es el PTH1R, común para la PTH y la PTHrP (Fig. 2). Este receptor pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembrana, acoplado a proteínas G [65]. La interacción del fragmento 1-36 de la PTHrP con el PTH1R activa las vías adenilato ciclasa (Ac)/proteína quinasa (PK) A y fosfolipasa C (PLC)/PKC, a través del acoplamiento a las proteínas G_s y G_q , respectivamente [4;32]. El determinante de la activación de AMPc /PKA reside en los dos primeros residuos N-terminales de la PTHrP [131]. La vía de activación de la PLC, con generación de trifosfato de inositol/ Ca^{2+} y/o activación de PKC, es más compleja que la de AMPc/PKA y depende de la densidad de receptores en la membrana [37;134]. Ambas vías de señalización –específicas según la estirpe celular-

parecen confluir en la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), en algunos tipos celulares [17;94].

Recientemente, se ha clonado un nuevo receptor distinto al PTH1R, el PTH2, con afinidad específica para la PTH [139]. Por otra parte, existen evidencias de la existencia de receptores para la PTHrP (1-36) y para otros dominios de la PTHrP, distintos del PTH1R, en varios tipos celulares [105;138;142].

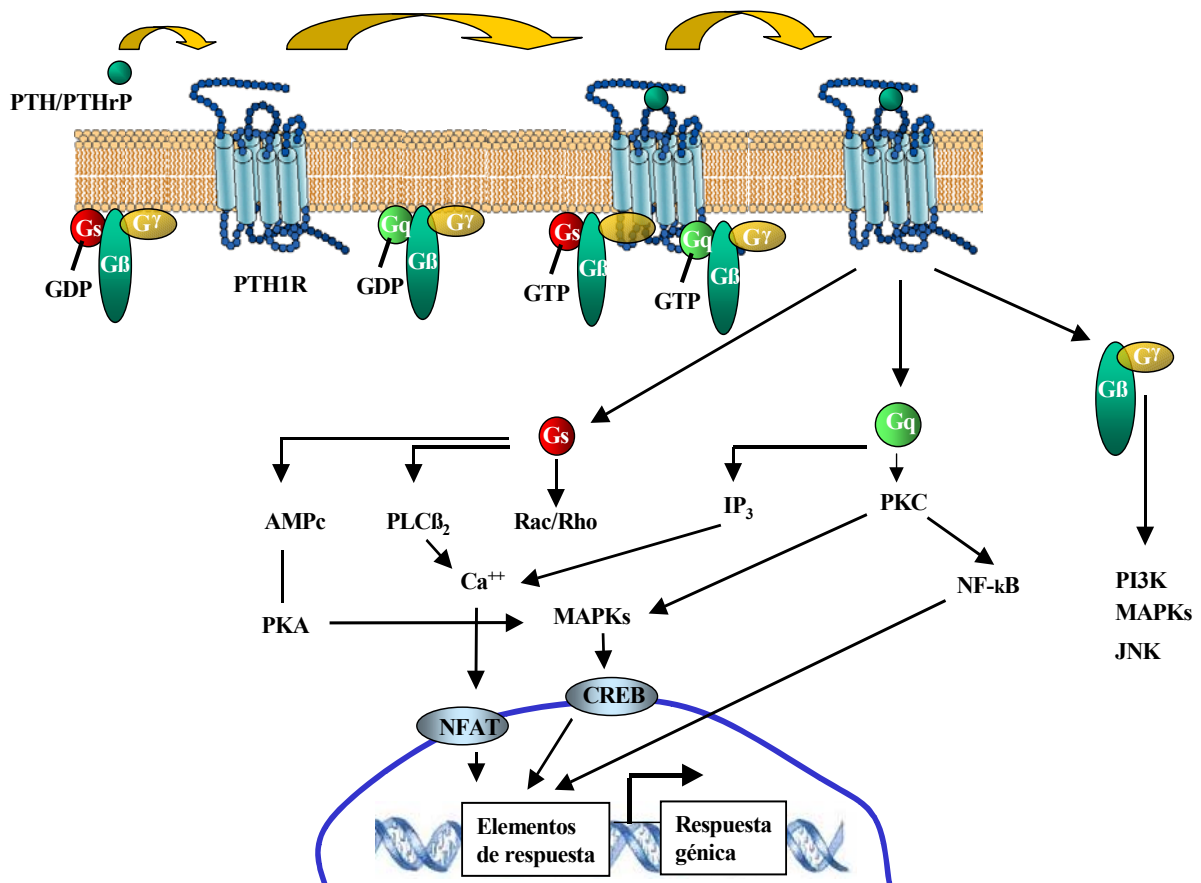


Fig. 2. Esquema representativo de posibles vías de señalización acopladas al PTH1R.

Actualmente se sabe que la PTHrP se sintetiza en la mayoría de los tejidos normales, tanto en la embriogénesis como en la vida adulta, donde ejerce acciones auto/paracrina e incluso intracrina [85]. Algunos de los efectos fisiológicos de la PTHrP que ocurren a través de la interacción con el PTH1R incluyen: la regulación del tono del músculo liso; la modulación del transporte transepitelial de calcio; y la regulación del crecimiento y/o la diferenciación celular y la apoptosis [23;107;108;131]. La supresión homocigótica del gen de la PTHrP o del PTH1R es letal, indicando que el sistema PTHrP/PTH1R juega un papel esencial en la embriogénesis y el desarrollo fetal [65;131]. Sin embargo, ratones con supresión del gen de la PTHrP heterocigótica son viables al nacer. A los 3 meses de edad, estos animales heterocigotos presentan una disminución del volumen óseo y cambios microestructurales del esqueleto que indican osteoporosis. La administración diaria de PTHrP (1-34) a estos ratones mejoró todos los parámetros de la microestructura esquelética; indicando el papel central de la PTHrP como factor osteogénico [93]. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que la internalización nuclear de la PTHrP afecta a la proliferación celular o a la apoptosis, dependiendo del tipo celular [23;56;138]. Los mecanismos asociados a estos efectos intranucleares de la PTHrP son desconocidos. En este sentido, la PTHrP es capaz de unirse al ARN, sugiriendo un posible papel en el procesamiento del ARN [2].

1.2. El Sistema de la PTHrP y sus Receptores en el Riñón

El estudio del riñón durante el desarrollo embrionario del ratón, ha mostrado que existen niveles elevados de ARNm de la PTHrP en el túbulo colector, el urotelio de la pelvis, los túbulos y en los elementos inmaduros glomerulares [8]. Sin embargo, la expresión génica del PTH1R no aumenta durante el desarrollo tubular y glomerular, y es indetectable en

el urotelio de la pelvis y en el túbulo colector [8]. Estos hallazgos sugieren un papel de la PTHrP en la maduración del riñón, posiblemente a través no solo del PTH1R sino de otros receptores aún sin caracterizar. En el riñón adulto, la PTHrP se ha identificado en los podocitos glomerulares y en las células mesangiales, en el túbulo proximal y distal, en el túbulo colector, en el árbol arterial intrarrenal (arteriolas aferentes y eferentes), así como en la mácula densa [77;88;147]. La eliminación homocigótica del gen de la PTHrP no afecta al desarrollo del riñón en el embrión de ratón. Sin embargo, una posible alteración renal en el neonato o en la vida adulta no se ha podido explorar en estos animales, ya que, como se ha mencionado en el punto anterior, mueren al nacer [66].

En estadios post-natales, el PTH1R (ARNm y proteína) se ha identificado en el túbulo proximal, tanto en la parte contorneada como recta, en la rama ascendente del asa de Henle, y en el túbulo contorneado distal, en ratas y en humanos; coincidente con los lugares conocidos de actuación de la PTH en la nefrona [10;72;74;77;123;147]. En un principio no fue posible detectar el PTH1R en células mesangiales humanas por transferencia Northern o RT-PCR [13;74;77]. Sin embargo, en trabajos recientes de nuestro grupo, utilizando las técnicas anteriores o el ensayo de protección de ARNasas, observamos su expresión en células mesangiales de rata [61]. Posiblemente las técnicas utilizadas para analizar la expresión génica del PTH1R fueron poco eficaces para la detección de posibles isoformas del PTH1R presentes en las células mesangiales humanas [63;64]. Así, este receptor podría mediar los efectos mitogénicos de la PTHrP (1-34) observados en las células mesangiales [13;130]. El PTH1R se expresa también en la vasculatura renal y en el podocito glomerular [10;29;30;72;74;77;89].

Recientemente, se han generado ratones que sobreexpresan constitutivamente la PTHrP específicamente en el túbulo proximal utilizando un transgén bajo el control del promotor de la γ -

glutamyltranspeptidasa [36]. Estos animales con sobreexpresión constitutiva de PTHrP en el riñón presentan una morfología y función renal normales, excepto por una discreta hipofosfatemia, al menos hasta los 6 meses de edad [36]. Estos hallazgos indican que, en situación fisiológica, la sobreexpresión de la PTHrP en el túbulo proximal no parece interferir significativamente con la fisiología renal.

1.2.1 Efectos de la PTHrP en el Sistema Glomérulo-Vascular

Como se ha mencionado anteriormente, la PTHrP es un potente relajante del músculo liso a través del PTH1R [23]. Fritsch y cols. [38] han demostrado recientemente que la sobreexpresión sistémica del receptor PTH1R provoca una disminución de la presión arterial y el tono vascular en ratas adultas. En este mismo sentido, animales transgénicos con sobreexpresión de PTHrP o PTH1R en la pared arterial presentan hipotensión mediada por NO y por AMPc [79;88;111]. Por el contrario, en ratas genéticamente hipertensas se ha demostrado que la desregulación del sistema PTHrP/PTH1R en el riñón se asocia al incremento de la resistencia vascular renal [145].

El estrés mecánico y una variedad de factores vasoactivos, como la angiotensina (Ang) II, la serotonina y la bradiquinina inducen de forma rápida la expresión génica de PTHrP en células de músculo liso vascular [23;102;109]. Este efecto de la Ang II ocurre a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. Además, la PTHrP parece modular los efectos de la Ang II sobre la proliferación de células de músculo liso vascular. Estos hallazgos sugieren que la PTHrP podría ejercer una función reguladora sobre los efectos vasoactivos y/o promotores del crecimiento de las células de músculo liso vascular inducidos por agentes vasoconstrictores como la Ang II [109]. Los datos

actuales apoyan pues la hipótesis de que el sistema PTHrP/PTH1R es un regulador crucial del tono vascular.

Existen evidencias que sugieren acciones complejas de la PTHrP en el glomérulo, que incluyen: el aumento de la tasa de filtración glomerular -por su acción vasodilatadora en la vasculatura pre-glomerular-; la relajación de las células mesangiales; y la estimulación del crecimiento de estas células [13;28;32;87;130].

Se ha observado que la PTHrP, producida a nivel renal, es capaz de aumentar la secreción de renina a través del receptor común con la PTH [124]. Así pues, el efecto neto de la PTHrP en el riñón podría depender de la relación entre su efecto vasodilatador y un posible efecto indirecto sobre la vasoconstricción a través de la estimulación de la renina. No obstante, datos recientes señalan que el efecto predominante de la PTHrP local sería aumentar el flujo plasmático renal y el filtrado glomerular en el riñón normal [23;38].

Endlich y cols, estudiaron los efectos de la PTHrP sobre el tono vascular renal en un modelo de obstrucción renal caracterizado por su respuesta hemodinámica con activación del sistema renina-angiotensina (SRA) y vasoconstricción. En este contexto, observaron que el fragmento N-terminal de la PTHrP administrado localmente en el riñón obstruido es capaz de inducir la vasodilatación de todos los segmentos pre-glomerulares vasculares, incluida la arteria aferente, y un incremento del flujo sanguíneo renal [28]. La infusión intrarenal de este fragmento directamente en la arteria del riñón izquierdo en la rata incrementa el flujo sanguíneo, la tasa de filtración glomerular y el flujo de orina en este riñón [87]. Se ha observado también que la PTHrP (1-34) ejerce un efecto relajante directo sobre las células mesangiales aisladas de riñón humano [13]; un efecto que promovería un incremento del coeficiente de ultrafiltración glomerular (K_f) y de la tasa de filtración

glomerular. Por tanto, los datos actuales sustentan que la producción local de PTHrP podría participar en la regulación del flujo plasmático renal y de la filtración glomerular.

Además de sus efectos vasoactivos, la PTHrP podría tener otras acciones en el glomérulo. Soifer y cols. [130] observaron un aumento de expresión de PTHrP glomerular (y tubular) durante la fase de recuperación tras la isquemia renal en la rata. Este grupo también demostró un efecto mitogénico de la PTHrP (1-34) en cultivos de células mesangiales de rata; sugiriendo un posible papel de esta proteína en la recuperación del riñón tras el daño isquémico [130]. Estos autores presentaron la primera evidencia de un posible papel fisiopatológico de la PTHrP glomerular. Posteriormente, Bosch y cols. [13] encontraron un efecto proliferativo similar de la PTHrP (1-34) en células mesangiales humanas.

1.2.2 Efectos de la PTHrP en el Túbulo Renal

En las células tubulares renales, la PTHrP ejerce efectos similares a la PTH a través de su interacción con el PTH1R. La PTHrP incrementa la reabsorción de calcio en el túbulo distal; mientras que en el túbulo proximal, inhibe la reabsorción del fosfato y del bicarbonato, y estimula la actividad de la 25-hidroxicolecalciferol 1α -hidroxilasa [23;35;80;108]. De hecho, algunas de estas acciones de la PTHrP permitieron su caracterización y aislamiento inicial de tumores asociados a hipercalcemia [83].

Estudios en las células túbuloepiteliales renales LLC-PK₁ transfectadas de modo estable con el PTH1R muestran una alta afinidad de unión -en el rango nM- del dominio homólogo N-terminal de la PTH y la PTHrP, asociado con la acumulación de AMPc y la activación de

calcio intracelular/PLC [14;53]; en contraste a lo observado en células de músculo liso vascular donde el PTH1R señala exclusivamente a través de la vía de AMPc [81]. Datos recientes apoyan la hipótesis de que tanto la densidad del PTH1R como la eficiencia de su acoplamiento a proteínas G condicionan los mecanismos intracelulares asociados a una determinada respuesta biológica al dominio N-terminal de la PTHrP en células renovasculares [53;81;113;134].

El PTH1R parece tener un modelo distinto de señalización en diferentes segmentos de la nefrona. Así, en el túbulo distal, la absorción transcelular de calcio mediada por este receptor implica un aumento sostenido de calcio intracelular dependiente de PLD [37]. Sin embargo, en el túbulo proximal, la PLC es responsable del pulso de calcio intracelular y la activación de PKC inducidos a través del PTH1R [37]. En este segmento de la nefrona, tanto la PTH como la PTHrP inhiben el intercambio Na^+/H^+ apical por un mecanismo dependiente de AMPc [12;80].

Por otra parte, la PTHrP ejerce acciones no relacionadas con los efectos endocrinos de la PTH en el túbulo renal. Así, esta proteína es mitogénica para varias líneas celulares túbuloepiteliales renales, de túbulo proximal y distal [15;25;44-46]. En estas células, este efecto parece mediado por la estimulación tanto de la Ac como de la PKC [44;46]. Recientemente, se han descrito acciones anti-apoptóticas de la PTHrP sobre las células túbuloepiteliales y los fibroblastos renales; un efecto que parece mediado a través del PTH1R [106;123].

1.2.3 La PTHrP en la Fisiopatología Renal

Tras el fracaso renal, las células túbuloepiteliales se ven afectadas de un modo dependiente de la severidad del daño y del tiempo de exposición al mismo [59;75]. La respuesta proliferativa de las células túbuloepiteliales tras el daño renal es importante para la recuperación tanto estructural como funcional del riñón. Una variedad de factores de crecimiento que actúan de una forma auto/paracrina (p.e., el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1) participan en el proceso de reparación del epitelio tubular [48;58;59;90;143].

Los efectos mitogénicos de la PTHrP y su sobreexpresión temprana en modelos experimentales de fracaso renal agudo inducido por isquemia o nefrotoxinas sugirieron, en un principio, su posible participación en el proceso regenerativo renal [123;130]. Sin embargo, esta hipótesis se ha puesto en duda en estudios recientes. Así, se ha observado que el pre-tratamiento con bloqueantes de la Ang II inhibe la sobreexpresión de PTHrP pero no la respuesta hiperplásica tubular en ratas con nefrotoxicidad por ácido fólico [107]. Además, la expresión del PTH1R está reducida en modelos de fracaso renal agudo o nefropatía túbulointersticial por sobrecarga proteica [72;123;130]. Este hecho contrasta con el comportamiento del receptor de otro factor mitogénico renal bien caracterizado, el EGF, cuya expresión aumenta tras el daño renal [90]. Hallazgos recientes sugieren que factores independientes de la PTHrP o la Ang II podrían estar implicados en la reducción del PTH1R observada en varios modelos de daño renal [36;77;77]. Por otra parte, el PTH1R es capaz de translocarse al núcleo de las células tubulares renales [144]. Además, utilizando inmunohistoquímica, se ha demostrado una intensa inmunotinción intranuclear para PTHrP –pero no para el PTH1R- en las células tubulares renales de ratones con nefropatía diabética [61]. Actualmente se

desconoce la relevancia fisiopatológica de estos mecanismos en la acción de la PTHrP en el riñón dañado. De cualquier modo, el cuestionamiento de los hipotéticos efectos beneficiosos de la PTHrP en el fracaso renal agudo viene apoyado por estudios recientes en ratones con sobreexpresión tubular de PTHrP, que demuestran su ineficacia para proteger al riñón de la isquemia o del daño inducido por ácido fólico [36;106]. Estos hallazgos parecen desechar un papel relevante de la PTHrP en los procesos de regeneración tras el fracaso renal agudo.

La sobreexpresión renal de PTHrP también se ha observado en otros modelos de nefropatías experimentales. Así, la administración crónica de ciclosporina, que induce atrofia tubular y fibrosis intersticial, se ha asociado con un incremento de expresión de PTHrP, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en la corteza renal de rata [47]. Además, el ARNm de la PTHrP aumenta progresivamente en la corteza renal durante el desarrollo de la proteinuria en un modelo de daño túbulointersticial por sobrecarga de albúmina en la rata [72]. Es interesante destacar que en este modelo se observó una intensa inmunotinción de PTHrP en las células mesangiales del glomérulo, asociado al incremento del crecimiento mesangial, la expansión de matriz y la proteinuria [72]. Recientemente, se ha observado un aumento de los niveles renales del sistema PTHrP/PTH1R, correlacionado con la proteinuria, en ratones diabéticos por inyección de estreptozotocina [61]. Además, utilizando ratones transgénicos que sobreexpresan constitutivamente PTHrP en las células del túbulo proximal, se encontró un incremento significativo del índice de hipertrofia renal y de la proteinuria con respecto a los animales controles. Estos resultados indican que el sistema PTHrP/PTH1R podría desempeñar un papel deletéreo en la progresión del daño renal.

1.3. Relación entre la Ang II y la PTHrP en el Daño Renal

Es bien conocido el importante papel fisiopatológico que juega el SRA en los mecanismos de daño renal [26;54]. Así, actualmente se considera al principal agonista de este sistema, la Ang II, como un factor de crecimiento capaz de sintetizarse en las células renales y que promueve la progresión del daño renal [92;120]. En varios modelos experimentales de fracaso renal agudo, como la nefrotoxicidad por ácido fólico, la isquemia/repercusión y la obstrucción ureteral unilateral (OUU), se ha observado una activación temprana de los componentes del SRA, incluida la Ang II [6;20;34;70;76;107;123]. Los antagonistas de la Ang II ejercen efectos beneficiosos en la recuperación del daño renal en estos modelos [3;6;34;70;107].

Datos recientes apuntan a la PTHrP como un posible factor implicado en los mecanismos de daño renal inducidos por la Ang II. La administración exógena de Ang II incrementa, a través de su receptor tipo 1 (AT₁), la expresión de PTHrP en células glomerulares y tubulares, así como en células de músculo liso vascular, tanto *in vivo* como *in vitro* [77;102;109]. La infusión sistémica de Ang II, a dosis que no indujeron cambios en la presión arterial, en ratas produjo daño tubular y fibrosis, asociados a la sobreexpresión de PTHrP en el parénquima renal [77]. Por otra parte, la recuperación de la función renal por antagonistas de la Ang II en el fracaso renal agudo por nefrotóxico se asoció a una normalización de la expresión de PTHrP [107].

Como se ha mencionado anteriormente, estas células tienen los mecanismos necesarios para sintetizar la Ang II, donde puede actuar de forma autocrina, paracrina o, incluso, intracrina [6;24;101;114]. De hecho, la interacción de la Ang II intracelular con sus receptores nucleares puede incrementar la transcripción génica[39;101]. En este

sentido, datos recientes de nuestro grupo demuestran que la inducción de la PTHrP por una dosis nefrotóxica de ácido fólico en células túbuloepiteliales depende de la relocalización perinuclear del complejo Ang II/AT₁ [107]. El mecanismo por el cual la Ang II aumenta la transcripción de la PTHrP en estas células requiere la fosforilación de ERK (quinasa de respuesta extracelular) seguida de la activación del factor de transcripción CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc) [107]. En conjunto, los datos actuales sugieren que en el daño renal: 1) la Ang II es un factor importante en la sobreexpresión de PTHrP; 2) la PTHrP podría contribuir a los efectos deletéreos de la Ang (Fig. 3).

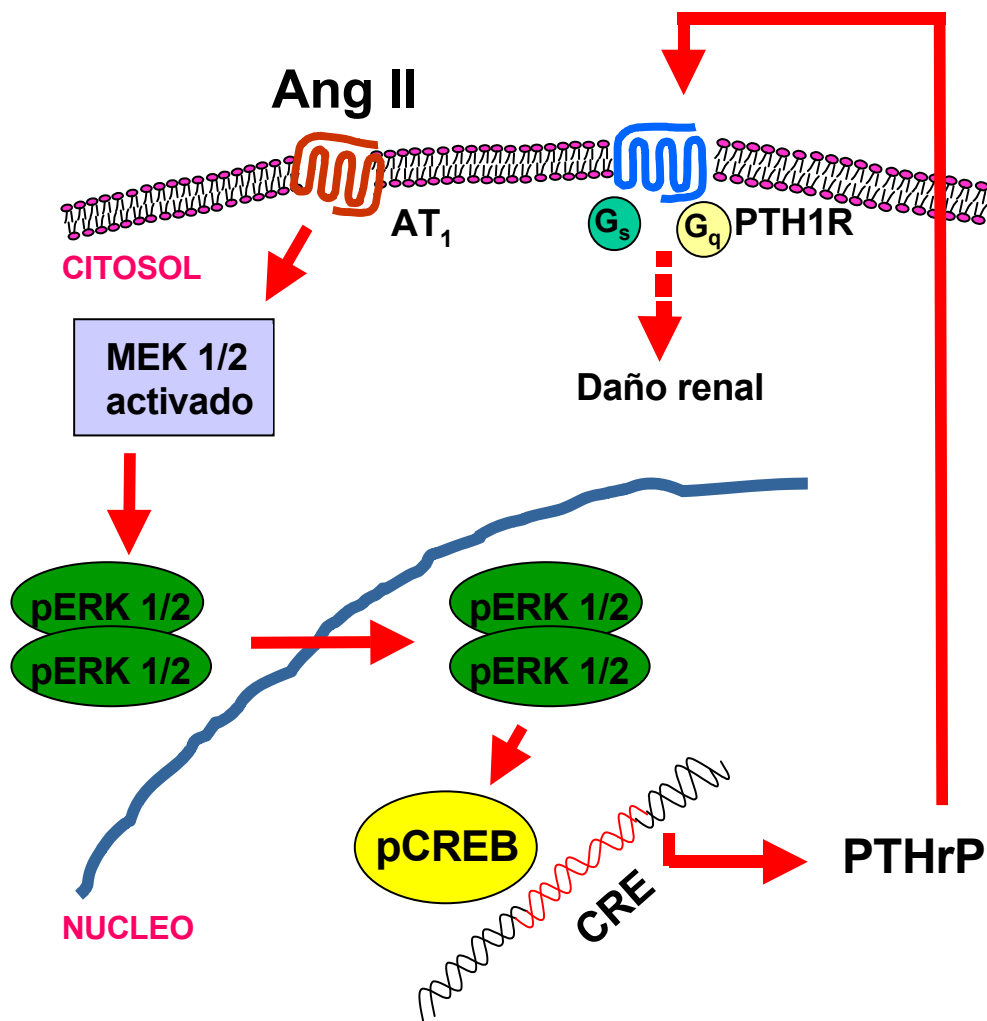


Fig. 3. Posible mecanismo por el que la PTHrP podría mediar las acciones de la Ang II. MEK = MAP/ERK quinasas 1 y 2; CRE= Elementos de respuesta a AMPc

1.4. Inflamación

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de eventos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones fisicoquímicas o biológicas. En el proceso inflamatorio destaca, en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona reactiva frente al agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata y, por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos, lo que lleva consigo alteraciones vasculares para favorecer este proceso migratorio [43;82;119]. De forma esquemática, se puede dividir la inflamación en cinco etapas:

- 1- Síntesis de mediadores. Son moléculas sintetizadas y/o liberadas bajo la actuación de determinados estímulos.
- 2- Una vez liberados, estos mediadores producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de células inmunes al foco inflamatorio.
- 3- Llegada de células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el proceso inflamatorio integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- 5- Reparación. Esta fase está constituida por una serie de sucesos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. Si esta fase no prospera, se pasa a una fase de inflamación crónica.

1.4.1 Inflamación y Riñón

Los procesos inflamatorios constituyen una etapa crítica en la evolución del daño renal. Así, un exceso de respuesta inflamatoria mal resuelta tras el daño inicial, conduce a una fibrosis progresiva y a la consecuente pérdida de función renal. Tras el daño, el riñón evoluciona a través de diferentes fases hacia un estadio terminal de fibrosis (Fig. 4). En la primera fase (de inducción), se comienzan a sobreexpresar citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en el tejido renal dañado. Esto se correlaciona con la migración de leucocitos circulantes, mayoritariamente monocitos/macrófagos y linfocitos T, hacia el intersticio renal [98] (Fig. 5). Además, en la zona túbulointersticial comienzan a migrar, activarse y proliferar fibroblastos. Esta activación fibroblástica se induce tanto por la acción de los leucocitos infiltrados como por factores secretados por las células tubulares. La segunda fase tras el daño renal se caracteriza por un aumento de síntesis y deposición de matriz extracelular y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte tanto de las células infiltradas como por células residentes en el tejido renal. En la fase final del daño que lleva a la pérdida de la función renal, en la que cesan los estímulos inflamatorios primarios, las células túbuloepiteliales secretan factores pro-fibrogénicos y continúa la proliferación de los fibroblastos activados.

1.4.2. Papel de las Células Túbuloepiteliales en la Inflamación Intersticial Renal

Las células túbuloepiteliales tienen un papel central en el desarrollo de la inflamación intersticial en el riñón dañado. Así mismo, estas células están expuestas al daño inducido por la presencia de proteinuria en las patologías glomerulares. Está bien demostrado que la reabsorción de proteínas asociada a la proteinuria produce toxicidad

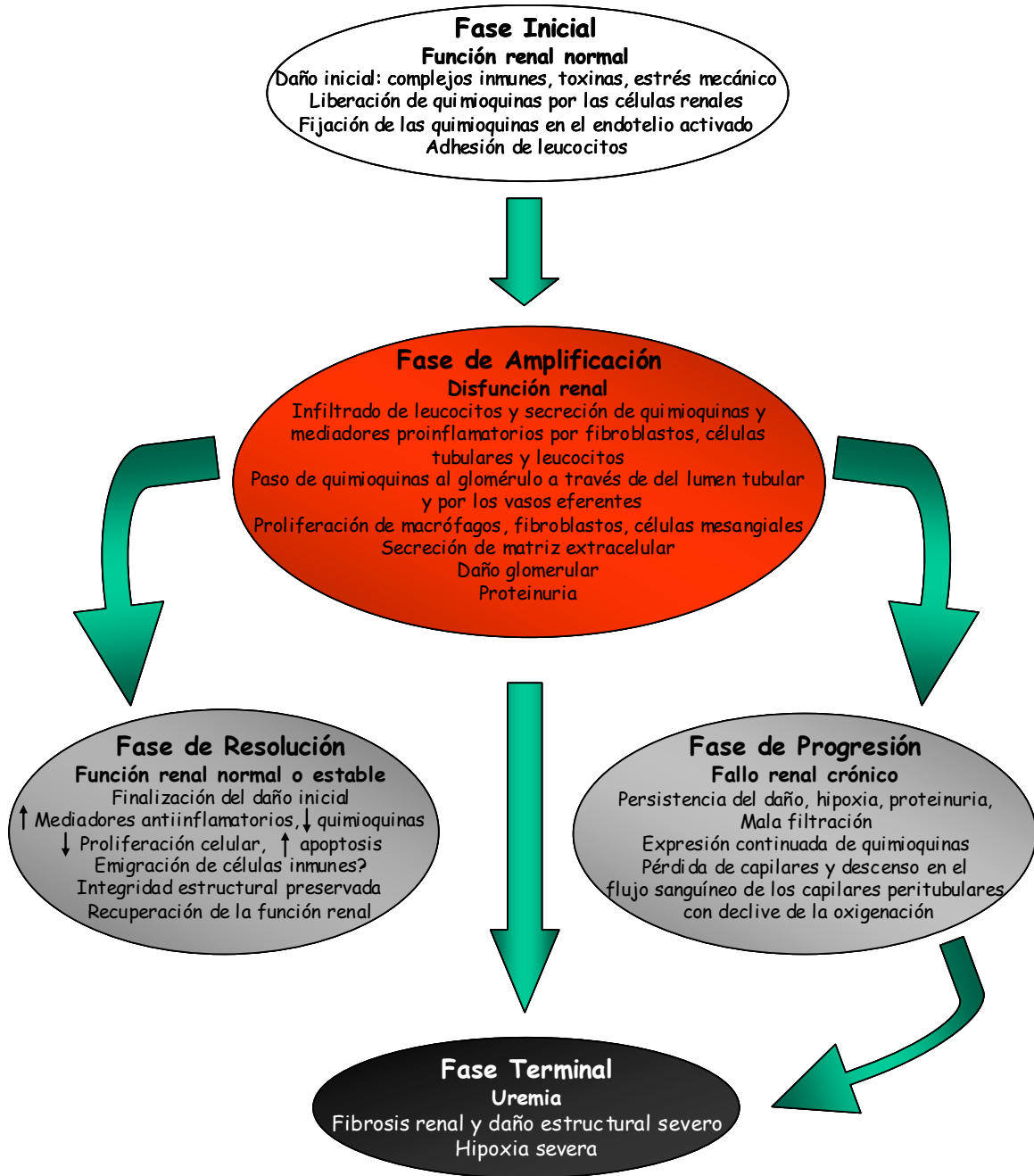
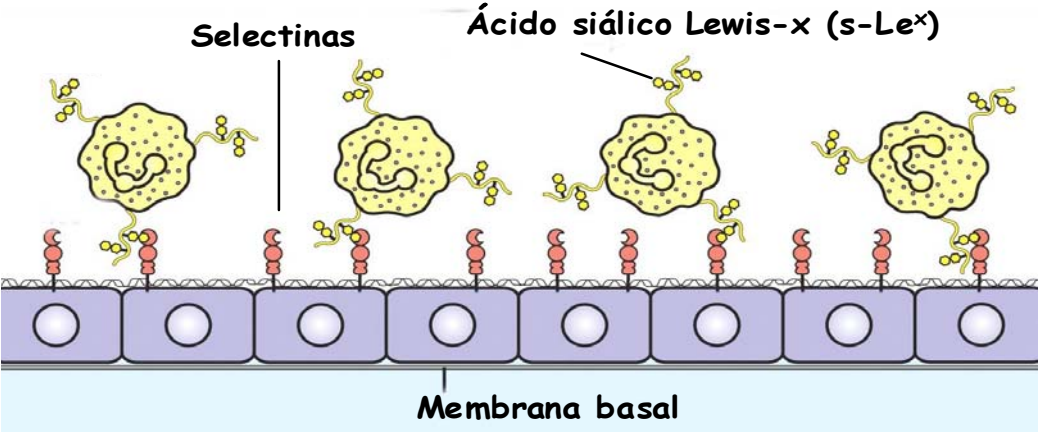


Fig. 4. Esquema de las fases de progresión del daño renal

Unión débil, mediada por las selectinas y sus ligandos, de las células endoteliales a los leucocitos, que permite que los leucocitos rueden por la superficie del endotelio vascular



| | | | |
|----------------------|---------------------------|------------|-----------|
| Adhesión de rodadura | Unión fuerte al endotelio | Diapédesis | Migración |
|----------------------|---------------------------|------------|-----------|

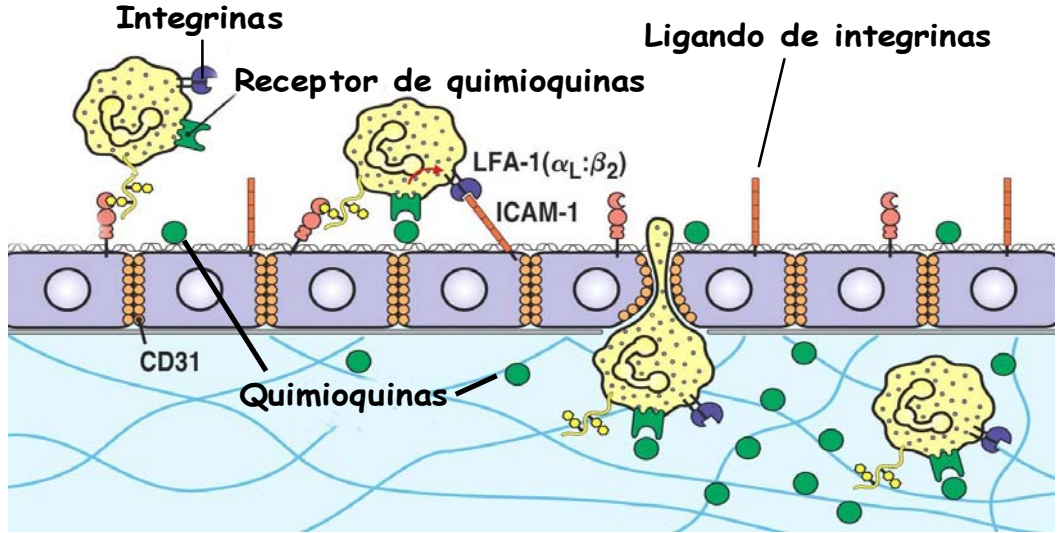


Fig. 5. Esquema general de los procesos de desplazamiento, fijación, diapédesis y migración de los leucocitos que se activan en la inflamación

tubular, a la que también contribuyen citoquinas que provienen del glomérulo dañado o del torrente circulatorio. Estos estímulos inducen a las células túbuloepiteliales a sintetizar y secretar diversas citoquinas/quimioquinas, tales como proteínas del complemento, endotelina-1, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*), osteopontina y moléculas de adhesión implicadas en el infiltrado intersticial y en la activación de los fibroblastos (Fig. 6).

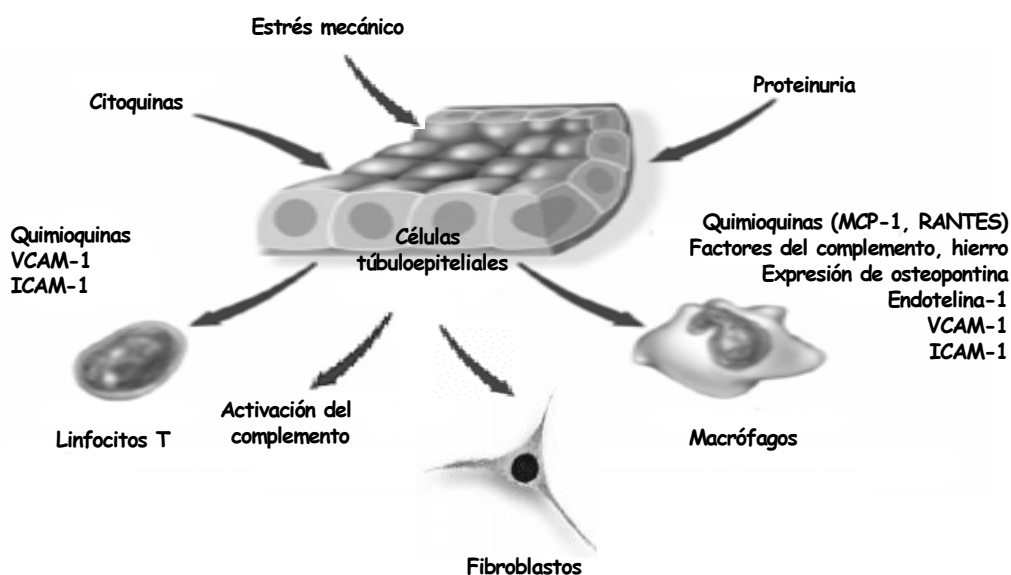


Fig. 6 Las células del epitelio tubular tienen un papel clave en la inflamación intersticial: estimuladas por proteinuria, citoquinas pro-inflamatorias y estrés mecánico responden a su vez con la síntesis y secreción de factores pro-inflamatorios que estimulan a leucocitos y fibroblastos.

Componentes del complemento filtrados a la orina pueden ser activados por las células tubulares [11]. En particular, las proteínas del complemento C3a y C5a son potentes quimiotácticos de monocitos. Además, las células túbuloepiteliales son capaces de sintetizar C3 y C4 tras ser expuestas a proteínas en su zona apical [136]. La ET-1 es también un factor quimiotáctico de monocitos [148].

MCP-1 y RANTES son quimioquinas bien caracterizadas en el daño renal. Ambas pueden ser sintetizadas por las células túbuloepiteliales y tanto su bloqueo como el de sus receptores reducen el componente inflamatorio intersticial, y por tanto mejoran la evolución del daño renal. La osteopontina es otro factor que se expresa en las células tubulares y contribuye al desarrollo del daño renal. Este factor es una molécula de adhesión de matriz extracelular que se describió originariamente en hueso. Animales transgénicos deficientes en esta proteína presentan menor infiltrado intersticial de macrófagos y deposición de matriz en el modelo de OUU [104]. Un aumento en los niveles del ion férrico liberado por la transferrina, especialmente en la orina acidificada, incrementa la inflamación renal [5]. También el estrés oxidativo mediado por hierro puede inducir la expresión de citoquinas pro-fibrogénicas [100], y la transferrina por sí misma puede ejercer efectos tóxicos sobre las células túbuloepiteliales [19]. Además, un aumento de expresión de las moléculas de adhesión ICAM (*intracelular adhesión molecule*)-1 y VCAM (*vascular adhesión molecule*)-1 precede al infiltrado intersticial en el proceso inflamatorio tras el daño renal.

Las células túbuloepiteliales son también capaces de responder a las propias citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, amplificando así la respuesta inflamatoria al daño renal [132].

1.4.3 La PTHrP como Citoquina Pro-Inflamatoria

Recientemente se ha sugerido que la PTHrP podría ejercer un papel mediador de citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral o ciertas interleuquinas, en algunas patologías inflamatorias e inmunes [41]. Así, se ha observado que la PTHrP se sobreexpresa en un modelo de endotoxemia y en la artritis reumatoide,

asociada a la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (citoquinas pro-inflamatorias bien caracterizadas). La endotoxemia letal por choque séptico se caracteriza por hipotensión y fallo multi-orgánico. En este contexto, la PTHrP está incrementada tanto en la circulación como en los órganos afectados. Su efecto hipotensor así como su relación con citoquinas proinflamatorias otorgan a la PTHrP un papel importante en la progresión de la inflamación en este modelo de daño. En la artritis reumatoide, se ha sugerido que los efectos deletéreos del TNF- α y/o la IL-1 β en el cartílago dañado podrían estar mediados, al menos en parte, por la PTHrP. Además, la expresión de IL-6 inducida por la PTHrP en sinoviocitos y osteoblastos podría contribuir a la alteración de la resorción ósea en esta patología. Así, la PTHrP podría constituir una diana de las terapias anti-inflamatorias en la artritis reumatoide [41].

Estudios *in vitro* han demostrado que la PTHrP activa el factor nuclear (NF)- κ B y la expresión de algunos factores dependientes del NF- κ B, como la IL-6 en distintos tipos celulares [42;52]. Este efecto parece implicar tanto la vía de PKA como a la PKC, al menos en células osteoblásticas [52]. En un estudio reciente de nuestro grupo, se ha observado una colocación de la PTHrP y el MCP-1 en células residentes e inflamatorias en placas de ateroma humanas [60;84;99]. Además, en células de músculo liso vascular, la PTHrP es capaz de aumentar tanto la actividad de NF- κ B como la expresión de MCP-1 [84]. Recientemente, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han descrito una asociación entre el infiltrado de macrófagos en el intersticio renal y la sobreexpresión de PTHrP en ratones con fracaso renal agudo inducido por ácido fólico [106;113].

Así pues, teniendo en cuenta la capacidad de la PTHrP como inductor de factores pro-inflamatorios, así como sus propiedades vasoactivas, la PTHrP podría jugar un papel importante en los mecanismos pro-inflamatorios desencadenados tras el daño renal.

1.4.4 Angiotensina II e Inflamación

Actualmente se considera a la Ang II no solo como un péptido vasoactivo, sino como una citoquina implicada en la regulación del crecimiento celular, la inflamación y la fibrosis; todos ellos, procesos que promueven la progresión del daño renal. En los últimos años, una diversidad de estudios han demostrado que la Ang II está implicada en los principales eventos y etapas del proceso inflamatorio (Fig. 7)[133]. Así, la Ang II incrementa la permeabilidad vascular que inicia dicho proceso, a través de la liberación de prostaglandinas (PGs) y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y mediante la reordenación de proteínas del citoesqueleto [10;110;125]. Además, la Ang II contribuye al reclutamiento de células inflamatorias a través de la regulación de moléculas de adhesión y quimioquinas en células túbuloepiteliales, mesangiales, del endotelio vascular y células de músculo liso vascular [40;67;71;91]. Por otra parte, la Ang II participa en la reparación y remodelado tisular modulando el crecimiento celular y la síntesis de matriz [26;92]. Los mecanismos moleculares a través de los cuales la Ang II ejerce todas estas acciones implican tanto la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, como a otros factores mediadores: endotelina-1, la proteína Rho (de la familia de proteínas G pequeñas) y especies reactivas de oxígeno generadas por activación de la NAD(P)H oxidasa [34;133;137].

