

1

INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN eNOS POR CICLOSPORINA A: PAPEL DE AP-1.
 J. Navarro-Antolín, S. Lamas. Centro de Investigaciones Biológicas, C.S.I.C. e I.R.S.I.N., Madrid.

El inmunosupresor de uso clínico Ciclosporina A (CsA) produce daño vascular endotelial. Se sabe poco de los cambios moleculares que produce en la transducción de señales y en la expresión génica en el endotelio. Nuestro grupo demostró que, en células endoteliales de aorta bovina (CEAB), la CsA aumentaba los niveles del ARN mensajero (ARNm) de la sintasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) (Am J Physiol 1996, 271:H1072-H1078), en un proceso en el que estaría implicado el estado redox celular (British J Pharmacol 1998, 124:447-454). El objetivo actual es conocer el mecanismo molecular de esta supraexpresión. Mediante técnica de Northern blot detectamos que 1 μ M CsA aumenta la expresión del ARNm de eNOS en CEAB por un mecanismo fundamentalmente transcripcional, dado que el bloqueo de la transcripción mediante la inhibición de la ARN polimerasa II anula este efecto (201.0 \pm 33.4 vs 118.7 \pm 25.3, % respecto del vehículo). Coincidente con ello, los ensayos de transcripción *in vitro* de nucleos aislados (run-on) muestran un aumento de la tasa de transcripción del gen eNOS en CEAB tratadas con CsA (161.3 \pm 5.2 % respecto del vehículo). Este hecho se corrobora con los resultados de transfecciones transitorias de 1.9 Kb del promotor humano de eNOS en CEAB (200.7 \pm 13.8 % respecto del vehículo) y en células endoteliales de cordón umbilical humano tratadas con CsA. Las transfecciones con fragmentos menores de la región reguladora 5' confirman una progresiva pérdida de actividad promotora (168.2 \pm 13.2, 137.3 \pm 9.7 y 112.2 \pm 10.0, % respecto del vehículo, para las construcciones de 1.5, 0.7 y 0.3 Kb respectivamente), implicando la existencia de sitios *cis* de respuesta a CsA en el promotor humano de la eNOS. Considerando la participación del estado redox celular en el aumento del ARNm de la eNOS producido por CsA y la existencia en el promotor humano de la eNOS de sitios *cis* para el factor de transcripción AP-1 (sensible al estado redox), evaluamos su participación en la inducción transcripcional de eNOS por CsA. Mediante ensayo de cambio de la movilidad electroforética de un oligonucleótido conteniendo la secuencia *cis* (TGAGTCA) del factor transcripcional AP-1 en el promotor de la eNOS, detectamos un aumento de su actividad de unión en CEAB tratadas con CsA. La transfección transitoria del fragmento de 1.5 Kb del promotor de la eNOS humana con el sitio *cis* para AP-1 mutado (AGATCTA) se asoció a una pérdida de inducibilidad por CsA (137.8 \pm 8.7 vs 88.6 \pm 7.4, % respecto del vehículo). Estos datos sugieren que el mecanismo subyacente al aumento del RNAm de la eNOS producido por CsA en células endoteliales es una inducción transcripcional, en la que participa AP-1.

3

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES MDR1 Y ENDOTELINA 1 EN LÍNEAS CELULARES DE TUBULO RENAL.
 F Arrebola, F O'Valle, A Olmo, M Aguilar, B Espigares, ME Reguero, M Guillen, D Aguilar, RG Del Moral
 Dept. de Anatomía Patológica, Hospital Universitario San Cecilio, 18012 Granada, España

La glicoproteína-P (gp-P) juega un importante papel en la protección frente a xenobióticos. La endotelina 1 (ET1) es un potente vasoconstrictor y su sobreexpresión en células renales puede ser uno de los mediadores de lesión tubular inducida por fármacos. La regulación transcripcional de los genes de multirresistencia a fármacos (MDR1) y ET1 comparte algunos mecanismos de activación a través de la proteína quinasa C y el promotor AP1. En este estudio se muestra el diferente comportamiento de la expresión de MDR1 y ET1 en células renales *in vitro*, su modulación por fármacos inmunosupresores (IS) y quimioterápicos (CT), y su relación con el ciclo celular. Se realizaron ensayos *in vitro* con líneas celulares derivadas de túbulo renal, MDCK y LLC-PK1, mantenidas en medio de cultivo MEM con 5% de suero bovino fetal. La inducción farmacológica se llevó a cabo mediante incubación durante 15 días con dosis subletales (IC₅₀) de los diferentes fármacos nefrotóxicos (IS y CT). Los niveles de expresión de los genes MDR1 y ET 1 se determinaron por RT-PCR. Se empleó citometría de flujo para medir los siguientes parámetros: expresión de gp-P (clon JSB-1), porcentaje de células positivas (%POS) e intensidad media de fluorescencia (MSFI). El ciclo celular y fracción de crecimiento fueron también determinadas de igual manera. Los niveles de ARNm de MDR1 en condiciones basales fueron 0.1 \pm 0.01 para MDCK y 0.11 \pm 0.007 para LLC-PK1. El %POS y el MSFI de gp-P fueron también similares en las líneas celulares de túbulo renal (%POS MDCK 83.65 \pm 22.71, LLC-PK1 81.28 \pm 20.5; MSFI MDCK 24.8 \pm 3.1, LLC-PK1 23.9 \pm 5.9). En estas condiciones, los niveles de ARNm de ET1 fueron mayores que los de MDR1 (MDCK 0.69 \pm 0.01, LLC-PK1 0.51 \pm 0.03). La incubación con fármacos (IS o CT) incrementó la MSFI de gp-P y la expresión de MDR1 en ambas líneas (p < 0.001, ANOVA). Estudios de RT-PCR mostraron que la expresión de los genes ET1 y MDR1 guardaban una relación inversa (coeficiente de Pearson r = -0.488, p < 0.05); así, los fármacos que inducían un mayor incremento en los niveles de ARNm de MDR1 inducían a su vez la mayor disminución en los niveles de ARNm de ET1. Los niveles de gp-P y de ARNm de MDR1 guardaban una relación directa con el porcentaje de células en fase S y G₂M (coeficiente de Pearson r = 0.465 y 0.576, respectivamente), mientras que los niveles de ARNm de ET1 no mostraron correlación estadística con las fases del ciclo celular. En conclusión, los resultados mostrados sugieren que la expresión diferencial de los genes MDR1 y ET1 modulados por diferentes fármacos nefrotóxicos podría ser un factor a considerar en el desarrollo de la nefrototoxicidad.