1.5. La Obstrucción Ureteral Unilateral como Modelo de Nefropatía Inflamatoria

Los riñones y el tracto urinario constituyen un sistema y, por tanto, el proceso obstructivo puede afectarlo en su totalidad. La nefropatía obstructiva implica un trastorno en el drenaje de la orina acompañado de un aumento de la presión en sistema urinario; responsable de la

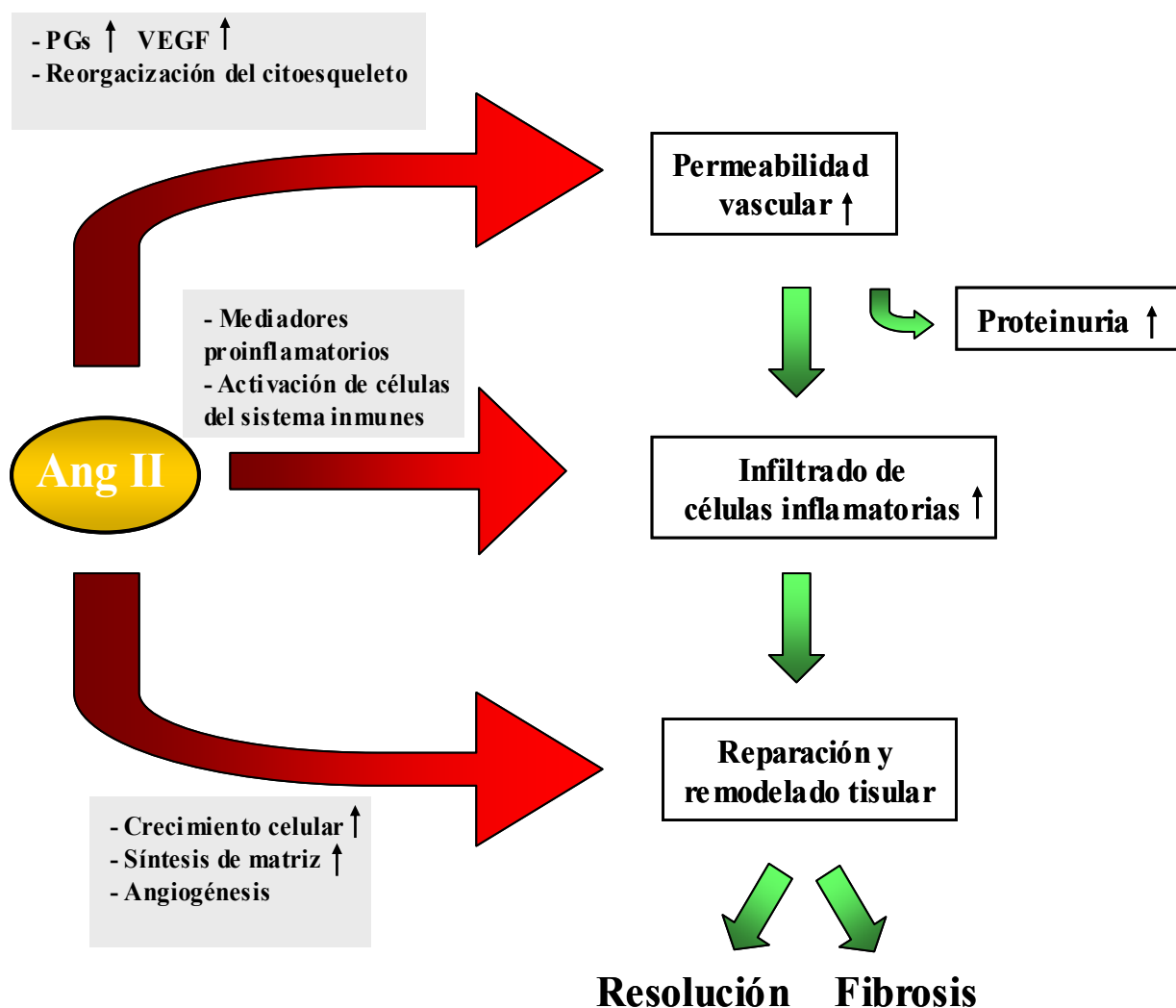


Fig. 7. La Ang II participa en los principales eventos de la respuesta inflamatoria. PGs=

dilatación –hidronefrosis- del riñón y vías urinarias [95]. Está bien establecido que este proceso desencadena una rápida e intensa respuesta inflamatoria. En este sentido, es interesante mencionar que ya en 1988 Schreiner y col., utilizando un modelo de nefropatía obstructiva experimental, describieron un rápido infiltrado renal de leucocitos que participan en la fisiopatología del riñón obstruido por medio de la producción de sustancias vasoactivas tales como el tromboxano A₂ [126].

La nefropatía obstructiva puede dar a lugar a cambios irreversibles de la estructura renal tales como la fibrosis intersticial, y puede presentarse en cualquier época de la vida. En los niños suele deberse a trastornos congénitos y se observa hasta en el 2-3 % de las autopsias. Por el contrario, en la edad adulta suele deberse a enfermedades adquiridas muy diversas entre las que se puede citar la litiasis renal. Se presenta hasta en el 4% de las autopsias tanto en hombres como en mujeres hasta los 20 años. Entre los 20-60 años la incidencia es mayor en mujeres, debido a patologías ginecológicas y el embarazo. A partir de la sexta década de la vida es en el hombre donde la incidencia es mayor debida frecuentemente a la patología prostática [69]. Las consecuencias renales de la obstrucción crónica del tracto urinario -tanto unilateral como bilateral- son complejas y suelen conllevar el desarrollo de atrofia del parénquima renal, seguido de fibrosis, con disminución del número de nefronas, y evolución a la pérdida progresiva de la función renal. De hecho, según el último informe de la sociedad española de nefrología (2005), sólo las nefropatías congénitas representaron el 2 % de las causas de insuficiencia renal crónica en España [18].

Tras la obstrucción ureteral (OU) se produce una respuesta hemodinámica (activación del SRA y vasoconstricción) y una respuesta inflamatoria intersticial renal [34]. Se ha demostrado la implicación de la activación del NF- κ B y de las MAPKs, como ERK, en estos procesos. Así, tras la OUU, la Ang II activa el NF- κ B, que promueve la expresión de factores pro-inflamatorios (quimioquinas, citoquinas, moléculas de adhesión, etc) [20;93]. El infiltrado de leucocitos al intersticio renal juega un papel importante en la progresión del daño renal obstructivo; y su control farmacológico reduce en gran medida el daño renal en esta situación [7;34]. Tanto la severidad del daño túbulointersticial como el grado de infiltrado de leucocitos al intersticio se correlacionan con el riesgo de progresión hacia un estadio de daño terminal y la pérdida

funcional del riñón obstruido [141]. El resultado final de una nefropatía obstructiva severa es una progresiva atrofia tubular y fibrosis intersticial con pérdida de nefronas.

Esta secuencia de acontecimientos que se desencadenan tras la OUU es común en humanos y ratones, lo que justifica el uso de estos roedores como modelo experimental en esta patología [21;27;34;104;141]. A pesar de los numerosos estudios clínicos y experimentales que han indagado sobre la fisiopatología de la nefropatía obstructiva, aún no existen marcadores tempranos de daño renal que permitan predecir su evolución, así como el desarrollo de dianas terapéuticas específicas en esta patología [22].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando los hallazgos descritos, que asocian a la PTHrP con la inflamación en diversos sistemas, hipotetizamos la implicación de esta proteína en los procesos inflamatorios desencadenados tras el daño renal. Para ratificar esta hipótesis, decidimos utilizar como modelo experimental *in vivo* ratones con OUU, normales y transgénicos con sobreexpresión constitutiva de la PTHrP en el túbulo proximal. Además, planteamos analizar *in vitro* los posibles mecanismos asociados a las acciones pro-inflamatorias de la PTHrP en las células túbuloepiteliales renales.

Planteamos los siguientes objetivos específicos:

In vivo.-

1. Estudiar la evolución del sistema PTHrP/PTH1R tras el daño obstructivo.
2. Evaluar la inflamación asociada a la sobreexpresión de PTHrP en el riñón obstruido.
3. Analizar las consecuencias del bloqueo farmacológico de la PTHrP o del PTH1R sobre el proceso inflamatorio desencadenado tras la OUU.
4. Determinar el posible papel de la PTHrP como mediador pro-inflamatorio de la Ang II en esta nefropatía experimental.

In vitro.-

1. Estudiar los mecanismos por los que la PTHrP induce la expresión de factores pro-inflamatorios en las células túbuloepiteliales.
2. Evaluar los efectos de la PTHrP, directos e indirectos a través de las células túbuloepiteliales, sobre la migración de macrófagos.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Ratones Transgénicos con Sobreexpresión Renal de la PTHrP

Los ratones transgénicos que sobreexpresan la PTHrP en el riñón fueron cedidos generosamente por los Dres. A.F. Stewart y A. García Ocaña (Dpto. de Endocrinología y Metabolismo, Universidad de Pittsburg, EEUU). Se construyeron utilizando el promotor de la γ -glutamyltranspeptidasa-I (GGT-I) que confiere especificidad en el túbulo contorneado proximal. En la construcción del transgénico se incluyó un transactivador controlado por tetraciclina, que permite la regulación reversible de la expresión génica (Fig. 8).

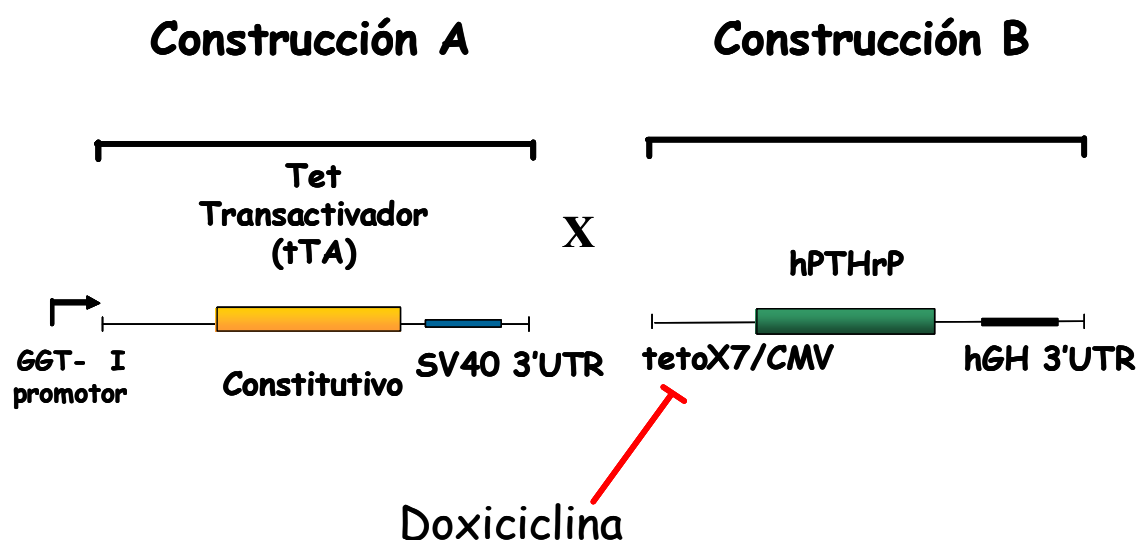


Fig. 8. Esquema de los dos transgenes utilizados para generar ratones con sobreexpresión constitutiva de PTHrP en el túbulo proximal. La construcción A contiene la secuencia de ADNc del promotor GGT-I, el tTA y el 3' UTR del antígeno del SV-40 T, que genera los ratones transgénicos GGT-tTA con la expresión específica de la proteína tTA en las células renales del túbulo proximal. La construcción B contiene la secuencia de ADNc de un elemento regulador híbrido compuesto por un operador de tetraciclina heptamerizado (tetoX7) fusionado con un elemento del promotor del citomegalovirus humano (CMV), la proteína PTHrP (1-141) humana y el 3' UTR de la hormona de crecimiento humana (hGH), que genera los ratones transgénicos Teto-PTHrP. Los ratones hemigénicos portadores de la construcción A se cruzaron con los portadores de la construcción B, y la descendencia que presente ambas construcciones tendrá una sobreexpresión constitutiva de la PTHrP localizada específicamente en las células del túbulo proximal. El tratamiento continuado de estos ratones con doxiciclina bloquea el operador tetoX7 de la construcción B, anulándose la sobreexpresión de PTHrP.

En primer lugar, se insertó un fragmento de 2,2 Kb perteneciente al promotor GGT-I delante de la secuencia que codifica para la proteína de fusión transactivadora *tet* (tTA) que actúa como un activador de la transcripción (construcción A). Por otra parte, el ADNc de la PTHrP (1-141) humana se situó bajo el control de un elemento regulador híbrido consistente en un operador sensible a tetraciclina heptamerizado (TetoX7) fusionado a un elemento inactivo del promotor del citomegalovirus humano, seguido de las secuencias 3' no traducidas del gen de la hormona de crecimiento humana (construcción B). Los animales transgénicos se identificaron mediante PCR del ADN aislado de la cola del ratón, usando los siguientes cebadores específicos: tTA [(5'- AACAACCCGTAAACTCGCC-3') y (5'-AAATCTGC CAGCTTTCCC-3')], hGH [(5'-CTACGGGGCTCTACTGCTTCAGG-3') y (5'-GGCACTG GAGTGGCAACTCCAAGG-3')] y GAPDH [(5'-CGTGGAGTCT ACTGGTGT CTCAGC-3') y (5'-GATGGCATGGACTGTGGTCATGAGC-3')], como gen constitutivo [123]. Para mantener las líneas de transgénicos, éstos se cruzaron con ratones normales Swiss CD-1. Para inducir la expresión de PTHrP, los ratones hemicingotos para la construcción B se cruzaron con los ratones hemicingotos portadores de la construcción A, generando así los ratones hemicingotos dobles transgénicos para GGT-tTA y Teto-PTHrP (PTHrP-TG). La sobreexpresión de la PTHrP no indujo cambios significativos ni en la morfología ni en la función renal basales; sólo se observó una leve hipofosfatemia, consistente con los efectos fosfatúricos de la PTHrP [36].

3.2. Modelo Experimental de OUU

Se utilizaron ratones (hembras y machos) de 25-35 g de peso corporal (4-8 meses). Los resultados obtenidos en los animales que sobreexpresan constitutivamente la PTHrP (PTHrP-TG) fueron comparados

con los animales controles (GGI-1, Teto-PTHrP y CD1) sin sobreexpresión constitutiva de PTHrP.

La OUU se llevó a cabo mediante ligadura distal del uréter izquierdo, a través de una incisión abdominal, con hilo de seda (3/0) en dos puntos separados del uréter, cortando entre los dos puntos para prevenir infecciones del tracto urinario (Fig. 9). Los ratones fueron sacrificados a diferentes días tras la obstrucción, obteniendo tanto el riñón obstruido como el contralateral. Los riñones de los ratones con operación simulada, con el uréter manipulado pero no obstruido, sirvieron como controles de la obstrucción. Todas las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo bajo anestesia. En algunos casos, previamente a la inducción del fracaso renal y durante el período de estudio, se administró el análogo [Asn¹⁰, Leu¹¹, D-Trp¹²] PTHrP (7-34) amida [PTHrP (7-34)], un bloqueante de PTH1R (35 µg/animal por día) (Bachem, Bubendorf, Suiza) por inyección intraperitoneal (i.p.) [87]. En otros casos, se administraron bloqueantes de los receptores de la Ang II: losartán (un antagonista del receptor AT₁) (10 mg/Kg por día, i.p.; MSD, España) o PD123319 (un antagonista del receptor AT₂) (30 mg/Kg por día, s.c.; Sigma, St. Louis, MO), un día antes de la OUU y diariamente durante el período de estudio. La eficacia de estos antagonistas sobre el bloqueo del PTH1R o de la Ang II, en su caso, ha sido comprobada previamente [34;86;121].

Como ya hemos mencionado en el punto 1, el operador TetoX7 presente en la construcción B del animal transgénico se inactiva en presencia de tetraciclina [68]. Así, sometimos a un grupo de ratones PTHrP-TG a un tratamiento con hidrocloreuro de doxiciclina, un análogo de la tetraciclina (Sigma) (200 µg/ml, en sacarosa al 4%, en el agua de bebida) desde una semana previa y durante los 4 días de obstrucción.

Se separaron varias porciones tanto del riñón contralateral como del obstruído; una porción se fijó en una solución de PFA al 4% para análisis morfológico e inmunohistoquímico; otra porción, para el aislamiento del ARN total; y el resto del riñón se utilizó para los estudios de expresión proteica. También se congeló en nitrógeno líquido una pequeña porción de corteza para analizar la actividad de NF- κ B (Fig. 9).

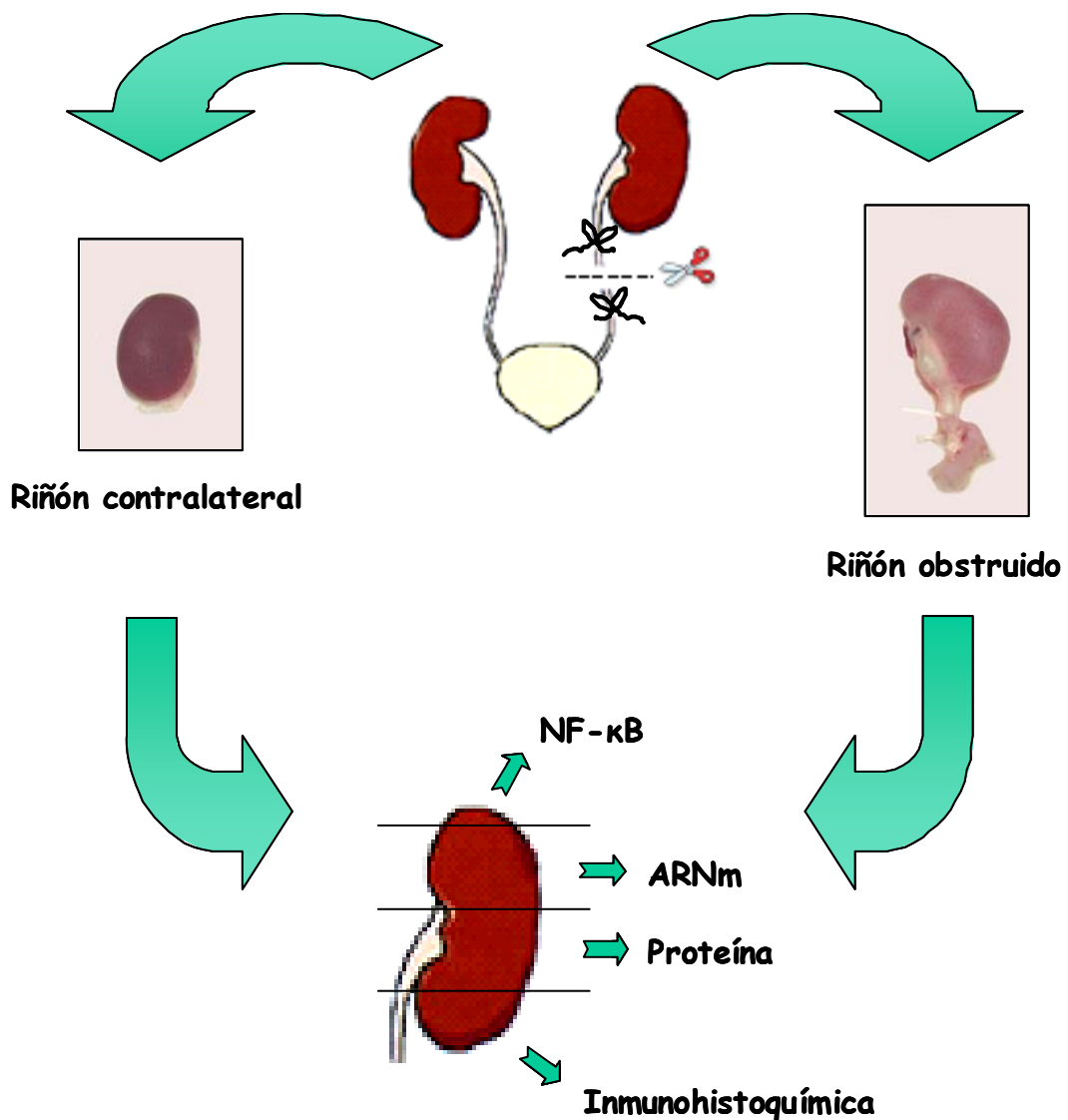


Fig. 9. Procedimiento quirúrgico y obtención de muestras tanto del riñón obstruído como contralateral en el modelo de OUU

3.3. Histología e Inmunohistoquímica

Las muestras histológicas se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y xilol y, posteriormente, se incluyeron en parafina. A continuación se realizaron cortes seriados de 2 μm de espesor que se depositaron en portaobjetos tratados con 3-aminopropiltrietoxisilano (APES)(Sigma) para aumentar la adherencia de los cortes al portaobjetos. Para valorar las alteraciones morfológicas, algunas secciones de riñón fueron teñidas con hematoxilina/eosina. Los posibles cambios en la matriz extracelular tras el daño renal se analizaron con tinción de Masson (Sigma). Para las inmunotinciones, los cortes se calentaron a 60°C durante 2 h, se enfriaron, y se desparafinaron e hidrataron mediante baños sucesivos con xilol, etanol absoluto, etanol 96%, etanol 70% y H₂O destilada. Tras la hidratación, los cortes se sometieron a dos pulsos (2 min) en el microondas a máxima potencia, en una solución de citrato 0,1M, pH 6, para el desenmascaramiento antigénico. Después, se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 30 min. Seguidamente, los cortes se incubaron con suero de cabra al 1,5% en tampón fosfato salino (PBS) durante 30 min para el bloqueo de uniones inespecíficas. En el caso de la inmunotinción para el marcador F4/80, el bloqueo se realizó con seroalbúmina bovina (SAB) al 8% y suero de cabra al 5% en PBS.

Las inmunotinciones se realizaron, según técnica estandarizada en nuestro laboratorio [61;77;84;106;107;123], utilizando los siguientes anticuerpos policlonales (dilución en paréntesis): anti-CD3 (1:200; Daco, Glostrup, Denmark), anti-PTH1R Ab-IV (1:200; Covance, Berkeley, CA); o el anticuerpo monoclonal anti-antígeno F4/80 de monocito/macrófago de ratón (1:50; Serotec, Oxford, RU). Tras toda la noche de incubación a 4°C con su correspondiente primario, los cortes se trataron con un complejo polimérico de peroxidasa-IgG anti-conejo (Envision+System, Dako)(CD3) o IgG anti-ratón o anti-rata (F4/80) biotinilada seguido del

complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako). Algunos cortes se incubaron sin anticuerpo primario, como control negativo. Las muestras se revelaron con el cromógeno DAB. Como contraste, se realizó tinción con hematoxilina.

Las tinciones fueron evaluadas en 5-10 campos, conteniendo al menos un glomérulo. El porcentaje del área teñida para Masson se evaluó de acuerdo con el siguiente criterio semicuantitativo: 0, tinción negativa; 1, 25% de tinción; 2, tinción entre un 25 y 50%; 3, tinción entre un 50 y 75%; y 4, por encima del 75%. Las tinciones para F4/80 y CD3 se evaluaron contando el número de células intersticiales teñidas por campo (x200), y calculando la media para cada animal. En todos los casos, el resultado final obtenido fue el valor medio de las evaluaciones.

3.4 . Cultivos Celulares

Las células MCT, suministradas por el Dr. Eric Neilson (Universidad de Pensilvania, PA), son células de túbulo proximal de ratón que se aislaron utilizando el marcador específico 3M-1 de este tipo celular [55] y que posteriormente fueron inmortalizadas. Se ha observado que esta línea celular es capaz de generar factores de respuesta inmune y matriz extracelular [55;57]. Además, las MCT responden al fragmento N-terminal común a la PTH y a la PTHrP [46;106] y expresa el PTH1R [61]. Estas células fueron cultivadas en RPMI 1640 con SFB al 10%, antibióticos (100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) y CO₂ al 5% a 37°C. La línea celular de monocitos/macrófagos RAW 264.7 (ECACC 91062702) fue generosamente aportada por el Dr. L. Rivas (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). Esta línea celular, que expresa receptores para quimioquinas y diversos factores proinflamatorios (quimioquinas, TNF e IL-1)[9;103;116], ha sido utilizada previamente para estudiar los mecanismos de la inflamación [16;78;127]. Las células RAW

264.7 se cultivaron en las mismas condiciones anteriormente mencionadas para las células MCT.

Para la realización de los experimentos, las células MCT (70,000 células/cm²) y las RAW 264.7 (3x10⁶ células/ml) se incubaron en medio libre de suero, con o sin PTHrP (1-36), a 0,1-100 nM, durante diferentes períodos de tiempo. La PTHrP (1-36) humana fue donada generosamente por el Dr. A. F. Stewart. En algunos experimentos, se añadieron 1 h antes del estímulo con PTHrP (1-36) diferentes inhibidores: PTHrP (7-34)(1μM); diversos inhibidores de NF-κB [Partenolida (Sigma)(25 μM) y Bay 117082 (Sigma)(25 μM)[128], que previenen la degradación de IκB por la inhibición de la fosforilación de IκB, o carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal (MG-132) (Calbiochem, San Diego, CA) (10 μM), que inhibe la actividad del proteosoma]; o el inhibidor de ERK 1/2 U0126 (Promega, Madison, WI)(25μM).

3.4.1 Inmunofluorescencia

Para analizar los cambios en la localización celular de la subunidad p65 del NF-κB, las células MCT subconfluentes, sembradas sobre cubreobjetos en placas multipocillo, se estimularon con PTHrP (1-36) (100 nM) de 15 a 45 min en medio sin suero, con o sin U0126. A continuación, se trataron las células con un fijador comercial (Merckofix[®], MSD). Tras la permeabilización con Tritón X-100 al 0,1% durante 20 min, las muestras se bloquearon con BSA al 3% durante 30 min. Se añadió el anticuerpo anti-p65 (1:75, Santa Cruz) en PBS, con SAB al 1% (toda la noche a 4°C). Posteriormente se incubaron con una IgG anti-ratón marcada con FITC (1:200) en PBS con SAB al 1% durante 1 h. Para el marcaje de los núcleos se realizó una incubación con yoduro de propidio (3 μg/ml) y RNasa A (0,1 mg/ml) en PBS durante 20min. Tras un lavado con agua, los cubreobjetos se montaron con Mowiol[®] sobre

portaobjetos, y se analizó la inmunofluorescencia con un microscopio confocal Leica DM-IRB.

3.4.2 Migración Celular

Para analizar la actividad quimiotáctica inducida por las MCT, primero incubamos estas células con diferentes agonistas durante 12 h. Tras este tiempo, retiramos el medio condicionado (1.300 μ l) y lo depositamos en dos pocillos de una placa P-24. Por otro lado, las células RAW 264.7 se sembraron en *Transwell* (5 μ m de poro; Corning, New York, NY) a 2×10^5 células/pocillo (200 μ l), depositado en la parte superior de cada pocillo de la P-24, y se dejaron migrar durante 24 h (Fig. 10). Ensayos preliminares demostraron que este período de tiempo es adecuado para analizar los efectos de los agonistas sobre la movilidad de estas células.

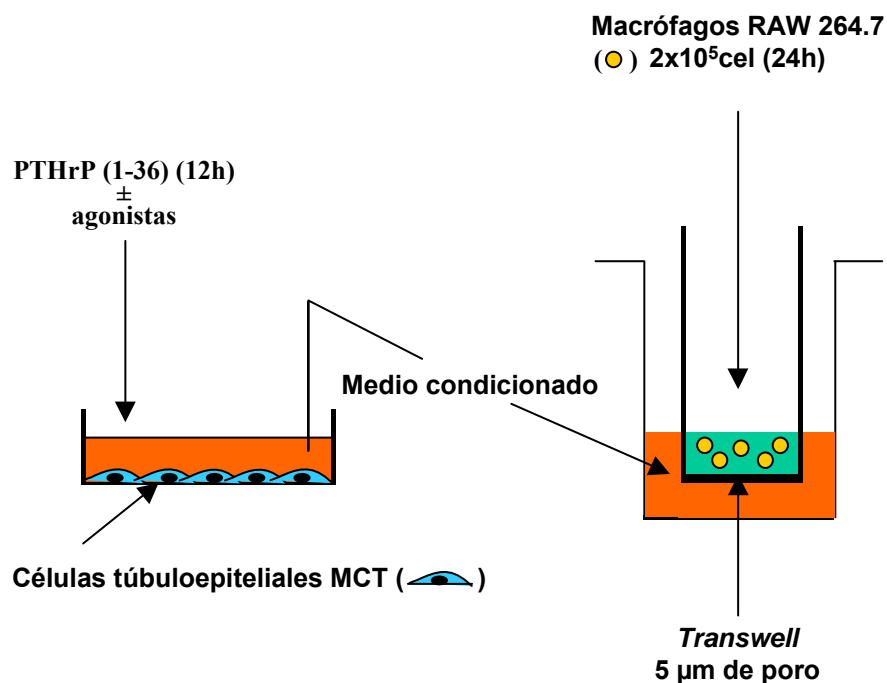


Fig. 10. Esquema representativo de un ensayo de migración utilizando *Transwells*

Para descartar el posible efecto quimiotáctico de la PTHrP presente en los medios condicionados de las MCT, tratamos estos medios con anticuerpos anti-PTHrP (C13, que reconoce la región N-terminal, y C6, que reconoce la región C-terminal)(ambos producidos en nuestro laboratorio) o PTHrP (7-34). También se trataron estos medios condicionados con anticuerpo anti-MCP-1 (1:100)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Además, evaluamos el efecto directo de la PTHrP (1-36) sobre la migración de macrófagos. En el *Transwell* sembramos células RAW 264.7 a la densidad utilizada anteriormente y en el pocillo de la P-24 pusimos medio RPMI con PTHrP (1-36) a diferentes concentraciones. Para estudiar la implicación del MCP-1 en la migración inducida directamente por PTHrP (1-36) utilizamos el anticuerpo neutralizante de esta quimioquina. Las células que migran al compartimiento inferior se contaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

3.5. Transferencia Western

El tejido renal o los extractos de células renales se homogeneizaron en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato sódico, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, aprotinina 0,8 μ M, pH 7,5, y la cuantificación de la proteína se realizó mediante el método de Bradford (Pierce, Rockford, IL), utilizando SAB como estándar. Los extractos proteicos así obtenidos (30-60 μ g de proteína), fueron separados en geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras. Las proteínas se

transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU), que se bloquearon durante 1 h a 37°C con leche desnatada al 5% en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (TBS) con Tween-20 al 0,05%. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos policlonales de conejo: MCP-1 (Santa Cruz Biotechnology)(1:500); PTH1R (Ab-IV; Covance, Berkeley, CA)(1:1.000); PTHrP (C6)(1:500)[36;77;106;107], o los anticuerpos anti-ERK 1/2 y anti-fosfo(p)ERK 1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴)(Cell Signaling Technology; Beverly, MA) (1:2.000). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-β actina (1:1.000) o anti-α tubulina (1:10.000)(Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron con una IgG anti-conejo o anti-ratón conjugadas con peroxidasa. Posteriormente, se reveló por quimioluminiscencia (Sistema ECL, GE Healthcare). Las bandas correspondientes del fluorograma fueron cuantificadas por densitometría mediante el programa *Molecular Dynamics Image Quant 3.3*.

3.6. Análisis por PCR a Tiempo Real

El ARN total se aisló con Trizol (Invitrogen, Groningen, Holanda), y la expresión génica se analizó mediante PCR a tiempo real siguiendo un protocolo estandarizado en nuestro laboratorio [34]. Brevemente, 4 µg de ARN se sometieron a transcripción inversa, usando oligonucleótidos aleatorios y la transcriptasa inversa modificada MMLV (Superscript II, Life Technologies, Rockville, MD), durante 2 h a 37°C, para la obtención del ADNc. La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un sistema ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando una polimerasa activada por calor TaqDNA (Amplitaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA),

así como cebadores específicos de ratón para: PTHrP (Mm00436057_m1); PTH1R (Mm00441046_m1); MCP-1 (Mm00441242_m1); RANTES (Mm01302428_m1); IL-6 (Mm00446190_m1); ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (Mm00516023_m1); y el receptor de MCP-1, CCR2 (Mm99999051_gH), y sondas TaqMan MGB correspondientes, obtenidos de Assay-by-DesignSM (Applied Biosystems). Después de una incubación inicial de 2 min a 50°C y otros 10 min a 95°C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de: 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s. El ARNr 18S se utilizó como gen endógeno amplificado en paralelo a los genes de interés. Los resultados se expresaron como niveles de expresión de cada gen de interés (una vez normalizados frente a los de la 18S) en cada condición experimental, respecto al control correspondiente [$2^{-\Delta C_t}$; El ciclo umbral (*threshold cycle*) (C_t) representa el ciclo de PCR en el cual el programa del equipo ABI 7500 detecta por primera vez un incremento apreciable de la fluorescencia sobre la señal basal. $\Delta C_t = C_t$ (gen de interés) – C_t (control endógeno 18S)]. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.7. Determinación de la Actividad de NF- κ B mediante Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética (EMSA)

Para analizar la actividad de NF- κ B *in vivo*, las porciones de riñón congeladas se pulverizaron y resuspendieron en: HEPES 20 mM, pH 7,6, NaCl 350 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,1 mM, ditioneitol 1mM y PMSF 0,5 mM en agitación durante 30 min. Tras centrifugar a 40,000xg durante 30 min

a 4°C, se recogió la fracción soluble. Los extractos celulares obtenidos (80 µg de proteína) fueron incubados con el oligonucleótido consenso de NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTCCCGGC-3'; Promega) marcado con [γ-³²P]-ATP.

Para determinar la actividad de NF-κB *in vitro*, se prepararon extractos proteicos nucleares de las células MCT tratadas a diferentes tiempos con PTHrP (1-36) 100 nM, en presencia o ausencia de U0126 (25 µM). Tras la estimulación, las células se centrifugaron a 5.000xg durante 10 min. El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de Tritón al 0,1% en PBS y se centrifugó a 3.000xg durante 10 min. El precipitado, que corresponde a la fracción nuclear, se lisó con: HEPES 20 mM, pH 7,9, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0,2 mM, aprotinina 1,4 µM, y se congeló a -80°C. Los extractos nucleares (4 µg de proteína) se incubaron con 200.000 dpm del oligonucleótido marcado descrito anteriormente en Tris-HCl 10 mM (pH 7,9), NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol al 4% y 1 µg de poli (dl-dC), en un volumen final de 15-20 µl durante 10-15 min a 4°C. Los complejos de ADN-proteína de las muestras *in vivo* e *in vitro* se resolvieron en geles de poliacrilamida al 5% en tampón de electroforesis Tris-ác. bórico/EDTA (TBE) 0,25x. Los geles se secaron y se expusieron a películas radiosensibles.

Como control de especificidad de la reacción, los extractos de riñón total (a los 4 días de obstrucción) o los extractos nucleares de las MCT [a los 30 min de estimulación con PTHrP (1-36)] se preincubaron con un exceso (100 veces) del oligonucleótido del NF-κB sin marcar. Para caracterizar las proteínas del complejo NF-κB-ADN, estos extractos nucleares se preincubaron durante 1 h a 4°C con 2 µl del anticuerpo anti-p65 citado o de un anticuerpo anti-p50 (Santa Cruz Biotechnology).

3.8. Análisis Estadístico

Los resultados descritos se han expresado como media \pm EEM. El efecto de los diferentes factores a lo largo del tiempo en el estudio *in vivo*, y las curvas de tiempo y de dosis-respuesta de la PTHrP (1-36) de los tratamientos *in vitro*, se evaluaron por análisis de varianza seguido de la prueba de Dunnett. La prueba de Mann Whitney (comparación no paramétrica entre dos muestras) se utilizó para analizar las diferencias entre los animales PTHrP-TG y los controles correspondientes, así como el efecto de los diferentes antagonistas *in vivo*. Esta prueba se utilizó también para analizar el efecto de los diferentes inhibidores en los experimentos *in vitro*. Se consideró una significación estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Expresión de PTHrP y su Receptor PTH1R tras la Obstrucción Ureteral Unilateral

Como se ha descrito en la literatura, tras el daño isquémico o daño renal agudo por nefrotoxicidad, la sobreexpresión de PTHrP se acompaña de una disminución de los niveles de PTH1R [41;77;106]. En este estudio, utilizando unos cebadores específicos de la PTHrP de ratón, encontramos que la expresión génica de la PTHrP endógena se incrementa de forma similar y significativa en los riñones obstruidos tanto de los ratones control como PTHrP-TG entre los 2- 6 días (Fig. 11A). Hay que tener en cuenta que la PTHrP que se sobreexpresa constitutivamente en estos últimos ratones proviene del transgén humano y, por tanto, el ARNm que codifica no es detectable por los cebadores, específicos de ratón, utilizados. A nivel proteico, utilizando un anticuerpo que reconoce tanto la PTHrP de ratón como humana, también se observa un aumento de PTHrP tras la obstrucción, pero en este caso, dicho aumento es superior en los animales transgénicos (Fig. 11B) [106]. Con respecto a los niveles de PTH1R, no encontramos variaciones ni a nivel de ARNm (Fig. 11A) ni de proteína (Fig. 11B), en los riñones obstruidos de ambos tipos de ratones estudiados. Teniendo en cuenta las variaciones de PTH1R que se han observado en otros modelos de daño renal [36;61;72;106;107], decidimos confirmar este resultado mediante inmunohistoquímica. Con esta técnica pudimos apreciar una inmunotinción positiva para PTH1R tubular, tanto basolateral (flechas) como en el borde en cepillo (cabezas de flecha) (Fig. 12), inalterada tras la OUU, en ambos tipos de ratones.

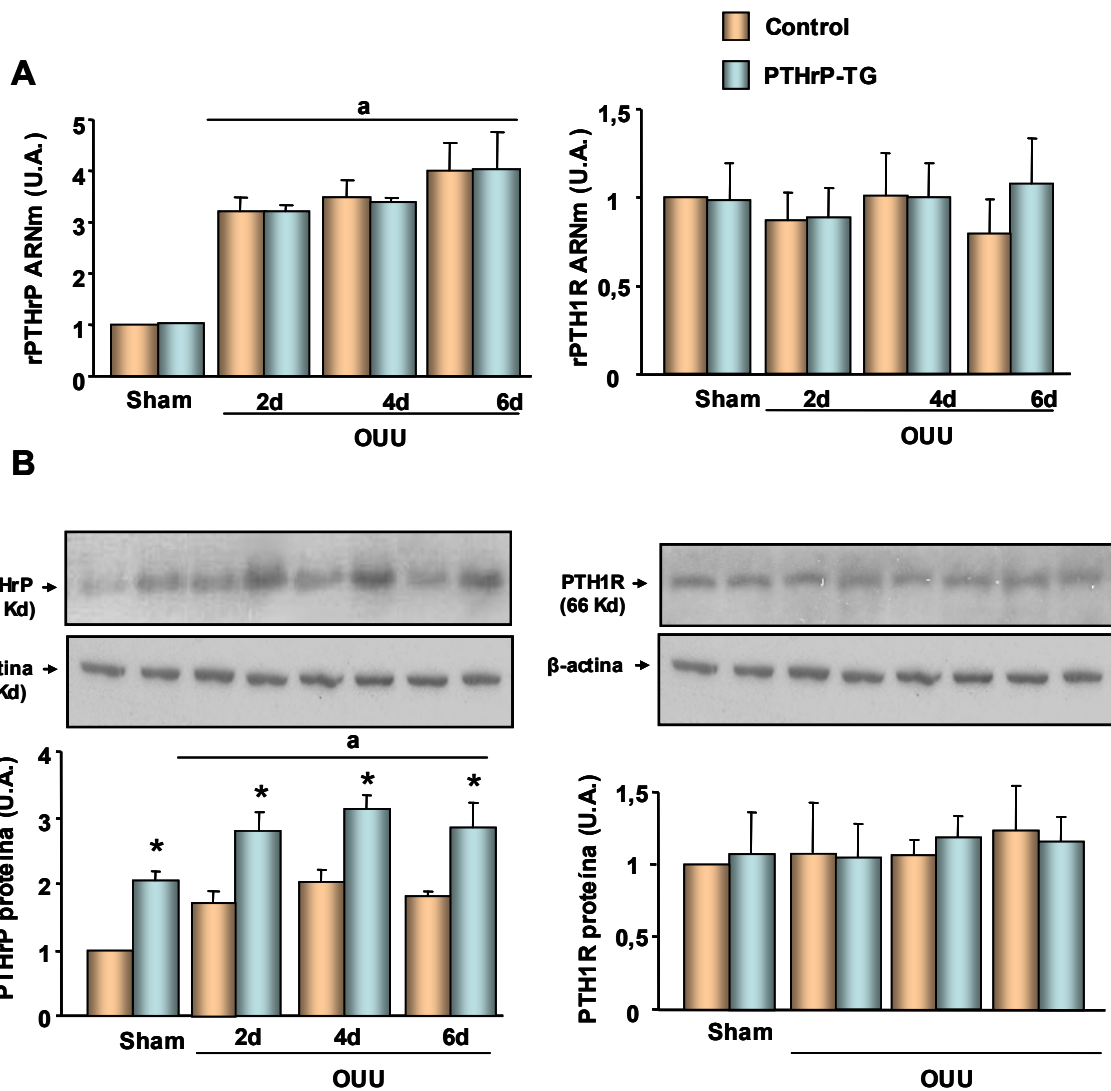


Fig.11. Evolución de la expresión de PTHrP y PTH1R en el riñón obstruido de ratón. La expresión génica de PTHrP y PTH1R (A) se evaluó mediante PCR a tiempo real, utilizando cebadores específicos de ratón (r), tanto en los riñones con operación simulada (*sham*) como en riñones con 2-6 días de obstrucción, obtenidos de ratones controles y ratones con sobreexpresión constitutiva de la PTHrP humana (PTHrP-TG). No se observaron diferencias en la sobreexpresión génica endógena de la PTHrP entre los dos tipos de ratones tras la OUU. Por otro lado, la expresión proteica de PTHrP y PTH1R (B) se determinó, en estos mismos animales, por transferencia western con anticuerpos que reconocen la PTHrP y PTH1R tanto de ratón como humana. Se puede observar como los animales PTHrP-TG tienen niveles proteicos basales superiores a los de los animales controles, y dicha diferencia se mantiene a lo largo del período de estudio. Con respecto al PTH1R, no se observaron diferencias entre ambos tipos de ratones, tanto a nivel génico como proteico. Se muestran geles representativos de la expresión proteica de PTHrP y PTH1R, utilizando como control de carga la α -actina. Los valores experimentales son la media \pm EEM de 4-6 ratones por grupo y por cada período de tiempo. * $p < 0,01$ vs valor de los ratones controles correspondientes; ^a $p < 0,01$ vs valor Sham correspondiente. U.A.= Unidades arbitrarias.

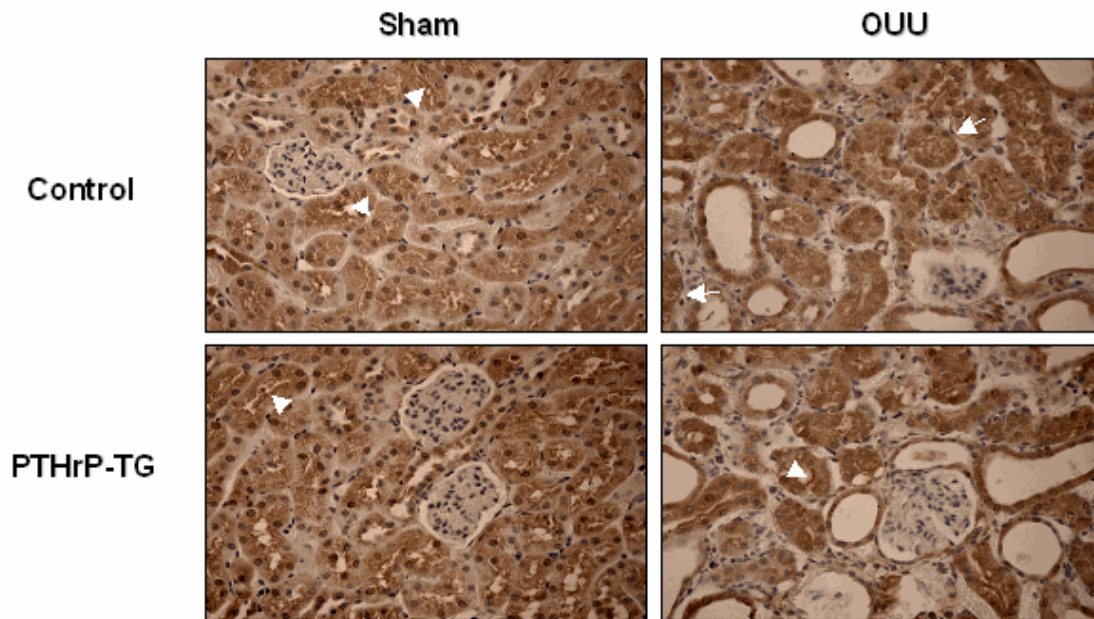


Fig. 12. Inmunotinción de PTH1R en el riñón de ratón. Inmunohistoquímica de PTH1R en riñones representativos de animales controles y PTHrP-TG, sometidos a operación simulada (Sham) u O UU, a 4 días (ampliación original x400). No se observaron cambios en los niveles de PTH1R ni con la obstrucción ni entre ambos tipos de animales. Se puede apreciar una tinción positiva para el PTH1R basolateral (flechas) y en el borde en cepillo (cabezas de flecha) de las células tubulares.

4.2. Estudio Morfológico del Riñón Obstruído

En este estudio, coherente con trabajos previos [36;106], no observamos diferencias histomorfológicas entre los animales control y los PTHrP-TG en condiciones basales. No obstante, las tinciones de hematoxilina/eosina y Masson a diferentes tiempos de la obstrucción mostraron que los ratones con sobreexpresión de PTHrP presentaron un significativo incremento de la atrofia y fibrosis túbulointersticial acompañado de mayor daño del epitelio tubular (Fig. 13).

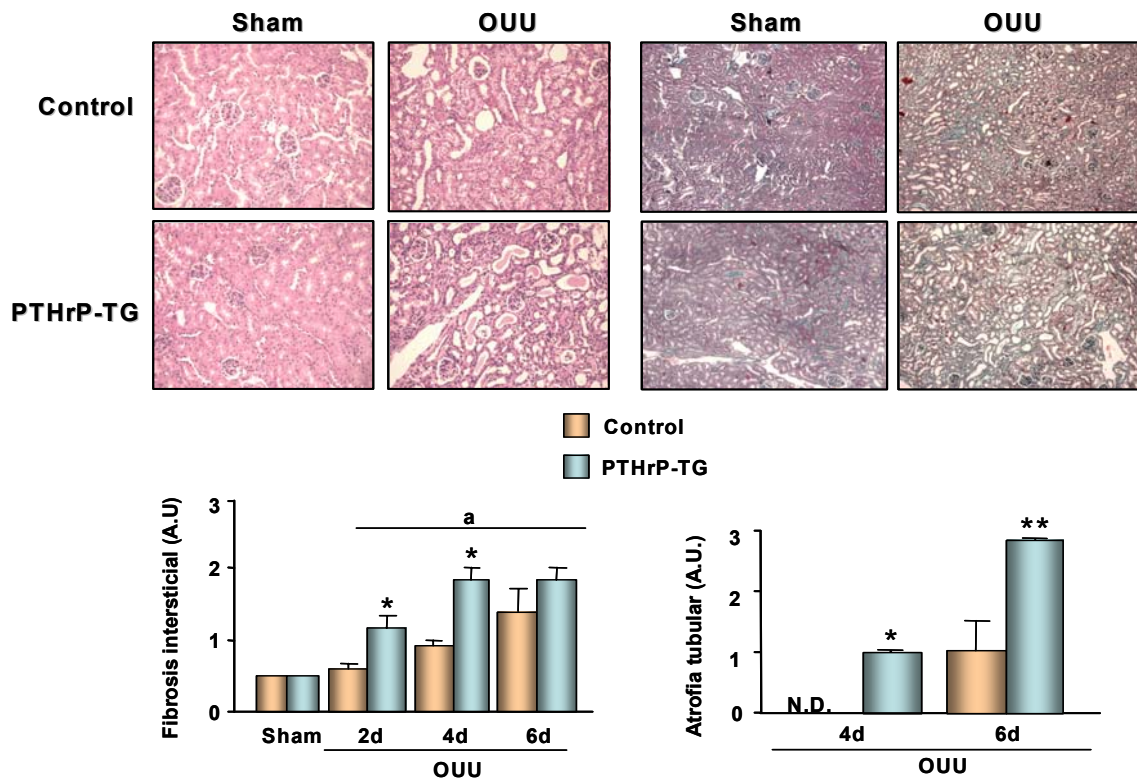


Fig. 13. Estudio de los cambios en la histomorfología renal tras la OUU en ratones. En los paneles superiores se muestran tinciones de hematoxilina/eosina (izquierda) y Masson (derecha) a 4 días tras la obstrucción en ratones controles y PTHrP-TG. Las gráficas inferiores representan la evolución de la fibrosis intersticial y de la atrofia tubular hasta 6 días en los riñones obstruidos de animales controles y PTHrP-TG. Los valores de la cuantificación de la tinción de Masson son la media \pm EEM de 4-6 animales por grupo y condición. * $p < 0,01$ vs valor correspondiente de los animales controles. ^a $p < 0,01$ vs valor del sham correspondiente. N.D.= no detectado.

4.3. La Respuesta de las Células Inflamatorias Intersticiales Renales está Relacionada con la Sobreexpresión de PTHrP tras la Obstrucción Ureteral Unilateral

En condiciones basales, tanto los ratones controles como los PTHrP-TG mostraron un número reducido de monocitos/macrófagos y linfocitos T (detectados por inmunotinción con F4/80 y CD3, respectivamente) en el intersticio renal. Sin embargo, a 4-6 días tras la obstrucción, observamos un gran incremento del infiltrado de

macrófagos en el intersticio renal en ambos tipos de ratones, siendo mayor en los animales PTHrP-TG (Fig. 14A). Además, el número de linfocitos T intersticiales también fue mayor en los animales PTHrP-TG ya a los 2 días tras la OUU, alcanzando valores similares en ambos tipos de animales al día 6 (Fig. 14B).

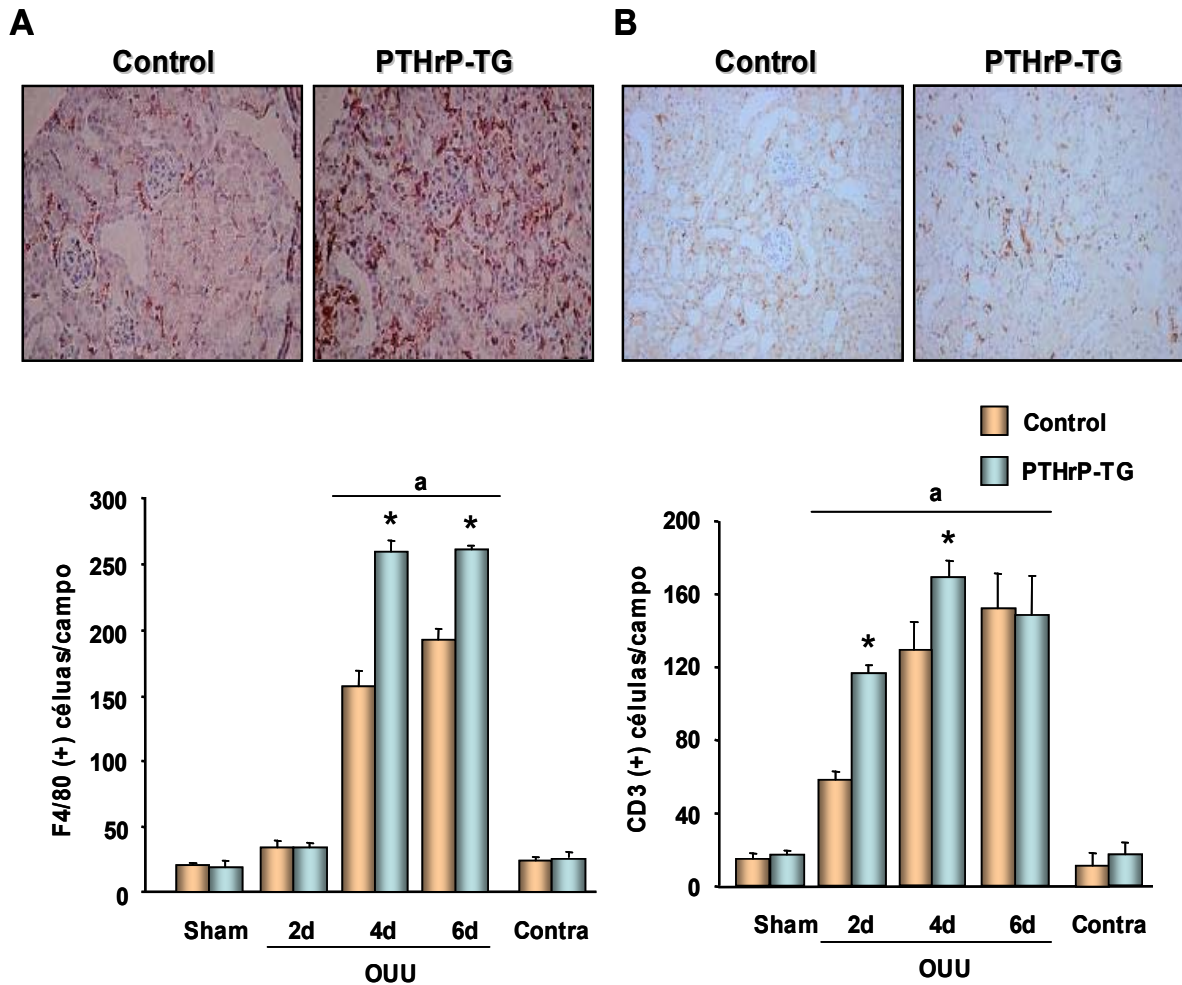


Fig. 14. Evolución del infiltrado de leucocitos en el riñón obstruido de animales controles y PTHrP-TG. En los paneles superiores se muestran fotografías representativas de la inmunotinción para F4/80 (a los 4 días de obstrucción) (izquierda) y CD3 (a los 2 días de obstrucción) (derecha) en cortes de riñón de ratones controles y PTHrP-TG (magnificación original, x200). En las gráficas inferiores se puede observar la evolución de la tinción para F4/80 (izquierda) y CD3 (derecha) hasta 6 días de obstrucción. Los valores de la cuantificación de células positivas son la media \pm EEM de 4-6 animales por grupo y por tiempo. * $p < 0,01$ vs valor control correspondiente. ^a $p < 0,01$ vs valor sham correspondiente. Contra = Riñón contralateral.

4.4. La Sobreexpresión de PTHrP en el Riñón Obstruido de Ratón se Asocia con un Incremento tanto de la Activación de NF- κ B como de la Expresión de Citoquinas y Quimioquinas Proinflamatorias

Se sabe que NF- κ B tiene un papel central en la respuesta inflamatoria tras la OUU como mediador de la sobreexpresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias [34;97]. En el presente estudio, los niveles de activación de NF- κ B fueron similares en los riñones no obstruidos, tanto en los animales PTHrP-TG como en sus controles. Sin embargo, a los 4 días tras la OUU, encontramos niveles elevados de esta actividad en los extractos de los riñones obstruidos de ambos tipos de ratones, siendo mayores en los PTHrP-TG. No se apreciaron diferencias significativas en los niveles de activación de NF- κ B en los riñones contralaterales de ambos tipos de ratones (Fig. 15).

Es conocido que tras la OUU se desencadenan una serie de acontecimientos que llevan a la sobreexpresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, así como de moléculas de adhesión, que favorecen el infiltrado de células inflamatorias en el riñón obstruido [141]. En el presente estudio, observamos una mayor expresión renal de MCP-1 (a nivel proteico) y de su receptor CCR2, así como de RANTES e IL-6 (a nivel génico) en riñones no obstruidos de los ratones PTHrP-TG en relación a la de los animales controles (Fig. 16). Tras la obstrucción se observó un incremento progresivo del ARNm de CCR2 y de RANTES, así como de los niveles de proteína de MCP-1 en ambos tipos de ratones en el período de estudio, siendo estos niveles superiores en los PTHrP-TG con respecto a los de los animales controles (Fig. 16, A-C). Además, observamos que los niveles de ICAM-1 alcanzaron un máximo a 2 días, manteniéndose dicho valor en los animales transgénicos y decayendo en los controles a lo largo del período de estudio (Fig. 16D). Por otra parte, encontramos un incremento rápido y transitorio de la expresión

génica de IL-6 tras la OUU, siendo ese incremento más acusado en los ratones PTHrP-TG (Fig. 16E).

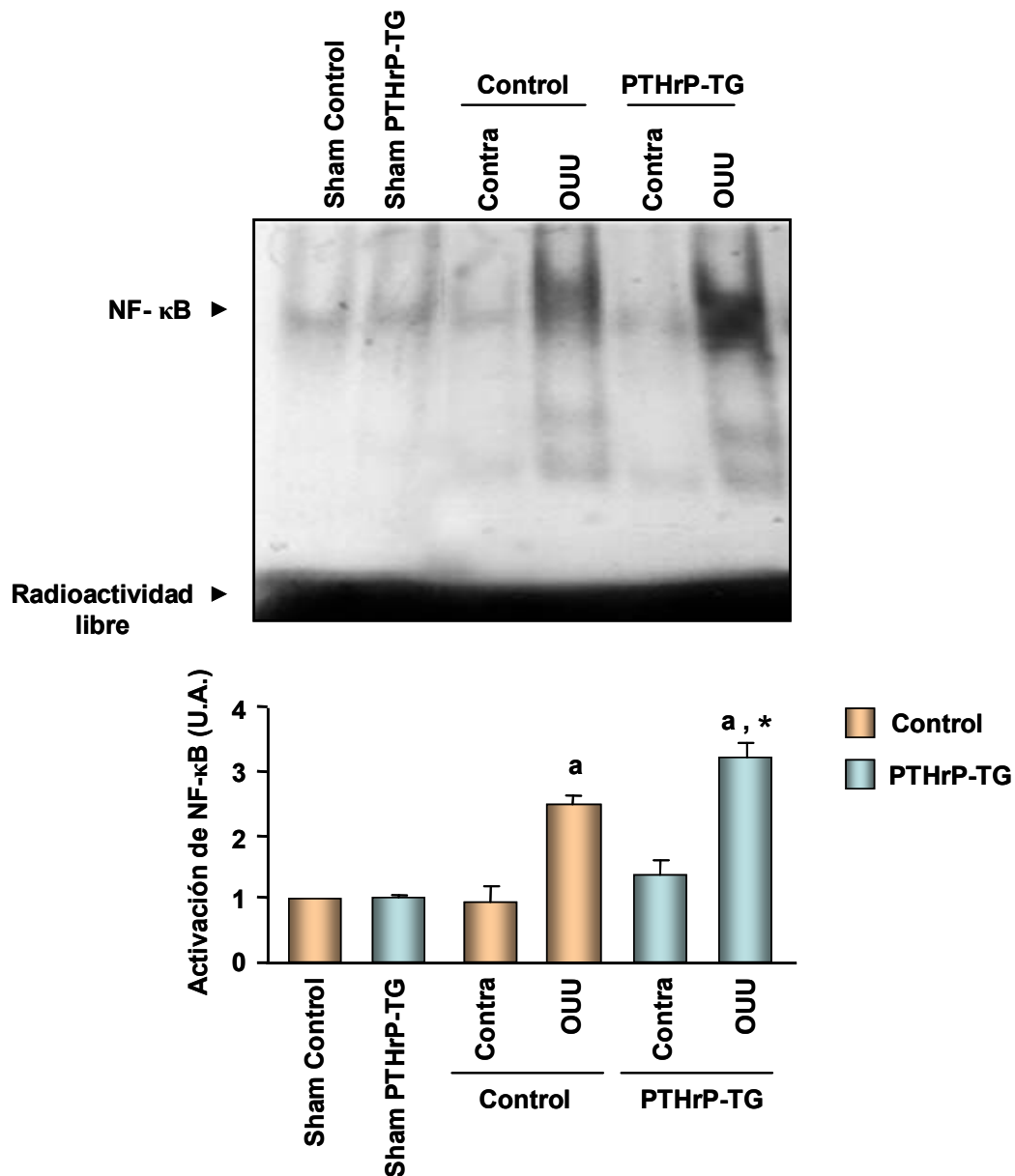


Fig. 15. Cambios en la activación de NF-κB en el riñón obstruido de ratones controles y PTHrP-TG. La activación de NF-κB se determinó por EMSA en extractos de riñón total de ambos tipos de ratones sometidos a OUU durante 4 días, utilizando como control de activación animales con operación simulada (sham). Se muestra un gel de EMSA representativo (panel superior). Los valores densitométricos son la media ± EEM de 4 animales por grupo (panel inferior). ^ap<0,01 vs valor del sham o del riñón contralateral correspondiente. *p<0,01 vs valor control correspondiente. U.A. = Unidades arbitrarias; Contra = Riñón contralateral.

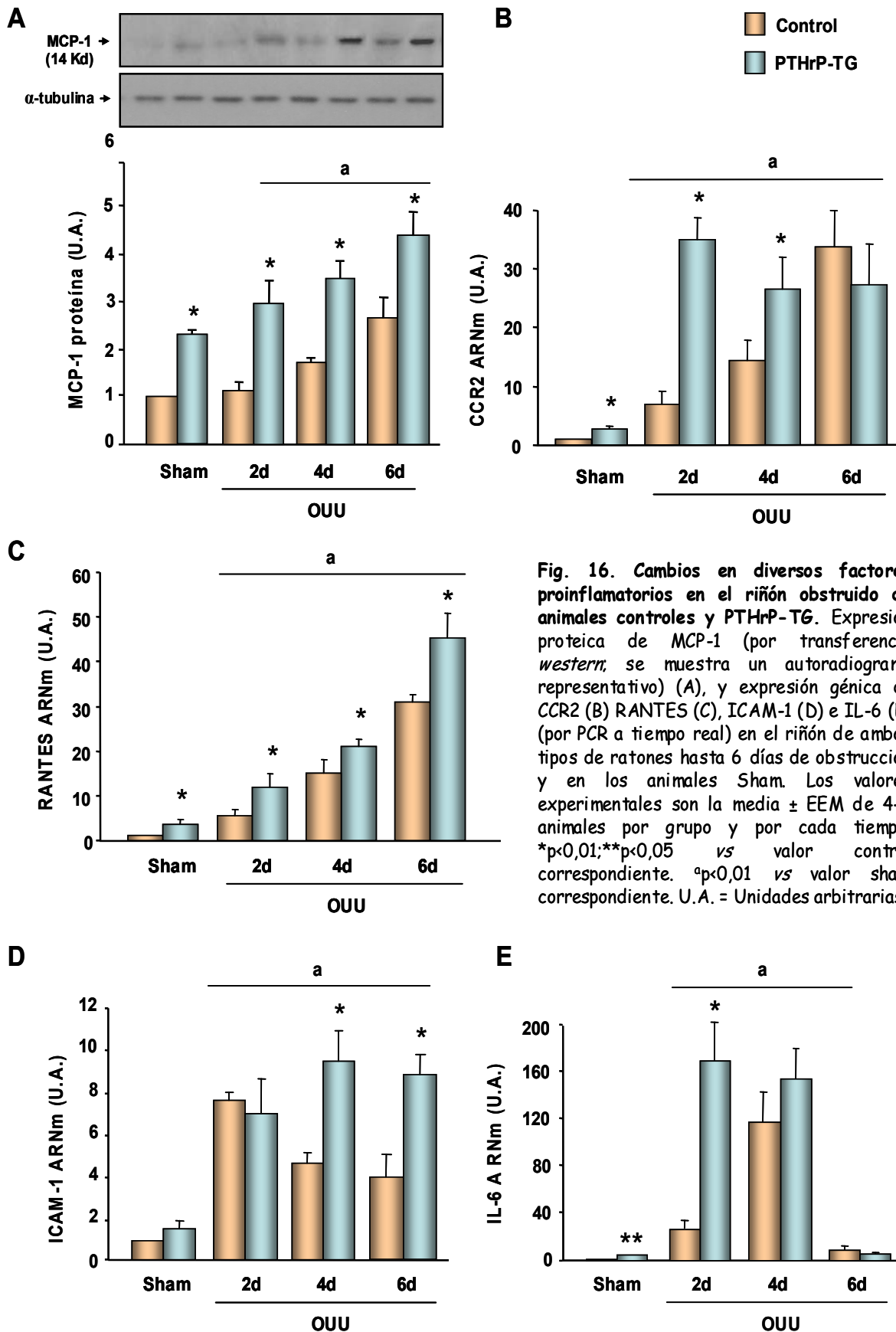


Fig. 16. Cambios en diversos factores proinflamatorios en el riñón obstruido de animales controles y PTHrP-TG. Expresión proteica de MCP-1 (por transferencia *western*; se muestra un autoradiograma representativo) (A), y expresión génica de CCR2 (B) RANTES (C), ICAM-1 (D) e IL-6 (E) (por PCR a tiempo real) en el riñón de ambos tipos de ratones hasta 6 días de obstrucción y en los animales Sham. Los valores experimentales son la media \pm EEM de 4-6 animales por grupo y por cada tiempo. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ vs valor control correspondiente. ^a $p < 0,01$ vs valor sham correspondiente. U.A. = Unidades arbitrarias.

4.5. La Modulación Farmacológica de PTHrP Reduce el Componente Inflamatorio en el Riñón Obstruido de Ratón

En los animales PTHrP-TG, la sobreexpresión de PTHrP está supeditada a la transactivación del operador tetoX7 y esa transactivación puede ser bloqueada con doxiciclina, como se ha explicado en el apartado 1 de la introducción. Así pues, tratamos a un grupo de animales PTHrP-TG con este antibiótico, a una dosis efectiva (200 µg/ml) para el bloqueo del promotor constitutivo que regula la sobreexpresión de la PTHrP [68;106]. Al anular esta sobreexpresión con este tratamiento, observamos una reducción de los niveles de PTHrP en el animal PTHrP-TG hasta los de los ratones controles (datos no mostrados) [36;106]. Además, esta disminución de PTHrP en los animales PTHrP-TG causada por la doxiciclina se acompañó de una bajada de actividad del factor NF-κB (Fig. 17A) y de la expresión génica de CCR2, RANTES e ICAM-1 (Fig. 17B), hasta valores similares a los de los animales controles tras 4 días de obstrucción.

Por otra parte, quisimos determinar los efectos del bloqueo de la PTHrP en la inflamación renal de los animales controles tras la OUU. Para ello, tratamos estos ratones con el péptido PTHrP (7-34) –un bloqueante del PTH1R [86;87;106]- desde un día antes de la operación y continuando con el tratamiento durante los 4 días de obstrucción. Este tratamiento produjo una disminución significativa en el número de monocitos/macrófagos y de linfocitos T intersticiales en el riñón obstruido respecto a los de los ratones no tratados (Fig. 18A). Esta disminución se asoció a unos menores niveles de las quimioquinas MCP-1 y RANTES en el riñón obstruido de los animales tratados (Fig. 18B).

Se ha descrito previamente que el losartán, un bloqueante del receptor AT₁ de la Ang II inhibe la sobreexpresión de PTHrP inducida por

A

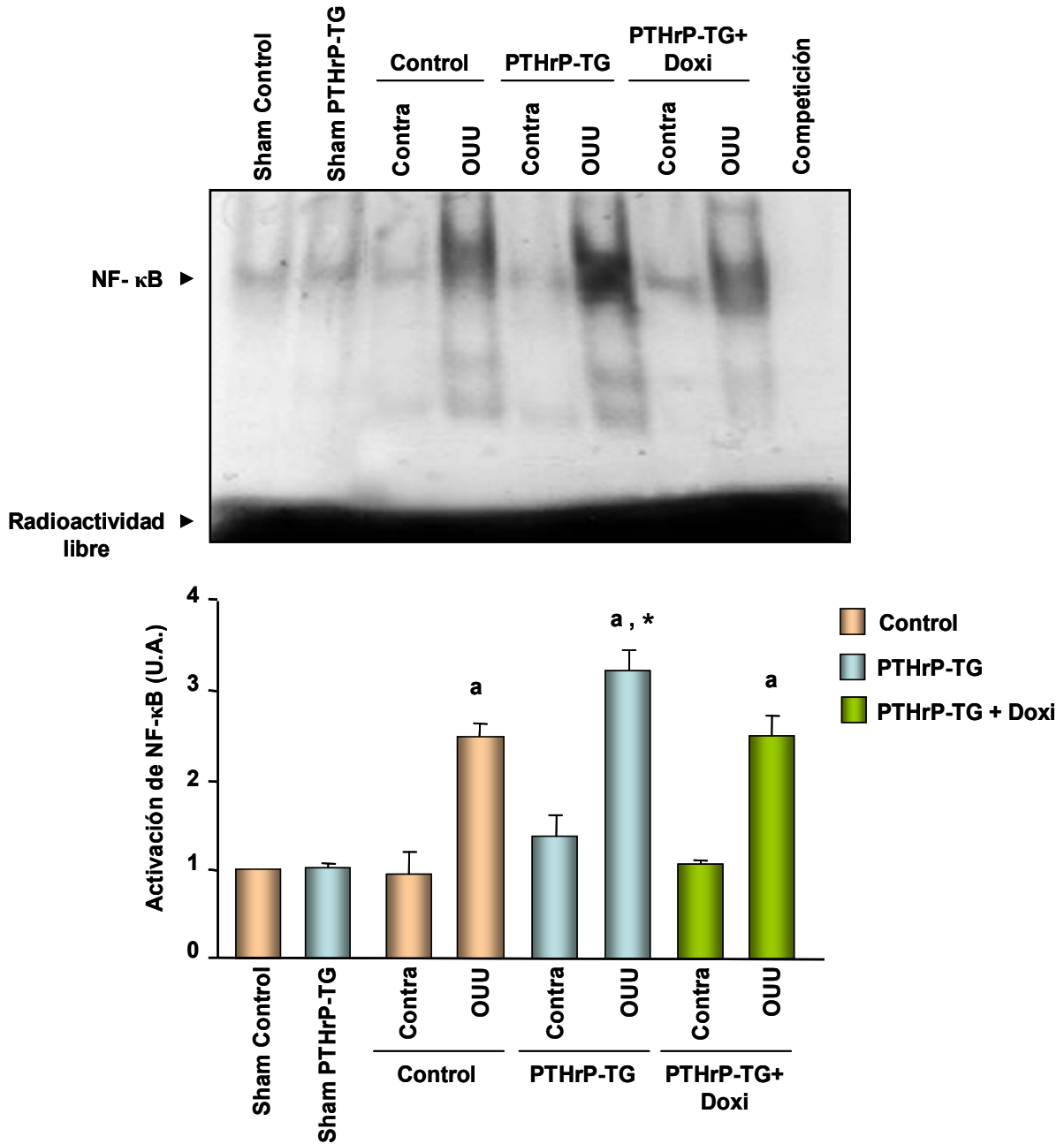


Figure 17A. Normalización de los niveles de factores proinflamatorios en los animales PTHrP-TG tratados con doxiciclina. (A) La activación de NF-κB se determinó por EMSA a partir de extractos de riñón total de ambos tipos de ratones sometidos a O UU durante 4 días u operación simulada (sham). Se muestra un gel de EMSA representativo (panel superior). Como control de especificidad, extractos celulares se preincubaron con un exceso de oligonucleótido de NF-κB no marcado durante 10 min a 4°C antes de añadir el marcado. Los valores densitométricos son la media ± EEM de 4 animales por cada grupo (panel inferior). ^ap<0,01 vs valor sham o contralateral correspondiente. *p<0,01 vs valor control correspondiente y tratado con doxiciclina. U.A. = Unidades arbitrarias. Doxi = Doxiciclina

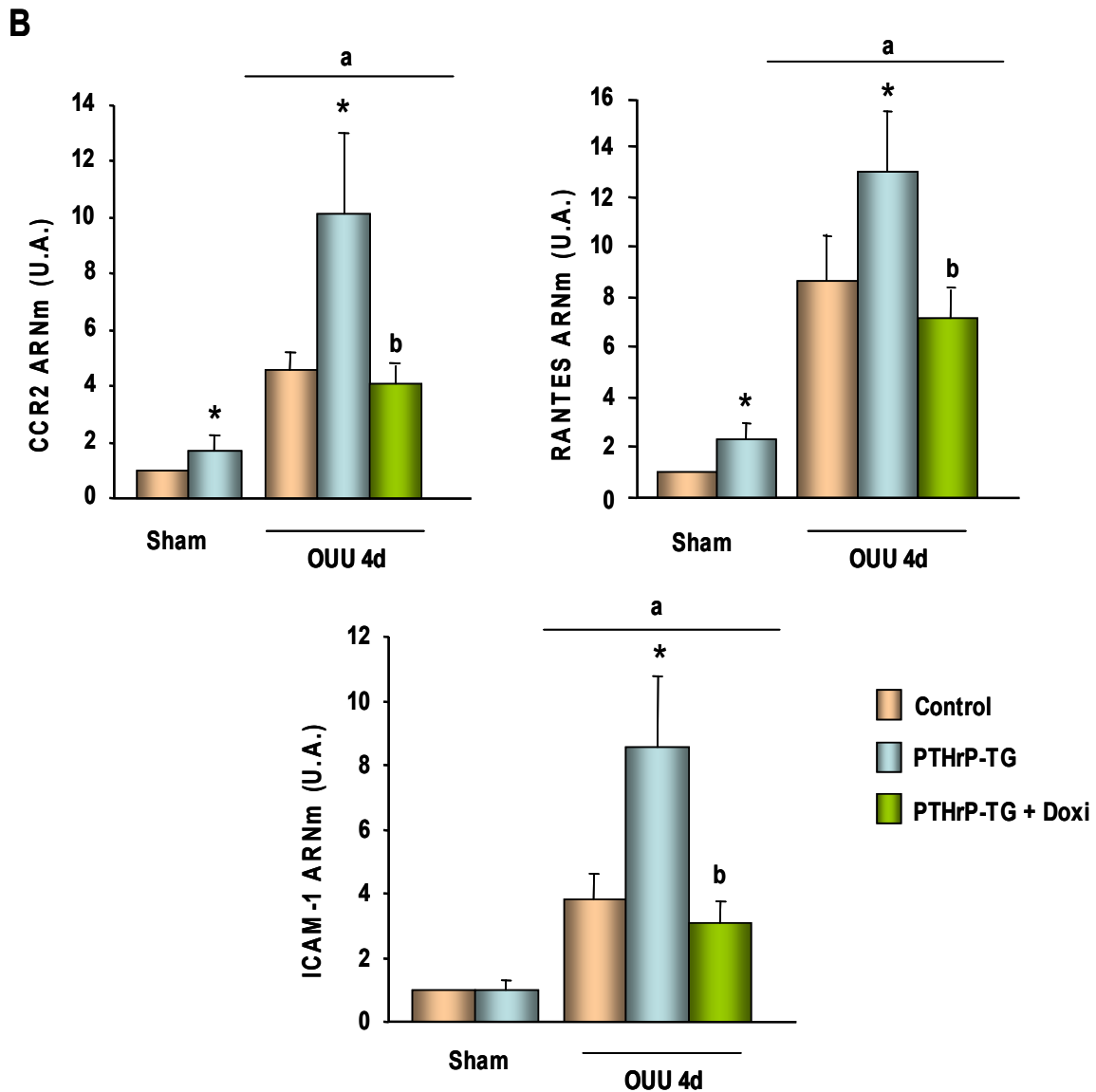


Fig. 17B. Normalización de los niveles de factores proinflamatorios en los animales PTHrP-TG tratados con doxiciclina. Mediante PCR a tiempo real se determinaron las variaciones de expresión de factores proinflamatorios en animales PTHrP-TG tratados con doxiciclina. Observamos que este tratamiento reduce los niveles de CCR2 (izquierda), RANTES (derecha) e ICAM-1 (centro) en el riñón obstruido de los ratones PTHrP-TG hasta equipararse a los de los controles correspondientes. Los valores experimentales son la media \pm EEM de 4-6 ratones por grupo. * $p < 0,01$ vs valor control correspondiente; ^a $p < 0,01$ vs Sham correspondiente; ^b $p < 0,01$ vs PTHrP-TG sin doxiciclina. U.A. = Unidades arbitrarias.

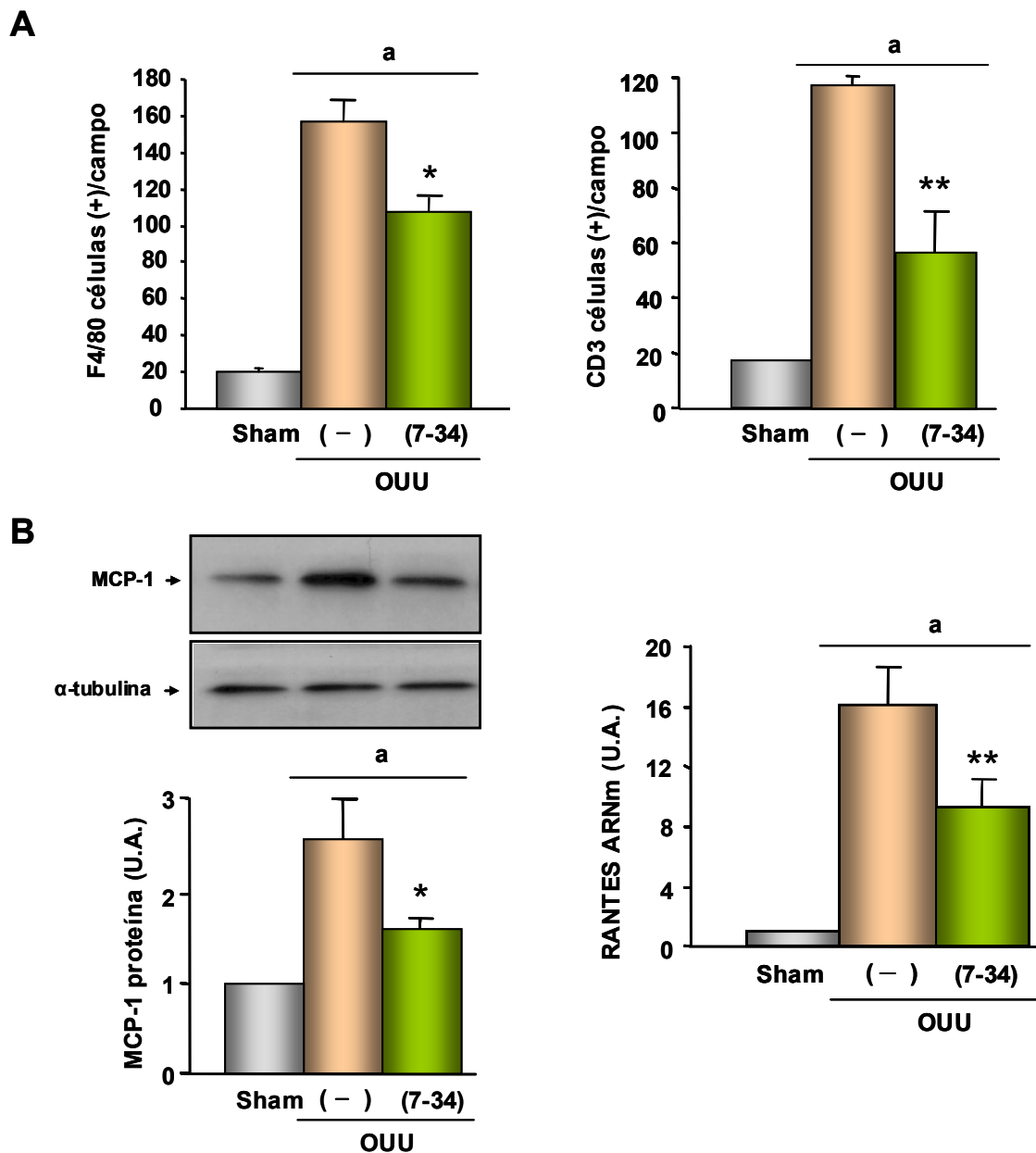
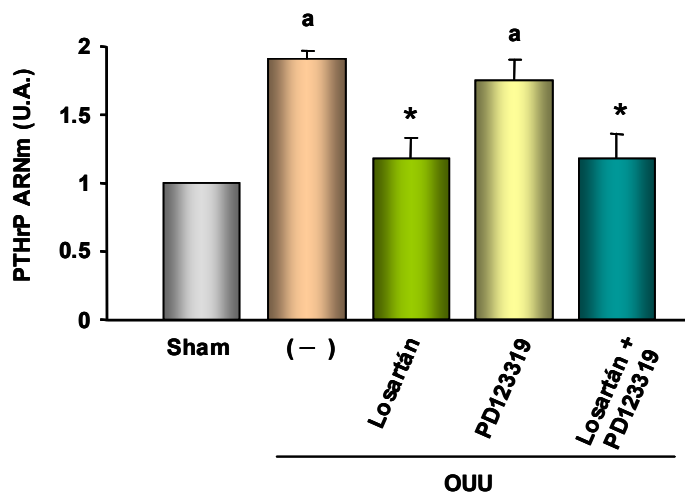


Fig. 18. Efecto del tratamiento con un antagonista del PTH1R sobre el proceso inflamatorio en el riñón obstruido de ratones controles. Se evaluaron tanto el número de macrófagos (identificados por células F4/80 positivas) y el de linfocitos T (identificados por células positivas de CD3) intersticiales (A), así como la expresión proteica del MCP-1 (por transferencia western; se muestra un autoradiograma representativo) y la expresión génica de RANTES (por PCR a tiempo real) (B) en el riñón obstruido de ratones controles con y sin tratamiento con el antagonista PTHrP (7-34), a 4 días de OUU. Los valores experimentales son la media \pm EEM de al menos 4 animales por grupo. ^a $p < 0,01$ vs valor sham. * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$ vs riñón obstruido sin tratamiento (-). U.A. = Unidades arbitrarias.

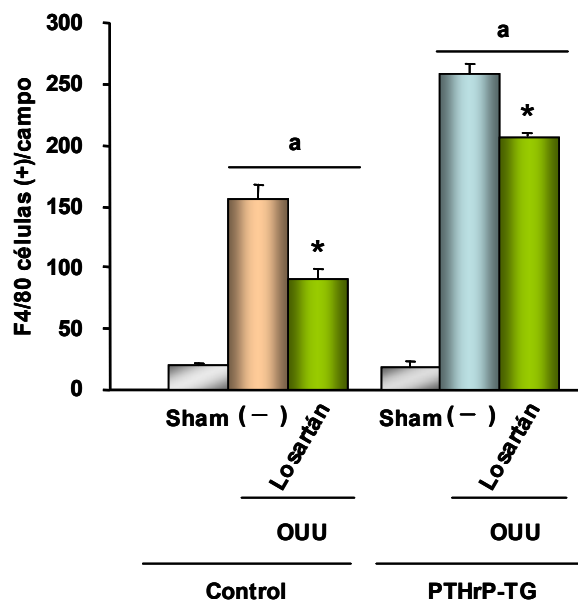
la Ang II en el riñón de rata [77;107]. En este estudio, encontramos que este antagonista, en contraste con el antagonista del AT₂ PD123319, previno la sobreexpresión de PTHrP en los riñones obstruidos de los ratones controles (Fig. 19A). El tratamiento combinado de ambos antagonistas tuvo los mismos efectos que el tratamiento solo con losartán. De forma coherente con estudios publicados previamente [34], el losartán disminuyó significativamente la respuesta inflamatoria – evaluada por conteo de células positivas para F4/80 y por la expresión proteica de MCP-1- tras el OUU en los ratones controles (Fig. 19, B y C).

Hay que destacar, sin embargo, que en los animales PTHrP-TG el tratamiento con el losartán no fue tan efectivo en esta reducción de la inflamación en el riñón obstruido. Así, observamos una menor atenuación del número de macrófagos intersticiales en los ratones PTHrP-TG, en comparación con la de los ratones controles tras el tratamiento con losartán (Fig. 19B). Además, no hubo diferencias significativas entre los niveles de MCP-1 en los riñones obstruidos de los animales PTHrP-TG tratados y no tratados con losartán (Fig. 19C).

A



B



C

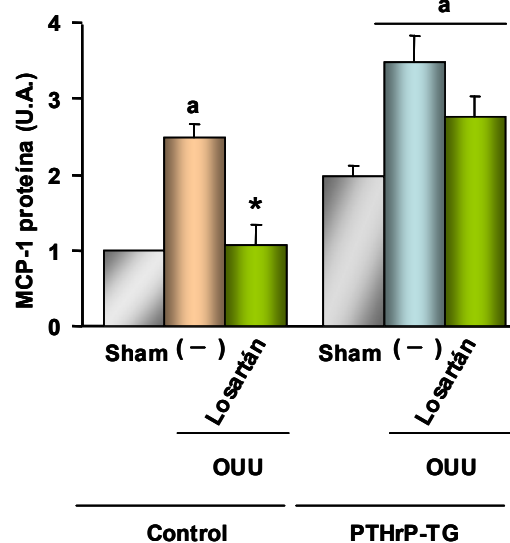
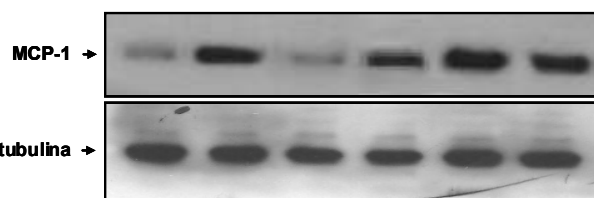


Fig. 19. Efecto de antagonistas de la Ang II sobre la expresión de PTHrP y las alteraciones inflamatorias en los riñones obstruidos de ratones controles y PTHrP-TG. (A) Expresión génica de la PTHrP endógena en el riñón obstruido de ratones controles (por PCR a tiempo real) con o sin tratamiento con antagonistas del receptor AT₁ (losartán), AT₂ (PD123319), o ambos, a los 2 días de OUU. Tanto en los animales controles como en los PTHrP-TG, con o sin tratamiento con losartán, se evaluaron el número de macrófagos intersticiales (identificados por inmunotinción con F4/80) (B) y los niveles proteicos de MCP-1 (se muestra un autoradiograma representativo) (C). Los valores experimentales son la media \pm EEM de al menos 4 animales por grupo y condición experimental. ^a $p < 0,01$ vs sham correspondiente. * $p < 0,01$ vs riñón obstruido sin tratamiento. U.A. = Unidades arbitrarias.

4.6. Papel de la Activación de NF- κ B y de las Quinasas Reguladoras de Señales Extracelulares (ERK) en los Mecanismos Pro-inflamatorios Inducidos por la PTHrP en Células Túbuloepiteliales de Ratón

Las células tubulares son capaces de producir citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que promueven el infiltrado de leucocitos tras el daño renal [20]. Por ello, para estudiar más a fondo los mecanismos implicados en la progresión de la inflamación renal asociada a la sobreexpresión de PTHrP en el riñón obstruido, realizamos una serie de experimentos *in vitro* utilizando cultivos de células túbuloepiteliales de ratón MCT. Para el estudio de la influencia de la PTHrP sobre la activación de NF- κ B utilizamos en primera instancia la técnica de microscopía confocal. Pudimos observar que, en estas células, la PTHrP (1-36), de forma dependiente de la dosis, induce la translocación de la subunidad activadora del NF- κ B p65 del citoplasma al núcleo a los 30 min (Fig. 20, A y B respectivamente). Para corroborar la asociación de esta translocación con la activación del NF- κ B, utilizamos la técnica de EMSA, usando extractos nucleares de células MCT tratadas con PTHrP (1-36) (100 nM) a diferentes tiempos. Con esta técnica pudimos observar una mayor afinidad de NF- κ B por el ADN a los 20-30 min tras la estimulación con la PTHrP (1-36) (Fig. 21A). En ambos tipos de experiencias (confocal y EMSA) se pretrataron células MCT con un inhibidor de la activación de ERK, U0126, 1h antes de añadir la PTHrP (1-36). Este pretratamiento inhibió tanto la translocación de p65 al núcleo como la activación de NF- κ B observada por EMSA (Fig. 20A y 21A). Estos resultados sugieren que la activación de NF- κ B inducida por la PTHrP (1-36) podría estar mediada por ERK. En este sentido, utilizando transferencia *Western*, observamos que la PTHrP (1-36) es capaz de inducir la fosforilación de ERK de forma rápida (5 min) y transitoria en las células MCT (Fig. 21B).