- Aceptado Póster
- Aceptado Presentación Oral

2

PAPEL DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EN LA APOPTOSIS DEL TUBULO PROXIMAL INDUCIDA POR CyA Y TACROLIMUS: SEMEJANZAS Y DIFERENCIAS
 A. Tejedor¹, M. Castilla¹, A. Torres¹, L. Boscá², S. Hortelano², C. Caramelo³, B. Herrero¹, JA Lázaro¹, JF Cañizo¹. ¹Hospital "Gregorio Marañón". ²I^o de Bioquímica.CSIC. ³Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Dos de los inmunosupresores utilizados actualmente en la mayoría de los programas de trasplantes de órganos sólidos, ciclosporina y tacrolimus, se caracterizan por su capacidad tóxica sobre el túbulo proximal. Pese a sus diferencias estructurales, ambos fármacos tienen un mecanismo de acción común, interfiriendo con la activación inmunofilin dependiente de la célula CD4. En este estudio hemos comparado los efectos de ambos inmunosupresores sobre la generación del potencial transmembrana por la cadena respiratoria mitocondrial de la célula proximal, a partir de cultivos primarios obtenidos de cerdos isogénicos para 3 loci del complejo mayor de histocompatibilidad.

RESULTADOS: Las células proximales entran en apoptosis cuando son tratadas con generadores exógenos de óxido nítrico, o con estímulos de la síntesis endógena de óxido nítrico. De modo peculiar sin embargo, no responden a la inducción de apoptosis con lipopolisacárido. A diferencia de las células de estirpe macrofágica, en las que ciclosporina y tacrolimus ejercen un efecto opuesto al del NO, en la célula proximal tanto ciclosporina (1-1000 ng/ml) como tacrolimus (5-500 ng/ml) ejercen un efecto sinérgico con NO induciendo apoptosis. En los tres casos, la apoptosis está mediada por caspasa III, y es totalmente bloqueada por inhibidores específicos de la misma (zVAD). Las células que son pretratadas con ciclosporina o tacrolimus y sobreviven, se hacen parcialmente resistentes a la inducción de apoptosis. Esta resistencia es tanto directa como cruzada, sugiriendo un mecanismo común a ambas drogas. La activación de caspasa III observada, parece estar en relación con daños directos sobre la generación del potencial de membrana mitocondrial. La adición aguda de ciclosporina a mitocondrias proximales no modifica su control respiratorio por ADP, pero inhibe la apertura ciclofilin-dependiente del poro de permeabilidad. Esta inhibición se acompaña de una hiperpolarización mitocondrial. Tacrolimus no modifica el poro de permeabilidad ciclofilin-dependiente. Sin embargo, el efecto de ciclosporina (opuesto al del NO) es temporal y se agota en menos de 30' al cabo de los cuales, tanto ciclosporina como tacrolimus condicionan una depolarización mitocondrial progresiva. La consecuencia morfológica es una hinchazón de la mitocondria con desestructuración y rotura de las crestas. En el momento de enviar este resumen no se ha conseguido aún demostrar la salida de citocromo C al citoplasma, causa más que probable de la activación de la caspasa III descrita.

CONCLUSIONES: a diferencia de otros tipos celulares, en el túbulo proximal la interferencia de ciclosporina con la regulación del volumen mitocondrial es temporal y desaparece en menos de media hora. El efecto a medio plazo es similar al del tacrolimus, depolarizando la mitocondria que se hincha y rompe, iniciando en ambos casos la activación de caspasa III que finalmente inducirá la apoptosis de la célula proximal. El tratamiento con uno de los dos fármacos induce tolerancia a la toxicidad del otro, lo que supone un factor de seguridad para la maniobra de sustitución de un fármaco por otro.