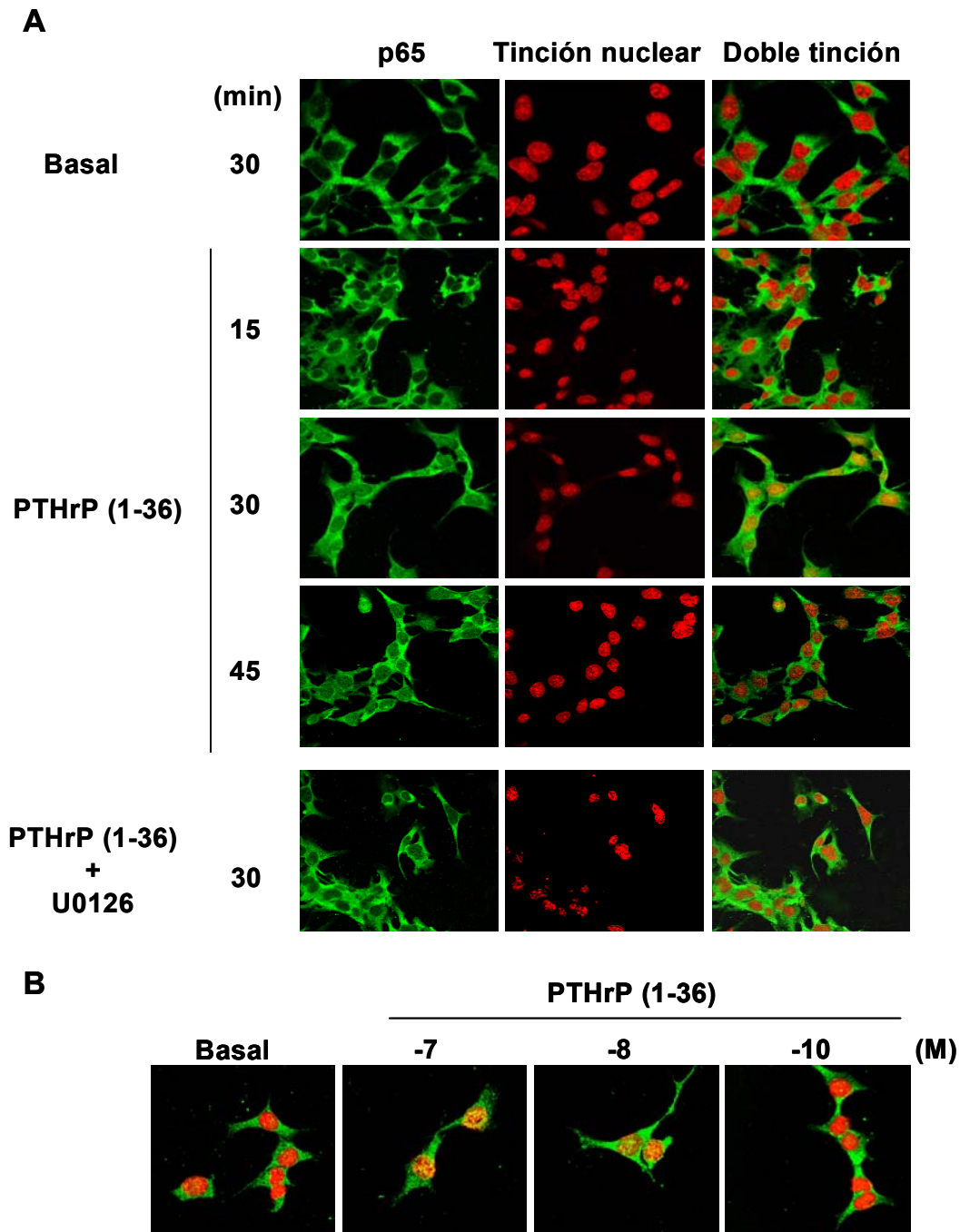


Fig. 20. La PTHrP (1-36) induce la translocación de la subunidad p65 de NF- κ B al núcleo en células túbuloepiteliales de ratón. (A) Las células MCT, sembradas de placas multipocillo y depletadas de suero, se trataron o no con PTHrP (1-36)(100nM) durante diferentes periodos de tiempo. En una de las condiciones, a parte del tratamiento con PTHrP, las células se pretrataron con U0126 (inhibidor de la fosforilación de ERK) 1h previa a la estimulación con PTHrP. (B) Otro grupo de MCT se trató con diferentes dosis de PTHrP (1-36) mantenidas durante 30min. La inmunofluorescencia se realizó con una doble tinción, para los núcleos [con yoduro de propídeo (IP); rojo] y para la detección de la p65 se utilizó una IgG específica marcada con isotiocianato de fluoresceína (verde). La superposición de ambas imágenes, rojo y verde, produce un tono anaranjado en los lugares de colocación en la MCT, denotando la presencia de una intensa fluorescencia de p65 en el núcleo de las células tratadas con PTHrP (1-36) durante 30min. El pretratamiento de las MCT con el U0126 (25 μ M) inhibió los efectos de la PTHrP (1-36) (A). Las imágenes mostradas, representativas de 3 experimentos independientes, se obtuvieron mediante la técnica de confocal.

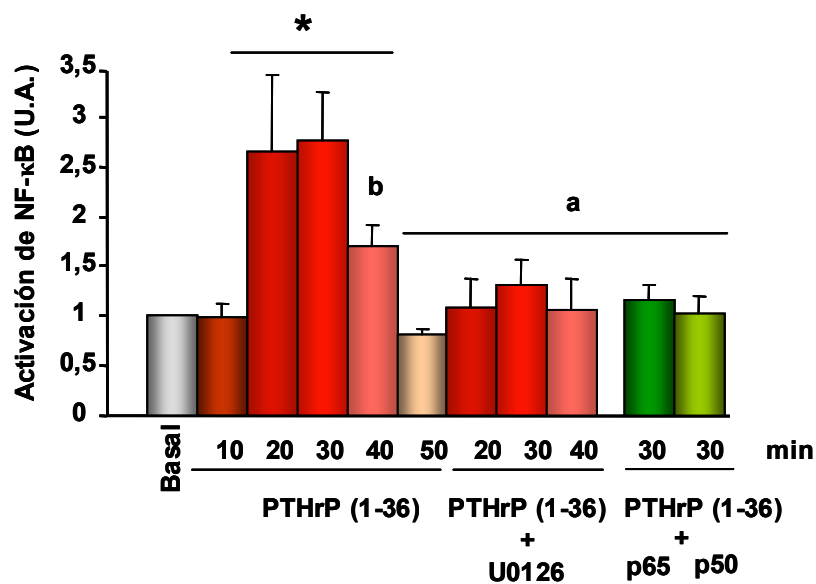
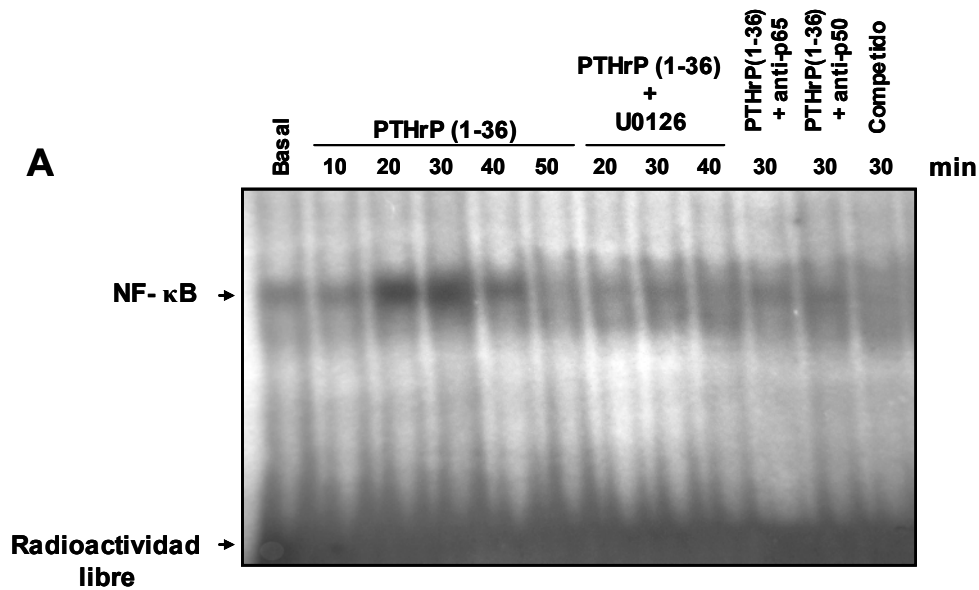


Fig. 21A. Activación de NF-κB y ERK inducida por la PTHrP (1-36) en las células túbuloepiteliales MCT. Mediante la técnica de EMSA observamos que la PTHrP (1-36), a 100nM, indujo la activación de NF-κB alcanzando su máximo entre 20 y 30 min. Cuando las células se pretrataron con el inhibidor de ERK, U0126, la PTHrP no era capaz de activar NF-κB. Se utilizaron como control de banda extractos nucleares, de células estimuladas con PTHrP durante 30min, tratados con anticuerpos anti-p65 y anti-p50, observándose en ambos casos una disminución en la intensidad de la banda. El último carril corresponde a extractos nucleares de células estimuladas con PTHrP durante 30min que han sido incubadas con un exceso de oligo frío, dando como consecuencia una reducción en la intensidad de la banda correspondiente a NF-κB. Los valores experimentales son la media ± EEM de 3 experimentos independientes y en duplicado. * $p < 0.01$ vs valor basal. ^a $p < 0.01$; ^b $p < 0.05$ vs valor correspondiente a PTHrP (1-36) 20-30 min. U.A. = Unidades arbitrarias.

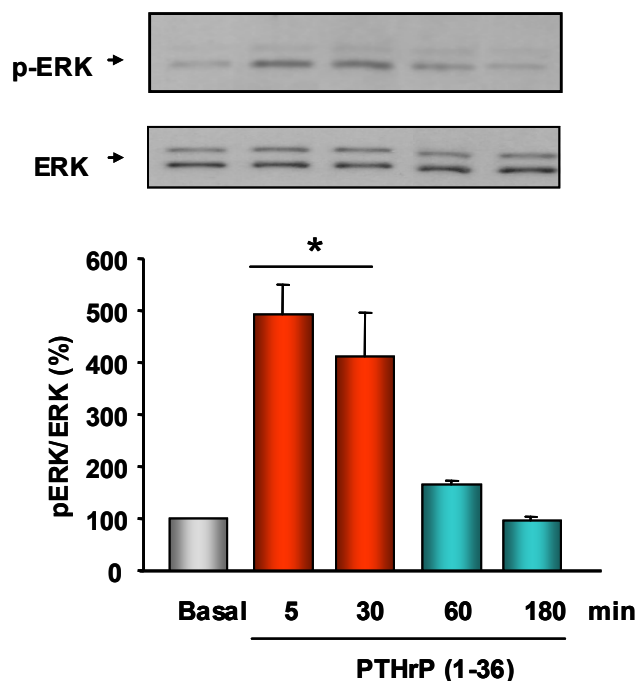
B

Fig. 21B. Activación de NF- κ B y ERK inducida por la PTHrP (1-36) en las células túbuloepiteliales MCT. La PTHrP (1-36) indujo la fosforilación de ERK de forma rápida (5min) y transitoria. La forma fosforilada de ERK se detecto por transferencia western utilizándose como control el ERK total. Los valores experimentales son la media \pm EEM de 3 experimentos independientes y en duplicado. * $p < 0.01$ vs valor basal. ^a $p < 0.01$; ^b $p < 0.05$ vs valor correspondiente a PTHrP (1-36) 20-30 min. ^c $p < 0.01$ vs valor correspondiente a PTHrP (1-36) 5 min.

Observamos que la PTHrP (1-36), en el mismo rango de concentración y período de tiempo que acabamos de mencionar, también induce la sobreexpresión de MCP-1 y RANTES en las células MCT. Así, encontramos que la PTHrP (1-36) (100 nM) induce la expresión de MCP-1 y RANTES, con un máximo entre 30 min y 1h de estimulación (Fig. 22A y B). La inducción de estas dos quimioquinas depende de la dosis de este péptido, encontrando su máximo efecto a 100 nM (Fig. 22A y B). El antagonista PTHrP (7-34), a 1 μ M, inhibió este efecto de la PTHrP (1-36) sobre la estimulación de MCP-1 y RANTES (Fig. 22A y B).

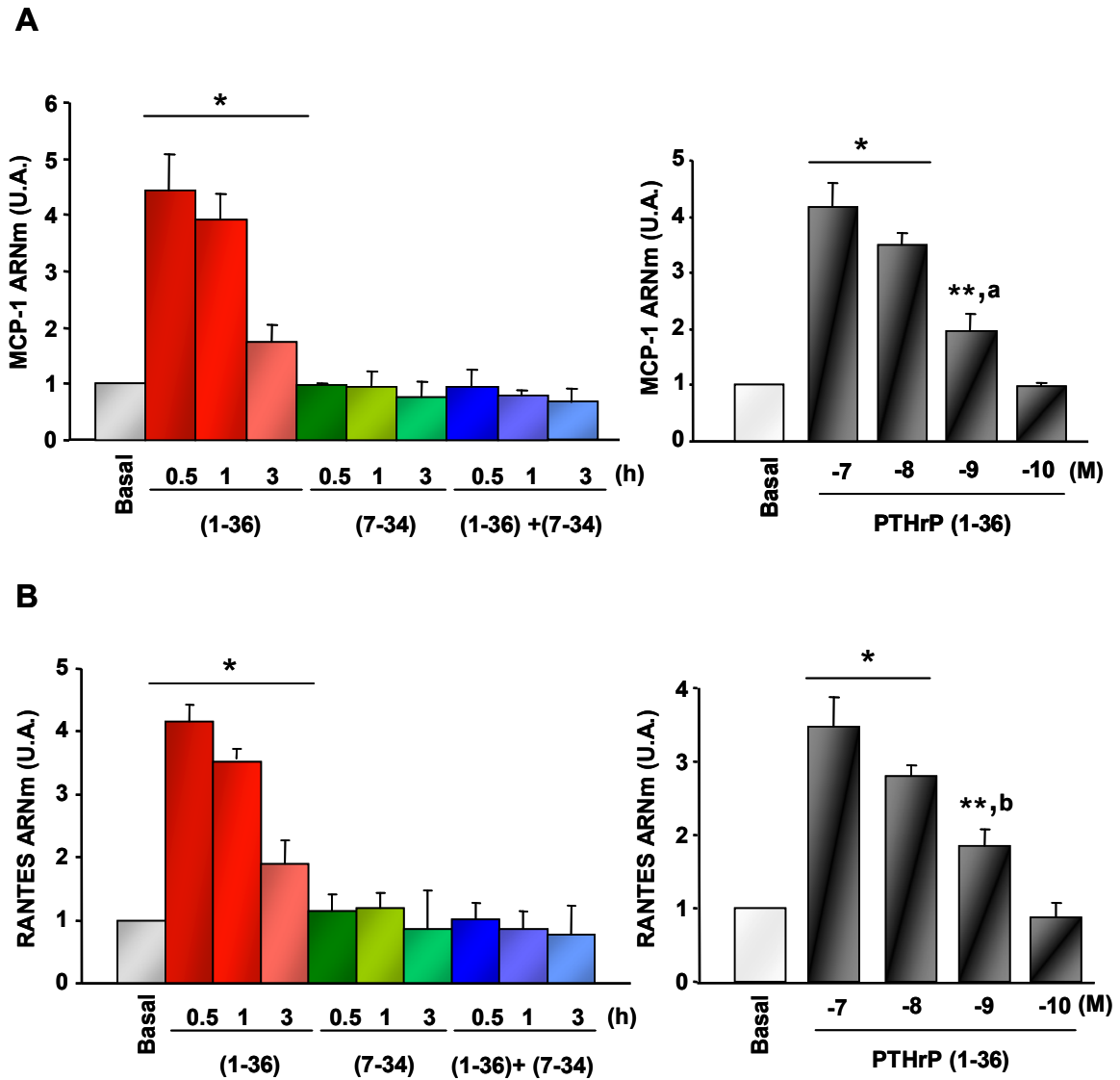


Fig. 22. La PTHrP (1-36) es capaz de inducir, de forma transitoria y dependiente de la dosis, la expresión génica de MCP-1 y RANTES en células túbuloepiteliales MCT. Los niveles de expresión génica de MCP-1 (A) y RANTES (B) se evaluaron por PCR a tiempo real. En las gráficas de la izquierda se muestran los cambios con respecto al tiempo en niveles de ARNm de MCP-1 (A) y RANTES (B) tras la estimulación con PTHrP (1-36) (a 100nM). En algunos experimentos, las células se pretrataron con PTHrP (7-34) (1 μ M) 1 h previa a la adición de la PTHrP (1-36) (A y B). En las gráficas de la derecha se muestra la variación de expresión de MCP-1 (A) y RANTES (B) dependiente de la dosis utilizada de PTHrP a 1 hora estimulación. Los valores experimentales son la media \pm EEM de 3 experimentos independientes y en duplicado. * $p < 0,01$; ** $0,05$ vs valor basal. ^a $p < 0,01$; ^b $0,05$ vs valor PTHrP (1-36) 10 nM. U.A. = Unidades arbitrarias.

Teniendo en cuenta estos resultados, nos planteamos ratificar el papel tanto de ERK como del factor de transcripción NF- κ B como mediadores de los efectos de la PTHrP (1-36) sobre la expresión de varios factores proinflamatorios en las células túbuloepiteliales. Para ello, sometimos a estas células a un pretratamiento con varios inhibidores de NF- κ B (partenolide, MG-132 o Bay 117082) y ERK (U0126) 1h antes de estimularlas con la PTHrP (1-36). Observamos que en todos los casos, el pretratamiento redujo significativamente el efecto estimulador de la PTHrP (1-36) sobre la expresión de MCP-1 y de RANTES, y abolió la sobreexpresión de CCR2 y de IL-6, en las células MCT (Fig. 23).

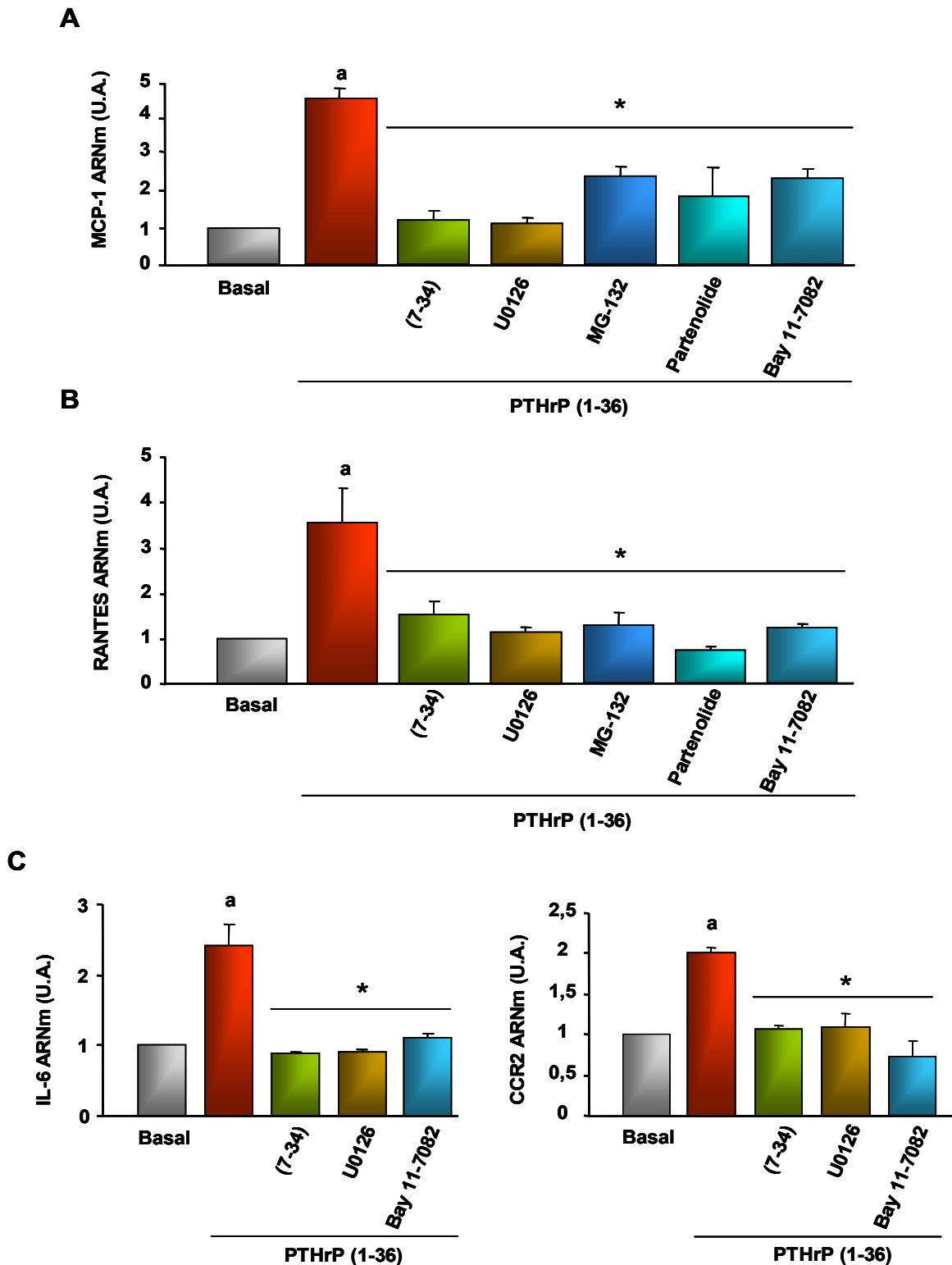


Figure 23. Efecto de los diferentes inhibidores de la expresión de factores proinflamatorios inducidos por PTHrP (1-36) en células MCT. Las células se trataron con PTHrP (1-36) (100 nM) durante 1 h. Los niveles de ARNm de MCP-1 (A), RANTES (B), así como de IL-6 y CCR2 (C) se evaluaron por PCR a tiempo real. Los diferentes inhibidores de NFκB [MG-132 (10 μM), Bay 11-7082 (25 μM) y partenolide (25 μM)], el inhibidor de ERK U0126 (25 μM), o PTHrP (7-34) (1 μM), se añadió 1 h antes de añadir el péptido PTHrP (1-36). Los valores experimentales son la media ± EEM de 3 experimentos independientes y en duplicado. ^ap<0,01 vs valor basal. *p<0,01 vs valor de tratados con PTHrP (1-36) sin inhibidores. U.A. = Unidades arbitrarias.

4.7. LA PTHrP (1-36) ESTIMULA LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS DE RATÓN RAW 264.7 DIRECTA O INDIRECTAMENTE A TRAVÉS DE LAS CÉLULAS TÚBULOEPITELIALES

Para estudiar la actividad pro-inflamatoria inducida por la PTHrP (1-36) a través de su interacción con las células túbuloepiteliales, utilizamos medios condicionados (MC) por las células MCT durante 24 h. Observamos que estos medios condicionados tras el tratamiento de las células MCT con PTHrP (1-36) (MC-PTHrP) inducen significativamente la movilidad de las células Raw 264.7 (Fig. 24A).

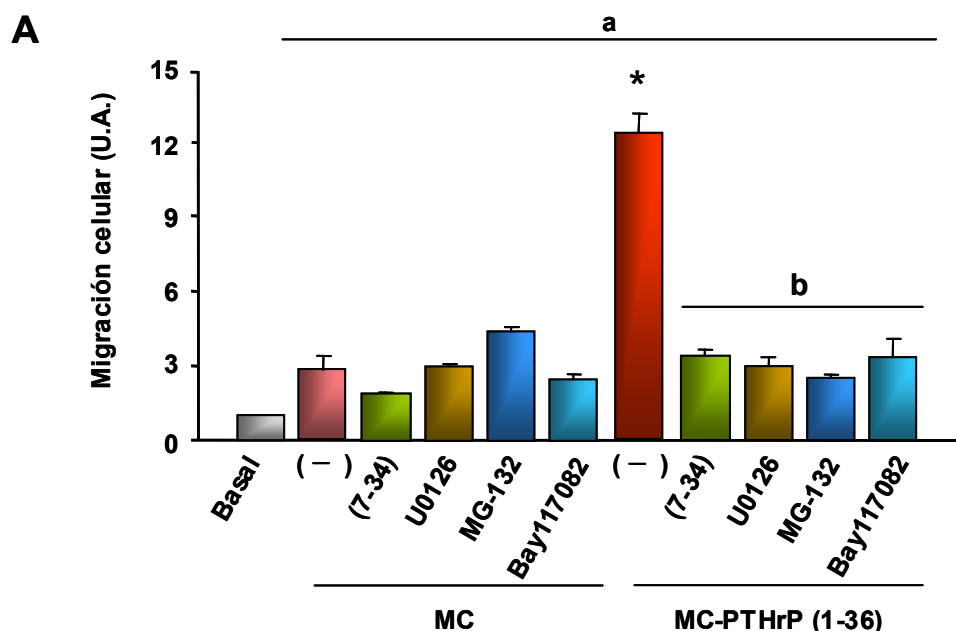


Fig. 24A. La PTHrP (1-36) induce la migración de las células Raw 264.7 *in vitro*. Las células MCT, depletadas de suero, se expusieron o no a PTHrP (1-36) (100 nM) en presencia o no de diferentes inhibidores durante 12h. De los medios condicionados (MC) resultantes de los tratamientos anteriores se testó su actividad quimiotáctica sobre las células RAW 264.7, según se ha descrito en el texto. Observándose como los medios condicionados con PTHrP (1-36) tenían un claro efecto quimiotáctico sobre las células RAW264.7 que se inhibía completamente en los casos en que las MCT habían sido tratadas con PTHrP (7-34), los inhibidores de NF- κ B o ERK. En todos los casos se utilizaron los factores a las mismas concentraciones que las descritas en la Fig. 23. Los valores experimentales son la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes y en duplicado. ^a $p < 0,01$ vs valor basal. ^{*} $p < 0,01$ vs valor de migración del MC con y sin inhibidores. ^b $p < 0,01$ vs valor de MC-PTHrP sin inhibidores (-). U.A. = Unidades arbitrarias

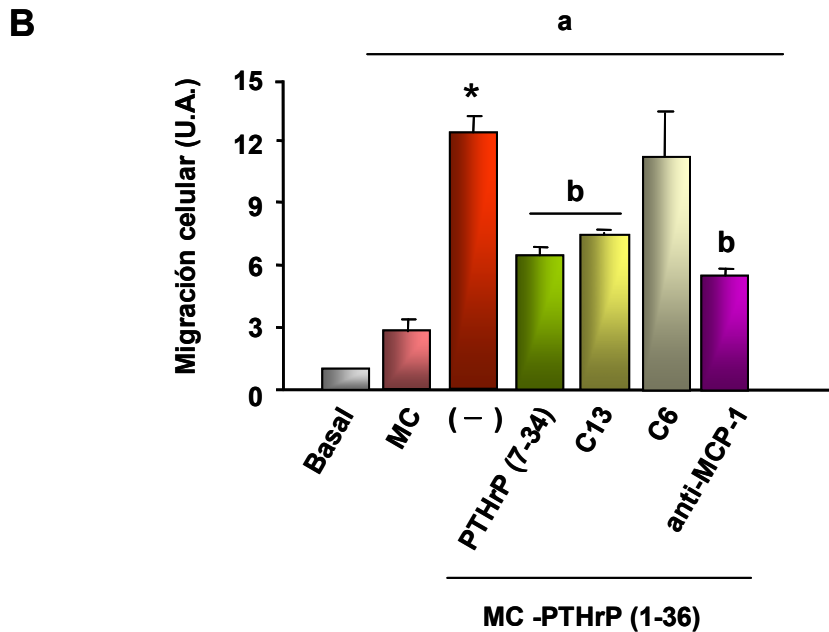


Fig. 24B. La PTHrP (1-36) induce la migración de las células Raw 264.7 *in vitro*. Los medios condicionados obtenidos del tratamiento con PTHrP (1-36) de las MCT, una vez recogido, se tratan con PTHrP (7-34) (1 μ M), anticuerpo anti-MCP-1, antisuero C13 anti-PTHrP que reconoce la región N-terminal de la PTHrP o antisuero C6 que reconoce la región C-terminal de la PTHrP (a 1:100 de dilución cada uno). Todos los tratamientos excepto con el anticuerpo C6, inhiben en parte la migración de las células RAW 264.7 inducida por el medio condicionado. Los valores experimentales son la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes y en duplicado. ^ap<0,01 vs valor basal. *p<0,01 vs valor de MC. ^bp<0,01 vs valor de MC-PTHrP sin inhibidores (-). U.A. = Unidades arbitrarias

Además, y de acuerdo con las observaciones anteriormente mencionadas, el pretratamiento de las células MCT con PTHrP (7-34) o con inhibidores de ERK 1/2 o NF κ B previno el efecto inducido por la PTHrP (1-36) sobre la migración de las células RAW 264.7 (Fig.24A).

Observamos que cuando añadimos a los medios condicionados de las MCT tras estimularlas con PTHrP (1-36) un anticuerpo anti-MCP-1, se neutralizaba en parte su actividad quimiotáctica sobre las RAW 264.7 (Fig. 24B). Esto indica que el MCP-1 inducido en las células MCT por la PTHrP (1-36) está implicado, al menos parcialmente, en la migración de estos macrófagos. Por otro lado, al añadir a los medios condicionados

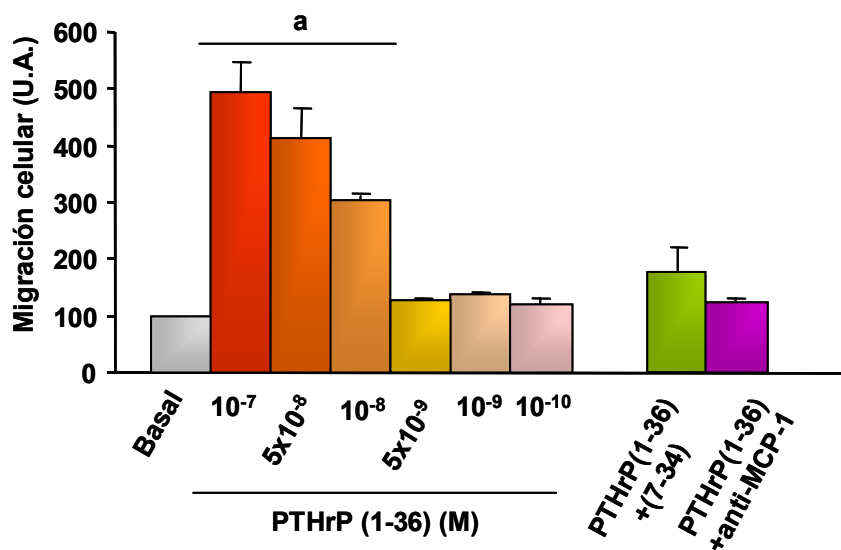
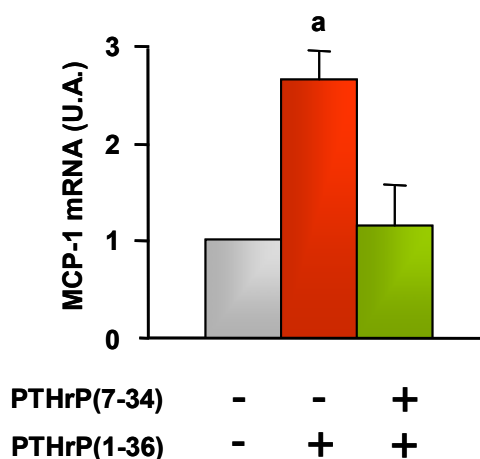
A**B**

Fig. 25. Efecto directo de la PTHrP (1-36) sobre los macrófagos RAW 264.7. (A) En vez de utilizar medios condicionados procedentes de MCT, para estudiar la influencia directa de la PTHrP sobre la migración se usó medio de cultivo RPMI, sin suero, con diferentes concentraciones de PTHrP (1-36) (de 0,1 a 100 nM). Se observó que la migración de las células RAW 264.7 es dependiente de la dosis de PTHrP (1-36). En algunos casos junto con la PTHrP se añadió el antagonista PTHrP (7-34)(1 μ M) o anticuerpo anti-MCP-1 (1:100) y en ambos casos se inhibió la migración inducida por PTHrP (1-36)(100nM). (B) Se sometió a las células RAW264.7 a un estímulo directo con PTHrP (1-36) y se observó una estimulación de la expresión de MCP-1 en estas células. Esta estimulación se inhibió con un pretratamiento con PTHrP (7-34)(1 μ M). Los valores experimentales son la media \pm EEM de al menos tres experimentos experimentales en duplicado. ^ap<0,01 vs valor basal y tratados con bloqueantes. U.A. = Unidades arbitrarias.

de las MCT, en las mismas condiciones anteriores, PTHrP (7-34) o un anticuerpo neutralizante que reconoce la región N-terminal de la PTHrP (C13) [el tratamiento con un anticuerpo que reconoce la región C-terminal de la PTHrP (C6) no tuvo efecto] observamos que también se reducía su capacidad quimiotáctica (Fig. 24B). Este hallazgo sugiere que la PTHrP (1-36) podría estimular directamente la movilidad de los macrófagos. Para corroborar esta hipótesis, analizamos el efecto de la PTHrP (1-36) –añadida a medio libre de suero sin condicionar por las MCT- sobre la migración de las células RAW 264.7. En estas condiciones, observamos un aumento de la migración de estas células inducida por la PTHrP (1-36) de forma dependiente de la dosis (Fig. 25A). Además, este péptido incrementa directamente la expresión génica de MCP-1 en las células RAW 264.7. Este aumento de migración inducido por la PTHrP (1-36) podría ser debido a una acción autocrina del MCP-1 en el macrófago, ya que cuando añadimos junto a la PTHrP (1-36) un anticuerpo anti-MCP-1 se inhibía dicha migración (Fig. 25 A). Además, tanto la sobreexpresión de MCP-1 como la migración de las células RAW 264.7 inducidas por la PTHrP (1-36) se inhibió con el antagonista PTHrP (7-34) (Fig. 25, A y B).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La progresión del daño en la enfermedad renal crónica es un proceso caracterizado por la pérdida de nefronas y el desarrollo de fibrosis que conduce a la insuficiencia renal terminal [20;117]. Este fenómeno se caracteriza por una excesiva deposición de matriz extracelular, a menudo asociado con atrofia y dilatación tubular, llegando incluso a la pérdida de función renal [132;146]. El espacio túbulointersticial ocupa alrededor del 90% del volumen total del riñón, por lo que sus alteraciones patológicas tienen una repercusión funcional. Dentro de las diferentes etapas evolutivas de la fibrogénesis renal, la fase inflamatoria es la más temprana y condiciona la evolución de aquella [132].

En la última década, la PTHrP, debido a sus características como agente proliferativo en células renales en cultivo, se propuso inicialmente como una posible diana terapéutica para acelerar la regeneración tisular tras el fracaso renal agudo [13;44]. Sin embargo, estudios posteriores usando ratones transgénicos que sobreexpresan la PTHrP en el túbulo proximal, revelaron que esta proteína no ejercía una acción protectora tras la isquemia o el daño nefrotóxico [36]. Esta conclusión está apoyada por resultados obtenidos en varios modelos experimentales de daño renal [61;77]. Concretamente, estudios llevados a cabo en un modelo de infusión de Ang II en rata demostraron que el aumento de PTHrP inducido por la Ang II a través del receptor AT₁ se asocia con fibrosis; y el tratamiento con un bloqueante de este receptor inhibe la expresión de la PTHrP y reduce la fibrosis en el parénquima renal [77].

Por otro lado, cada vez existen más evidencias de la relación entre la PTHrP y el proceso inflamatorio. Así, recientemente se ha incluido a la PTHrP en el conjunto de citoquinas que se estimulan en la inflamación multiorgánica inducida por la artritis reumatoide [41]. Además, se ha demostrado la existencia de una interacción bidireccional entre la PTHrP y la IL-6 en células osteoblásticas y astrocitos humanos [42;51;52]. En áreas de inflamación de la placa aterosclerótica, la mayor expresión de PTHrP -en la células del músculo liso y en los macrófagos- se correlaciona con la mayor severidad del daño [84;99;135]. Más relacionado con los resultados de la presente Tesis, recientemente nuestro grupo ha observado un incremento en el infiltrado de macrófagos del intersticio renal asociado a la sobreexpresión tubular de la PTHrP en ratones con nefrotoxicidad por ácido fólico [106]. Este hallazgo sugiere que en este modelo de fracaso renal agudo, la PTHrP podría promover la síntesis de factores quimiotácticos de macrófagos a través de mecanismos autocrinos y/o paracrinos en el túbulo renal [106].

Para analizar el papel de la PTHrP como factor pro-inflamatorio renal, en esta Tesis doctoral decidimos utilizar el modelo experimental de OUU en ratones; un modelo caracterizado por el desarrollo de un proceso inflamatorio rápido en el riñón obstruido [20;34;104;141]. Así, la OUU induce una respuesta hemodinámica, seguida de vasoconstricción, la activación del SRA y una respuesta inflamatoria túbulointersticial [34]. Tanto la activación del NF- κ B como de las MAPKs -en concreto, ERK- están implicadas como mediadores intracelulares en estos procesos. Así, tras la OUU la Ang II generada es capaz de activar NF- κ B el cual promueve la expresión de múltiples factores proinflamatorios (quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión) [20;93].

Para caracterizar las acciones de la PTHrP en este modelo de inflamación renal, utilizamos varias aproximaciones experimentales. Por un lado, usamos ratones transgénicos que sobreexpresan la PTHrP de forma constitutiva en las células del tubúculo proximal, para analizar las consecuencias de un exceso de PTHrP en el tejido renal inflamado tras la obstrucción del uréter. Por otro lado, utilizamos diferentes sistemas de bloqueo de la PTHrP: 1) anulando con la doxiciclina la sobreexpresión constitutiva de PTHrP en los animales transgénicos; 2) bloqueando su receptor PTH1R con el péptido PTHrP (7-34); 3) inhibiendo la expresión de PTHrP endógena a través del bloqueo del receptor AT₁ de la Ang II. Además, llevamos a cabo estudios *in vitro* en células túbuloepiteliales renales y macrófagos de ratón.

Como esperábamos, a tenor de los resultados publicados con anterioridad en varios modelos de fallo renal agudo [33;106], en este trabajo demostramos que la PTHrP se sobreexpresa en el riñón obstruido de ratón de forma dependiente de la Ang II a través de un mecanismo mediado, al menos en parte, por su receptor AT₁. Con respecto a la expresión de PTH1R, podemos decir que sus niveles no varían en el riñón obstruido de ratón, en contraste con observaciones previas en otros modelos de fracaso renal agudo por isquemia o nefrotoxinas donde se produce una disminución de los niveles de PTH1R concomitante al aumento de expresión de la PTHrP [36;72;106;107]. En este sentido, se ha descrito un aumento del PTH1R asociado a la sobreexpresión de PTHrP en un modelo de nefropatía diabética producida por estreptozotocina en ratones [61]. Aun no se conocen los mecanismos responsables de esta heterogeneidad en la expresión del PTH1R dependiendo del tipo de daño renal. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la Ang II podría jugar un papel significativo en este aspecto. Así, se ha observado que la Ang II, a través de su receptor AT₁, es capaz de desestabilizar el ARNm del PTH1R en la vasculatura renal en un modelo de hipertensión

espontánea en ratas. Este efecto parece específico de los vasos renales e independiente del incremento de la presión sanguínea en estos animales [145].

Como ya hemos mencionado, en un reciente estudio realizado en nuestro laboratorio utilizando un modelo de nefrotoxicidad inducida por ácido fólico, observamos un incremento del infiltrado de macrófagos en el intersticio renal en la fase de recuperación del daño, entre 1-3 semanas tras la administración del nefrotóxico. El hecho de que este infiltrado fue significativamente mayor en los ratones PTHrP-TG sugiere que en el riñón dañado, la sobreexpresión de la PTHrP podría promover la síntesis de algún factor quimiotáctico de macrófagos a través de mecanismos autocrinos y/o paracrinos [106]. En este sentido, datos previos han demostrado un aumento de expresión de la PTHrP en macrófagos y en células de músculo liso vascular en lesiones ateroscleróticas humanas tras la aterectomía, relacionado con la severidad de la lesión [84;99].

Tras la OUU, observamos un progresivo incremento en el número de macrófagos intersticiales, asociado al aumento de expresión renal de MCP-1 y de su receptor CCR2, tanto en los ratones controles como en los PTHrP-TG; siendo este aumento mayor en estos últimos. Esto concuerda con nuestros resultados obtenidos *in vitro*, que demuestran un efecto estimulador de la PTHrP (1-36) sobre la expresión de MCP-1 y CCR2 en células túbuloepiteliales renales. Además, tanto el infiltrado de linfocitos T como la expresión génica de IL-6 y RANTES fueron mayores en el riñón obstruido de ratón, sobre todo en los PTHrP-TG. Este hallazgo se corroboró con los resultados obtenidos en las células túbuloepiteliales *in vitro*, según los cuales la PTHrP (1-36) indujo la expresión de ambas citoquinas. Estos datos en conjunto apoyan el papel de la PTHrP como factor proinflamatorio en el riñón dañado.

En consonancia con estudios previos [96], observamos un aumento de la expresión génica de ICAM-1 a los 2 días de la OUU en los ratones controles, que disminuyó hasta el día 6 del estudio. Sin embargo, en los ratones PTHrP-TG, esta molécula de adhesión permanece elevada en el riñón obstruido en el mismo período de tiempo. ICAM-1 es un tipo de molécula de adhesión intercelular que está presente a bajas concentraciones en la membrana de leucocitos y células endoteliales. Ciertas citoquinas estimuladoras [tales como interferón- γ , TNF- α o la IL-1], promueven la expresión de esta proteína en células epiteliales y mesangiales, así como en fibroblastos. ICAM-1 juega un papel esencial en el reclutamiento de leucocitos al intersticio del riñón dañado [112]. Así, la sobreexpresión de ICAM-1 relacionada con los mayores niveles de PTHrP, junto al hecho de que la PTHrP es un modulador del tono y de la permeabilidad vascular [13;23;28;87;109], sugieren que esta proteína podría promover el paso de leucocitos circulantes al intersticio del riñón obstruido.

Es un hecho conocido que el factor de transcripción NF- κ B se activa en una gran variedad de lesiones renales [50]. La activación del NF- κ B induce la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6), quimioquinas (MCP-1, RANTES) y moléculas de adhesión (ICAM-1) mediadoras de la respuesta inflamatoria tras el daño renal [20;34;132;133]. Tras la OUU se ha descrito un aumento de activación del NF- κ B asociado a la respuesta inflamatoria, y el bloqueo de su activación con inhibidores específicos reduce dicha respuesta [20;34]. Los resultados de la presente Tesis sugieren que la activación de este factor de transcripción está estrechamente relacionada con la PTHrP, puesto que los niveles de activación del NF- κ B eran superiores en los animales PTHrP-TG con respecto a los animales controles tras la OUU.

Además, hemos observado que la PTHrP (1-36) es capaz de activar NF- κ B en las células MCT *in vitro*.

En situación basal, encontramos una mayor expresión de MCP-1, CCR2, RANTES e IL-6, aunque no de actividad del NF- κ B, en los riñones de los ratones PTHrP-TG en comparación con los animales controles. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente en esta Tesis, no se observan diferencias fenotípicas basales entre ambos tipos de animales. Estos hallazgos sugieren, por un lado, que la sobreexpresión basal de los factores anteriormente mencionados debe estar regulada por mecanismos independientes del NF- κ B, que podrían implicar al AP-1 [140]. Por otro lado, se puede hipotetizar la existencia de algún mecanismo represor de la respuesta inflamatoria en los animales PTHrP-TG en situación no patológica. Dicho sistema podría ser sobrepasado en situación de daño obstructivo, y así desencadenarse la respuesta inflamatoria. El hecho de que esta respuesta inflamatoria sea mayor en los animales PTHrP-TG podría ser debido, en parte, a los mayores niveles basales de varios factores proinflamatorios respecto a los de los ratones controles.

Para ratificar que los cambios observados en el riñón obstruido de los ratones PTHrP-TG eran debidos a la sobreexpresión constitutiva de la PTHrP, utilizamos varias estrategias experimentales. Por un lado, tratamos a estos animales una semana previa y durante la obstrucción con doxiciclina suministrada en el agua de bebida. En trabajos previos, se demostró la efectividad de este tratamiento para anular la sobreexpresión de PTHrP en los animales PTHrP-TG [68;106]. Observamos que el tratamiento con el antibiótico redujo la sobreexpresión de la PTHrP en estos animales a los niveles de los ratones controles. Esta reducción se acompañó de una normalización de los niveles de activación del NF- κ B, relacionada a su vez con la bajada hasta niveles

de animales controles de la expresión de CCR2, RANTES e ICAM-1 en el riñón obstruido. Estos resultados indican una relación directa entre la PTHrP y diversas citoquinas pro-inflamatorias en este modelo experimental.

Otra estrategia utilizada en el mismo sentido fue examinar el efecto del bloqueo de la PTHrP en ratones controles sometidos a 4 días de obstrucción, tiempo durante el que observamos una sobreexpresión endógena de la PTHrP. Para ello, utilizamos un inhibidor competitivo del PTH1R, la PTHrP (7-34), que se une a este receptor pero no desencadena respuesta [86;87;129]. Encontramos que el pretratamiento con la PTHrP (7-34) indujo una reducción significativa del número de macrófagos y de linfocitos T en el intersticio renal, asociada a la disminución de los niveles renales de MCP-1 y RANTES. Este efecto lo corroboramos en las células MCT *in vitro*, en las que el antagonista PTHrP (7-34) inhibió el efecto estimulador de la PTHrP(1-36) sobre la expresión de ambas quimioquinas. Además, observamos que la presencia de PTHrP (7-34) en los medios condicionados por las células MCT estimulados con PTHrP (1-36) inhibió la migración de macrófagos. También observamos que la PTHrP (7-34) inhibió el efecto directo de la PTHrP (1-36) sobre la migración de estas células. Estos hallazgos apoyan firmemente la hipótesis de que la PTHrP endógena sobreexpresada tras el daño obstructivo actúa como un factor proinflamatorio en el riñón dañado.

Actualmente, está bien establecido que la activación del SRA juega un papel importante en la nefropatía obstructiva, como promotor de la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas que contribuyen al daño renal [20;34;92;96;122]. Recientemente, se ha podido observar que en ratas sometidas a un modelo experimental de daño renal agudo inducido por nefrotóxico, el losartán, un antagonista del receptor AT₁ de la Ang II, suprimió la sobreexpresión de PTHrP en el riñón dañado [107]. En este trabajo de Tesis, utilizando este antagonista de la Ang II como

estrategia alternativa de supresión farmacológica de la PTHrP renal, observamos un efecto similar en el riñón obstruído de ratón. Además, este inhibidor fue capaz de reducir tanto el infiltrado de macrófagos como de los niveles proteicos de MCP-1 aumentados en esta situación, en consonancia con datos previos [34]. Sin embargo, encontramos que este tratamiento fue menos eficaz para inhibir la respuesta inflamatoria en los ratones PTHrP-TG. Puesto que la sobreexpresión de PTHrP en los animales transgénicos es constitutiva, y por tanto independiente de la Ang II, estos datos apoyan el que la PTHrP podría mediar al menos algunas de las acciones proinflamatorias de la Ang II en el riñón obstruído.

Como ya hemos comentado, la activación del NF- κ B se considera clave para desencadenar la respuesta inflamatoria renal, lo que explica la eficacia de los inhibidores de este factor para detener la progresión del daño renal en varias situaciones experimentales [34;49;50;73;97;123]. En nuestro modelo obstructivo, encontramos una asociación entre los niveles renales de PTHrP y la actividad del NF- κ B, acorde con los cambios de varios factores dependientes de este factor. En esta Tesis, nos planteamos estudiar los mecanismos implicados en esta asociación entre la PTHrP y la activación del NF- κ B *in vitro* en las células túbuloepiteliales MCT. En estas células, encontramos que la PTHrP (1-36) fue capaz de inducir de forma rápida la unión del complejo NF- κ B al ADN, así como la translocación nuclear de la subunidad p65, un componente clave de la actividad de este complejo. Además, el pretratamiento de las células MCT con diferentes inhibidores del NF- κ B inhibió la expresión de MCP-1, RANTES, IL-6 y CCR2 inducida por la PTHrP (1-36). Estos resultados indican el papel esencial de este factor de transcripción en los mecanismos por los que la PTHrP induce la expresión de los factores citados en las células túbuloepiteliales.

En la presente Tesis, encontramos también que un inhibidor de ERK abolió la activación del NF- κ B y la sobreexpresión de los factores proinflamatorios estudiados, inducidas por la PTHrP (1-36) en estas células. Este hecho apoya la hipótesis de que la activación de ERK es un paso importante en las vías de activación de NF- κ B que conducen a la inflamación [62;118]. Además, el efecto del medio condicionado por las MCT tras el tratamiento con PTHrP (1-36) sobre la migración de macrófagos se inhibió cuando las MCT eran pretratadas con inhibidores de la activación de NF- κ B y ERK. Estos datos en conjunto indican el importante papel que juegan tanto ERK como NF- κ B como mediadores de los efectos proinflamatorios inducidos por la PTHrP en el riñón obstruido (Fig. 26).

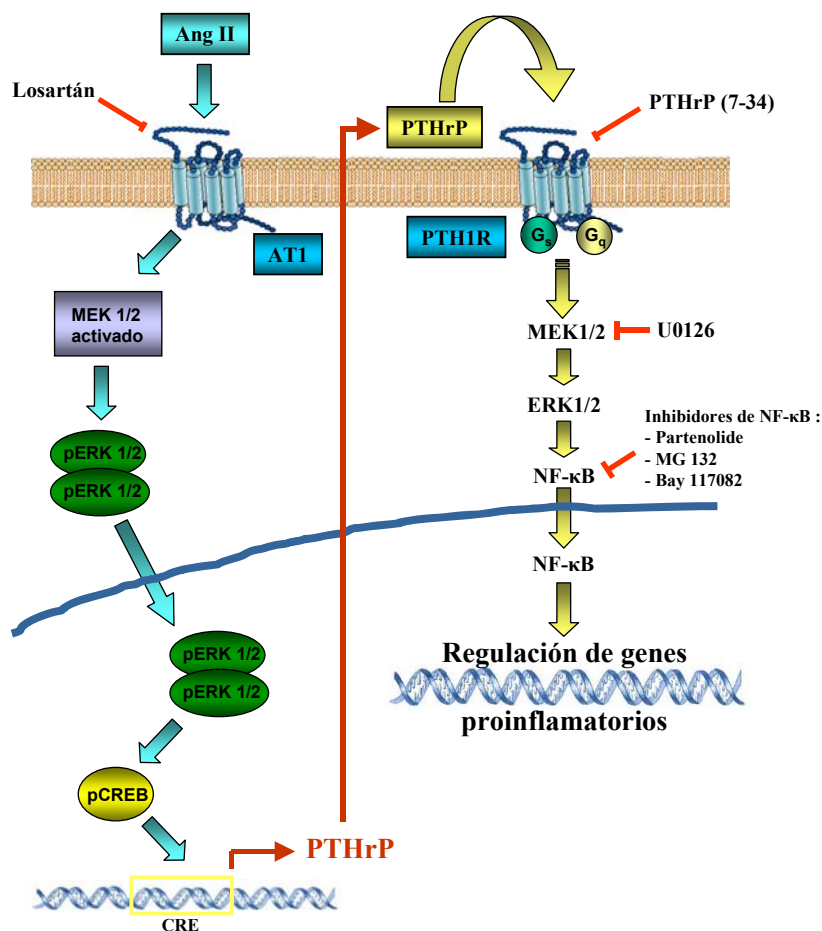


Fig. 26. Relación entre la Ang II y la PTHrP en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios en las células túbuloepiteliales renales.

Un estudio previo ha demostrado, mediante inmunotinción, que la PTHrP y MCP-1 se colocan en los macrófagos de la placa de aterosclerosis [84]. Este hecho sugiere una posible interacción directa entre la PTHrP y la producción del MCP-1 en este tipo celular. En la presente Tesis, para corroborar esta hipótesis utilizamos la línea de monocito/macrófago RAW 264.7. Observamos que la PTHrP (1-36) estimuló tanto la producción de MCP-1 como la migración celular en estas células. Además, nuestros resultados sugieren que ambos efectos se producen a través de la interacción de la PTHrP con su receptor PTH1R, ya que se inhibieron tras el pretratamiento con PTHrP (7-34).

En resumen, los estudios de la presente Tesis demuestran el importante papel de la PTHrP en el proceso inflamatorio desencadenado tras la obstrucción renal en un modelo de ratón. Nuestros hallazgos indican que la PTHrP incrementa el infiltrado de células leucocitarias al intersticio renal a través de la sobreexpresión de diversos factores proinflamatorios, tanto en las células túbuloepiteliales como actuando directamente sobre los macrófagos. Considerando que la PTHrP es un relajante vascular, es razonable especular que sus efectos sobre la hemodinámica y permeabilidad vascular en el riñón podrían amplificar la respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta la relación entre la inflamación y la fibrogenesis renal [20;115;117;132], nuestros hallazgos aportan nuevos datos para comprender los mecanismos responsables del daño renal obstructivo; y sitúan a la PTHrP como posible marcador de daño y potencial diana terapéutica en esta patología.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, hemos extraído las siguientes conclusiones:

1. La PTHrP se sobreexpresa de forma temprana en la fase inflamatoria de la nefropatía obstructiva en ratones.
2. La sobreexpresión de la PTHrP en esta situación experimental se correlaciona con el infiltrado leucocitario y la producción de factores proinflamatorios en el riñón obstruido.
3. El bloqueo de la sobreexpresión de la PTHrP se traduce en un descenso de la respuesta inflamatoria en el riñón obstruido.
4. La PTHrP parece actuar como mediadora, al menos en parte, de las acciones proinflamatorias de la Ang II en el riñón obstruido.
5. La activación del NF- κ B y de MAPKs (pERK 1/2) son mediadores intracelulares de la respuesta inflamatoria inducida por la PTHrP en las células túbuloepiteliales y en los macrófagos, posiblemente a través del PTH1R.

Nuestros resultados apoyan el importante papel de la PTHrP en los mecanismos asociados al proceso inflamatorio desencadenado en la nefropatía obstructiva. La PTHrP podría así vislumbrarse como un posible nuevo marcador de daño y/o diana terapéutica en esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarts MM, Levy D, He B *et al.*: Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J Biol Chem* 274:4832-4838, 1999
2. Aarts MM, Rix A, Guo J *et al.*: The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J Bone Miner Res* 14:1493-1503, 1999
3. Abdulkader RC, Yuki MM, Paiva AC, Marcondes M: Prolonged inhibition of angiotensin II attenuates glycerol-induced acute renal failure. *Braz J Med Biol Res* 21:233-239, 1988
4. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T *et al.*: Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2732-2736, 1992
5. Alfrey AC, Froment DH, Hammond WS: Role of iron in the tubulo-interstitial injury in nephrotoxic serum nephritis. *Kidney Int* 36:753-759, 1989
6. Allred AJ, Chappell MC, Ferrario CM, Diz DI: Differential actions of renal ischemic injury on the intrarenal angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F636-F645, 2000
7. Anders HJ, Ninichuk V, Schlondorff D: Progression of kidney disease: blocking leukocyte recruitment with chemokine receptor CCR1 antagonists. *Kidney Int* 69:29-32, 2006

8. Aya K, Tanaka H, Ichinose Y *et al.*: Expression of parathyroid hormone-related peptide messenger ribonucleic acid in developing kidney. *Kidney Int* 55:1696-1703, 1999
9. Barrett EG, Johnston C, Oberdorster G, Finkelstein JN: Antioxidant treatment attenuates cytokine and chemokine levels in murine macrophages following silica exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 158:211-220, 1999
10. Baylis C, Brenner BM: Modulation by prostaglandin synthesis inhibitors of the action of exogenous angiotensin II on glomerular ultrafiltration in the rat. *Circ Res* 43:889-898, 1978
11. Biancone L, David S, Della P, V *et al.*: Alternative pathway activation of complement by cultured human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 45:451-460, 1994
12. Binswanger U, Helmle-Kolb C, Forgo J *et al.*: Rapid stimulation of Na⁺/H⁺ exchange by 1,25-dihydroxyvitamin D₃; interaction with parathyroid-hormone-dependent inhibition. *Pflugers Arch* 424:391-397, 1993
13. Bosch RJ, Rojo-Linares P, Torrecillas-Casamayor G *et al.*: Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol* 277:E990-E995, 1999
14. Bringhurst FR, Juppner H, Guo J *et al.*: Cloned, stably expressed parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptors activate multiple messenger signals and biological responses in LLC-PK1 kidney cells. *Endocrinology* 132:2090-2098, 1993
15. Burton PB, Moniz C, Knight DE: Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 167:1134-1138, 1990

16. Campa VM, Iglesias JM, Carcedo MT *et al.*: Polyinosinic acid induces TNF and NO production as well as NF-kappaB and AP-1 transcriptional activation in the monocytomacrophage cell line RAW 264.7. *Inflamm Res* 54:328-337, 2005
17. Carpio L, Gladu J, Goltzman D, Rabbani SA: Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E489-E499, 2001
18. Ceballos M, López-Revuelta K, Saracho R *et al.*: Informe de diálisis y trasplante correspondiente al año 2002 de la Sociedad Española de Nefrología y Registros Autonómicos. *Nefrología* 25:121-130, 2005
19. Chen L, Boadle RA, Harris DC: Toxicity of holotransferrin but not albumin in proximal tubule cells in primary culture. *J Am Soc Nephrol* 9:77-84, 1998
20. Chevalier RL: Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:157-168, 2006
21. Chevalier RL: Promise for gene therapy in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 66:1709-1710, 2004
22. Chevalier RL, Peters CA: Congenital urinary tract obstruction: Proceedings of the State-Of-The-Art Strategic Planning Workshop-National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 11-12 March 2002. *Pediatr Nephrol* 18:576-606, 2003
23. Clemens TL, Cormier S, Eichinger A *et al.*: Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 134:1113-1136, 2001

24. Cook JL, Zhang Z, Re RN: In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res* 89:1138-1146, 2001
25. de Miguel F, García-Canero R, Esbrit P: Co-purification of calcium transport-stimulating and DNA synthesis-stimulating agents with parathormone-like activity isolated from the hypercalcaemic strain of the Walker 256 tumour. *Eur J Cancer* 27:1022-1026, 1991
26. Egido J: Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* 49:578-597, 1996
27. Eis V, Luckow B, Vielhauer V *et al.*: Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15:337-347, 2004
28. Endlich K, Massfelder T, Helwig JJ, Steinhausen M: Vascular effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. *J Physiol* 483 (Pt 2):481-490, 1995
29. Endlich N, Endlich K: Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol* 85:229-234, 2006
30. Endlich N, Nobiling R, Kriz W, Endlich K: Expression and signaling of parathyroid hormone-related protein in cultured podocytes. *Exp Nephrol* 9:436-443, 2001
31. Esbrit P: Hypercalcemia of malignancy--new insights into an old syndrome. *Clin Lab* 47:67-71, 2001

32. Esbrit P, Benítez-Verguizas J, de Miguel F *et al.*: Characterization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor and signaling in hypercalcemic Walker 256 tumor cells. *J Endocrinol* 166:11-20, 2000
33. Esbrit P, Santos S, Ortega A *et al.*: Parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. From vessels to glomeruli and tubular epithelium. *Am J Nephrol* 21:179-184, 2001
34. Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M *et al.*: Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15:1514-1529, 2004
35. Everhart-Caye M, Inzucchi SE, Guinness-Henry J *et al.*: Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81:199-208, 1996
36. Fiaschi-Taesch NM, Santos S, Reddy V *et al.*: Prevention of acute ischemic renal failure by targeted delivery of growth factors to the proximal tubule in transgenic mice: the efficacy of parathyroid hormone-related protein and hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol* 15:112-125, 2004
37. Friedman PA, Gesek FA, Morley P *et al.*: Cell-specific signaling and structure-activity relations of parathyroid hormone analogs in mouse kidney cells. *Endocrinology* 140:301-309, 1999
38. Fritsch S, Lindner V, Welsch S *et al.*: Intravenous delivery of PTH/PTHrP type 1 receptor cDNA to rats decreases heart rate, blood pressure, renal tone, renin angiotensin system, and stress-induced cardiovascular responses. *J Am Soc Nephrol* 15:2588-2600, 2004

39. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C *et al.*: Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87:1123-1132, 2000
40. Fukuhara M, Geary RL, Diz DI *et al.*: Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* 35:353-359, 2000
41. Funk JL: A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 1:1101-1121, 2001
42. Funk JL, Trout CR, Wei H *et al.*: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) induction in reactive astrocytes following brain injury: a possible mediator of CNS inflammation. *Brain Res* 915:195-209, 2001
43. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. *Raven Press* 721-733, 1989. New York
44. García-Ocaña A, de Miguel F, Peñaranda C *et al.*: Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res* 10:1875-1884, 1995
45. García-Ocaña A, Galbraith SC, Van Why SK *et al.*: Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol* 10:238-244, 1999
46. García-Ocaña A, Gómez-Casero E, Peñaranda C, Esbrit P: Parathyroid hormone-related protein increases DNA synthesis in proximal tubule cells by cyclic AMP- and protein kinase C-dependent pathways. *Life Sci* 62:2267-2273, 1998
47. García-Ocaña A, Gómez-Casero E, Peñaranda C *et al.*: Cyclosporine increases renal parathyroid hormone-related protein expression in vivo in the rat. *Transplantation* 65:860-863, 1998

48. Gobe G, Zhang XJ, Willgoss DA *et al.*: Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 11:454-467, 2000
49. Gómez-Garre D, Largo R, Tejera N *et al.*: Activation of NF-kappaB in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 37:1171-1178, 2001
50. Gujjarro C, Egido J: Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59:415-424, 2001
51. Guillén C, de Gortázar AR, Esbrit P: The interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor system induces parathyroid hormone-related protein in human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 75:153-159, 2004
52. Guillén C, Martínez P, de Gortázar AR *et al.*: Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277:28109-28117, 2002
53. Guo J, Iida-Klein A, Huang X *et al.*: Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor density modulates activation of phospholipase C and phosphate transport by PTH in LLC-PK1 cells. *Endocrinology* 136:3884-3891, 1995
54. Harris RC, Martínez-Maldonado M: Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21:328-335, 1995
55. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH *et al.*: Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol* 107:1359-1368, 1988

56. Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H *et al.*: Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 15:4064-4075, 1995
57. Hines WH, Haverty TP, Elias JA *et al.*: T cell recognition of epithelial self. *Autoimmunity* 5:37-47, 1989
58. Hirschberg R, Ding H: Mechanisms of insulin-like growth factor-I-induced accelerated recovery in experimental ischemic acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 24:211-219, 1998
59. Humes HD, Lake EW, Liu S: Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21:353-365, 1995
60. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K *et al.*: Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis* 152:97-105, 2000
61. Izquierdo A, López-Luna P, Ortega A *et al.*: The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in streptozotocin-induced diabetes. *Kidney Int* 69:2171-2177, 2006
62. Jo SK, Cho WY, Sung SA *et al.*: MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int* 67:458-466, 2005
63. Jobert AS, Fernandes I, Turner G *et al.*: Expression of alternatively spliced isoforms of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger RNA in human kidney and bone cells. *Mol Endocrinol* 10:1066-1076, 1996

64. Joun H, Lanske B, Karperien M *et al.*: Tissue-specific transcription start sites and alternative splicing of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor gene: a new PTH/PTHrP receptor splice variant that lacks the signal peptide. *Endocrinology* 138:1742-1749, 1997
65. Juppner H: Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3:371-378, 1994
66. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J *et al.*: Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* 8:277-289, 1994
67. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL: Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 226:862-868, 1996
68. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F *et al.*: Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10933-10938, 1996
69. Klahr S, Buerkert J, Morrison A: Urinary Tract Obstruction (1443-1490)(The Kidney).1986. Ed por Brenner BM y Rector CC. *W.B. Saunders Company, Filadelfia*
70. Kontogiannis J, Burns KD: Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol* 274:F79-F90, 1998
71. Krejcy K, Eichler HG, Jilka B *et al.*: Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 74:9-14, 1996

72. Largo R, Gómez-Garre D, Santos S *et al.*: Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int* 55:82-90, 1999
73. Lee FT, Cao Z, Long DM *et al.*: Interactions between angiotensin II and NF-kappaB-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2139-2151, 2004
74. Lee K, Brown D, Urena P *et al.*: Localization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor mRNA in kidney. *Am J Physiol* 270:F186-F191, 1996
75. Lieberthal W, Levine JS: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271:F477-F488, 1996
76. Long GW, Misra DC, Juleff R *et al.*: Protective effects of enalaprilat against postischemic renal failure. *J Surg Res* 54:254-257, 1993
77. Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P *et al.*: Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13:1595-1607, 2002
78. MacSween JM, Rajaraman K, Rajaraman R, Fox RA: Macrophage migration inhibition factor (MIF): reducing the variables. *J Immunol Methods* 52:127-136, 1982
79. Maeda S, Sutliff RL, Qian J *et al.*: Targeted overexpression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) to vascular smooth muscle in transgenic mice lowers blood pressure and alters vascular contractility. *Endocrinology* 140:1815-1825, 1999

80. Maeda S, Wu S, Green J *et al.*: The N-terminal portion of parathyroid hormone-related protein mediates the inhibition of apical Na⁺/H⁺ exchange in opossum kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 9:175-181, 1998
81. Maeda S, Wu S, Juppner H *et al.*: Cell-specific signal transduction of parathyroid hormone (PTH)-related protein through stably expressed recombinant PTH/PTHrP receptors in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 137:3154-3162, 1996
82. Male DK, Champion B, Cooke A, Owen M: Cell traffic and inflammation. (Advance Immunology 2^a ed.). 1991. Ed Gower London-New York
83. Martin TJ, Moseley JM, Williams ED: Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 154 Suppl:S23-S37, 1997
84. Martín-Ventura JL, Ortego M, Esbrit P *et al.*: Possible role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis. *Stroke* 34:1783-1789, 2003
85. Massfelder T, Dann P, Wu TL *et al.*: Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13630-13635, 1997
86. Massfelder T, Lang H, Schordan E *et al.*: Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 64:180-188, 2004

87. Massfelder T, Parekh N, Endlich K *et al.*: Effect of intrarenally infused parathyroid hormone-related protein on renal blood flow and glomerular filtration rate in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 118:1995-2000, 1996
88. Massfelder T, Stewart AF, Endlich K *et al.*: Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int* 50:1591-1603, 1996
89. Massfelder T, Taesch N, Endlich N *et al.*: Paradoxical actions of exogenous and endogenous parathyroid hormone-related protein on renal vascular smooth muscle cell proliferation: reversion in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J* 15:707-718, 2001
90. Matsumoto K, Nakamura T: Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 59:2023-2038, 2001
91. Mene P, Fais S, Cinotti GA *et al.*: Regulation of U-937 monocyte adhesion to cultured human mesangial cells by cytokines and vasoactive agents. *Nephrol Dial Transplant* 10:481-489, 1995
92. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38:635-638, 2001
93. Miao D, He B, Jiang Y *et al.*: Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest* 115:2402-2411, 2005
94. Miao D, Tong XK, Chan GK *et al.*: Parathyroid hormone-related peptide stimulates osteogenic cell proliferation through protein kinase C activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 276:32204-32213, 2001

95. Møller JC and Djurhuus JC: Obstructive Disease of the Kidney and the Urinary Tract (863-894) (Renal Pathology 2^o edición). 1994. Ed. Tisher CC y Brenner BM. *J.B. Lippincott Company*, Philadelphia.
96. Morrissey JJ, Klahr S: Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis. *Am J Physiol* 274:F580-F586, 1998
97. Morrissey JJ, Klahr S: Rapid communication. Enalapril decreases nuclear factor kappa B activation in the kidney with ureteral obstruction. *Kidney Int* 52:926-933, 1997
98. Muller GA, Markovic-Lipkovski J, Frank J, Rodemann HP: The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2:S198-S205, 1992
99. Nakayama T, Ohtsuru A, Enomoto H *et al.*: Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1028-1035, 1994
100. Nath KA, Croatt AJ, Haggard JJ, Grande JP: Renal response to repetitive exposure to heme proteins: chronic injury induced by an acute insult. *Kidney Int* 57:2423-2433, 2000
101. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H: Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 39:316-322, 2002
102. Noda M, Kato T, Takuwa N *et al.*: Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269:17911-17917, 1994

103. Oostendorp J, Hylkema MN, Luinge M *et al.*: Localization and enhanced mRNA expression of the orphan chemokine receptor L-CCR in the lung in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *J Histochem Cytochem* 52:401-410, 2004
104. Ophascharoensuk V, Giachelli CM, Gordon K *et al.*: Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int* 56:571-580, 1999
105. Orloff JJ, Ganz MB, Nathanson MH *et al.*: A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology* 137:5376-5385, 1996
106. Ortega A, Rámila D, Ardura JA *et al.*: Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 17:1594-1603, 2006
107. Ortega A, Rámila D, Izquierdo A *et al.*: Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 16:939-949, 2005
108. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S *et al.*: Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76:127-173, 1996
109. Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A *et al.*: Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 268:1987-1994, 1993

110. Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P *et al.*: Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10:245-255, 1999
111. Qian J, Lorenz JN, Maeda S *et al.*: Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology* 140:1826-1833, 1999
112. Rabb H, O'Meara YM, Maderna P *et al.*: Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 51:1463-1468, 1997
113. Rámila D, Ardura JA, Esbrit P: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a new proinflammatory factor in renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation (NDT) Suplemento* 21(7):1749-2046, 2006
114. Re R: The nature of intracrine peptide hormone action. *Hypertension* 34:534-538, 1999
115. Rees AJ: The role of infiltrating leukocytes in progressive renal disease: implications for therapy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:348-349, 2006
116. Remick DG, Scales WE, May MA *et al.*: In situ hybridization analysis of macrophage-derived tumor necrosis factor and interleukin-1 mRNA. *Lab Invest* 59:809-816, 1988
117. Remuzzi G, Bertani T: Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339:1448-1456, 1998

118. Ren L, Blanchette JB, White LR *et al.*: Soluble fibronectin induces chemokine gene expression in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 68:2111-2120, 2005
119. Roit IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología*. 2ª ed. (Barcelona: Salvat). 1992.
Ref Type: Generic
120. Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 52:1497-1510, 1997
121. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V *et al.*: Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 21:16-20, 2006
122. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Lorenzo O *et al.*: Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 12-22, 2002
123. Santos S, Bosch RJ, Ortega A *et al.*: Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure. *Kidney Int* 60:982-995, 2001
124. Saussine C, Massfelder T, Parnin F *et al.*: Renin stimulating properties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int* 44:764-773, 1993
125. Schramek H, Coroneos E, Dunn MJ: Interactions of the vasoconstrictor peptides, angiotensin II and endothelin-1, with vasodilatory prostaglandins. *Semin Nephrol* 15:195-204, 1995
126. Schreiner GF, Harris KP, Purkerson ML, Klahr S: Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney Int* 34:487-493, 1988

127. Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN: Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 207:80-88, 1995
128. Skurk T, Van Harmelen V, Hauner H: Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1199-1203, 2004
129. Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE *et al.*: Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology* 145:2815-2823, 2004
130. Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB *et al.*: Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest* 92:2850-2857, 1993
131. Strewler GJ: The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med* 342:177-185, 2000
132. Strutz F, Neilson EG: New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24:459-476, 2003
133. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O *et al.*: Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35:881-900, 2003
134. Takasu H, Guo J, Bringhurst FR: Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 14:11-20, 1999

135. Taki H, Kashiwagi A, Tanaka Y, Horiike K: Expression of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) via an osmotic effect in human umbilical vein endothelial cells exposed to high glucose medium. *Life Sci* 58:1713-1721, 1996
136. Tang WW, Ulich TR, Lacey DL *et al.*: Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 148:1169-1180, 1996
137. Touyz RM, Yao G, Viel E *et al.*: Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 22:1141-1149, 2004
138. Tovar Sepulveda VA, Shen X, Falzon M: Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143:596-606, 2002
139. Usdin TB, Gruber C, Bonner TI: Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 270:15455-15458, 1995
140. Viedt C, Dechend R, Fei J *et al.*: MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *J Am Soc Nephrol* 13:1534-1547, 2002
141. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M *et al.*: Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 12:1173-1187, 2001

142. Villanueva-Peñacarrillo ML, Cancelas J, de Miguel F *et al.*: Parathyroid hormone-related peptide stimulates DNA synthesis and insulin secretion in pancreatic islets. *J Endocrinol* 163:403-408, 1999
143. Wang Z, Chen JK, Wang SW *et al.*: Importance of functional EGF receptors in recovery from acute nephrotoxic injury. *J Am Soc Nephrol* 14:3147-3154, 2003
144. Watson PH, Fraher LJ, Hendy GN *et al.*: Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J Bone Miner Res* 15:1033-1044, 2000
145. Welsch S, Schordan E, Coquard C *et al.*: Abnormal renovascular parathyroid hormone-1 receptor in hypertension: Primary defect or secondary to angiotensin II type 1 receptor activation? *Endocrinology* 147:4384-4391, 2006
146. White KE, Bilous RW: Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 1 disease. *J Am Soc Nephrol* 11:1667-1673, 2000
147. Yang T, Hassan S, Huang YG *et al.*: Expression of PTHrP, PTH/PTHrP receptor, and Ca(2+)-sensing receptor mRNAs along the rat nephron. *Am J Physiol* 272:F751-F758, 1997
148. Zoja C, Morigi M, Figliuzzi M *et al.*: Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 26:934-941, 1995

Anexos

8. ANEXOS

I. Congresos internacionales

- **Autores:** D Rámila, JA Ardura, P Esbrit

Título: Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation through extracellular-related protein kinases and NF- κ B activation

Tipo de participación: Póster

Congreso: XLIV Congreso de la ERA-EDTA (European Renal Association European Diálisis and Transplantation).

Lugar de celebración: Barcelona, España

Fecha: Junio 2007

-**Autores:** D Rámila, JA Ardura, P Esbrit

Título: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a new proinflammatory factor in renal disease

Tipo de participación: Oral

Congreso: XLIII Congreso de la ERA-EDTA (European Renal Association-European Diálisis and Transplantation)

Lugar de celebración: Glasgow, Reino Unido

Fecha: Julio 2006

-**Autores:** D Rámila, A Ortega, JA Ardura, F Strutz, RJ Bosch, P Esbrit

Título: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a proinflammatory/profibrotic cytokine in obstructive nephropathy

Tipo de participación: Póster

Congreso: XLII Congreso de la ERA-EDTA (European Renal Association-European Diálisis and Transplantation)

Publicación: Nephrology Dialysis Transplantation (NDT) Suplemento Junio; 20 (6): 1025 – 1285, 2005.

Lugar de celebración: Estambul, Turkía

Fecha: Junio 2005

- **Autores:** M Romero, A Ortega, A Izquierdo, D Rámila, ME Fernández, J Bover, P Esbrit, RJ Bosch

Título: Parathyroid Hormone related protein (PTHrP) induces hypertrophy and production of extracellular matrix proteins in podocytes. Implications for Diabetic Nephropathy.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XLIII ERA-EDTA Congress

Publicación: NDT 21 (supl. 4): SP111

Lugar de celebración: Glasgow, United kingdom

Fecha: Julio 2006

- **Autores:** JA Ardura, R Berruguete, D Rámila, MV Álvarez-Arroyo, P Esbrit
Título: Role of vascular endothelial growth factor and its receptors as mediators of various profibrogenic actions of parathyroid hormone-related protein in the kidney
Tipo de participación: Póster y oral
Congreso: XXXIV Congreso internacional de la ECTS (34th European Symposium on Calcified Tissues)
Lugar de celebración: Copenhague, Dinamarca
Fecha: Mayo 2007

-**Autores:** JA Ardura, D Rámila, R Berruguete, MV Álvarez-Arroyo, P Esbrit
Título: The N-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein induces epithelial-mesenchymal transition by transactivation of the epidermal growth factor receptor
Tipo de participación: Póster
Congreso: XXXIV Congreso internacional de la ECTS (34th European Symposium on Calcified Tissues)
Lugar de celebración: Copenhague, Dinamarca
Fecha: Mayo 2007

- **Autores:** JA Ardura, D Rámila, R Berruguete, MV Alvarez-Arroyo, P Esbrit
Título: Parathyroid hormone-related protein interacts with transforming growth factor β , epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor in epithelial-mesenchymal transition
Tipo de participación: Póster
Congreso: XLIII Congreso Internacional de la ERA-EDTA (European Renal Association-European Diálisis and Transplant)
Publicación: Nephrology Dialysis Transplantation (NDT) Suplemento Julio; 21 (7): 1749 – 2046, 2006
Lugar de celebración: Glasgow, Reino Unido
Fecha: Julio 2006

-**Autores:** JA Ardura, A Ortega, D Rámila, F Strutz, P Esbrit
Título: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a new renal cytokine inducing epithelial-mesenchymal transition
Tipo de participación: Póster
Congreso: XLII ERA-EDTA (European Renal Association-European Diálisis and Transplant)
Publicación: Nephrology Dialysis Transplantation (NDT) Suplemento Junio; 20 (6): 1025 – 1285, 2005.
Lugar de celebración: Estambul, Turkia
Fecha: Junio 2005

-Autores: A Ortega, D Ramila, JA Ardura, Pedro Esbrit

Título: Role of angiotensin II on the parathyroid hormone-related protein (PTHrP) overexpression after folic acid-induced injury in tubuloepithelial cells

Tipo de participación: Póster

Congreso: XLI ERA-EDTA (European Renal Association-European Diálisis and Transplant)

Lugar de celebración: Lisboa, Portugal

Fecha: Mayo 2004

-Autores: D Ramila, A Ortega, **JA Ardura**, V Esteban, A Barat, M Ruiz-Ortega, P Esbrit

Título: Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a fibrogenesis-promoting factor in folic acid-induced acute renal failure

Tipo de participación: Póster

Congreso: XLI ERA-EDTA (European Renal Association-European Diálisis and Transplant)

Lugar de celebración: Lisboa, Portugal

Fecha: Mayo 2004

-Autores: D Rámila, A Ortega, F Mata, P Esbrit

Título: Parathyroid hormone-related protein as a survival factor in experimental acute renal failure

Tipo de participación: Oral

Congreso: ISN-ERA/EDTA World Congress of Nefrology. Satellite symposium on ARF

Lugar de celebración: Gante, Bélgica

Fecha: Junio, 2003

-Autores: A Ortega, D Rámila, A Izquierdo, RJ Bosch, R Gazapo, P Esbrit.

Título: Relationship between the renin-angiotensin system and parathyroid hormone-related protein in an experimental model of acute renal failure

Tipo de participación: Oral

Congreso: ISN-ERA/EDTA World Congress of Nefrology. Satellite symposium on ARF

Lugar de celebración: Gante, Bélgica

Fecha: Junio, 2003

II. Premios

Premio a la Investigación Básica de la XVIII Edición de Premios de la Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo (2006)

Título: “La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP): Una nueva citoquina proinflamatoria y profibrogénica en la patología renal”.

III. Publicaciones:

Kidney Internacional en revisión

Parathyroid Hormone-Related Protein Promotes Inflammation in the Mouse Obstructed Kidney

David Rámila¹, Juan Antonio Ardura¹, Vanesa Esteban², Arantxa Ortega³, Marta Ruiz-Ortega², Ricardo J Bosch³, and Pedro Esbrit^{1,*}.

¹Bone and Mineral Metabolism Laboratory and ²Vascular and Renal Laboratory, Fundación Jiménez Díaz (Capió Group) and Universidad Autónoma de Madrid; ³Laboratory of Renal Physiology and Experimental Nephrology, Department of Physiology, Alcalá University, Alcalá de Henares, Spain.

Short title: **PTHrP and Inflammation in the Mouse Obstructed Kidney**

Recent evidence suggests that parathyroid hormone-related protein (PTHrP) can promote fibrogenesis in the acutely damaged kidney. Considering the relation between fibrosis and inflammation, we assessed whether renal overexpression of this protein would affect the inflammatory response following unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. Transgenic mice overexpressing PTHrP (PTHrP-TG) in the proximal tubule had greater renal tubulointerstitial damage, leukocyte influx, and expression of several pro-inflammatory factors than their control littermates after UUO. Reversal of PTHrP overexpression in PTHrP-TG mice, or the antagonist PTHrP (7-34) in control mice, decreased the inflammatory response to UUO. Losartan, which abolished UUO-induced PTHrP overexpression, also decreased the latter response in both types of mice but less efficiently in PTHrP-TG mice. PTHrP (1-36) induced NFκ-B activation and overexpression of various pro-inflammatory cytokines in mouse tubuloepithelial MCT cells. This peptide also increased mouse monocyte/macrophage Raw 264.7 cells' migration, partly

through inducing MCP-1 secretion by MCT cells. These *in vitro* effects were dramatically decreased by both NF- κ B and extracellular signal-related kinase (ERK) inhibitors. Our findings demonstrate the critical role of PTHrP on the inflammatory process following kidney obstruction in mice. *In vitro* data also indicate that ERK-mediated NF- κ B activation seems to be an important mechanism whereby PTHrP may trigger renal inflammation. PTHrP is thus emerging as a new inflammation marker and a putative therapeutic target in the obstructed kidney.

Role of Parathyroid Hormone–Related Protein in Tubulointerstitial Apoptosis and Fibrosis after Folic Acid–Induced Nephrotoxicity

Arantxa Ortega,^{*†} David Rámila,^{*‡} Juan Antonio Ardura,^{*‡} Vanesa Esteban,[‡] Marta Ruiz-Ortega,[‡] Antonio Barat,[§] Rosa Gazapo,^{||} Ricardo J. Bosch,[†] and Pedro Esbrit^{*}

^{*}Bone and Mineral Metabolism Laboratory, [‡]Vascular and Renal Laboratory, [§]Pathology Department, and ^{||}Biochemistry Department, Fundación Jiménez Díaz-UTE (Cipio Group) and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid; and

[†]Laboratory of Renal Physiology and Experimental Nephrology, Department of Physiology, Alcalá University, Alcalá de Henares, Spain

Parathyroid hormone–related protein (PTHrP) is shortly upregulated in acute renal injury, but its pathophysiologic role is unclear. Investigated was whether PTHrP might act as a profibrogenic factor in mice that do or do not overexpress PTHrP in the proximal tubule after folic acid (FA) nephrotoxicity, a model of acute renal damage followed by partial regeneration and patchy tubulointerstitial fibrosis. It was found that constitutive PTHrP overexpression in these animals conveyed a significant increase in tubulointerstitial fibrosis, associated with both fibroblast activation (as α -smooth muscle actin staining) and macrophage influx, compared with control littermates at 2 to 3 wk after FA damage. Cell proliferation and survival was higher ($P < 0.01$) in the renal interstitium of PTHrP-overexpressing mice than in control littermates within this period after injury. Moreover, the former mice had a constitutive Bcl-X_L protein overexpression. *In vitro* studies in renal tubulointerstitial and fibroblastic cells strongly suggest that PTHrP (1-36) (100 nM) reduced FA-induced apoptosis through a dual mechanism involving Bcl-X_L upregulation and Akt and Bad phosphorylation. PTHrP (1-36) also stimulated monocyte chemoattractant protein-1 expression in tubuloepithelial cells, as well as type-1 procollagen gene expression and fibronectin (mRNA levels and protein secretion) in these cells and renal fibroblastic cells. Our findings indicate that this peptide, by interaction with the PTH1 receptor, can increase tubulointerstitial cell survival and seems to act as a proinflammatory and profibrogenic factor in the FA-damaged kidney.

J Am Soc Nephrol 17: 1594–1603, 2006. doi: 10.1681/ASN.2005070690

Both dysfunction and loss of tubular epithelial cells play central roles on the mechanisms of kidney damage after ischemic or toxic challenge (1,2). Shortly after renal damage, the tubular epithelium generates proinflammatory mediators that promote the influx of inflammatory cells into the tubulointerstitial space (3). Tubulointerstitial inflammation now is known to contribute to interstitial fibrosis and kidney damage progression (4,5). Apoptosis participates in the initial loss of intrinsic renal cells after acute kidney injury, but it also may provide a balance for the excessive mononuclear cell infiltrate and the compensatory tubular hyperplasia in this setting (1,6,7).

Parathyroid hormone (PTH)-related protein PTHrP and the PTH1 receptor (PTH1R) are abundant throughout the renal parenchyma (8,9). In the tubular epithelium, PTHrP has mitogenic features, and its overexpression occurs rapidly in exper-

imental models of several nephropathies (10–12). However, PTHrP overexpression in the renal proximal tubule has proved inefficient in protecting against ischemic or nephrotoxic renal injury in mice (13). On the other hand, recent data support the concept that PTHrP may act as a proinflammatory mediator in various pathophysiologic conditions (14,15). Moreover, angiotensin II (Ang II) infusion in rats was shown recently to induce the renal PTHrP/PTH1R system, associated with tubular damage and fibrosis (16).

Previous *in vitro* studies have shown that endogenous PTHrP seems to increase tubuloepithelial cell viability after injury (12,17). Moreover, whereas PTHrP can promote cell death in a rat intestinal cell line (18), it inhibits apoptosis in both pancreatic β cells and chondrocytes (19,20). At least in chondrocytes, this antiapoptotic effect seems to involve PTHrP interaction with the PTH1R and also its internalization into the nucleus (20). As stated above, a putative inhibitory effect of PTHrP on renal cell apoptosis might have a significant impact on the pathogenesis of kidney injury.

In this study, we examined the role of PTHrP in folic acid (FA) nephrotoxicity—in which acute renal damage occurs associated with an early upregulation of PTHrP followed by partial regeneration and patchy tubulointerstitial fibrosis

Received July 7, 2005. Accepted March 6, 2006.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

U.O. and D.R. contributed equally to this work.

Address correspondence to: Dr. Pedro Esbrit, Laboratorio de Metabolismo Mineral Óseo, Fundación Jiménez Díaz-UTE, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. Phone: +34-91-550-4894; Fax: +34-91-549-8075; E-mail: pesbrit@fjd.es

within several weeks (17,21,22)—in mice that do or do not overexpress PTHrP in the renal proximal tubule. We also explored some of the mechanisms whereby PTHrP might contribute to the temporal changes in tubulointerstitial fibrosis in this model of acute tubular injury.

Materials and Methods

PTHrP-Overexpressing Transgenic Mice

PTHrP-overexpressing transgenic (PTHrP-TG) mice were a gift of Drs. A.F. Stewart and A. García-Ocaña (Department of Endocrinology and Metabolism, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA). These mice were generated by breeding hemizygote mice for two types of constructs: One that consists of a 2.2-kb γ -glutamyl transpeptidase promoter fragment upstream of a tetracycline transactivator fusion protein and another that contains a human PTHrP cDNA placed under the control of a tetracycline operator (13). Transgene-bearing founders were outbred continually to normal CD-1 mice to generate hemizygotes. Genotyping of these mice was carried out by tail DNA PCR. In all of the experiments described below, gender-unslected mice (4 to 8 mo of age), homogeneously distributed among groups, were used. The results that were obtained with PTHrP-TG mice were compared with those that were obtained with control littermates (those that bear either one of the previously mentioned constructs or normal CD-1 mice) (13). Studies were performed with the approval of and in accordance with guidelines established by Institutional Animal Care and Use Committee at Fundación Jiménez Díaz.

Induction of FA Nephrotoxicity

Renal failure was induced by a single intraperitoneal injection of FA (250 mg/kg body wt) in 300 mM sodium bicarbonate (vehicle) (21,23). At different periods (up to 4 wk) after injection of either FA or vehicle (controls), some mice were food deprived and placed in restrictive cages. After 24 h, urine was collected and blood was taken by cardiac puncture under anesthesia. Plasma and urine creatinine were determined by autoanalyzer (Dimension RXL; Dade Behring, Liederbach, Germany). All mice were killed, and the kidneys were harvested. One kidney from each animal in all groups was fixed in 4% p-formaldehyde for histologic studies. The remaining kidney of each animal was homogenized in lysis buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, and 1.4 μ M aprotinin [pH 7.5]) and stored at -20°C for subsequent analysis.

Histology and Immunohistochemistry

Histologic evaluation by hematoxylin/eosin and staining analysis were performed routinely on serial paraffin-embedded renal tissue sections (2 μ m) within the same mouse tissue. Apoptosis was identified by condensed nuclear chromatin and intact cell membranes (24). Alternatively, some tissue samples were incubated with 100 μ g/ml RNase A (Sigma, St. Louis, MO) and 2 μ g/ml propidium iodide (Sigma) in PBS for 10 min at 37°C in the dark and analyzed by fluorescence microscopy. Apoptotic cell death also was assessed by enzymatic *in situ* labeling of DNA strand breaks using the terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method (In Situ Cell Death Detection Kit; Promega, Madison, WI) in mouse kidney samples.

Immunohistochemistry was performed using previously described protocols (15–17,21,25) and the following antibodies (dilution, -fold): Two rabbit polyclonal antibodies against proliferating cell nuclear antigen (PCNA; Dako, Glostrup, Denmark; 150) or laminin (Neo Markers, Fremont, CA; 100), respectively, and two mAb against the F4/80 antigen in murine monocytes/macrophages (Serotec, Oxford, UK; 50) or

α -smooth muscle actin (α -SMA; Sigma; 150), respectively. The tissue sections were rehydrated, and endogenous peroxidase and nonspecific binding were blocked. Then, they were incubated for 30 min at room temperature (PCNA) or overnight at 4°C with the primary antibodies. Sections subsequently were incubated with the corresponding anti-IgG biotinylated-conjugated antibody followed by the avidin-biotin-peroxidase complex (Dako) or a polymer-peroxidase complex (Envision+ System; Dako; PCNA and α -SMA), and 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. The sections were counterstained with hematoxylin. Some tissue samples were incubated without the primary antibody, as negative controls.

Staining was evaluated in five to 10 different high-power fields per section that contained at least one glomerulus in four sections from each experimental mouse in a total of three to five mice per group. Tubular and interstitial TUNEL staining was evaluated by counting the number of stained cell nuclei per field in the proximal and distal tubules (identified by morphologic criteria) and in the interstitium, respectively. In the latter compartment, the number of PCNA- and F4/80-positive cells also was counted per field. The percentage of stained area for Masson's, laminin, and α -SMA was estimated by the following semiquantitative score: 0, no staining; 1, up to 25%; 2, between 25 and 50%; 3, between 50 and 75%; and 4, >75%. All evaluations were performed by two to three independent observers in a blinded manner, and the corresponding mean score value was obtained for each mouse.

Cell Culture Studies

Rat tubuloeplithelial NRK-52E (ATCC CRL 1571) and renal fibroblastic NRK-49F (ATCC CRL 1570) cells were grown in DMEM with 10% FBS, 1% nonessential amino acids, and antibiotics in 5% CO_2 at 37°C . Wild-type mouse cortical tubule (MCT) cells or those that constitutively overexpressed the human Bcl-X_L gene (MCT-Bcl-X_L) (23,26) were grown in RPMI 1640 with 10% FBS.