4

EFFECTO PROTECTOR DEL MOFETIL MICOFENOLATO EN LA NEFRITIS AUTOINMUNE INDUCIDA POR HgCl2 EN LA RATA BROWN NORWAY.
 E. Nieto, E. Escudero, A. Martín, E. Navarro y F. Mampaso.

Dpto. Anatomía Patológica. Hospital Ramón y Cajal. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

El Mofetil Micofenolato (MMF) es un nuevo inmunosupresor cuyo principio activo, el ácido micofenólico, produce la depleción del GTP celular mediante la inhibición no competitiva de la enzima inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), una de las enzimas claves en la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos. De esta manera ejerce un efecto antiproliferativo selectivo sobre linfocitos y monocitos ya que, en ellos, ésta es la única vía posible de síntesis. Usando el modelo de nefritis autoinmune inducida en la rata Brown Norway mediante la administración de HgCl₂ (1mg/Kg, 5 inyecciones s.c.) hemos querido estudiar el efecto que pudiera tener este fármaco en el desarrollo y progresión de esta enfermedad caracterizada por una activación policlonal de células B autorreactivas dependiente de células Th2. Como consecuencia, se produce una enfermedad autoinmune caracterizada por síntesis de auto-anticuerpos (auto-Acs) anti-ADNss y anti-membrana basal glomerular (MBG), así como depósitos lineales glomerulares de IgG, severa proteinuria y desarrollo de una nefritis tubulointerstitial.

Para ello, dos grupos (A y B) de ratas BN fueron expuestos a HgCl₂. Además el grupo A (n=8) recibió 80mg/Kg/día de MMF por vía oral y el grupo B (n=6) recibió el vehículo y se utilizó como control. En ambos grupos se estudiaron los siguientes parámetros: niveles séricos de Acs anti-ADNss, Acs anti-MBG y sus depósitos glomerulares, niveles de proteinuria y de nitritos en orina, e infiltrado intersticial leucocitario.

Nuestros resultados demostraron una supresión de la síntesis de Acs anti-ADNss y anti-MBG, y ausencia de depósitos glomerulares de estos últimos auto-Acs en el grupo de ratas tratadas con el inmunosupresor. A su vez, los valores de proteinuria que en las ratas control alcanzaban niveles de 120mg/24h., retornaron a sus niveles basales (3-20mg/24h.). Con respecto a la concentración de nitritos en orina se observó un descenso significativo (p<0.001) en el grupo tratado con MMF (5-14 mg/24h.) al compararlo con el grupo control (40-70mg/24h.). Y, finalmente, observamos la desaparición del infiltrado leucocitario renal en las ratas tratadas con MMF. Estos datos sugieren el importante papel protector que desempeña el MMF en este modelo experimental, lo que podría representar una alternativa potencial para el tratamiento de algunas afecciones autoinmunes con daño renal.

5

EL ACIDO 9-CIS RETINOICO MODULA LA EXPRESION DE VASCULAR CELL-ADHESION MOLECULE-1 EN CELULAS MESANGIALES HUMANAS EN CULTIVO E INHIBE LA ADHESION DE MONOCITOS A DICHAS CELULAS

Moreno Manzano, V; Sepúlveda Muñoz, Juan Carlos; Torrecillas Casamayor, Guadalupe; Díez marques, Luisa; Rodríguez Puyol, Manuel; Lucio Cazaña, Francisco Javier
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares (Madrid)

El ácido 9-cis retinoico es un isomero del ácido retinoico todo-*trans* que estimula específicamente los receptores de retinoide RXR y, además estimula los receptores RAR, a diferencia de ácido retinoico todo-*trans*, que solamente activa receptores RAR. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que 9-cis retinoico inhibe en células mesangiales humanas en cultivo la expresión de osteopontina, una glicoproteína que es secretada por células mesangiales y que está implicada en la adhesión de monocitos al tejido glomerular. En el presente trabajo hemos evaluado la acción de 9-cis retinoico sobre la expresión mesangial de otra molécula de adhesión, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), también implicada en la adhesión de monocitos al tejido glomerular. Asimismo, se ha estudiado el efecto de 9-cis retinoico sobre la adhesión de monocitos a células mesangiales humanas en cultivo. Los experimentos se desarrollaron en cultivos de células mesangiales (obtenidas desde riñones rechazados para trasplante) de pase 20-25, confluentes y quiescentes por incubación durante 48 horas en medio al 0.5%. Los monocitos se aislaron desde sangre total de donantes sanos: en primer lugar se obtuvieron células mononucleares en Lymphoprep mediante centrifugación y luego se incubaron estas células en frascos Roux durante 24 horas para permitir la adhesión diferencial de los monocitos. La expresión de VCAM-1 se estudió mediante Northern blot en células mesangiales tratadas con ácido 9-cis retinoico durante 2 horas y luego incubadas durante 24 horas en una de estas tres condiciones: control, estimuladas con suero de ternera fetal al 20% o estimuladas con factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , 10 ng/ml). La adhesión de monocitos se evaluó en cultivos de células mesangiales tratadas en las mismas tres condiciones experimentales, añadiendo 800.000 monocitos por placa P35. Nuestros resultados indican que 9-cis retinoico inhibe la adhesión de monocitos a células mesangiales incubadas en condiciones control o de estimulación. Similarmente, el ácido 9-cis retinoico modula la expresión de VCAM-1 en células mesangiales cultivadas bajo las diferentes condiciones experimentales. Experimentos aislados realizados con ácido retinoico todo-*trans* demostraron que este retinoide es menos activo que el ácido 9-cis retinoico.

7

EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO MEDIADOR DE LA CONTRACCIÓN CELULAR PRODUCIDA POR ANGIOTENSINA II

G. Torrecillas, J.C. Sepúlveda-Muñoz, M. Rodríguez-Puyol, S. López-Ongil, V. Moreno-Manzano, D. Rodríguez-Puyol*.
Dpto. Fisiología. Universidad de Alcalá y Hospital Príncipe de Asturias*. Alcalá de Henares. Madrid.

En los últimos años, las especies reactivas del oxígeno (ROS) se han propuesto como mediadores en las respuestas celulares tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, la hipótesis de que la contracción dependiente de AII, pudiera ser mediada por ROS, particularmente H₂O₂, no ha sido previamente analizada. Los presentes experimentos fueron diseñados para estudiar esta hipótesis, así como los posibles mecanismos implicados. La catalasa (CAT, 80 U/ml) inhibió el aumento de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, parámetro bioquímico que precede a la contracción celular, así como la disminución del área de sección celular (ASC) inducido por AII 1 μ M en células musculares lisas de aorta de rata en cultivo (CMLVR) y en células mesangiales de rata en cultivo (CMR). Este efecto preventivo de la CAT también se repitió cuando las células eran tratadas con otro agonista contráctil el PAF (1 μ M). La peroxidasa de rábano bloqueó la reducción del ASC producida por AII y PAF en ambos tipos celulares. Por otra parte en CMLVR la catalasa es capaz de abolir completamente el pico de calcio producido por AII 1 μ M, de una forma dosis dependiente. En células cargadas con CAT (la concentración de CAT intracelular aumentaba 3 veces) la AII no aumentaba la concentración intracelular de calcio. En conclusión, estos resultados apuntan al H₂O₂ como un metabolito crítico en la regulación de la contracción celular que parece regular la liberación de calcio dependiente de IP₃.

6

IMPORTANCIA DE LA PROTEINA DE SHOCK TERMICO 84 ((Hsp84) EN LA RESPUESTA ANTINFLAMATORIA DE LOS GLUCOCORTICOIDES (GC).

D. Rodríguez-Puyol*, A. Bellocq, S. Doublier, S. Suberville, J. Pérez, B. Escoubet, B. Fouqueray, L. Baud. *Sección de Nefrología, Hospital Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá y Unidades 426 y 489 INSERM, Paris.

Los GC son fundamentales en el tratamiento de múltiples enfermedades renales, pero la respuesta clínica es limitada. La posible modulación de su eficacia antiinflamatoria puede resultar de gran utilidad. Los presentes experimentos se realizaron para evaluar los mecanismos de potenciación de la eficacia antiinflamatoria de los GC por parte de la somatostatina (ST). En macrófagos murinos, la ST incrementó el número de receptores de GC (77.9 vs 39.0 pmoles/mg proteína, p < 0.05) sin modificar su afinidad. El efecto fue máximo con ST 10 nM y entre 8 y 24 h. Este incremento no se asoció a un aumento del ARNm (ensayo de protección con ribonucleasa) y del contenido proteico (western blot) del receptor de GC, sino a una mayor estabilidad de uno de los componentes del receptor de GC, la proteína Hsp84. La degradación de esta proteína, cuyo ARN no aumentó tras la incubación con ST (RT-PCR semicuantitativa), disminuyó en presencia del péptido. Esta disminución de la degradación de Hsp84 parece ser debida a una disminución de la actividad de la calpaina intracelular (medida mediante fluorimetría, utilizando Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) ya que a) la ST inhibe la actividad basal (214 \pm 16 pmol/min/pocillo) de la calpaina celular de forma dosis dependiente, b) los inhibidores de las proteasas intracelulares (Inhibidor I de la calpaina y calpeptina) aumentan la fijación de los GC a su receptor y c) la degradación de Hsp84 es también bloqueada por estos inhibidores. La potenciación del efecto antiinflamatorio de los GC tras el bloqueo de la actividad calpaina se confirmó evaluando la inhibición de la óxido nítrico sintetasa inducible (síntesis de nitritos) por parte de la dexametasona, en células incubadas con lipopolisacárido. En este sistema, la calpeptina potenció de forma significativa el efecto inhibitorio de la dexametasona. En resumen, los presentes experimentos sugieren la posibilidad de poder modular la respuesta clínica a los GC mediante la estabilización de Hsp84, un efecto que parece depender de la calpaina.