For viability studies, subconfluent cells (50,000 cells/cm²) were incubated for 24 h with 10 mM FA—a toxic dose for renal epithelial cells (17,21)—or serum-depleted medium, with or without 100 nM PTHrP (1-36) and/or 1 μ M [Asn¹⁰, Leu¹¹, D-Trp¹²] PTHrP (7-34) amide [PTHrP (7-34); Bachem, Bubendorf, Switzerland]. At specific points thereafter, nonadherent cells were collected and pooled with adherent cells (after gentle trypsinization). Total cell numbers and the percentage of cell viability were determined by trypan blue exclusion. Alternatively, cells were stained with the DNA fluorescent dye 4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (24). The number of nuclei with fragmented or condensed DNA/300 nuclei was taken as an index of apoptosis. For flow cytometry studies, cells were collected, as described above, and incubated in the dark for 1 h at 4°C in 60 μ g/ml RNase A, 50 μ g/ml propidium iodide, and 0.05% Nonidet P-40 in PBS. FACScan analysis then was performed using LYSIS II software. The percentage of hypodiploid cells, corresponding to apoptotic cells, was calculated on the basis of evaluation of 10,000 cells per experimental condition (23).

Western Blot Analysis

Kidney tissue or cell samples were homogenized in lysis buffer, and protein content was determined by the Bradford method (Pierce, Rockford, IL), using BSA as standard. To analyze Akt and Bad phosphorylation, a phosphatase-inhibitor cocktail (Set II; Calbiochem, San Diego, CA) was added to lysis buffer. Proteins (30 to 60 μ g/lane) were separated on 12.5% polyacrylamide-SDS gels under reducing condition. After electrophoresis, samples were transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK), blocked with either 5% defatted milk or 5% BSA (only for PTHrP) in PBS or 50 ml

Tris-HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl (phospho-⁴⁷³Ser-Akt, Akt, phospho-¹³⁶Ser-Bad, Bad) with 0.05% Tween-20, and incubated overnight at 4°C with the following rabbit polyclonal antibodies (dilution, -fold): Anti-PTHrP antiserum C6 (2500) (15,16,21,25), anti-PTH1R Ab-IV (Covance, Berkeley, CA; 1000) (13,25), anti-monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 500), anti-Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology; 2000), anti-Bcl-X_L antibody (Santa Cruz Biotechnology; 500), anti-Bax antibody (Santa Cruz Biotechnology; 2000), anti-phospho-⁴⁷³Ser-Akt or anti-Akt antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA; 1000), anti-phospho-¹³⁶Ser-Bad (Santa Cruz Biotechnology; 500), or anti-Bad antibodies (1000) and anti-fibronectin antibody (Chemicon, Temecula, CA; 2500) (27). The efficacy of protein transfer to the membranes was assessed by either α -tubuline or α -actin or by Ponceau S staining. The membranes subsequently were incubated with relevant peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, developed by ECL chemiluminescence (Amersham), and fluorogram bands were quantified by densitometry.

Real-Time PCR

Cell total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), and gene expression was analyzed by real-time PCR (27,28). Rat fibronectin-specific forward and reverse primers and probe were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA), whereas for rat type-1 procollagen, predeveloped TaqMan assay reagents, primers, and probe were used (Rn00584426_m1), as described in detail previously (27,28). 18S rRNA served as housekeeping gene and was amplified in parallel with genes of interest.

Statistical Analyses

All results are expressed as mean \pm SEM. Variance analysis followed by Dunnett test was performed to assess the effect of FA on the various parameters that were evaluated throughout the course of study *in vivo*. Mann-Whitney test was performed to analyze the differences between PTHrP-TG mice and their control littermates. Correlation between two numerical variables was assessed by Spearman coefficient. The effects of the different treatments *in vitro* were assessed by parametric (Dunnett test) or nonparametric (Kruskal-Wallis test) ANOVA or Mann-Whitney test as appropriate. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Changes in Renal Function in Mice with FA Nephrotoxicity

We recently reported that both PTHrP-TG mice and their control littermates exhibited a normal and similar renal function in basal condition and the same levels of renal impairment up to 1 wk after FA injury (13). Three weeks after FA injection, the latter mice showed a complete recovery of the renal function according to the creatinine clearance: 0.14 ± 0.01 versus 0.12 ± 0.01 ml/min in vehicle-treated mice. However, PTHrP-TG mice still showed a dramatic decrease in this parameter (0.04 ± 0.02 ml/min; $P < 0.01$ versus corresponding value in control littermates).

Increased Extracellular Matrix Deposition and Interstitial α -SMA Immunostaining in the Kidney of PTHrP-TG Mice with FA Nephrotoxicity

In previous studies (13,17), we found that the kidneys from uninjured PTHrP-TG mice showed normal structure upon light microscopy examination. We also had found that early in FA injury, an increase in PTHrP associated with PTH1R downregulation occurs (13,17,21). We found herein that between 2 and 3

wk after FA, the PTHrP levels remained elevated in the kidney of PTHrP-TG mice, whereas the renal PTHrP/PTH1R system normalizes in control littermates (Figure 1A). At this time, interstitial fibrotic areas (assessed by Masson's and laminin staining) that surrounded atrophic tubules were observed in FA-injected animals, which were higher in PTHrP-TG mice. At 4 wk, patchy fibrosis remained elevated in both types of mice, with a tendency to higher values—which did not reach statistical significance—in PTHrP-TG mice (Figure 1, B and C).

Consistent with the aforementioned results on extracellular matrix deposition, we found a significant increase in interstitial staining for α -SMA—a marker of fibroblast activation (5)—in the renal cortex of PTHrP-TG mice by 2 to 3 wk after FA damage. At 4 wk, this staining decreased but was still detectable in both types of mice (Figure 2A).

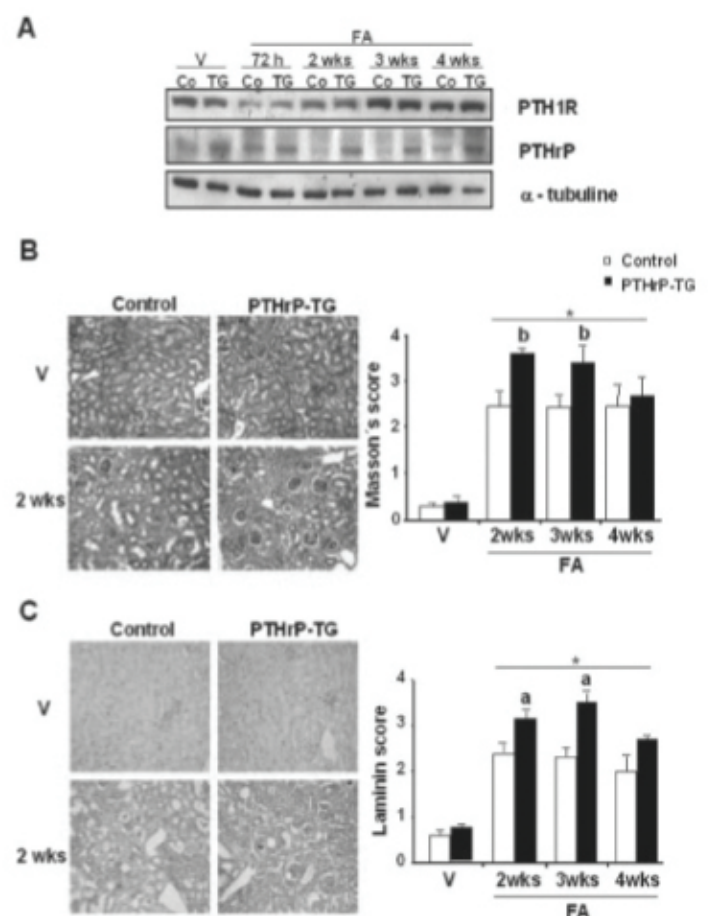


Figure 1. Evolution of the parathyroid hormone-related protein (PTHrP)/PTH1 receptor (PTH1R) system (A), as well as Masson's (B) and laminin (C) staining in the kidney of control (Co; □) and PTHrP-transgenic (PTHrP-TG; ■) mice after folic acid (FA) or vehicle (V) injection. Representative autoradiograms that correspond to Western blot analysis of PTHrP and the PTH1R (and α -tubuline, a constitutive control) in renal protein extracts from both types of mice are shown (A). Masson's and laminin staining in the kidney of representative control and PTHrP-TG mice after V or FA injection at 2 wk is shown. Corresponding positivity score values are mean \pm SEM of four mice per group at each period (B and C). * $P < 0.01$ versus corresponding V-treated value; ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ versus corresponding control value. Magnification, $\times 200$.

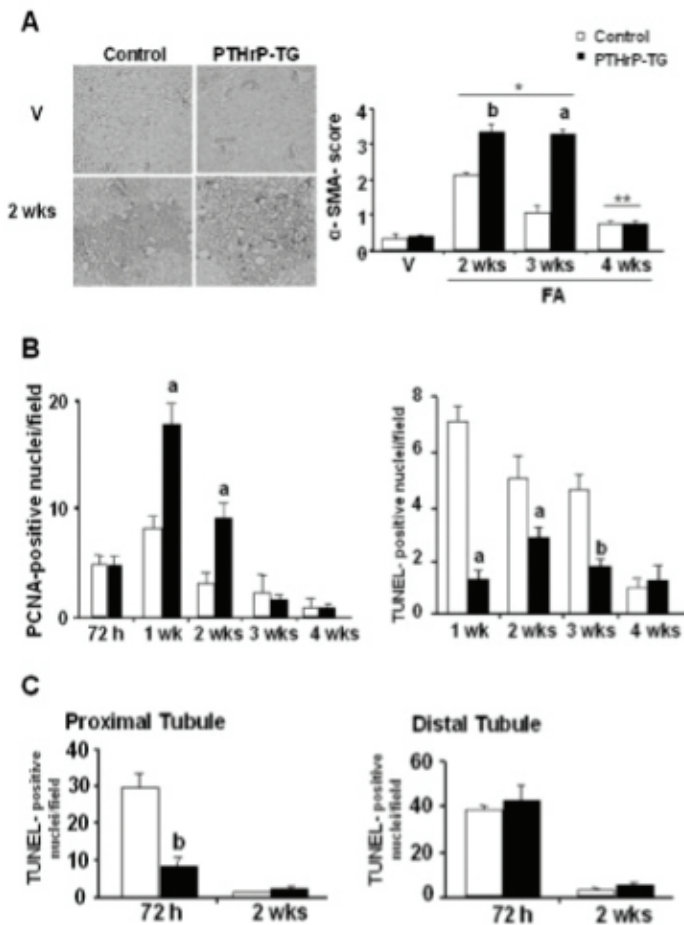


Figure 2. (A) Time course of changes in α -smooth muscle actin (α -SMA) immunostaining in the renal interstitium of control (□) and PTHrP-TG (■) mice after FA injury or V injection. α -SMA positivity in the kidney of representative control and PTHrP-TG mice after V or FA injection at 2 wk is shown. α -SMA -positivity score values are mean \pm SEM of four mice per group at each period. Positivity for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the renal cortical interstitium (left) and for terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (right) in the latter (B) and in the proximal and distal tubules (C) of control and PTHrP-TG mice at different periods after FA injury. Staining score values are mean \pm SEM of four to six mice per group at each period. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ versus corresponding V-treated value; ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ versus corresponding control value. Magnification, $\times 100$.

Increased Interstitial Proliferation and Survival and Macrophage Influx in PTHrP-TG Mice after FA Damage

An increased number of PCNA-positive cells was observed in the renal interstitium of PTHrP-TG mice, compared with that in control littermates, within 1 to 2 wk after nephrotoxic injury (Figure 2B, left). In the former mice, a decrease in TUNEL-positive interstitial cells also was found at this stage after FA (Figure 2B, right). This decrease might reflect, at least in part, an increased clearance of these cells as a result of an enhanced macrophage infiltration (29). In fact, in the renal interstitium, the number of F4/80-positive cells was significantly higher in PTHrP-TG mice than in their control littermates at 1 to 3 wk after FA (Figure 3A). Moreover, there was a significant correlation between this number and that of TUNEL-positive cells

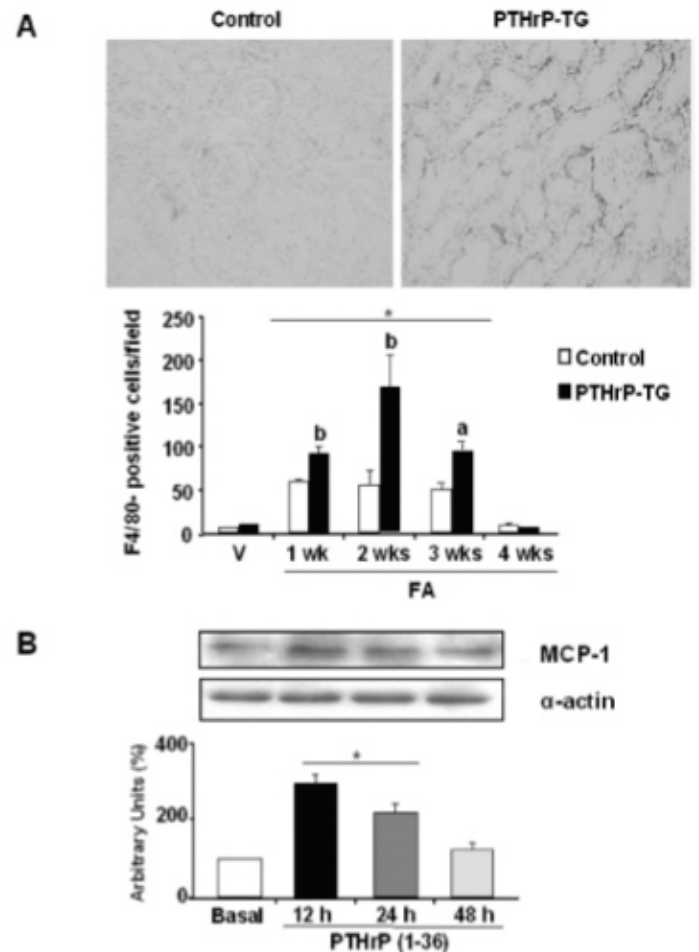


Figure 3. (A) Changes in interstitial F4/80 immunostaining in the renal cortex of control and PTHrP-TG mice after FA injury or V injection. F4/80 staining in representative control (□) and PTHrP-TG (■) mice at 2 wk is shown (top). F4/80 positivity score values are mean \pm SEM of four to eight mice per group at each period. * $P < 0.01$ versus corresponding V-treated value; ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ versus corresponding control value. (B) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protein expression in tubuloepithelial cells NRK-52E after stimulation with 100 nM PTHrP (1-36). Representative autoradiograms corresponding to Western blot analysis of MCP-1 and α -actin, a constitutive control, in these cells' protein extracts are shown. Values are mean \pm SEM from at least two independent experiments in duplicate. * $P < 0.01$ versus basal value (100%). Magnification, $\times 200$.

($r = -0.788$, $P < 0.01$) but also between the latter and the score values for α -SMA ($r = -0.810$, $P < 0.05$) in these animals. Therefore, a prolonged survival of interstitial fibroblasts seems to occur associated with renal PTHrP overexpression and fibrosis in mice. In addition, we found that PTHrP (1-36) can stimulate MCP-1 protein in tubuloepithelial cells NRK-52E (Figure 3B). Therefore, a higher survival of damaged proximal tubule cells, as observed in PTHrP-TG mice early after FA injection (Figure 2C), might promote MCP-1 synthesis and thus macrophage influx in these mice. At the end of the study, both PCNA and TUNEL-positive tubulointerstitial cells (Figure 2B), as well as F4/80 staining (Figure 3A), were similarly decreased to almost undetectable values in both types of mice.

Bcl-X_L Is Overexpressed in the Kidney of PTHrP-TG Mice

We next determined the expression of various cell death-related proteins in the mouse kidney at different times after FA injury by Western blot. It is interesting that we found that PTHrP-TG mice showed basal overexpression of the antiapoptotic protein Bcl-X_L, which remained unchanged after FA injury (Figure 4A). However, in these mice, the basal protein levels of either Bax or Bcl-2 (a pro- and antiapoptotic protein, respectively [30]) were similar to those in control littermates (Figure 4A, top). In the latter mice, FA induced an increase in both

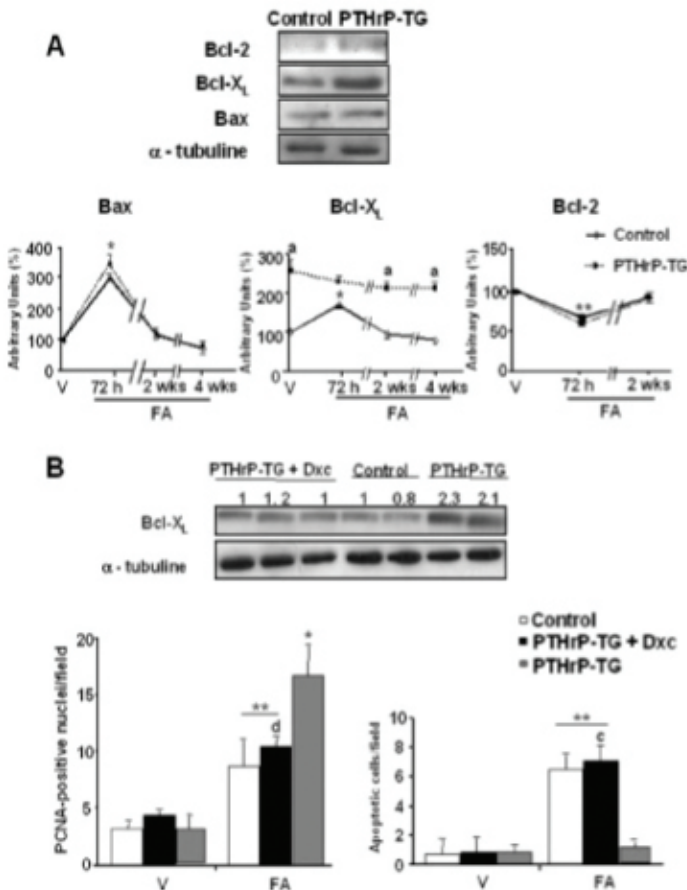


Figure 4. (A) Evolution of apoptosis-related proteins in the kidney of control and PTHrP-TG mice after FA damage. Representative autoradiograms corresponding to Western blot analysis of these proteins in basal conditions are shown (top). Relative densitometric values are mean \pm SEM of four to six mice per group at each period versus those of V-treated mice. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ versus V value (100%); ^a $P < 0.01$ versus corresponding values in control mice at the same point. (B) Effect of doxycycline treatment on Bcl-X_L protein expression and interstitial proliferation and apoptosis in the kidney of PTHrP-TG mice. Basal Bcl-X_L protein expression (by Western blot) and renal interstitial cell proliferation (PCNA) and apoptosis (by propidium iodide) at 1 wk of FA injury were evaluated in the kidney of control mice (□) and PTHrP-TG mice that were treated (■) or not treated (▨) with doxycycline (20 mg/L). Relative intensities of Bcl-X_L signals are indicated at the top top). Experimental values are mean \pm SEM of four to six mice per group. * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ versus corresponding V-treated value; ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$ versus corresponding PTHrP-TG value.

Bcl-X_L and Bax and a decrease in Bcl-2 protein levels at 72 h, which normalized at 2 wk (Figure 4A, bottom). In PTHrP-TG mice, however, changes in both Bax and Bcl-2 proteins occurred accordingly to those in their control littermates.

To confirm that renal PTHrP overexpression was responsible for the observed Bcl-X_L upregulation and tubulointerstitial changes in PTHrP-TG mice, doxycycline (20 mg/L) was administered (in the drinking water) to these mice to reverse PTHrP overexpression (13). At 1 wk after this administration, renal Bcl-X_L protein overexpression in PTHrP-TG mice decreased to normal levels (Figure 4B, top). In these animals, doxycycline treatment for an extended period of 1 wk after FA changed the number of PCNA-positive cells or cells that underwent apoptosis in the renal interstitium to levels that were indistinguishable from those in normal mice (Figure 4B, bottom).

PTHrP (1-36) Is a Survival Factor for Renal Tubuloepithelial and Fibroblastic Cells

To assess further whether PTHrP may act as a survival factor in renal tubulointerstitial cells *in vitro*, we used NRK-52E cells, a rat tubuloepithelial cell line of proximal tubule origin (17,31), which shows a growth response to PTHrP (17), and NRK-49F, a rat renal fibroblast cell line (32). Treatment of serum-deprived NRK-52E cells with 100 nM PTHrP (1-36) for 48 h significantly decreased the number of apoptotic cells—assessed by DAPI staining—from 53 ± 7 to $16 \pm 4\%$ ($P < 0.05$, $n = 4$); similar to $13 \pm 8\%$ in cells that were grown in 10% FBS-containing medium. Moreover, flow cytometry indicated that the increase in apoptotic hypodiploid cells' number by 10 mM FA was decreased by PTHrP (1-36) in a dose-dependent manner (Figure 5A). However, the percentage of NRK-52E cells that underwent apoptosis upon addition of FA was unaffected by this peptide in the presence of 1 μ M PTHrP (7-34), a PTH1R antagonist (33): 22% (FA alone) or 26% (FA + both peptides). This was confirmed by using trypan blue staining to assess cell viability (Figure 5B, left). In addition, we found that PTHrP (1-36) increased the survival of FA-treated NRK-49F cells, an effect that also was inhibited by PTHrP (7-34) (Figure 6A, left).

Activation of caspases has been shown to have a role in cisplatin-induced nephrotoxicity and other renal injuries (6,7,34). We found that the pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (zVAD-fmk; Calbiochem, San Diego, CA), at 50 μ M, significantly inhibited the effect of 10 mM FA on cell death in both NRK-52E and -49F cells, in the presence or absence of 100 nM PTHrP (1-36) (Figures 5B and 6A, right).

PTHrP (1-36) Induces Bcl-X_L Protein Expression in Both NRK-52E and -49F Cells

To confirm that Bcl-X_L protein is in fact a target for PTHrP antiapoptotic action in the kidney, as suggested by our *in vivo* findings, we performed further experiments in renal cells *in vitro*. In both NRK-52E and -49F cells, FA significantly reduced the Bcl-X_L/Bax protein ratio (by decreasing the former and increasing the latter) within 24 h. However, PTHrP (1-36), at 100 nM, markedly increased Bcl-X_L protein expression and the Bcl-X_L/Bax protein ratio in the presence of FA in both cell lines; an effect abrogated by 1 μ M PTHrP (7-34) (Figures 5C and 6B).

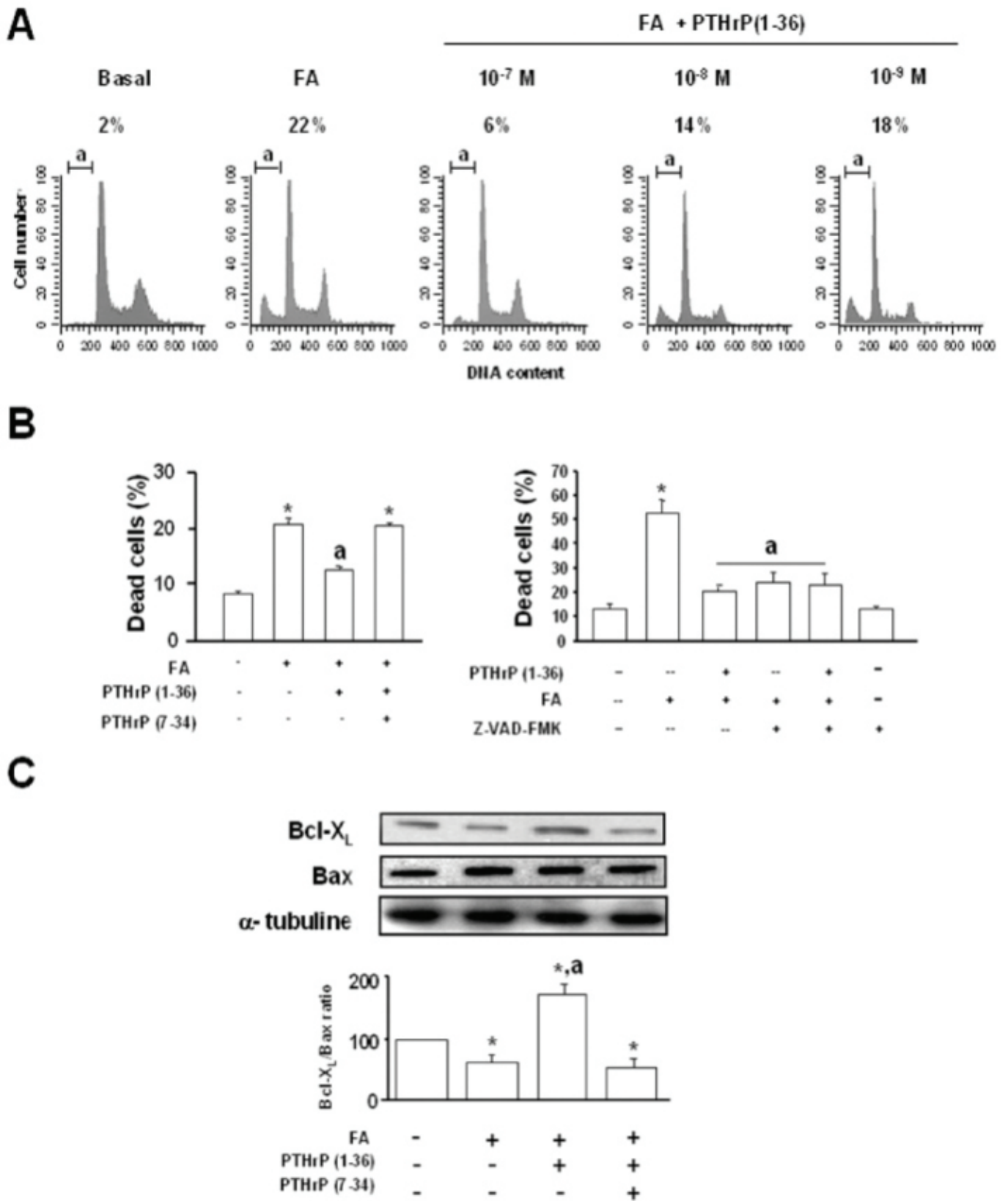


Figure 5. PTHrP (1-36) decreases apoptosis that was induced by FA toxicity in tubuleepithelial cells NRK-52E. (A) Apoptosis was assessed by flow cytometry after cell incubation with 10 mM FA and various PTHrP (1-36) doses (or saline V) for 24 h. (B) The stimulatory effect of PTHrP (1-36) at 100 nM on cell viability (estimated by trypan blue) was abrogated by either 1 μM PTHrP^D (7-34) (left) or the caspase pan-inhibitor Z-VAD-fmk (at 50 μM) (right). The inhibitors were added 1 h before FA and PTHrP (1-36) (C) PTHrP (1-36) at 100 nM stimulates the Bcl-X_L/Bax protein ratio that was decreased by FA in NRK-52E cells; this effect was abrogated by 1 μM PTHrP (7-34). Values are mean ± SEM from at least three independent experiments in triplicate. **P* < 0.05 versus nonstimulated basal value and/or Z-VAD-fmk alone; ^a*P* < 0.01 versus FA- and/or PTHrP (7-34)-treated values.

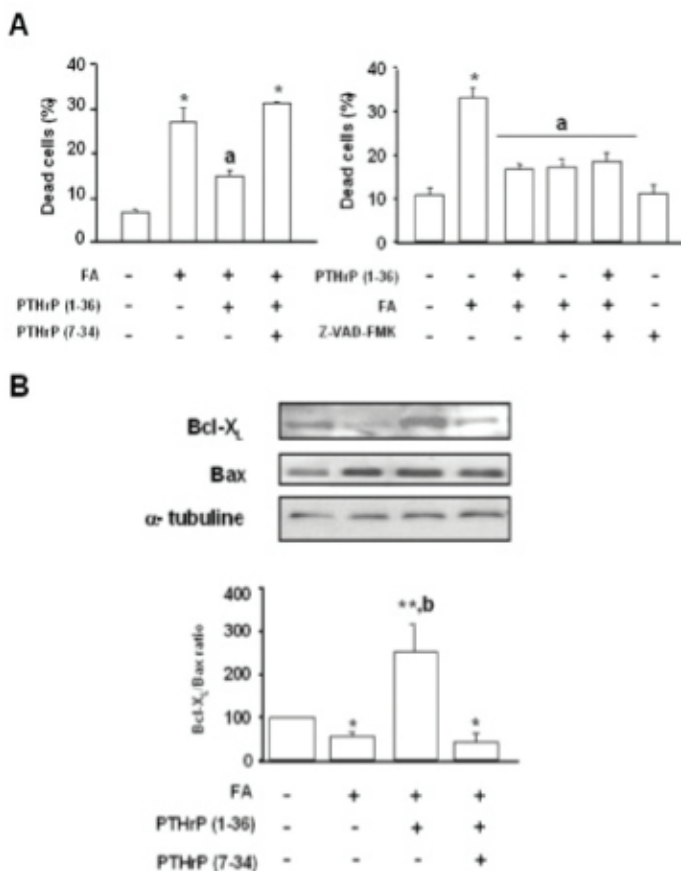


Figure 6. PTHrP (1-36) increases cell viability, which was decreased by FA in renal fibroblastic cells NRK-49F. Subconfluent cells were stimulated with the agonists for 24 h, and then cell viability was assessed by trypan blue. PTHrP (1-36) and FA were used at 100 nM and 10 mM, respectively. (A) The stimulatory effect of PTHrP (1-36) on cell viability was abrogated by either 1 μ M PTHrP (7-34) (left) or the caspase pan-inhibitor Z-VAD-fmk (at 50 μ M; right). The inhibitors were added 1 h before FA and PTHrP (1-36). (B) PTHrP (1-36) stimulates the Bcl-X_L/Bax protein ratio that was decreased by FA in NRK-49F cells; this effect was abrogated by 1 μ M PTHrP (7-34). Values are mean \pm SEM from at least three independent experiments in triplicate. **P* < 0.01, ***P* < 0.05 versus nonstimulated basal value and/or Z-VAD-fmk alone; ^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.05 versus FA- and/or PTHrP (7-34)-treated values.

A Dual Mechanism Is Responsible for the Antiapoptotic Effect of PTHrP (1-36) in Renal Tubuloepithelial Cells

We next determined whether changes in Bcl-X_L protein indeed was critical for the effect on cell survival that was induced by PTHrP (1-36) in renal tubuloepithelial cells. We used MCT cells, which show a proliferative response to this peptide (35) and in which protection from apoptosis can be conferred by constitutive expression of Bcl-X_L (26). MCT cells that did or did not overexpress Bcl-X_L protein were exposed to 10 mM FA for 24 h, in the presence or absence of PTHrP (1-36). Bcl-X_L overexpression resulted in decreased cell death that was induced by FA (Figure 7A). However, the presence of PTHrP (1-36) improved cell viability similarly in MCT cells that did or did not overexpress Bcl-X_L (Figure 7A), suggesting that its effect on cell survival, at least in these tubuloepithelial cells, is not fully accounted for by an increase in Bcl-X_L.

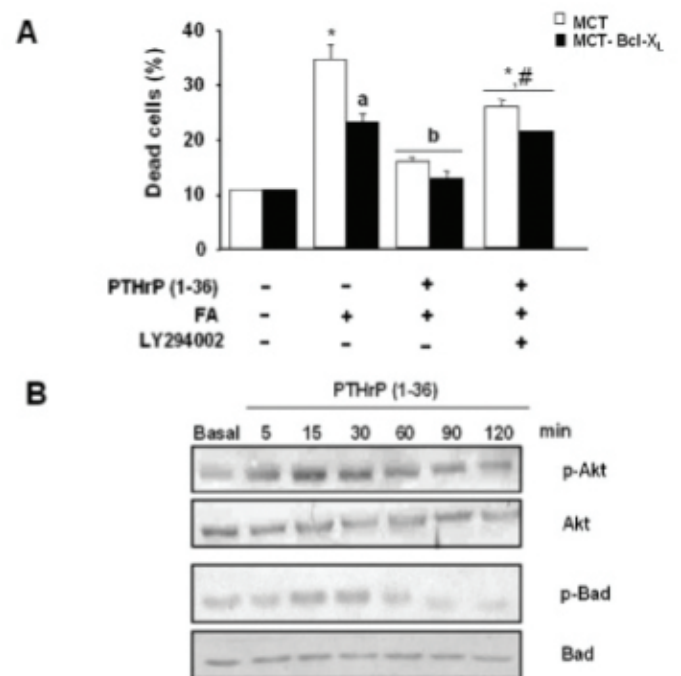


Figure 7. The effect of PTHrP (1-36) on cell survival that was decreased by FA in tubuloepithelial cells is related to phosphoinositol 3-kinase (PI3-K) pathway activation. (A) Subconfluent mouse cortical tubule (MCT) cells that did (■) or did not (□) overexpress Bcl-X_L were treated with 10 mM FA for 24 h, in the presence or absence of PTHrP (1-36) (at 100 nM) and/or the PI3-K inhibitor LY294002 (at 10 μ M). The inhibitor was added 1 h before FA and PTHrP (1-36). Cell viability was determined by trypan blue. Values are mean \pm SEM from three independent experiments in triplicate. **P* < 0.01 versus corresponding nonstimulated basal value; ^a*P* < 0.01 versus corresponding FA value in wild-type MCT cells; ^b*P* < 0.01 versus corresponding FA + PTHrP (1-36) values. (B) PTHrP (1-36) stimulates ⁴⁷³Ser-Akt and ¹³⁶Ser-Bad phosphorylation in MCT cells. Wild-type MCT cells were serum-depleted for 24 h, and then fresh medium that contained this peptide (at 100 nM; or not; basal) was added. At different time points, cell extracts were obtained for Western blot analysis of phospho-⁴⁷³Ser-Akt and phospho-¹³⁶Ser-Bad and total Akt and Bad (as internal controls).

Another proapoptotic Bcl-2 family member, Bad, has the ability to bind directly to Bcl-X_L, blocking its survival function (36). The pro-death activity of Bad depends on its phosphorylated status, controlled by phosphoinositol 3-kinase (PI3-K)-mediated Akt phosphorylation (36,37). We found herein that LY294002 (Sigma; Figure 7A) or wortmannin (data not shown), two PI3-K inhibitors (37,38), significantly inhibited the stimulatory effect of PTHrP (1-36) on cell survival in both wild-type and Bcl-X_L-overexpressing MCT cells after FA incubation. Furthermore, PTHrP (1-36), at 100 nM, rapidly and transiently stimulated Akt and Bad phosphorylation at Ser (473) and Ser (136), respectively (without significantly affecting the respective total protein levels) in MCT cells (Figure 7B).

PTHrP (1-36) Induces a Fibrogenic Phenotype in Both NRK-52E and -49F cells

We further explored *in vitro* the hypothesis that PTHrP may contribute to the process of fibrogenesis. PTHrP (1-36), at 100

nM, was found to increase α -SMA protein expression in NRK-49F at 48 h, an effect that was inhibited by 1 μ M PTHrP (7-34) (Figure 8A). In addition, PTHrP (1-36) at the same concentration increased the gene expression of the extracellular matrix proteins type-1 procollagen and fibronectin (27) and also the release of the latter protein into the cell-conditioned medium in these cells and NRK-52E cells (Figure 8, B and C).

Discussion

PTHrP has growth-regulatory features in tubuloepithelial cells (11,12,17,35), but current evidence does not support that it has a significant role in the renal regenerative process after acute kidney injury: (1) The PTH1R gene is downregulated

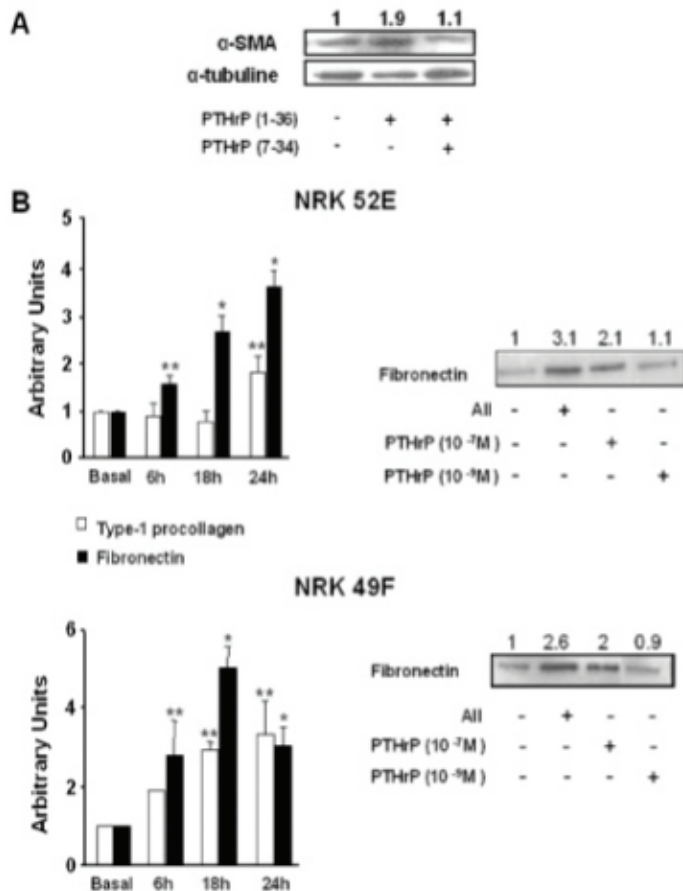


Figure 8. PTHrP (1-36) increases fibroblastic cell activation as well as type-1 procollagen and fibronectin expression by both renal fibroblastic and tubuloepithelial cells. (A) Near confluent NRK-49F cells were stimulated with this peptide (at 100 nM), in the presence or absence of PTHrP (7-34) (at 1 μ M) for 48 h. Western blot analysis of α -SMA then was performed in cell extracts. (B) NRK-52E and NRK-49F cells were serum-depleted for 24 h before incubation with the agonists for 6 to 48 h. Fibronectin (■) and type-1 procollagen (□) gene expression was assessed by real-time PCR (left). Fibronectin secretion was determined in the cell-conditioned media by Western blot. The effect of angiotensin II (AII), at 100 nM, is shown as a positive control. Ponceau S staining was used as loading control (not shown; right). Relative intensities of fibronectin signals are indicated at the top. Values are mean \pm SEM from at least three independent experiments in triplicate. $P < *0.01$, $**P < 0.05$ versus nonstimulated basal value.

rapidly, and targeted delivery of PTHrP to the proximal tubule does not provide protection in this setting (13,17,39); and (2) renal PTHrP upregulation but not tubular hyperplasia in the FA-injured kidney can be prevented by Ang II blockers (21). However, PTHrP seems to be involved in the mechanisms that are associated with Ang II-induced renal injury (16,21). Furthermore, PTHrP overexpression correlates with the development of proteinuria in rats with tubulointerstitial damage that was induced by protein overload and in an experimental mouse model of diabetic nephropathy (25,40).

To investigate further the putative role of PTHrP in the mechanism(s) of renal damage, we used herein previously characterized PTHrP-TG mice (13). Although their early response to either ischemic or FA-induced acute renal injury was similar to that of their control littermates (13), we have extended our initial period of study to several weeks after FA damage in both types of mice. Three weeks after FA injection, PTHrP-TG mice showed a significant impairment of renal function; meanwhile, it was back to normal values in control littermates. As expected (22), focal areas of tubulointerstitial fibrosis (as assessed by changes in Masson's, laminin, and α -SMA staining) were evident in control mice within this period after FA, but they were significantly higher in PTHrP-TG mice. These *in vivo* findings were supported further by our *in vitro* data demonstrating that PTHrP (1-36) can induce α -SMA in a renal fibroblastic cell line and stimulates type-1 procollagen and fibronectin expression in this cell line and in tubuloepithelial cells. Collectively, these results suggest that PTHrP seems to act as a fibrogenic mediator in FA nephrotoxicity.

Apoptosis was shown recently to be an important component of the acute response of the tubular epithelium to FA injury in mice (23). Whereas apoptosis of tubular cells after an acute renal insult is considered to be deleterious by facilitating tubular atrophy, apoptosis of interstitial cells may be a mechanism to prevent fibrogenesis (1,6). We found that PTHrP overexpression and fibrosis were associated with an imbalance of apoptosis and cell proliferation in favor of the latter, which will result in a net increase of interstitial fibroblasts in the mouse kidney after FA injury. Our *in vivo* and *in vitro* findings also suggest that, in this setting, PTHrP can promote macrophage influx by directly increasing the synthesis of MCP-1 in tubuloepithelial cells. This is consistent with previous studies showing that PTHrP also is able to induce MCP-1 synthesis in smooth muscle cells, whereby it might promote monocyte recruitment in human atherosclerotic plaques (15,41,42). Because macrophage infiltration is closely related to tubulointerstitial fibrosis (5), our results provide a rationale to explain, at least in part, the increased fibrosis in the FA-injured kidney of PTHrP-TG mice. Collectively, our findings indicate that PTHrP overexpression in the proximal tubule is associated with inflammation and tubulointerstitial fibrosis after FA-induced nephrotoxicity.

These results also demonstrate that PTHrP may act directly as a survival factor for tubulointerstitial cells. Therefore, constitutive upregulation of Bcl-X_L was found to occur in the kidney of PTHrP-TG mice, and this upregulation as well as the proliferative and antiapoptotic response of renal interstitial cells to FA were prevented by doxycycline-induced reversal (

PTHrP overexpression in these mice. Moreover, our *in vitro* data indicate that PTHrP (1-36) increases cell survival that is associated with an increase in Bcl-X_L/Bax ratio in tubulointerstitial and renal fibroblastic cells that are treated with the nephrotoxin. Both effects were abolished by a PTH1R antagonist, suggesting that they might be mediated through this receptor in these cells. In addition, a pan-caspase inhibitor dramatically reduced the FA-induced decrease in cell survival, in the presence or absence of PTHrP (1-36), in both renal cell types, further supporting the antiapoptotic effect of this peptide. However, PTHrP (1-36) was equally efficient in protecting MCT cells that did or did not overexpress Bcl-X_L from FA injury, suggesting that PTHrP might affect a mechanism downstream of Bcl-X_L protein to increase tubulointerstitial cell survival. Our results suggest that such a mechanism is likely to involve activation of the PI3-K/Akt/Bad pathway (36–38).

Conclusion

This study demonstrates that the overall effects of PTHrP seem to be proinflammatory and profibrogenic in the FA-damaged kidney. Collectively, our findings support the hypothesis that PTHrP might contribute to the progression of renal damage in nephrotoxic renal injury by complex mechanisms: Increasing tubulointerstitial cell survival and inducing macrophage infiltration and fibroblastic activation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2002-04356-C02-02), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 08.6/0038.1/2000-2 and GR/SAL/0415/2004), Instituto de Salud Carlos III (C03/08), FIS (PI020513), and Spanish Society of Nephrology. A.O. and J.A.A. were supported by Conchita Rábago Foundation and D.R. and V.E. by "Ikerketa eta Prestakuntza Programa" from the Basque Government and Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), respectively. A.O. is currently a recipient of a research contract from "Juan de la Cierva" Program from the Spanish Ministry of Education and Science.

Portions of this study were presented at the Acute Renal Failure Satellite Symposium, June 13 to 15, 2003, Ghent, Belgium; and the XLI Congress of the European Renal Association, May 15 to 18, 2004, Lisbon, Portugal.

We thank A.F. Stewart and A. García-Ocaña for critical reading of the manuscript and L.M. Blanco-Colio (Vascular and Renal Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz) for kindly supplying MCT-Bcl-X_L cells.