8

MODULACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS POR LAS PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

L. González-Santiago, S. López-Ongil, J. A. Martínez-Torres, C. Pérez Caballero, R. Ortega, M. Rodríguez-Puyol.

Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, España.
El colágeno tipo I es uno de los componentes mayoritarios de la matriz extracelular en condiciones fisiopatológicas. Los siguientes experimentos se diseñaron para analizar la influencia de colágeno tipo I en los patrones de síntesis de factores endoteliales vasoactivos (óxido nítrico y endotelina). Para ello, se cultivaron HuVEC en colágeno IV (Col.IV) como matriz fisiológica, y en colágeno I (Col.I) como sustrato patológico. Se cuantificó la producción de nitritos y la conversión de L-arginina a L-citrulina como medida de la actividad de la óxido nítrico sintetasa constitutiva endotelial (eNOS) y la producción de endotelina en distintas condiciones experimentales. Se estudió el mRNA de eNOS y de la preproendotelina-1 (prepro-1) por Northern blot. La síntesis basal de nitritos y de citrulina disminuyó en células crecidas en Col.I con respecto a las crecidas en Col.IV. Tras estimular con Ciclosporina A (CsA) 1 μ M y con glucosa oxidasa (GO) 1 mU/ml, durante 24h, la síntesis de nitritos y la producción de citrulina aumentó en células crecidas en Col.IV. Los siguientes valores corresponden a los tratamientos con CsA y GO respectivamente (%Nitritos: 221,228 vs Control; %Citrulina: 172,152 vs Control). Sin embargo, este incremento no se observó en las células cultivadas en Col.I (%Nitritos: 110,104 vs Control; %Citrulina: 114,65 vs Control). Por otra parte, mientras que la producción basal de endotelina estaba aumentada en células en colágeno I (Col.I: 17.14, Col.I: 21.45 fmoles/ml), no se observaron diferencias entre matrices cuando las células eran tratadas con CsA y GO. Con respecto a la expresión de eNOS en condiciones basales, se observó que en HuVEC en Col.I estaba disminuida en un 41% con respecto al IV, mientras que el mRNA de prepro-1 se encontraba incrementado (146%). Después del tratamiento con CsA, no existían diferencias en la expresión de eNOS (Col.IV: 103%, Col.I: 112%) y prepro-1 (Col.IV: 117%, Col.I: 86%) entre las dos matrices. Cuando las células fueron tratadas con GO, el mRNA de eNOS aumentó, pero únicamente en las cultivadas sobre Col.IV (Col.IV: 143%, Col.I: 86%). La expresión de prepro-1 no se modificó en ningún caso. Estos resultados sugieren que la matriz extracelular podría estar modulando los patrones de síntesis de los factores endoteliales vasoactivos en patologías vasculares caracterizadas por la presencia de una matriz anormal.

9

EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN RENOVASCULAR SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN RENAL DE RATAS DIABÉTICAS

Gallego B, Arévalo M*, Flores O, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. Departamento de Fisiología y Farmacología. *Departamento de Anatomía e Histología. Universidad de Salamanca. España.

La hipertensión es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de nefropatía en la diabetes mellitus. Con el fin de separar los efectos debidos a las alteraciones hemodinámicas de las alteraciones metabólicas típicas de la diabetes, hemos combinado un modelo de hipertensión renovascular progresiva (coartación de la aorta entre las dos arterias renales) con la diabetes inducida por estreptozotocina, lo que permite tener dos riñones sometidos a distinta presión de perfusión en el mismo entorno metabólico. Tres meses después de la coartación, se determinan la tasa de filtración glomerular (TFG), el flujo plasmático renal (FPR), tanto del riñón situado por encima (DE) como del situado por debajo (IZ) de la ligadura. También se determina la presión de perfusión (PP) y la proteinuria (PU) de cada riñón. Los animales diabéticos se dividieron en dos grupos: afectados (DI-AF), en los que aumenta la proteinuria del riñón hipertenso, y no afectados (DI-NAF), en los que no aumenta. La fibrosis glomerular e intersticial se cuantifica en secciones renales, teñidas con rojo sirio, por un sistema de análisis de imagen digital. Los resultados de área (μm^2) de sección corpuscular (CORP), del floculo (FLO), mesangial (MES), e intersticial (INT), expresados como medianas, se muestran en la tabla inferior.

GRUPO	TFG DE ml/min	TFG IZ ml/min	FPR DE ml/min	FPR IZ ml/min	PP DE mm Hg	PP IZ mm Hg	PU DE $\mu\text{g}/30\text{ min}$	PU IZ $\mu\text{g}/30\text{ min}$
COAR(23)	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	5.0 ± 0.6	4.9 ± 0.4	175 ± 7	128 ± 5	512 ± 61*	361 ± 38
DI-AF(10)	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	5.5 ± 0.6	5.0 ± 0.5	167 ± 10	140 ± 5	770 ± 196**	421 ± 70
DI-NAF(15)	2.0 ± 0.1*	1.9 ± 0.1*	5.7 ± 0.5	5.2 ± 0.4	183 ± 10	145 ± 4*	322 ± 49*	484 ± 62

GRUPO	CORP DE	CORP IZ	FLO DE	FLO IZ	MES DE	MES IZ	INT DE	INT IZ
COAR(23)	10733	10734	9255*	9078	2656*	2365	11774#	12150
DI-AF(10)	12015*	11279*	10502*	9942*	2950*	2881*	11869*	14860*
DI-NAF(15)	11677*	11463*	10015*	9758*	2950*	2721*	14400*	14953*

* $p < 0.05$ vs coartación, § $p < 0.05$ vs di-af # $p < 0.05$ vs riñón izquierdo

La valoración semicuantitativa de TGF- β , observada por inmunohistoquímica revela que la expresión glomerular mayor se encuentra en el riñón derecho del grupo DI-AF y la menor en el riñón izquierdo del grupo coartación (COAR). En el intersticio no se detecta expresión.

Estos resultados demuestran que la hipertensión glomerular y la hiperglucemia actúan de forma sinérgica en la alteración de la estructura y función renal y que el TGF- β está implicado en dicha alteración.

MEDIACION DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO EN LA ACTIVACION MESANGIAL INDUCIDA POR GENTAMICINA

C. Martínez-Salgado, N. Eleno, P. Tavares², J. García-Criado¹, A. Rodríguez-Barbero y J.M. López-Novoa. Dept. Fisiología y Farmacología, e Instituto "Reina Sofía" de Investigación Nefrológica y ¹Dept. Cirugía (Univ. Salamanca), ²Dept. Farmacología e Terapéutica Experimental (Univ. Coimbra, Portugal)

Introducción. Los radicales libres del oxígeno (RLO) median la reducción de la tasa de filtración glomerular observada después del tratamiento con gentamicina (G) in vivo. Previamente hemos demostrado que la G tiene un efecto contráctil y proliferativo sobre células mesangiales en cultivo (CM) dependiente de la concentración. En este trabajo se estudia la posible mediación de RLO sobre la activación mesangial inducida por G (10^{-5}M).

Métodos. Se emplean cultivos primarios de células mesangiales aisladas de glomérulos de rata. Se hacen estudios de contracción (midiendo la reducción del área de la superficie plana celular) y proliferación mesangial (determinando la síntesis de DNA mediante la incorporación de timidina-[³H], y el número de células viables por una técnica colorimétrica con cristal violeta). Se determina la síntesis de O_2^- (método basado en la reducción del citocromo C por O_2^-) y de H_2O_2 (midiendo fluorimétricamente la oxidación de la dihidrorodamina a rodamina). La peroxidación lipídica se determina por un método basado en la medida del malondialdehído producido por la reacción del ácido tiobarbitúrico con los peróxidos lipídicos. Los cambios en fluidez de membrana se determinan midiendo los cambios en anisotropía producidos en la sonda fluorescente hidrofóbica que se une a la membrana difenilhexatrieno, y en su derivado catiónico. Los resultados se expresan como media \pm EEM. Las comparaciones de medias se realiza mediante análisis de varianza.

Resultados. Las células mesangiales se contraen en presencia de $\text{G}10^{-5}\text{M}$. Este efecto aumenta en función del tiempo (0-60 min). Además, $\text{G}10^{-5}\text{M}$ aumenta la síntesis de DNA y el número de células viables. La preincubación con dos enzimas barrenderos de RLO, superóxido dismutasa (SOD, 15 U/ml) y catalasa (CAT, 80 U/ml) inhibe la contracción y proliferación inducida por G hasta niveles basales. Dos donadores de O_2^- como son el sistema xantina-xantina oxidada (X $0,2\text{mM} + \text{XO } 2\text{mU/ml}$) y dimetoxinaftoquinona (DMNQ, 2uM) producen, al igual que la G, contracción y proliferación mesangial. Las CM incubadas (1-24 horas) con $\text{G}10^{-5}\text{M}$ muestran una producción constante de O_2^- ($12,75 \text{ nmol } \text{O}_2^- \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). No se ha detectado producción de H_2O_2 (0,0002-0,1%), peroxidación lipídica ni cambios en la fluidez de la membrana

Conclusiones. La G no ejerce un efecto necrótico o citotóxico directo sobre las células mesangiales. Es posible que la cantidad de RLO liberados en las CM estimuladas con G actúen como mediadores de la contracción y proliferación mesangial inducidas por G.

11

EXPRESIÓN Y EVIDENCIA FUNCIONAL DE LAS INTEGRINA $\beta 1$ ACTIVADAS EN EL DAÑO RENAL POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

E. Navarro, A. Martín, C. Correa, E. Escudero, E. Nieto, J. Pascual, R. Fernández Espino, E. Mampaso. Servicio de Anatomía Patológica, Nefrología y Cirugía Experimental. Hospital Ramón y Cajal. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

En la pérdida de la integridad de la estructura del túbulo renal durante el daño isquémico subletal con desprendimiento de las células epiteliales tubulares y descamación hacia la luz con oclusión por la formación de cilindros, van a jugar un papel decisivo las alteraciones en la estructura, función y distribución de un grupo de proteínas adhesivas denominadas integrinas. Estos receptores de adhesión que intervienen en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular pueden además incrementar las interacciones homotípicas y heterotípicas de las propias células descamadas, facilitando la obstrucción tubular. La integrinas $\beta 1$ o moléculas VLA comprenden un subgrupo de la familia de las integrinas que se expresa en la cara basolateral de la célula epitelial y que facilita su unión a la membrana basal tubular. En la familia de las integrinas $\beta 1$ se ha descrito la existencia de una región reguladora específica cuya expresión se relaciona con la activación celular y unión al ligando y que es reconocida por un Ac denominado HUTS-21, el cual, presenta reacción cruzada con una región de activación similar en la cadena $\beta 1$ de rata.