References

- Lieberthal W, Levine JL: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271: F477–F488, 1996
- Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS: Polarity, integrin and extracellular matrix dynamics in the post-ischemic rat kidney. *Am J Physiol* 275: C711–C731, 1998
- Bonventre JV, Zuk A: Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney Int* 66: 480–485, 2004
- Strutz F, Neilson EG: The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl* 45: S106–S110, 1994
- Strutz F, Neilson EG: New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24: 459–476, 2003
- Ortiz A, Lorz C, Justo P, Catalan MP, Egido J: Contribution of apoptotic cell death to renal injury. *J Cell Mol Med* 5: 18–32, 2001
- Jones EA, Shahed A, Shoskes DA: Modulation of apoptotic and inflammatory genes by bioflavonoids and angiotensin II inhibition in ureteral obstruction. *Urology* 56: 346–351, 2000
- Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF: Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76: 127–173, 1996
- Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fischer E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J, Schluter K, Silve C, Stewart AF, Takane K, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related protein and its receptors: Nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 134: 1113–1136, 2001
- Esbrit P, Santos S, Ortega A, Fernandez-Agullo T, Velez E, Troya S, Garrido P, Pena A, Bover J, Bosch RJ: Parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. From vessels to glomeruli and tubular epithelium. *Am J Nephrol* 21: 179–184, 2001
- García-Ocaña A, De Miguel F, Penaranda C, Albar JP, Sarasa JL, Esbrit P: Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res* 10: 1875–1884, 1995
- García-Ocaña A, Galbraith SC, Van Why SK, Yang K, Golovyan L, Dann P, Zager RA, Stewart AF, Siegel NJ, Orloff JJ: Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol* 10: 238–244, 1999
- Fiaschi-Taesch NM, Santos S, Reddy V, Van Why SK, Philbrick WF, Ortega A, Esbrit P, Orloff JJ, García-Ocaña A: Prevention of acute ischemic renal failure by targeted delivery of growth factors to the proximal tubule in transgenic mice: The efficacy of parathyroid hormone-related protein and hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol* 15: 112–125, 2004
- Funk JL: A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 1: 1101–1121, 2001
- Martin-Ventura JL, Ortego M, Esbrit P, Hernandez-Presa MA, Ortega L, Egido J: Possible role of parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis. *Stroke* 34: 1783–1789, 2003
- Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P, Ruperez M, Ortega A, Santos S, Blanco J, Ortega L, Egido J: Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 1595–1607, 2002
- Santos S, Bosch RJ, Ortega A, Largo R, Fernandez-Agullo T, Gazapo R, Egido J, Esbrit P: Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure. *Kidney Int* 60: 982–995, 2001
- Ye Y, Wang C, Du P, Falzon M, Seitz PK, Cooper CW: Overexpression of parathyroid hormone-related protein enhances apoptosis in the rat intestinal cell line, IEC-6. *Endocrinology* 142: 1906–1914, 2001

19. Cebrian A, Garcia-Ocana A, Takane KK, Sipula D, Stewart AF, Vasavada RC: Overexpression of parathyroid hormone-related protein inhibits pancreatic beta-cell death in vivo and in vitro. *Diabetes* 51: 3003–3013, 2002
20. Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BM, Goltzman D, Karaplis AC: Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 15: 4064–4075, 1995
21. Ortega A, Ramila D, Izquierdo A, Gonzalez L, Barat A, Gazapo R, Bosch RJ, Esbrit P: Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 16: 939–949, 2005
22. Yuan HT, Li XZ, Pitera JE, Long DA, Woolf AS: Peritubular capillary loss after mouse acute nephrotoxicity correlates with down regulation of vascular endothelial growth factor-A and hypoxia-inducible factor-1alpha. *Am J Pathol* 163: 2289–2301, 2003
23. Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egido J, Neilson EG: Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* 57: 969–981, 2000
24. Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV: Anatomical methods in cell death. In: *Methods in Cell Biology, Cell Death*, edited by Schwartz LM, Osborne BA, San Diego, Academic Press, 1995, pp 1–27
25. Izquierdo A, Lopez-Luna P, Ortega A, Romero M, Gutierrez-Tarres MA, Arribas I, Ruiz-Alvarez MJ, Esbrit P, Bosch RJ: The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Kidney Int* 2006, in press
26. Blanco-Colio LM, Justo P, Daehn I, Lorz C, Ortiz A, Egido J: Bcl-xL overexpression protects from apoptosis induced by HMG-CoA reductase inhibitors in murine tubular cells. *Kidney Int* 64: 181–191, 2003
27. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M: Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 111: 2509–25017, 2005
28. Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M: Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1514–1529, 2004
29. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83: 865–875, 1989
30. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899–1911, 1999
31. Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY: Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 56: 1455–1467, 1999
32. Lewis MP, Norman JT: Differential response of activated versus non-activated renal fibroblasts to tubular epithelial cells: A model of initiation and progression of fibrosis. *Exp Nephrol* 6: 132–143, 1998
33. Nutt RF, Caulfield MP, Levy JJ, Gibbons SW, Rosenblatt M, McKee RL: Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH2 by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11. *Endocrinology* 127: 491–493, 1990
34. Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV: Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 60: 1726–1736, 2001
35. Garcia-Ocana A, Gomez-Casero E, Penaranda C, Esbrit P: Parathyroid hormone-related protein increases DNA synthesis in proximal tubule cells by cAMP- and protein kinase C-dependent pathways. *Life Sci* 62: 2267–2273, 1998
36. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285–291, 1995
37. Liu Y: Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol* 277: F624–F633, 1999
38. Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR: Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 247–252, 2001
39. Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB, Kashgarian M, Siegel NJ, Stewart AF: Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest* 92: 2850–2857, 1993
40. Largo R, Gomez-Garre D, Santos S, Penaranda C, Blanco J, Esbrit P, Egido J: Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int* 55: 82–90, 1999
41. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y: Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: Functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis* 152: 97–105, 2000
42. Nakayama T, Ohtsuru A, Enomoto H, Namba H, Ozeki S, Shibata Y, Yokota T, Nobuyoshi M, Ito M, Sekine I, Yamashita S: Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1028–1035, 1994

Role of the Renin-Angiotensin System on the Parathyroid Hormone–Related Protein Overexpression Induced by Nephrotoxic Acute Renal Failure in the Rat

Arantxa Ortega,* David Rámila,* Adriana Izquierdo,[§] Laura González,[§] Antonio Barat,[†] Rosa Gazapo,[†] Ricardo J. Bosch,[§] and Pedro Esbrit*

*Bone and Mineral Metabolism Laboratory, [†]Pathology Department, and [‡]Biochemistry Department, Fundación Jiménez Díaz UTE, Madrid; and [§]Laboratory of Renal Physiology and Experimental Nephrology, Department of Physiology, Alcalá University, Alcalá de Henares, Spain

Parathyroid hormone–related protein (PTHrP), a mitogenic factor for renal cells, is overexpressed in acute renal failure (ARF). Recent data support an association between PTHrP and the renin-angiotensin system in the damaged kidney. The effects of angiotensin II (Ang II) inhibitors (quinapril, enalapril, and/or losartan) on PTHrP and the PTH1 receptor (PTH1R) expression in rats with either folic acid (FA)- or gentamicin-induced ARF were analyzed. The decreased renal function and the PTHrP upregulation and PTH1R downregulation induced by the nephrotoxins were inhibited by the Ang II blockers. In tubuloe epithelial cells NRK-52E, the rapid (10 min) increase in PTHrP mRNA by FA, associated with a perinuclear relocalization of Ang II/AT1 receptor, was inhibited by losartan but not candesartan, which traps Ang II receptors at the cell surface. Maximal PTHrP protein overexpression by FA (at 24 to 72 h)—or by exogenous Ang II—was abolished by both Ang II antagonists. PTHrP upregulation by FA was preceded by increased extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation and inhibited by the ERK inhibitor PD098059. FA also activated cAMP response element-binding (CREB) protein, and this was prevented by losartan in these cells. Moreover, PTHrP mRNA overexpression by either FA or Ang II occurred in NRK 52E that were transfected with a CREB construct but not the dominant-negative CREB133 construct. These findings demonstrate that the decreased renal function and PTHrP overexpression in nephrotoxin-damaged kidney depends on renin-angiotensin system. In this setting, intracellular Ang II/AT1 receptor recycling seems to be related to PTHrP induction through ERK and CREB activation in tubuloe epithelial cells.

J Am Soc Nephrol 16: 939-949, 2005. doi: 10.1681/ASN.2004040328

Ischemic and nephrotoxic acute renal failure (ARF) occurs frequently in hospitalized patients. Current hypothesis supports that renal dysfunction in ARF is caused by sublethally damaged—often structurally intact—tubuloe epithelial cells that are able to recover after removal of the insult (1,2). Recovery from ARF occurs associated with an immediate early gene response that is similar to that triggered by growth factors. It is currently thought that autocrine/paracrine growth factors that are released at sites of nephron injury act as mediators of tubular regeneration (2,3).

Parathyroid hormone–related protein (PTHrP) is a widespread factor in fetal and adult tissues, where it exerts complex functions (4). In the kidney, PTHrP and the PTH1 receptor (PTH1R) are present along the nephron and in the intrarenal arterial tree (5,6). PTHrP expression is rapidly and transiently upregulated during the recovery period after renal ischemia or folic acid (FA)-induced ARF in rats (7,8). PTHrP has growth-regulatory properties in some

renal cell types (8–12). However, the putative role of PTHrP in the regenerative process of the damaged kidney is intriguing because the PTH1R gene is rapidly downregulated in tubular cells after acute renal injury (7,8).

The renin-angiotensin system (RAS) plays an important pathogenetic role in the progression of kidney damage, but its involvement in ARF is poorly understood (13–15). In rats with tubulointerstitial damage after protein overload or FA injection, both PTHrP and angiotensin-converting enzyme (ACE) genes are upregulated in the renal cortex (8,16). Moreover, angiotensin II (Ang II) stimulates PTHrP expression in renal and vascular smooth muscle cells both *in vivo* and *in vitro* (6,17). In fact, recent findings suggest that PTHrP might contribute to Ang II-induced tubular injury (6).

In this study, we examined the interaction between Ang II and PTHrP in nephrotoxic ARF, both in rats *in vivo* and in tubuloe epithelial cells *in vitro*. Our findings provide further insights into the important role of Ang II on the pathogenesis of this condition.

Materials and Methods

Induction of Nephrotoxic ARF

Male Wistar rats (250 g body wt) were fed standard rat diet and given free access to water. Some rats received a single intraperitoneal injection of FA (Sigma, St. Louis, MO), 250 mg/kg in 300 mM NaHCO₃

Received April 27, 2004. Accepted January 7, 2005.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Address correspondence to: Dr. Pedro Esbrit, Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo, Fundación Jiménez Díaz-UTE, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-550-4894; Fax: 34-91-549-8075; E-mail: pesbrit@fjd.es

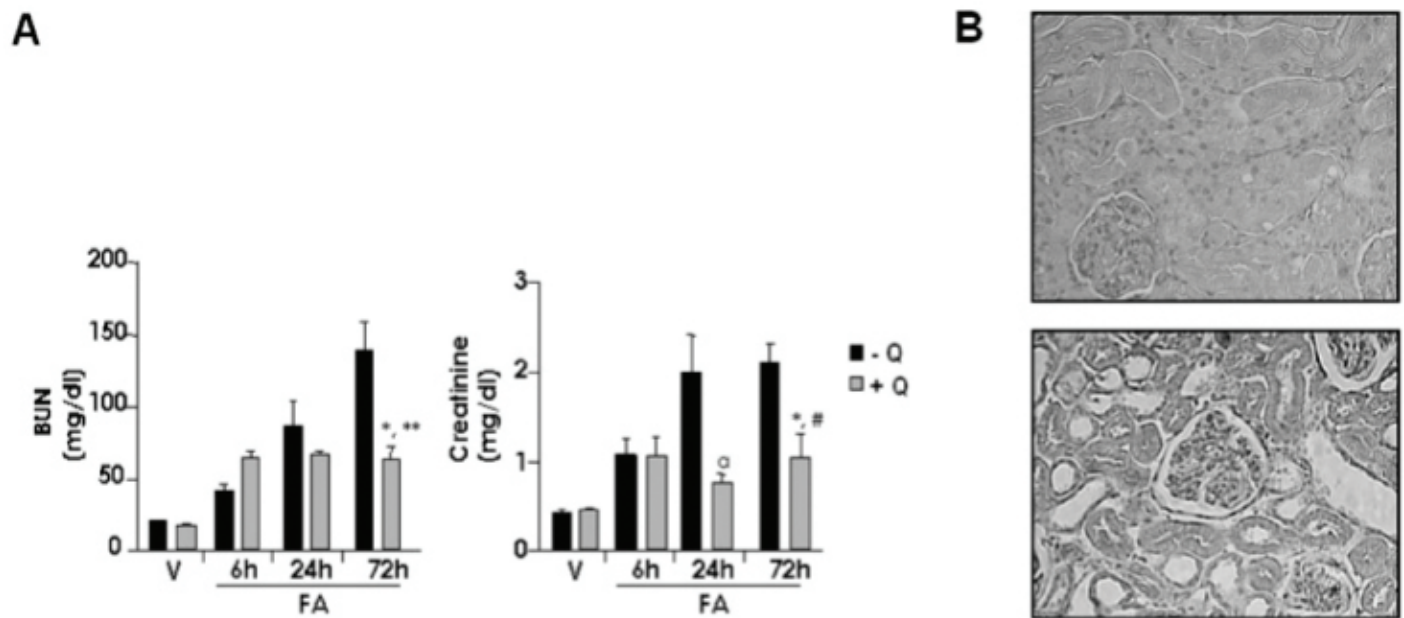


Figure 1. (A) Time course of changes in plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) in rats with folic acid (FA)-induced injury, pretreated or not with quinapril (Q). Experimental values are mean \pm SEM of four to six animals per group at each time. V, vehicle-injected rats. * $P < 0.05$ versus -Q at 72 h; ^a $P < 0.025$ versus -Q at 24 h; ** $P < 0.01$; [#] $P < 0.05$ versus V. (B) Periodic acid-Schiff (PAS) staining in representative renal tissue samples of rats, pretreated (top) or not (bottom) with quinapril, at 6 h after FA injury. Histologic examination of kidney sections showed that tubular dilation and edema were prevented by pretreatment with this ACE inhibitor. Magnification, $\times 200$.

(vehicle) or the same volume of vehicle (8). Another group of rats received injections twice daily for 4 consecutive days with gentamicin (Calbiochem, San Diego, CA), 200 mg/kg in 0.9% NaCl (vehicle), or vehicle alone (18). Some rats were treated with 4 mg/L enalapril (MSD, Madrid, Spain) or quinapril (200 mg/L; Parke-Davis, Madrid, Spain) in the drinking water for 2 or 3 wk, respectively, before FA injection. Other groups of animals received losartan (20 or 100 mg/L; MSD) in the drinking water for 1 or 2 wk before either FA or gentamicin injection, respectively. These doses were selected because they have shown to elicit at least partial Ang II blockade (19–21). At different times, four to six animals from each group were killed under ether anesthesia, and kidneys were removed. One kidney from each animal in all groups was fixed in 4% buffered p-formaldehyde for light microscopy examination and immunohistochemistry. The remaining kidney of each animal was removed, weighed, and stored in RNeasy (Ambion, Austin, TX) at -20°C for up to 3 d for subsequent total RNA and protein extraction.

Blood was taken by cardiac puncture under ether anesthesia after overnight fast. Plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were determined by autoanalyzer (Hitachi Chemistry System, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

Histology and Immunohistochemistry

Fixed renal tissue sections were dehydrated by graded ethanols and xylene and embedded in paraffin. Paraffin-embedded tissue sections (4 μm) were mounted on 3-aminopropyltriethoxy-silane-treated slides for histologic evaluation (by periodic acid-Schiff reactive staining) or immunohistochemistry. The latter was performed using the following rabbit polyclonal antibodies (dilution, -fold): anti-PTHrP antiserum C6 (100); anti-Ang II antiserum (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA; 400); and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antiserum (Dako, Glostrup, Denmark; 150) (6,8). Immunostaining was performed as described in detail (6,8). After incubation with the corresponding primary antiserum for

either 1 h (PTHrP) or 30 min (Ang II and PCNA), the sections were incubated with a polymer-peroxidase complex (Envision+System; Dako) and 3,3'-diaminobenzidine and then counterstained with Carazzi's hematoxylin. Some tissue sections were incubated without the primary antibody as negative controls. PCNA staining was evaluated in at least four $\times 400$ microscopic fields by counting the number of stained tubular cell nuclei per field, and the corresponding mean from each rat was calculated.

Cell Culture Studies

Rat kidney tubuloepithelial cells NRK 52E (ATCC CRL 1571) were grown in DMEM with 5% FBS and antibiotics, in 5% CO_2 at 37°C , as described (8). NRK 52E cells were serum-depleted for 24 h before addition of FA, at 10 mM in 300 mM NaHCO_3 , a toxic dose for these cells (8). Some NRK 52E cells were transfected with pCMV-cAMP response element-binding (CREB); constitutively expressing the wild-type CREB) or pCMV-CREB133 (a dominant-negative mutant vector preventing Ser¹³³ phosphorylation of CREB; Clontech, Palo Alto, CA) using lipofectamine (Invitrogen, Groningen, the Netherlands), according to the manufacturer's instructions. The transfected cells were selected in 1 mg/ml gentamicin (Invitrogen) for 3 wk to establish stable cell lines. Subsequently, cells were treated with the agonists for different times before total RNA isolation.

In some experiments, NRK 52E cells that were grown on coverslips in multiwell plates were stimulated with 10 mM FA for different time periods in FBS-depleted medium. Then, they were fixed with 64% isopropanol/15% polyoxyethylene (Cell-fix; Shandon, Pittsburgh, PA) and either permeabilized or not with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min at 4°C . After blocking with 1.5% normal goat serum in PBS for 30 min, the anti-Ang antibody referred to above or a polyclonal AT1 receptor antibody (San Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were added, each at 1:200 dilution for 1 h at room temperature. Then, FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Sigma), at 1:200 dilution, was added for 30 min. After extensiv

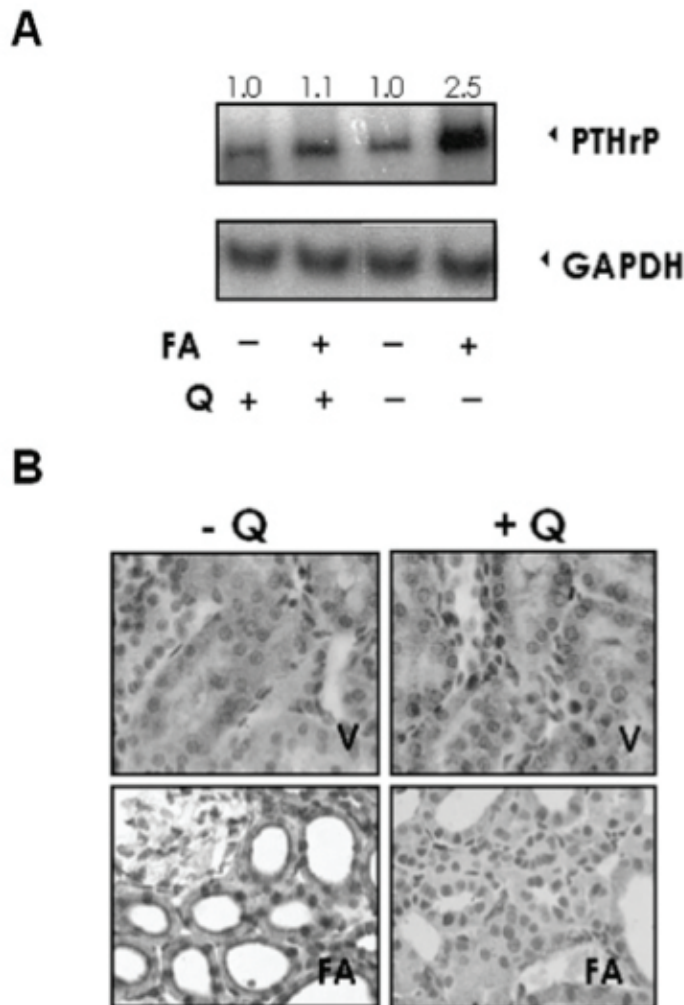


Figure 2. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) overexpression—both mRNA and protein—after FA injury. (A) PTHrP mRNA in the rat renal tissue at 6 h after FA injury, with or without quinapril (Q) pretreatment. PTHrP mRNA and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, a constitutive control, were evaluated by reverse transcription-PCR (RT-PCR). Relative intensities of PTHrP signal corresponding to four to six animals per group are indicated at the top. (B) PTHrP immunostaining with C6 antiserum in the rat renal cortex at 72 h after FA injury or vehicle (V) injection, with or without Q pretreatment. Magnification, $\times 1000$ (top) and $\times 500$ (bottom).

washing, cells were mounted in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA), and immunofluorescence analysis was performed with a Leica DM-IRB confocal microscope.

Total RNA and Protein Extraction

Total RNA and protein were isolated from either rat kidney homogenates obtained with a glass-Teflon homogenizer or FBS-deleted NRK 52E cells using TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified by A_{260}/A_{280} ratio. Protein was determined by the Bradford's method (Pierce, Rockford, IL), using BSA as standard.

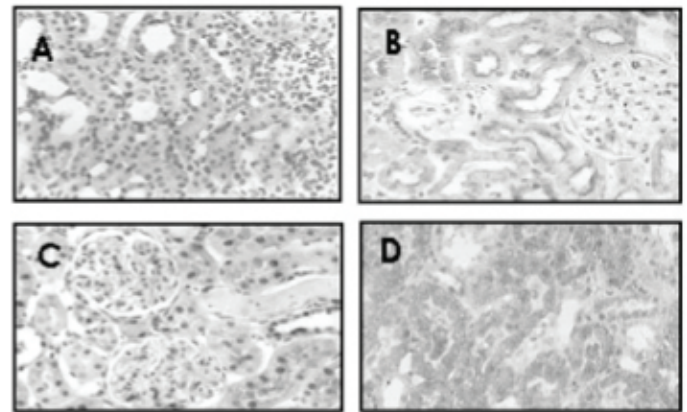


Figure 3. Effect of losartan (LST) pretreatment on angiotensin II (Ang II) immunostaining in the kidney of rats with FA injury. Ang II positivity in the rat renal cortex at 72 h after vehicle injection (B) or FA injury (C and D), with (D) or without (C) LST pretreatment. (A) Negative control (without primary antibody) is also shown. Magnification, $\times 100$.

Semiquantitative Reverse Transcription-PCR

Total RNA from rat kidney or NRK 52E cells (10 to 100 ng) was reverse-transcribed, and resulting cDNA was amplified using the Titanium One-step RT-PCR kit (Clontech) with specific primers for rat PTHrP (6,8,16). Either the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was amplified using specific primers (6,8), or modified 18S primers (QuantumRNA 18S Internal Standards; Ambion) were used for 18S coamplification, as constitutive controls.

The reaction mixture (10 μ l) was incubated for 45 min at 48°C and 2 min at 95°C, followed by 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 60 to 62°C, and 2 min at 68°C, with a final extension of 7 min at 68°C. Preliminary experiments established that these conditions provided a linear cDNA amplification in each case. PCR products were separated on 2% agarose gels, and bands were visualized by ethidium bromide staining. Values that were obtained after densitometric scanning of PCR products were normalized against those of the corresponding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 18S PCR products.

Western Blot Analysis

Total protein extracts (60 μ g of protein) from rat kidney or NRK 52E cells were separated on 12.5% polyacrylamide-SDS gels under reducing conditions. After electrophoresis, samples were transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK), blocked with either 5% BSA (PTHrP) or 5% defatted milk (PTH1R, p42/p44 extracellular signal-regulated kinases [ERK1/2] and phospho(p)ERK 1/2) in PBS with 0.05% Tween-20, and then incubated overnight with an anti-pERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) or an anti-ERK1/2 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), each at 1:1000 dilution; the anti-PTHrP antiserum C6, at 2500-fold dilution; or affinity-purified anti-PTH1R antibody Ab-VII (Covance, Berkeley, CA), at 5 μ g/ml (6). β -Actin and α -tubulin were detected with a specific rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) or mouse monoclonal antibody (Sigma), respectively, as constitutive controls. After extensive washing, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and developed by enhanced chemiluminescence (Amersham). The corresponding fluorogram bands were quantified by densitometric scanning (ImageQuant; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

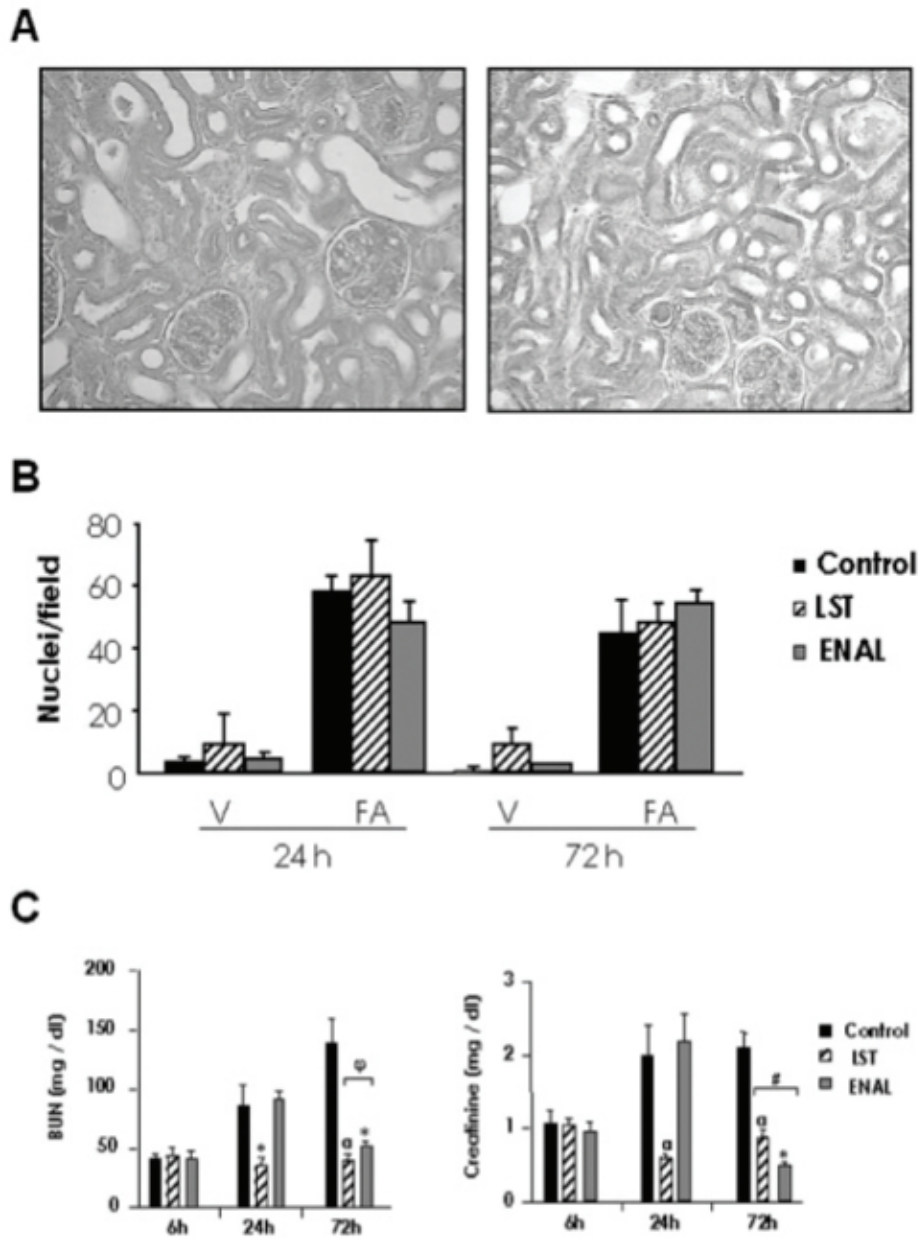


Figure 4. (A) PAS staining in representative renal tissue samples of rats that were pretreated with enalapril (ENAL; left) or losartan (LST; right), at 72 h after FA injury. Histologic examination of kidney sections showed that tubular dilation and edema were not prevented by pretreatment with these Ang II inhibitors. (B) Renal tubular cell proliferation at 24 to 72 h after FA injury in rats that were pretreated or not with LST or ENAL. $P < 0.01$ at 24 h or 72 h versus the corresponding proliferating cell nuclear antigen score values of vehicle (V)-injected rats. (C) Time course of changes in plasma creatinine and BUN in rats with FA-induced renal injury, pretreated or not with LST or ENAL. Experimental values are mean \pm SEM of four to six animals per group at each time period. * $P < 0.025$, $^{\ast}P < 0.05$ versus the corresponding untreated values; $^{\ast}P < 0.05$, $^{\ast\ast}P < 0.01$ versus values of V-injected rats: 18 ± 3 mg/dl (BUN) and 0.5 ± 0.1 mg/dl (plasma creatinine). Magnification, $\times 200$ (left) and $\times 150$ (right) in A.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Nuclear extracts were prepared according to a commercially available procedure (NE-PER, Pierce), as described previously (22). The synthetic double-stranded CRE oligonucleotide 5'-AGAGATTGCTGACGTCAGAGAGCTAG-3' was 5'-end-labeled with $10 \mu\text{Ci}$ ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP and T4 polymerase. Nuclear extracts (4 μg of protein) were incubated with 200,000 dpm of ^{32}P -labeled oligonucleotide probe in 20 μl of a reaction mixture that contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 4% glycerol, and 1 μg of poly (dI-dC) for 20 min at 4°C . Protein-DNA complexes were resolved on native 5% polyacrylamide/0.25 \times

TBE gels. Gels then were dried and exposed to radiosensitive film. As specificity controls, nuclear extracts were preincubated with a 100-fold excess of either unlabeled oligonucleotide or another oligonucleotide that had an NF- κB or core-binding factor $\alpha 1$ (cbf1) binding site, for 20 min at 4°C , before addition of the labeled probe.

Statistical Analyses

Results are expressed as mean \pm SEM throughout the text. Statistic analysis was performed by either Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney test, when appropriate. $P < 0.05$ was considered significant.

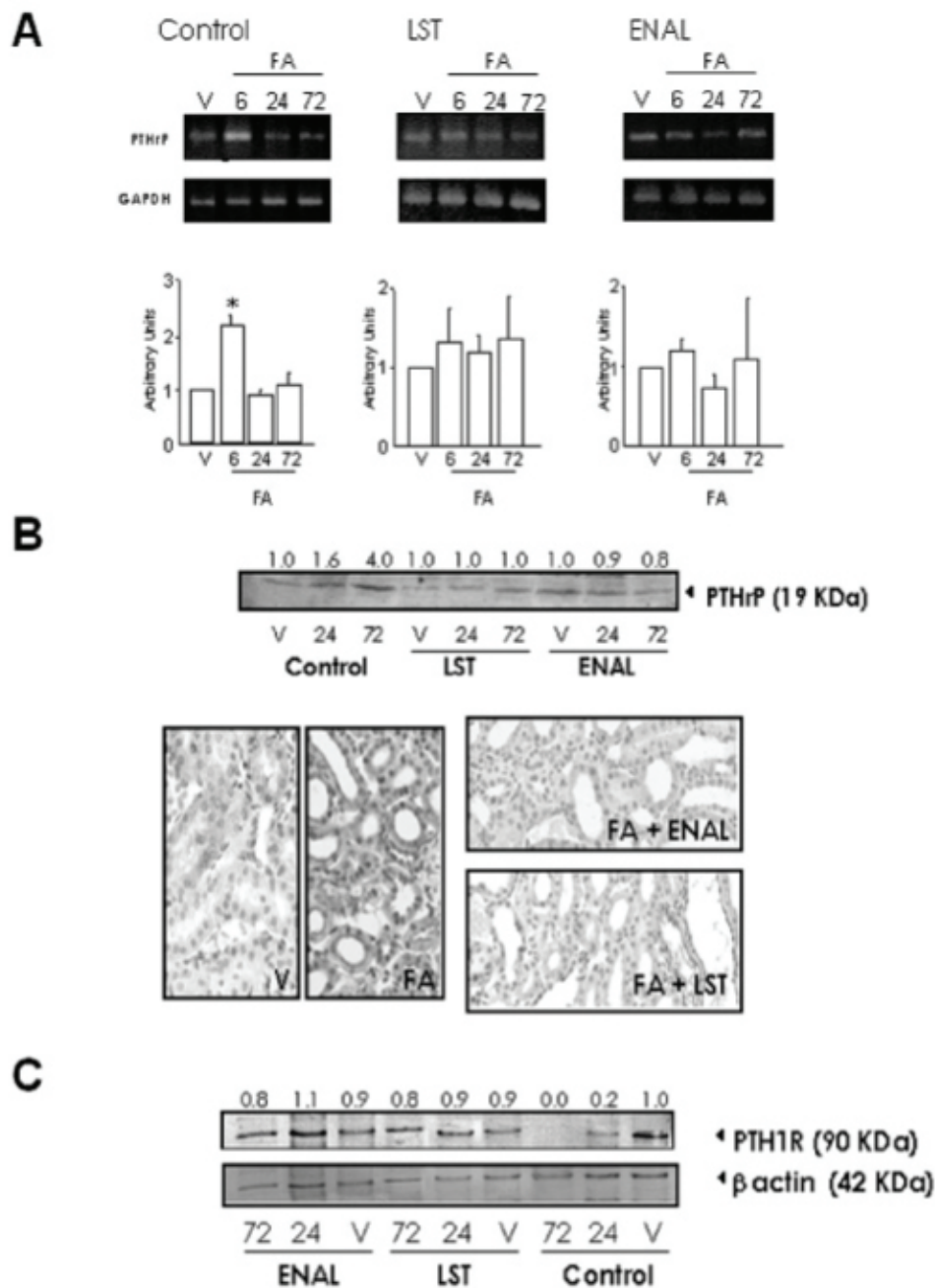


Figure 5. PTHrP and PTH1 receptor (PTH1R) in the FA-injured kidney of rats after enalapril (ENAL) or losartan (LST) pretreatments. (A) Representative autoradiograms corresponding to PTHrP mRNA changes (evaluated by RT-PCR) in the kidney at 6 to 72 h after FA injury, with or without (control) LST or ENAL pretreatment, or vehicle (V) injection. GAPDH mRNA was included as a constitutive control. Relative densitometric values, as mean \pm SEM of four to six animals per group at each time period, versus those of V-injected rats are also shown. * $P < 0.01$ versus V value. (B) PTHrP protein was evaluated in the rat kidney by Western blot, at 24 h and 72 h, or immunohistochemistry, at 72 h after FA or V. (C) Western blot analysis of PTH1R protein levels at 24 h and 72 h after FA, pretreated or not with the Ang II inhibitors, or V injection. Protein loading was similar in each well, as assessed by using Ponceau S staining (data not shown; B), or β -actin as an internal control (C). Relative intensities of PTHrP and PTH1R signals, indicated at the top (B and C), are shown.

Results

Effect of Ang II Blockade on Changes in Renal Function and PTHrP Expression Induced by Nephrotoxic ARF

We found that the decreased renal function was significantly improved by quinapril pretreatment within 24 to 72 h after FA (Figure 1A). Moreover, histologic findings showed that tubular lilation and edema, which were observed already at 6 h after FA injection, were prevented by pretreatment with this ACE

inhibitor (Figure 1B). In addition, PTHrP upregulation—both mRNA (by reverse transcription-PCR) and protein (by immunohistochemistry)—induced by FA in the rat renal cortex was not observed following Ang II blockade by quinapril (Figure 2).

We further evaluated whether inhibition of PTHrP overexpression after FA might be a consequence of the dramatic decrease in histologic alterations in the rat renal cortex associated with quinapril administration. Thus, in the next series of

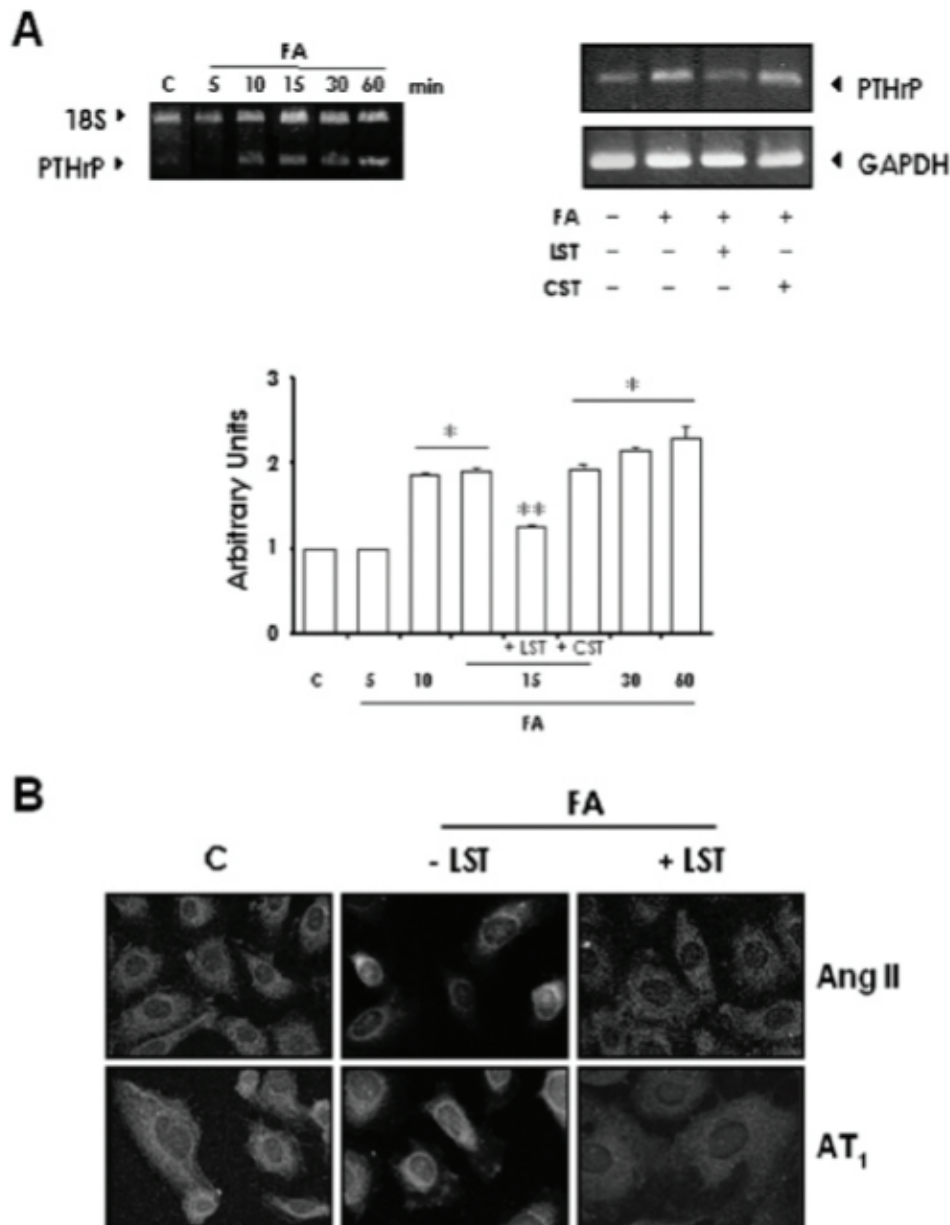


Figure 6. (A) PTHrP mRNA induction by FA, in the presence or absence of either losartan (LST) or candesartan (CST), in NRK 52E. Representative autoradiograms corresponding to PTHrP mRNA changes (analyzed by RT-PCR) after addition of FA (10 mM) for different time periods (left) or 15 min (right). Either 18S or GAPDH mRNA were used as constitutive controls. C, saline control. Relative densitometric values, as mean \pm SEM from three different experiments, are also shown. * $P < 0.05$ versus C value; ** $P < 0.05$ versus FA alone at 15 min. (B) FA induced, within 10 min, a rapid relocalization of the Ang II/AT₁ receptor complex to the nuclear envelope of NRK 52E cells, which was inhibited by LST. Both Ang II antagonists (at 10 μ M) were added 1 h before FA (A and B).

experiments we used less efficient doses of another ACE inhibitor, enalapril, and of an AT₁ antagonist, losartan, for a shorter period than that used for quinapril to neutralize partially Ang II action. This pretreatment with enalapril increased ACE mRNA expression in vehicle-injected rats, as well as its FA-induced overexpression (8), which is likely due to ACE activity inhibition (15) (data not shown). Ang II staining was observed mainly in the brush border of cortical tubules in vehicle-injected rats but localized to the nuclei of tubule cells after FA injection, as previously reported (8). However, this relocalization was prevented by losartan pretreatment (Figure 3).

With the use of this maneuver, there were no significant

changes in the renal histologic alterations (Figure 4A) or the increased PCNA immunostaining in renal tubule cells (Figure 4B) acutely observed after FA in rats that were pretreated with these Ang II antagonists. However, both enalapril and losartan pretreatments significantly decreased the acute deterioration of the renal function after FA injection (Figure 4C). This improvement in the renal function induced by the Ang II inhibitors was associated with a lack of renal PTHrP (mRNA and protein upregulation after FA (Figure 5, A and B). Moreover, the PTHrP levels in the FA-injured kidney were not downregulated but remained similar to those of vehicle-injected controls after pretreatment with both Ang II antagonists (Figure 5C).

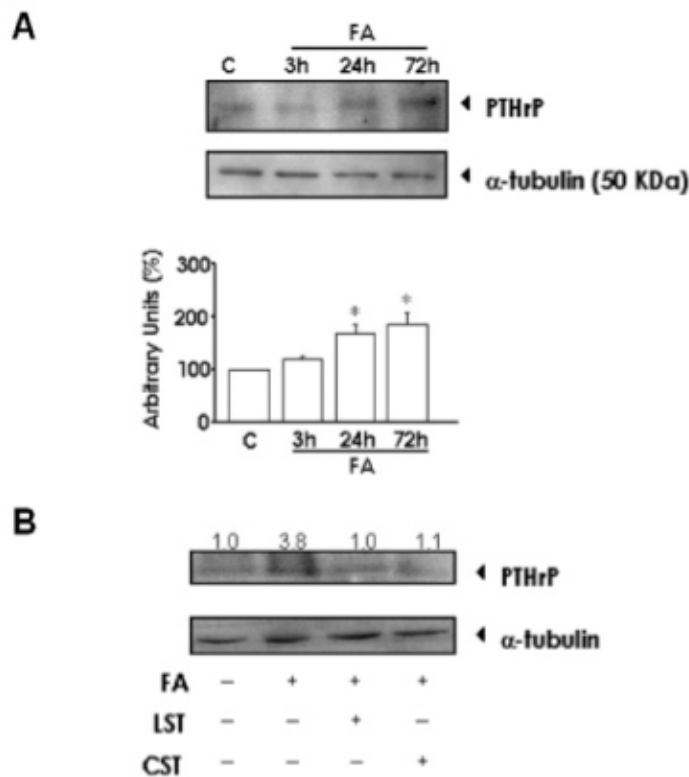


Figure 7. Western analysis of PTHrP protein levels (using anti-serum C6) in NRK 52E cells after incubation with FA (10 mM), at different time periods (A) or at 24 h, in the presence or absence of Ang II antagonists (B). Losartan (LST) or candesartan (CST) was added (at 10 μ M) 1 h before FA. Protein loading was similar in each well, as assessed by α -tubulin as an internal control. (A) Relative densitometric values, as mean \pm SEM from at least three different experiments, are shown. * $P < 0.05$ versus control (C) value. (B) Relative intensities of PTHrP signal are indicated at the top.

To confirm independently the apparent association between RAS activation and PTHrP overexpression in nephrotoxic ARF, we assessed the effect of losartan on the PTHrP response to a distinct model of induction of this condition by injecting high doses of gentamicin into rats. Renal function in gentamicin-injected animals, which was dramatically deteriorated at day 4 after gentamicin injection, improved significantly after losartan pretreatment. Thus, plasma creatinine and BUN values (mg/dl) were, respectively, 0.25 ± 0.05 and 10.5 ± 0.5 (control animals; $n = 4$) versus 6.0 ± 0.6 or 3.1 ± 0.7 , and 162 ± 16 or 103 ± 18 , in gentamicin-injured animals, either untreated or treated with losartan ($P < 0.05$; $n = 6$). Four days after gentamicin injection, we also found significant changes in the renal PTHrP/PTH1R system: PTHrP protein levels increased to $191 \pm 8\%$, but those of the PTH1R protein decreased to $69 \pm 8\%$, compared with the corresponding values in control rats (100%; $P < 0.05$ or less; $n =$). After losartan pretreatment, the PTHrP protein values ($107 \pm 17\%$) normalized to those in control animals, whereas the downregulated PTH1R protein levels remained low ($82 \pm 8\%$ versus $69 \pm 8\%$; $P > 0.05$) but showed a tendency to reach those of vehicle-injected (control) rats.