El objetivo del presente estudio pretende examinar el papel que las integrinas $\beta 1$ activadas puedan tener en el desprendimiento de las células epiteliales y posterior formación de cilindros en el modelo de daño por isquemia-reperfusión en la rata. Con tal propósito, 21 machos de la cepa Sprague-Dawley se sometieron a clampaje bilateral de la arteria renal durante 50-60 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se procedió al restablecimiento del flujo sanguíneo dividiendo a las ratas en grupos de 0, 1, 3, 6, 24, 48h y 72h, y una semana post-isquemia. En los distintos tiempos se extrajeron ambos riñones para su estudio por microscopía óptica e inmunofluorescencia indirecta. El daño renal inducido como consecuencia de la isquemia (necrosis tubular y formación de cilindros) fue patente desde tiempos muy cortos (1h. post-reperfusión), siendo la gravedad de estas lesiones morfológicas máxima tras 24h. de reperfusión para aminorar 1 semana después. Por otra parte, el estudio por inmunofluorescencia indirecta mostró una cinética de la expresión de integrinas $\beta 1$ activadas en relación con la evolución de la lesión de la célula epitelial. Así pudimos demostrar positividad para el Ac HUTS-21 en la cara basal de células tubulares dañadas pero no desprendidas, en la porción apical de aquellas células parcialmente desprendidas y en la membrana celular de aquellas otras células totalmente desprendidas y formadoras de cilindros.

Estos resultados sugieren un papel importante de las integrinas $\beta 1$ activadas en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del túbulo renal, lo que posibilitaría el diseño de nuevas estrategias terapéuticas frente al daño renal isquémico.

PAPEL DE LA PROTEINA RELACIONADA CON LA PARATHORMONA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

S. Santos, R. Gazapo*, J.L. Sarasa**, J. Egidio y P. Esbrit. U. de Investigación, Bioquímica Clínica* y A. Patológica**, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Introducción: La regeneración renal tras el fracaso renal agudo parece mediada por la acción de factores de crecimiento (EGF, IGF-I). La proteína relacionada con la parathormona (PTH), PTHrP, se expresa en diversos tejidos normales, fetales y adultos, incluyendo el riñón. En este órgano y en células de túbulo proximal en cultivo, la producción de PTHrP aumenta tras la isquemia y la disminución brusca de ATP, respectivamente. Sin embargo, el papel de la PTHrP en los mecanismos de respuesta al daño renal es aún desconocido. En este estudio, hemos evaluado la expresión de PTHrP y su efecto como factor de crecimiento renal, en un modelo de fracaso renal agudo por ác. fólico (AF). Este modelo, a diferencia de la isquemia, se asocia a una intensa hiperplasia tubular con escasas áreas de necrosis.

Materiales y Métodos: Realizamos una única inyección i.p. de AF (250 mg/Kg) en ratas Wistar (250 g). A la 1,5 h tras el AF, algunos animales se trataron con una dosis única s.c. de PTH (1-34) o PTHrP (1-36), 3-50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A distintos tiempos, y tras anestesia, se extrajeron los riñones, que se procesaron para inmunohistoquímica y aislamiento de ARN. Este fue transcrito a ADNc que se amplificó por PCR con cebadores específicos para PTHrP o GAPDH (gen constitutivo).

Resultados: La función renal de las ratas empeoró rápidamente (1 h) tras el AF. Así, la creatinina en plasma y el BUN se mantuvieron elevados hasta el día 6 post-AF, siendo sus valores a las 24 h: $144 \pm 92 \mu\text{M}$ y $23 \pm 14 \text{ mM}$, respecto a los controles: $53 \pm 9 \mu\text{M}$ y $6 \pm 1 \text{ mM}$, respectivamente ($p < 0,01$). Hemos encontrado que a 1 h y a las 24 h tras el AF, el ARNm de la PTHrP en el riñón aumenta 3 y 2 veces, respectivamente, comparado con el de las ratas controles. Este aumento transitorio es similar al observado con el ARNm del c-fos, un gen asociado a la hiperplasia renal. Además, la inmunotinción tubular con anticuerpos que reconocen distintos epítopos de la PTHrP aumentó significativamente desde las 6 h tras el AF. La administración de PTH (1-34) o PTHrP (1-36) indujo un aumento de proliferación tubular, evaluada por inmunotinción con un anticuerpo que reconoce el antígeno de proliferación nuclear (PC10), asociado a un ligero ($p < 0,05$) aumento transitorio (24 h) de BUN y creatinina plasmática, sin cambios significativos en la calcemia.

Conclusiones: La PTHrP producida tras el daño renal agudo se asocia a la respuesta proliferativa tubular. Paradójicamente, la inyección de PTH o PTHrP se asoció a un empeoramiento de la función renal de las ratas tratadas con AF. Este efecto podría estar mediado por la posible acción de estos péptidos sobre la producción intrarenal de angiotensina II.

10

12

DISMINUCION DE LA PROGRESION DE LA ENFERMEDAD RENAL EN RATAS CON ABLACION RENAL

J.C. Rodríguez Pérez, A. Anabitarte, A. Losada, J. Cabrera Galvan, F. Rodríguez Esparragón, L. Palop, C. Plaza. Unidad de Investigación-Servicio de Nefrología, Hospital Ntra Sra del Pino. Las Palmas de Gran Canaria.