Role of Ang II on PTHrP Overexpression Associated with Nephrotoxic-Induced Injury in Renal Tubulopithelial Cells

To explore further the relationship between Ang II and PTHrP overexpression after nephrotoxic-induced ARF, we used rat renal epithelial cells NRK 52E. These cells express RAS and can synthesize Ang II, and they have AT1 receptors (23). In addition, we previously demonstrated that these cells produce PTHrP, whose gene expression increased within 6 h after treatment with 10 mM FA (8). In this study, this concentration of FA rapidly (within 10 min) induced PTHrP mRNA in NRK 52E cells (Figure 6A). This early onset of PTHrP mRNA overexpression was associated with a rapid relocalization of the Ang II/AT1 receptor complex (visualized by immunostaining with specific Ang II or AT1 antibodies) mainly to the perinuclear area of these cells (Figure 6B). It is interesting that both events were inhibited by 10 μ M losartan (Figure 6). However, 10 μ M candesartan, another Ang II antagonist that—in contrast to losartan—prevents AT1 receptor internalization and recycling (24), was inefficient in this regard (Figure 6A). In contrast, the maximal increase in PTHrP protein, which was observed within 24 to 72 h after FA (Figure 7A), was abolished by either losartan or candesartan in NRK 52E cells (Figure 7B). Both Ang II antagonists were equally effective in inhibiting the stimulatory effect of exogenously added Ang II, at 100 nM, on PTHrP in these cells. Thus, PTHrP mRNA levels increased to $181 \pm 15\%$ ($P < 0.05$) at 1 h by Ang II alone and were $96 \pm 6\%$ or $94 \pm 3\%$ with losartan or candesartan, respectively, compared with control (100%; $n = 3$). Meanwhile, PTHrP protein levels were $316 \pm 17\%$ ($P < 0.01$) at 24 h after Ang II and either $100 \pm 5\%$ or $99 \pm 5\%$ in the simultaneous presence of losartan or candesartan, respectively, with regards to control (100%; $n = 3$).

Mechanism by which Ang II Induces PTHrP Overexpression after FA-Induced Injury in Renal Tubulopithelial Cells

Ang II interaction with AT1 receptors activates various transcription factors, including CREB protein, which elicits changes in PTHrP gene transcription in various cell types (25–27). In this study, Ang II was found to stimulate rapidly (within 10 min) CRE-binding activity in NRK 52E cell nuclear extracts, and this was inhibited by losartan (Figure 8A, left). ERK1/2 are rapidly activated (phosphorylated) by Ang II via AT1 receptors, leading to CREB activation in various cell types (25,27,28). We found that Ang II, within a time course similar to that of CREB activation, increases ERK1/2 phosphorylation (without affecting total ERK levels) in NRK 52E cell extracts (Figure 8A, right).

We next assessed whether CREB and ERK1/2 activation might be involved in the mechanism of FA-induced PTHrP overexpression through Ang II in NRK 52E cells. We found that FA rapidly induced CREB activation in NRK 52E cell extracts, and this was inhibited by losartan (Figure 8B, left). FA also stimulated ERK1/2 phosphorylation within a similar time course in these cell extracts (Figure 8B, right). Furthermore, PTHrP mRNA overexpression triggered by either FA or Ang II did occur in NRK 52E that were transfected with a wild-type CREB construct but not in those with the mutant CREB133 construct (Figure 9A). In addition, PTHrP

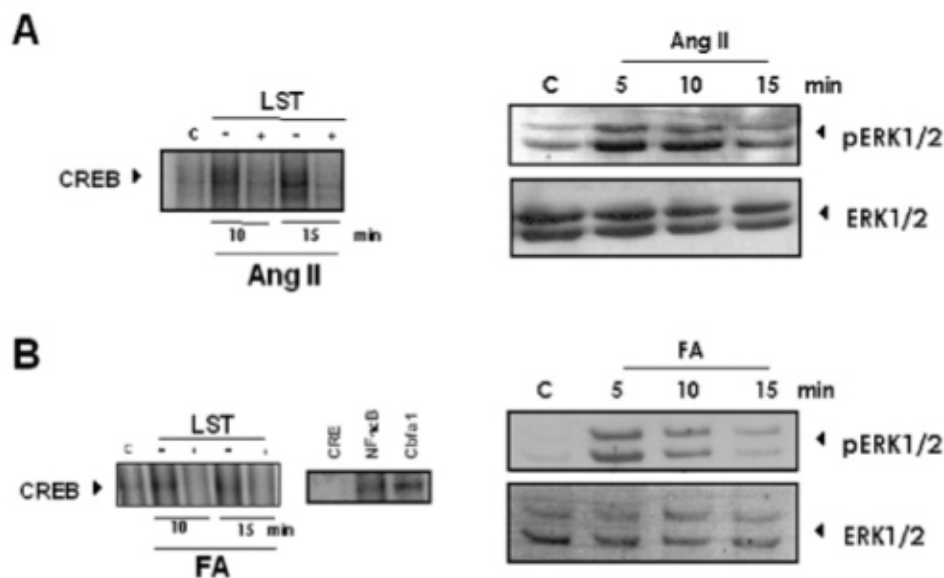


Figure 8. cAMP response element-binding (CREB) activation and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation induced by exogenously added Ang II or FA in NRK 52E cells. By using electrophoretic mobility shift assay with a synthetic double-stranded CRE oligonucleotide, it was found that Ang II (100 nM) as well as FA (10 mM) stimulated CREB activity within 10 min in NRK 52E cell nuclear extracts, and this activation was inhibited by previously (1 h) adding 10 μM losartan (LST; A and B, left). The retarded band in these extracts from FA-stimulated cells, at 10 min, disappeared with an excess of unlabeled CRE oligonucleotide but not with two noncompetitive oligonucleotides, confirming the specificity of the binding (B, middle). ERK1/2 phosphorylation by Ang II and FA in NRK 52E cell extracts (A and B, right). Western blot analysis using antibodies against phosphorylated forms of ERK (pERK1/2) or ERK1/2 was performed. C, nonstimulated control (at 5 min).

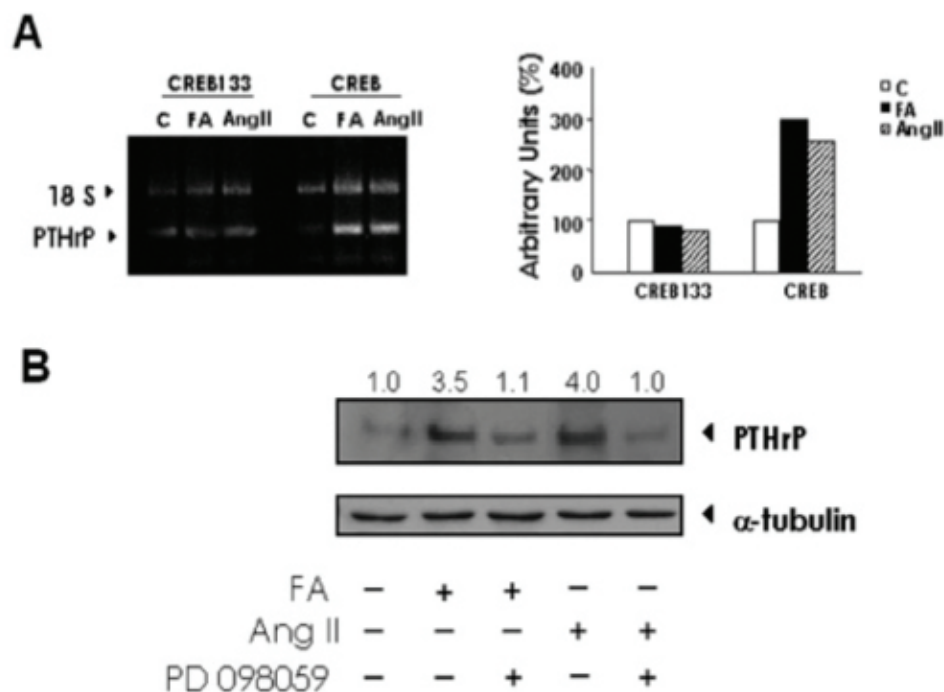


Figure 9. (A) Inhibition of PTHrP mRNA overexpression induced by either FA or Ang II in NRK 52E that were transiently transfected with a mutant of CREB (CREB133) but not in those that were transfected with a wild-type CREB construct. Representative autoradiogram showing PTHrP mRNA, and 18 S mRNA as a constitutive control, in transfected cells with each plasmid after 1-h stimulation with the agonists. C, saline control (left). Densitometric analysis of PTHrP mRNA levels corresponding to mean \pm SEM (<5% of the mean in all cases) from three different experiments (right). (B) Western blot analysis of PTHrP protein levels (using antiserum C6) in NRK 52E cells after incubation with either FA or Ang II for 24 h, with or without 10 μM PD098059. The inhibitor was added 1 h before the nephrotoxin or Ang II. Protein loading was similar in each well, as assessed by α-tubulin as an internal control. FA and Ang II were used at 10 mM and 100 nM, respectively. Relative intensities of PTHrP signal, indicated at the top, are shown.

protein upregulation by FA or Ang II was inhibited by 10 μ M PD098059, an ERK kinase inhibitor (29), in these cells (Figure 9B).

Discussion

Current evidence indicates the important role of RAS in the pathophysiologic mechanisms of renal injury (6,13-16). In fact, Ang II, the main RAS agonist, is now considered as a growth factor that plays an important role in the progression of kidney damage (14). This is related to the well-documented findings that Ang II can induce the synthesis of several mediators, such as TNF- α , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1, and the activity of the transcription factor NF- κ B, associated with the presence of glomerular and interstitial inflammatory cells in the kidney (19,30). Furthermore, previous studies support that this system is also involved in the mechanisms associated with ARF. Thus, activation of local components of RAS, including Ang II, seems to occur early after either FA injection or ischemia/reperfusion, and administration of Ang II antagonists exerts beneficial effects on renal function in the latter setting (8,15,20,31). Moreover, Ang II inhibition attenuates glycerol-induced ARF (32). This study demonstrates that Ang II blockade causes a significant improvement in the renal function after FA- or gentamicin-induced acute renal injury in rats.

Renal functional recovery after nephrotoxic or ischemic ARF requires the repair of the injured tubular epithelium, a process that seems to be modulated by a variety of renal growth factors and cytokines (2,3). In the kidney, Ang II can also affect renal cell growth besides its effects on extracellular matrix accumulation; *e.g.*, it promotes EGF-stimulated proximal tubule cell proliferation (33,34). In this study, we found that the dramatic quinapril-induced amelioration of renal function after FA was associated with low (normal) tubular cell proliferation (by PCNA immunostaining) and normal renal histology. However, pretreatment with lower doses of two different Ang II antagonists (enalapril and losartan) led to a significant improvement of rat renal function without significant changes in either tubular PCNA staining or histologic morphology in FA-injured kidney. Moreover, previous studies using the renal ischemic model have shown that AT1 receptor mRNA was downregulated in the renal cortex early after reperfusion, in the presence of an intense tubular proliferation (31). Collectively, these findings and the results herein support the notion that Ang II does not interact significantly with the mechanisms involved in tubular hyperplasia in both models of ARF.

In a previous study, we showed that PTHrP (1-36), exogenously administered as a single dose shortly after FA injection in rats, moderately but significantly increased the number of PCNA-stained tubular cells, without affecting the deteriorated renal function, at 24 h (8). In this study, we found that the renal PTHrP overexpression in rats with FA-induced ARF was abolished by two ACE inhibitors or the AT1 receptor antagonist losartan, even by using low doses of these antagonists, which did not affect tubular cell hyperplasia. These findings indicate that the initial proliferative response of the renal tubule to FA occurs independent of PTHrP, and Ang II antagonists are able to exert beneficial effects in FA-injured kidney by probably affecting intrarenal hemodynamics.

It is interesting that pretreatment with the Ang II antagonists, in addition to preventing PTHrP overexpression, impaired the PTH1R protein downregulation observed in the acutely damaged rat kidney. Collectively, our findings support the notion that RAS activation is responsible for PTHrP induction and that Ang II blockade leads to normalization of the renal PTHrP/PTH1R system in nephrotoxic ARF.

We found that a nephrotoxic concentration of FA rapidly stimulates PTHrP mRNA in NRK 52E cells by a mechanism inhibited by losartan but not by candesartan, two agents that differ in their cell permeability (24). However, both antagonists inhibited PTHrP induction by exogenous Ang II, which suggests a similar effectiveness in their interaction with AT1 receptors on the cell surface in these cells. It is interesting that losartan also blocked the perinuclear relocalization of Ang II and the AT1 receptor that occurs shortly after FA addition to NRK 52E cells. The kidney accumulates Ang II from the circulation, but it can clearly be synthesized locally within the renal cells and act in an autocrine, paracrine, or even intracrine manner (15,24,35). Regarding the last, intracellular Ang II may accumulate as a result of Ang II/AT1 receptor complex formation in cell endosomes or as a result of its interaction with Ang II nuclear receptors, associated with disease severity in various pathologic conditions (35,36). The aforementioned difference between the efficacy of losartan and candesartan suggests that intracellular Ang II retention might be responsible for the early PTHrP gene induction by FA in renal tubule cells. This is consistent with previous findings in other cell types indicating that intracellular Ang II can increase gene transcription (24). However, both Ang II antagonists were shown to be equally effective in inhibiting PTHrP protein induction triggered by FA, suggesting that an autocrine mechanism may also contribute to this response at a later stage.

Ang II interaction with the AT1 receptor activates the MAPK pathway, leading to CREB activation (25,27,28). In this study, FA rapidly induced an AT1 receptor-mediated increase in CREB activation in NRK 52E cells. We also found herein that FA, in a similar manner to Ang II, induced ERK1/2 phosphorylation in NRK 52E cells. Moreover, inhibition of either ERK or CREB activation abolished FA-induced upregulation of PTHrP in these cells. Collectively, these findings support the hypothesis that in renal tubuloepithelial cells, PTHrP overexpression by FA is coupled to CREB activation through a pathway that requires ERK1/2 phosphorylation.

We recently demonstrated a correlation between the improvement of tubular damage and fibrosis and PTHrP inhibition after AT1 receptor blockade in rats with Ang II-induced renal injury (6). These findings further support the notion that PTHrP upregulation might be related to the mechanisms associated with Ang II-induced kidney injury. It was suggested previously that, in the arterial wall, PTHrP might act locally to antagonize some of the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells (4,17,37). Thus, although further work is needed to define the true pathogenetic role of both proteins in ARF, PTHrP might either exert a reciprocal control on or recapitulate at least some Ang II effects in the acutely damaged kidney.

In conclusion, the findings presented here demonstrate that

PTHrP overexpression in nephrotoxic ARF depends on RAS activation. In addition, we have identified a mechanism by which a nephrotoxic concentration of FA, through activation of a local Ang II/AT1 receptor system, can induce PTHrP overexpression in the renal tubule.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (MS&T; PB98-0700-C02-01/02 and SAF2002-04356-C03-01/03), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 08.6/0038/2000-1/2), Sociedad Española de Nefrología, and Instituto de Salud Carlos III (C03/08). A.O. and D.R., and A.I. are fellows of Conchita Rábago Foundation and MS&T, respectively.

Portions of this study were presented at the Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, October 30 to November 4, 2002; the Acute Renal Failure Satellite Symposium, Ghent, Belgium, June 13 to 15, 2003; and the XLI Congress of the European Renal Association, Lisbon, Portugal, May 15 to 18, 2004.

We are grateful to Dr. A. López-Farré (Cardiovascular Research Laboratory, Hospital Clínico S. Carlos, Madrid) for providing us with the AT1 receptor antibody and candesartan.

References

- Lieberthal W, Levine JS: Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271: F477-F488, 1996
- Humes HD, Lake EW, Liu S: Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21: 353-365, 1995
- Hammerman MR, Safirstein R, Harris RC, Toback FG, Humes HD: The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol* 279: F3-F11, 2000
- Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fisher E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J, Schüler K-D, Silve C, Stewart AF, Takene K, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related protein and its receptors: Nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 134: 1113-1136, 2001
- Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer NE, Judes C, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related protein detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int* 50: 1591-1603, 1996
- Lorenzo O, Ruiz-Ortega M, Esbrit P, Rupérez M, Ortega A, Santos S, Blanco J, Ortega L, Egido J: Angiotensin II increases parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and the type 1 PTH/PTHrP receptor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 1595-1607, 2002
- Soifer NE, Van Why SK, Ganz MB, Kashgarian M, Siegel NJ, Stewart AF: Expression of parathyroid hormone-related protein in the rat glomerulus and tubule during recovery from renal ischemia. *J Clin Invest* 92: 2850-2857, 1993
- Santos S, Bosch RJ, Ortega A, Largo R, Fernández-Agulló T, Gazapo R, Egido J, Esbrit P: Up-regulation of renal parathyroid hormone-related protein in FA-induced ARF: Relationship to the renal regenerative process. *Kidney Int* 60: 982-995, 2001
- Bosch RJ, Rojo-Linares P, Torrecillas-Casamayor G, Iglesias-Cruz MC, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M: Effects of parathyroid hormone-related protein on human mesangial cells in culture. *Am J Physiol* 277: E990-E995, 1999
- García-Ocaña A, Galbraith SC, Van Why SK, Yang K, Golovyan L, Dann P, Zager RA, Stewart AF, Siegel NJ, Orloff JJ: Expression and role of parathyroid hormone-related protein in human renal proximal tubule cells during recovery from ATP depletion. *J Am Soc Nephrol* 10: 238-244, 1999
- De Miguel F, García-Cañero R, Esbrit P: Copurification of calcium transport-stimulating and DNA synthesis-stimulating agents with parathormone-like activity isolated from the hypercalcemic strain of the Walker 256 tumor. *Eur J Cancer* 27: 1022-1026, 1991
- García-Ocaña A, De Miguel F, Peñaranda C, Albar JP, Sarasa JL, Esbrit P: Parathyroid hormone-related protein is an autocrine modulator of rabbit proximal tubule cell growth. *J Bone Miner Res* 10: 1875-1884, 1995
- Harris RC, Martínez-Maldonado M: Angiotensin II-mediated renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21: 328-335, 1995
- Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 38: 635-638, 2001
- Allred AJ, Chappell MC, Ferrario CM, Diz DI: Differential actions of renal ischemic injury on the intrarenal angiotensin system. *Am J Physiol* 279: F636-F645, 2000
- Largo R, Gómez-Garre D, Santos S, Peñaranda C, Esbrit P, Egido J: Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage. *Kidney Int* 55: 82-90, 1999
- Pirola CJ, Wang HM, Kaymar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA: Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 268: 1987-1994, 1993
- Piron A, Leonard I, Nonclercq D, Toubeau G, Falmagne P, Heuson-Stiennon JA, Laurent G: In vitro demonstration of a mitogenic activity in renal tissue extracts during regenerative hyperplasia. *Am J Physiol* 274: F348-F357, 1998
- Gómez-Garre D, Largo R, Tejera N, Fortes J, Manzarbeitia F, Egido J: Activation of NF-kappa B in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria: Role of angiotensin II and endothelin-1. *Hypertension* 37: 1171-1178, 2001
- Long GW, Misra DC, Juleff R, Blossom G, Czako PF, Glover JL: Protective effects of enalaprilat against postischemic renal failure. *J Surg Res* 54: 254-257, 1993
- Mimran A, Ribstein J: Angiotensin receptor blockers: Pharmacology and clinical significance. *J Am Soc Nephrol* 10[Suppl]: S273-S277, 1999
- Guillén C, Martínez P, De Gortázar A, Martínez MA, Esbrit P: Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277: 28109-28117, 2002
- Miyajima A, Chen J, Kirman I: Interaction of nitric oxid and transforming growth factor-beta 1 induced by angiotensin II and mechanical stretch in rat renal tubular epithelial cells. *J Urol* 164: 1729-1734, 2000
- Cook JL, Zhang Z, Re RN: In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res* 89: 1138-1142, 2001

25. Cammarota M, Bevilacqua LRM, Dunkley PR, Rostas JAP: Angiotensin II promotes the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) at Ser133 through an ERK1/2-dependent mechanism. *J Neurochem* 79: 1122-1128, 2001
26. Chilco PJ, Leopold V, Zajac JD: Differential regulation of the parathyroid hormone-related protein gene P1 and P3 promoters by cAMP. *Mol Cell Endocrinol* 138: 173-184, 1998
27. Funakoshi Y, Ichiki T, Takeda K, Tokuno T, Iino N, Takeshita A: Critical role of cAMP-response element-binding protein for angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277: 18710-18717, 2002
28. Bernhard M, Montminy M: Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev* 2: 599-609, 2001
29. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR: PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-27494, 1995
30. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J: Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int* 62: S12-S22, 2002
31. Kontogiannis J, Burns KD: Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol* 43: F79-F90, 1998
32. Abdulkader RC, Yuki MM, Paiva AC, Marcondes M: Prolonged inhibition of angiotensin II attenuates glycerol-induced acute renal failure. *Braz Med Biol Res* 21: 233-239, 1988
33. Sadoshima J: Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res* 86: 1187-1189, 2000
34. Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YO, Kim YS, Kim J, Bang BK: Influence of the renin-angiotensin system on epidermal growth factor expression in normal and cyclosporine-treated rat kidney. *Kidney Int* 60: 847-857, 2001
35. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyora A, Kobari H: Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension* 39: 316-322, 2002
36. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Jinard B, Anversa P: Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87: 1123-1132, 2000
37. Wu S, Pirola CJ, Green J, Yamaguchi DT, Okano K, Juepner H, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL: Effects of N-terminal, midregion, and C-terminal parathyroid hormone-related peptides on adenosine 3',5'-monophosphate and cytoplasmic free calcium in rat aortic smooth muscle cells and UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* 133: 2437-2444, 1993

III. Capítulos de Libros:



Novel Aspects of PTHrP Physiopathology

Editors: Claudio Luparello (Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Palermo, Italy)

Book Description:

The idea of this book is to attempt to provide an appropriate ground for the discussion of modern PTHrP-related issues, and for the consideration of attentive speculation and comments on current work. It is designed to intersect all the usual lines of disciplines, providing a site for presenting pertinent investigations and for discussing critical questions relevant to the entire field, thus seeking to develop a new focus and new perspectives for all those concerned with PTHrP and its pathobiology.

Table of Contents:

1. Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP): An Ancient String of Cytokines with Many Known and Still Unknown Functions (James F. Whitfield (Inst. for Biological Sciences, National Research Council of Canada, ON, Canada)

2. Parathyroid Hormone and Related Peptides in Fish: From Sequence to Function (Adelino V.M. Canário; Juan Fuentes; Pedro M. Guerreiro and Deborah M. Power (Centre of Marine Sciences, Univ. of Algarve, Faro, Portugal)

3. PTHrP Function in the Skin: Probing Beneath the Surface. (John Foley; A. Godwin Diamond; Ryan M. Gonterman; Carlos D. Offutt and Yong-Mee Cho, Indiana Univ., School of Medicine, IN)

4. Novel Aspects of PTHrP in Lung Biology and Pathobiology (John S. Torday and Virender K. Rehan, The Los Angeles Biomedical Research Inst. at Harbor-UCLA Med. Center, CA, USA)

5. Role of PTHrP in Renal Pathophysiology (Pedro Esbrit; David Ramilai and Juan Antonio Ardura, Bone and Mineral Metabolism Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Madrid); et al.

6. Effects of Temporal changes in PTHrP and Ihh Expressions on Bone Growth, Studied by a Theoretical Model (C.C. van Donkelaar, Eindhoven Univ. of Technology, The Netherlands)

7. PTHrP/PTH1R: A Complex Crosstalk Among Different Signaling Pathways. (Maioli Emanuela; Fortino Vittoria and Torricelli Claudia Univ. of Siena, Italy)
8. PTHrP and the Inflammatory Response (Janet L. Funk, Univ. of Arizona, AZ)
9. Molecular Signaling of PTHrP in Tumor (Majed S. Alokail, College of Science #5, King Saud Univ., Kingdom of Saudi Arabia)
10. Mechanisms Involved in the Regulation of PTHrP Expression (Jürgen Dittmer, Univ. of Halle,(Saale)Germany)
11. Novel molecular interactions of parathyroid hormone-related protein in cancer (John J. Grzesiak and Michael Bouvet, Veterans Affairs San Diego Healthcare System, Dept. of Surgery); Randolph H. Hastings; Douglas W. Burton and Leonard J. Deftos, Univ. of California, CA)
12. Genomewide Hypomethylation and PTHrP Gene Hypermethylation as a Model for the Prediction of Cancer risk in Rheumatoid Arthritis(Fabio Caradonna; Giusi Barbata and Giulia Sciandrello, Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Palermo, Italy)
13. Aspects of the Cytotoxic Activity of PTHrP [38-94]-Amide On Human Breast Cancer Cells (Rosalia Sirchia, Arianna Gullo and Claudio Luparello, Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Palermo, Italy)



15

Parathyroid hormone-related protein as a renal cytokine involved in kidney damage and repair

Arantxa Ortega¹, David Rámila¹, Adriana Izquierdo², Ricardo J. Bosch² and Pedro Esbrit¹

¹Bone and Mineral Metabolism Laboratory, Fundación Jiménez Díaz, Madrid; ²Laboratory of Renal Physiology and Experimental Nephrology, Department of Physiology, Alcalá University, Alcalá de Henares, Spain

Abstract

Parathyroid hormone [PTH]-related protein [PTHrP] was first identified as the main agent responsible for humoral hypercalcemia of malignancy. PTHrP is now known to be synthesized in most normal tissues, where it has autocrine/paracrine and even intracrine actions. Both PTHrP and the PTH/PTHrP type 1 receptor are abundant throughout the renal parenchyma. In the kidney, PTHrP appears to exert modulatory roles of both glomerular and tubular function, and is a potent vasodilator of renal vessels. PTHrP overexpression occurs in experimental models of several nephropathies, and current data support that it might interact in a complex fashion with the mechanisms of renal injury and repair.

1. Introduction

Parathyroid hormone (PTH)-related protein (PTHrP) was initially isolated from tumors associated

with humoral hypercalcemia of malignancy. PTHrP overproduced by these tumors is now known to be the main factor responsible for the increase in both bone resorption and renal calcium reabsorption in this syndrome [1]. These effects occur by interaction with a G protein coupled receptor, the so-called PTH/PTHrP type 1 receptor (PTH1R). The N-terminal region of PTH and PTHrP binds to this receptor with almost equal affinities due to sequence and conformational homologies in this region of both proteins [2].

PTH and PTHrP are products of separate genes located on chromosomes 11 and 12, respectively. In contrast to the relatively simple structure of the PTH gene, the PTHrP gene is complex. It consists of eight exons which may produce through alternative splicing three distinct mRNA species encoding three proteins of 139, 141, and 173 aminoacids differing in their C-terminal region [3]. These PTHrP isoforms undergo extensive posttranscriptional processing which give rise to a family of mature secretory forms, each with its own physiological function(s) [3-5].

Whereas PTHrP can act as an endocrine factor in cancer, its production by many normal tissues is associated with a variety of autocrine/paracrine effects during fetal and adult life. Some but not all of these physiological effects occur through the PTH1R interaction, and include: regulation of smooth muscle tone, modulation of transepithelial calcium transport, and regulation of cell growth and/or cell differentiation and apoptosis [3-5]. Disruption of the PTHrP or the PTH1R genes is lethal in the homozygous state, indicating that the PTHrP/PTH1R system has an important developmental role(s) in the foetus [4,6]. In addition, recent studies have shown that PTHrP can internalize into the nucleus where it may affect cell proliferation or apoptosis, depending on the cell type [5,7,8]. PTHrP also binds to RNA, suggesting its putative role in RNA processing [9].

PTHrP has complex effects in the kidney (Table 1). However, understanding of the precise renal action(s) of this protein in normal and pathologic conditions is only

Table 1. PTHrP and the kidney

| | Actions | References |
|--------------------------|---|--|
| Vasoactive effects | Vasodilatation, interaction with Ang II | Clemens et al [5] Lorenzo et al [13] Pirola et al [47] |
| Glomerular actions | RBF and GFR modulation | Massfelder et al [11,17]; Endlich et al [16] |
| | Mesangial cell relaxation and cell growth | Bosch et al [15] Soifer et al [19] |
| | Stimulation of renin | Saussine et al [20] |
| Effects on renal tubules | PTH-like effects on ion transport and 1 α -hydroxylase | Everhart-Caye et al [21]; Maeda et al [22] |
| | Tubular cell proliferation | Burton et al [25]; De Miguel et al [26]; Garcia-Ocaña et al [27-29]; Santos et al [30] |

RBF = renal blood flow; GFR = glomerular filtration rate.

beginning to be unraveled. The present review focuses on current hypothesis which envisions PTHrP as a renal cytokine interacting with the mechanisms of kidney damage and repair.

2. PTHrP and its receptors in the kidney

Targeted disruption of the PTHrP gene in mice has not been shown to be associated with abnormalities in kidney development, although a possible altered function in neonatal or adult life is unknown as these mice die at birth [6]. A more recent study has examined the localization of PTHrP and the PTH1R mRNA in the developing mouse kidney [10]. High PTHrP mRNA levels were found during the generation of new nephrons in: the collecting duct, urothelium of the pelvis, the developing tubules, and immature elements of the glomerulus. The PTH1R mRNA was unchanged during development of tubules and glomeruli, but was not found in the urothelium of the pelvis or the collecting duct [10]. This suggests a role for PTHrP, mediated through the PTH1R and maybe other uncharacterized receptors, in renal maturation.

In the adult kidney, PTHrP has been identified in the glomerular podocytes and mesangial cells, in proximal, distal, and collecting tubules, in the intrarenal arterial tree, including afferent and efferent arterioles, as well as in the macula densa [11-13]. Using different mRNA and protein detection techniques, the PTH1R has been detected in convoluted and straight proximal tubules, cortical straight ascendent limbs, and in distal convoluted tubules in both rats and humans, consistent with known sites of PTH action [12-14]. This receptor is also present in rat mesangial cells, although it could not be detected in human mesangial cells [13-15]. In addition, a PTHrP receptor transcript with an apparent sequence homology with that of the PTH1R is abundant in human glomerular podocytes [14].

3. Effects of PTHrP in the glomerulus

PTHrP is a potent smooth muscle relaxant, and several lines of evidence support its complex action(s) on the glomerulus [3,5,11]. Using a hydronephrotic rat kidney model, local administration of the N-terminal PTHrP fragment induced vasodilatation of all preglomerular vascular segments, including the afferent arteriole, and an increase in renal blood flow [16]. Furthermore, PTHrP infused directly into the renal artery of anaesthetized rats increased the renal blood flow, the glomerular filtration rate and the urine flow without significantly increasing the filtration fraction [17]. PTHrP was also found to induce relaxation of cultured human mesangial cells precontracted with platelet-activating factor, and to reduce bradykinin-induced increase in $[Ca_i^{2+}]$ in mouse podocytes, through the cAMP pathway [15,18]. On the other hand, PTHrP stimulates renin secretion in the rat kidney, and stimulates mesangial cell growth in vitro [15,19,20]. It has been hypothesized that these bifunctional features of PTHrP might provide a self-regulating mechanism(s) to modulate renal blood flow and glomerular filtration rate in renal physiology [5].

4. Effects of PTHrP in the renal tubule

In renal tubular cells, PTHrP exerts PTH-like effects through interaction with the PTH1R. Therefore, PTHrP increases calcium reabsorption in the distal tubule, while in

the proximal tubule, it inhibits phosphate and bicarbonate reabsorption, as well as Na^+/H^+ exchange, and stimulates 25-hydroxycholecalciferol 1α -hydroxylase activity [5,21,22]. Studies using stable transfection of the PTH1R cDNA into tubuloepithelial cells LLC-PK₁ lacking this receptor show that adenylate cyclase and phospholipase C activation following N-terminal PTHrP incubation are differently affected by the receptor density [23]. Thus, modulation of the PTH1R density, and its G protein coupling, might provide a mechanism to explain the distinct pattern of PTH1R signaling after PTHrP binding in different nephron segments [24].

PTHrP also has actions unrelated to those traditionally associated with PTH in the renal tubules. Therefore, PTHrP is mitogenic for various tubuloepithelial cells in culture, including renal carcinoma cells, distal tubule-like cells MDCK, and subconfluent proximal tubule cells [25-30]. This effect in the latter cells seems to occur by activation of the PTH1R and subsequent stimulation of both adenylate cyclase and protein kinase C [28].

5. PTHrP and renal disease

Ischemic and toxic injury to renal tubular epithelial cells can cause both acute and chronic renal failure depending on the intensity and exposure time to the damage [31,32]. Proliferation of affected tubular cells appears to be important for timely tubular recovery following renal injury and for subsequent functional recovery of the injured kidney. Some renal growth factors, acting in an autocrine and paracrine manner, appear to participate in the repair process of the tubular epithelium in this setting [32-35].

PTHrP gene expression increases during the recovery phase after renal ischemic injury or following folic acid-induced acute renal failure in rats [19,30]. PTHrP overexpression was also observed *in vitro* in proximal tubule-like cells following severe ATP depletion or exposure to folic acid [29,30]. Moreover, this PTHrP upregulation has an autocrine effect to counteract in part the folic acid- or ATP depletion-induced decrease in the cell number [29,30]. These findings suggest that PTHrP could participate in the regenerative process after acute renal injury.

Both tubular necrosis and apoptosis are common events associated with renal damage [31,35]. In this regard, PTHrP has been shown to inhibit cell death in some cell types, while it promotes cell death in a rat intestinal cell line [7,36-39]. The cellular mechanisms by which PTHrP can inhibit cell death in some cell types remain unclear. In chondrocytes, the antiapoptotic effect of PTHrP appears to involve its interaction with the PTH1R, and also its internalization into the nucleus [7,36]. In any event, a putative modulatory action of PTHrP on apoptosis in renal tubular cells –which has yet to be tested– could contribute to repairment of the damaged renal parenchima.

Chronic cyclosporin administration, which induces interstitial fibrosis and tubular atrophy, is associated with PTHrP upregulation in the rat renal cortex [40]. The renal expression of PTHrP was also recently evaluated in a rat model of protein overload, since proteinuria correlates with progression to end-stage renal disease. In this model, PTHrP mRNA was found to increase sequentially in the renal cortex during the development of proteinuria [41]. Interestingly, dramatic PTHrP immunostaining was found to occur in glomerular mesangial cells, associated with an increased mesangial growth and matrix expansion in rats with proteinuria [41]. Moreover, PTHrP expression was upregulated in the kidney of mice with streptozotocin-induced diabetes, in association

with the initial stages of diabetic nephropathy [42]. Collectively, these data suggest that PTHrP might be involved in the mechanisms associated with renal damage.

The renin-angiotensin system is known to play an important pathogenetic role in the development of kidney damage [43,44]. In fact, angiotensin II (Ang II) can induce either cell proliferation or cell hypertrophy in both mesangial and tubuloepithelial cells, and in interstitial fibroblasts [44,45]. Interestingly, this factor via AT₁ receptors stimulates PTHrP expression in glomerular and tubular cells, as well as in vascular smooth muscle cells both in vivo and in vitro [13,46]. Thus, Ang II is a likely candidate responsible for PTHrP overexpression at least in the chronically damaged kidney. It is currently unknown whether PTHrP might contribute to some of the deleterious effects of Ang II or represents a compensatory mechanism to attenuate kidney injury.

The putative role played by PTHrP in the damaged kidney is currently intriguing since the PTH1R gene was rapidly downregulated following acute renal injury [19,30]. This is in contrast to other well characterized renal mitogens, such as epidermal growth factor and hepatocyte growth factor, whose receptors are upregulated after acute renal failure [32,34]. Moreover, this receptor was also decreased in protein overloaded rats [41]. Factors other than Ang II –and also PTHrP– is likely to account for the PTH1R downregulation associated with kidney damage [13,47]. It is interesting to mention in this context that spliced variants of the PTH1R appear to be present in the kidney [48]; and that the PTH1R can be internalized into the nucleus in renal tubular cells [49]. The pathophysiological relevance of these mechanisms for the PTHrP action in the damaged kidney is presently unknown.

6. Future perspectives

Much work has still to be done to fully understand the true role of PTHrP in renal pathophysiology. Specifically, the following issues should be addressed in future studies: 1) characterization of PTHrP receptors different from the PTH1R and their putative contribution to overall PTHrP effects in the kidney; 2) assessment of possible effects of other PTHrP fragments distinct from the PTH-like fragment on renal cell growth and/or cell differentiation; 3) analysis of the relationship between PTHrP and other well characterized growth factors and vasoactive agents in the regulation of renal growth and/or function; 4) evaluation of the relative significance of haemodynamic and growth effects of PTHrP in the injured kidney; 5) assesment of a possible therapeutic role of PTHrP as a renal regenerative factor in renal failure.

References

1. Martin, T.J., Moseley, J.M., Williams, E.D. 1997, *J. Endocrinol.* 154, S23.
2. Mannstadt, M., Jüppner, H., Gardella, T.J. 1999, *Am. J. Physiol.* 277, F665.
3. Philbrick, W.M., Wysolmerski, J.J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J.J., Yang, K.H., Vasavada, R.C., Weir, E.C., Broadus, A.S., Stewart, A.F. 1996, *Physiol. Rev.* 76, 127.
4. Strewler, G.J. 2000, *N. Engl. J. Med.* 342, 177.
5. Clemens, T.L., Cormier, S., Eichinger, A., Endlich, K., Fiaschi-Taesch, N., Fischer, E., Friedman, P.A., Karaplis, A.C., Massfelder, T., Rossert, J., Schlüter, K.D., Silve, C., Stewart, A.F., Takane, K., Helwig, J.-J. 2001, *Br. J. Pharmacol.* 134, 1113.

6. Karaplis, A.C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R.T., Tybulewicz, V.L.J., Kronenberg, H.M., Mulligan, R.C. 1994, *Genes Develop* 8, 277.
7. Henderson, J.E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B.M.K., Goltzman, D., Karaplis, A.C. 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15, 4064.
8. Aarts, M.M., Rix, A., Guo, J., Bringhurst, R., Henderson, J.E. 1999, *J. Bone. Miner. Res.* 14, 1493.
9. Aarts, M.M., Levy, D., He, B., Stregger, S., Chen, T., Richard, S., Henderson, J.E. 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 4832.
10. Aya, K., Tanaka, H., Ichinose, Y., Kobayashi, M., Seino, Y. 1999, *Kidney Int.* 55, 1696.
11. Massfelder, T., Stewart, A.F., Endlich, K., Soifer, N.E., Judes, C., Helwig, J.J. 1996, *Kidney Int.* 50, 1591.
12. Yang, T., Hassan, S., Huang, Y.G., Smart, A.M., Briggs, J.P., Schnermann, J.B. 1997, *Am. J. Physiol.* 272, F751.
13. Lorenzo, O., Ruiz-Ortega, M., Esbrit, P., Rupérez, M., Ortega, A., Santos, S., Blanco, J., Ortega, L., Egido, J. 2002, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1595.
14. Lee, K., Brown, D., Ureña, P., Ardaillou, N., Ardaillou, R., Deeds, J., Segre, G.V. 1996, *Am. J. Physiol.* 270, F186.
15. Bosch, R.J., Rojo-Linares, P., Torrecillas-Casamayor, G., Iglesias-Cruz, M.C., Rodríguez-Puyol, D., Rodríguez-Puyol, M. 1999, *Am. J. Physiol.* 277, E990.
16. Endlich, K., Massfelder, T., Helwig, J.J., Steinhausen, M. 1995, *J. Physiol.* 483, 481.
17. Massfelder, T., Parekh, K., Endlich, K., Saussine, C., Steinhausen, M., Helwing, J.J. 1996, *British J. Pharmacol.* 118, 1995.
18. Endlich, N., Nobile, R., Kriz, W., Endlich, K. 2001, *Exp. Nephrol.* 9, 436.
19. Soifer, E.N., Van Why, S.K., Ganz, M.B., Kashgarian, M., Siegel, N.J., Stewart, A.F. 1993, *J. Clin. Invest.* 92, 2850.
20. Saussine, C., Massfelder, T., Parnin, F., Judes, C., Simeoni, U., Helwig, J.J. 1993, *Kidney Int.* 44, 764.
21. Everhart-Caye, M., Inzucchi, S.E., Guinnes-Henry, J., Mitnick, M.A., Stewart, A.F. 1996, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 199.
22. Maeda, S., Wu, S., Green, J., Kim, H., Bosch, R., Lee, I., Adams, J., Clemens, T.L., Kurtz, I. 1996, *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 175.
23. Takasu, H., Guo, J., Bringhurst, F.R. 1999, *J. Bone Miner. Res.* 14, 11.
24. Friedman, P.A., Gesek, F.A., Morley, P., Whitfield, J.F., Willick, G.E. 1999, *Endocrinology* 140, 301.
25. Burton, P.B.J., Moniz, C., Knight, E. 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 1134.
26. De Miguel, F., García-Cañero, R., Esbrit, P. 1991, *Eur. J. Cancer* 8, 1022.
27. García-Ocaña, A., De Miguel, F., Peñaranda, C., Albar, J.P., Sarasa, J.L., Esbrit, P. 1995, *J. Bone Miner. Res.* 10, 1875.
28. García-Ocaña, A., Gómez-Casero, E., Peñaranda, C., Esbrit, P. 1998, *Life Sci.* 62, 2267.
29. García-Ocaña, A., Galbraith, S.C., Van Why, S.K., Yang, K., Golovyan, L., Dann, P., Zager, R.A., Stewart, A.F., Siegel, N.J., Orloff, J.J. 1999, *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 238.
30. Santos, S., Bosch, R.J., Ortega, A., Largo, R., Fernández-Agulló, T., Gazapo, R., Egido, J., Esbrit, P. 2001, *Kidney Int.* 60, 982.
31. Lieberthal, W., Levine, J.S. 1996, *Am. J. Physiol.* 271, F477.
32. Humes, H.D., Lake, E.W., Liu, S. 1995, *Miner. Electrolyte Metab.* 21, 353.
33. Vukicevic, S., Basic, V., Rogic, D., Basic, N., Shih, M.S., Shepard, A., Jin, D., Dattatreya Murthy, B., Jones, W., Dorai, H., Ryan, S., Griffiths, D., Maliakal, J., Jelic, M., Pastorcic, M., Stavljenic, A., Sampath, T.K. 1998, *J. Clin. Invest.* 102, 202.
34. Matsumoto, K., Nakamura, T. 2001, *Kidney Int.* 59, 2023.
35. Gobé, G., Zhang, X.J., Willgoss, D.A., Schoch, E., Hogg, N.A., Endre, Z.H. 2000, *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 454.

36. Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, W.M., Broadus, A.E., Baron, R. 1997, *J. Cell. Biol.* 136, 205.
37. Chen, H.L., Demiralp, B., Schenider, A., Koh, A.J., Silve, C., Wang, C.Y., McCauley, L.K. 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 19374.
38. Cebrian, A., García-Ocaña, A., Takane, K.K., Sipula, D., Stewart, A.F., Vasavada, R.C. 2002, *Diabetes* 51, 30003.
39. Ye, Y., Wang, C., Du, P., Falzon, M., Seitz, P.K., Cooper, C.W. 2001, *Endocrinology* 142, 1906.
40. García-Ocaña, A., Gómez-Casero, E., Peñaranda, C., Sarasa, J.L., Esbrit, P. 1998, *Transplantation* 65, 860.
41. Largo, R., Gómez-Garre, D., Santos, S., Peñaranda, C., Esbrit, P., Egido, J. 1999, *Kidney Int.* 5, 82.
42. Garrido, P., Peña, A., Izquierdo, A., Ortega, A., Arribas, I., Esbrit, P., López-Luna, P., Bosch, R.J. 2001, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 835A (Abstract).
43. Harris, R.C., Martínez-Maldonado, M. 1995, *Miner. Electrolyte. Metab.* 21, 328.
44. Egido, J. 1996, *Kidney Int.* 49, 578.
45. Ruiz-Ortega, M., Egido, J. 1997, *Kidney Int.* 52, 1497.
46. Pirola, C.J., Wang, H.M., Kaymar, A., Wu, S., Enomoto, H., Sharifi, B., Forrester, J.S., Clemens, T.L., Fagin, J.A. 1993, *J. Biol. Chem.* 268, 1987.
47. Fiaschi-Taesch, N.M., Santos, S., Van Why, S., Esbrit, P., Orloff, J.J., Stewart, A.F. 2001, *Bone* 28 (Suppl.), S80 (Abstract).
48. Jobert, A.S., Fernandes, I., Turner, G., Coureau, C., Prie, D., Nissenson, R.A., Friedlander, G., Silve, C. 1996, *Mol. Endocrinol.* 10, 1066.
49. Watson, P.H., Fraher, L.J., Hendy, G.N., Chung, U.I., Kiesel, M., Natale, B.V., Hodzman, A.B. 2000, *J. Bone Miner. Res.* 15, 1033.