La hipertensión arterial juega un importante papel en la progresión de la glomeruloesclerosis (GES) tras pérdida de masa renal. Los fármacos antihipertensivos tienen diferentes efectos sobre la hemodinámica y morfología renal. Hemos utilizado el modelo de rata con 5/6 de nefrectomía (Nx). Cincuenta y cuatro ratas Sprague-Dawley fueron distribuidas en 5 grupos. I: 5/6 Nx no tratado, II: Sham, III: 5/6 Nx tratadas con carvedilol (CVD) a dosis de 5 mg/kg/d, IV: 5/6 Nx con CVD a 10 mg/kg/d y V: 5/6 Nx con CVD a 20 mg/kg/d. El protocolo experimental incluyó tomas de PA en la cola de la rata y determinaciones de proteinuria basal, 3, 5 y 11 semanas de tratamiento. Al final del estudio se obtuvo sangre para creatinina (Cr), así como el riñón remanente para estudio morfológico que incluía score de GES (Saito y col, *Kidney Int*, 1987) y el volumen del ovillo glomerular [VG=1.25 x (A_G)^{0.72}] (Weibel ER, 1979). A las 11 semanas se evidenció una disminución significativa de la U_{prot} V en todos los grupos tratados 170.3±13.4 (P<0.001), 163±8.1 (P<0.001) y 25±3.9 (P<0.001) respecto al grupo no tratado 712±76 mg/d. y a la muestra basal. La PAM disminuyó significativamente tras 11 semanas de tratamiento solo cuando se utilizaron las dosis de 10 (P<0.01) y 20 mg/kg/d (P<0.001) de CVD. La Cr sérica fue significativamente inferior en el grupo sham y en los animales tratados (P<0.01). El tamaño renal disminuyó en el grupo tratado. Se analizaron 115 glom. por rata. Se obtuvieron cinco valores de GES para cada glom. de acuerdo a la extensión de la esclerosis incluido el nº de glom. intactos. Los grupos tratados mostraron menor GES, siendo estas diferencias significativas respecto al no tratado (chi² con corrección de Yates). El VG (VG x 10⁶ µm³) se muestra:

Grupo I: 3.51 ± 0.015	Grupo IV vs Grupo I: P< 0.01; t= 0.0025. Grupo V vs Grupo I: P< 0.01; t= 0.0025. Grupo II vs Grupo I: P< 0.01; t= 0.09.
Grupo II: 0.86 ± 0.05	Grupo V vs Grupo III: P< 0.01; t= 0.0025. Grupo III vs Grupo II: P< 0.01; t= 0.09. Grupo IV vs Grupo II: P< 0.01; t= 0.09. Grupo IV vs Grupo II: P< 0.01; t= 0.09.
Grupo III: 3.09 ± 0.015	Grupo V vs Grupo II: P< 0.01; t= 0.09. Grupo IV vs Grupo II: P< 0.01; t= 0.09. Grupo V vs Grupo II: P< 0.01; t= 0.09.
Grupo IV: 2.88 ± 0.30	Contrario a los beta-bloqueadores clásicos no selectivos y a los alfa-bloqueantes postsinápticos, el CVD mejora la función renal incluso en los grupos tratados con dosis
Grupo V: 2.40 ± 0.30	no antihipertensivas, acompañándose de una reducción de la proteinuria, reducción en el score de GES y una reducción del VG. Estos hallazgos, apoyan la existencia de propiedades renoprotectoras del CVD mas semejantes a otros grupos de drogas antihipertensivas como los calcio-antagonistas o inhibidores de la ECA. Si estos efectos renoprotectores se vehiculizan a través del bloqueo de alguna de las vías de señalización de la Angio II, están por definir.

no antihipertensivas, acompañándose de una reducción de la proteinuria, reducción en el score de GES y una reducción del VG. Estos hallazgos, apoyan la existencia de propiedades renoprotectoras del CVD mas semejantes a otros grupos de drogas antihipertensivas como los calcio-antagonistas o inhibidores de la ECA. Si estos efectos renoprotectores se vehiculizan a través del bloqueo de alguna de las vías de señalización de la Angio II, están por definir.

EL TRATAMIENTO AGUDO CON T₃ INHIBE LA RESPUESTA A VASOCONSTRICTORES EN RIÑÓN AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA: PAPEL DE LOS MEDIADORES ENDOTELIALES.

Lorente O, Wangenstein R, De Gracia MC*, Osuna A*, Vargas F. Dpto Fisiología Facultad. de Medicina. * Serv. Nefrología U.Experimental. H.U. "Virgen de las Nieves". Granada

INTRODUCCION.-La administración aguda de T₃ produce una disminución de la resistencia sistémica y en la tira de aorta así como en células de músculo liso vascular procedentes de cultivos primarios de aorta de rata produce vasodilatación. Esta acción vasodilatadora se produce en tiras de aorta con y sin endotelio, lo que indica que en vasos de conducción este efecto no esta mediado por factores relajantes derivados de endotelio.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) analizar el efecto agudo de T₃ en vasos de resistencia sobre la respuesta a vasoconstrictores (VC). b) determinar la posible participación de los mediadores endoteliales en dicha respuesta.

MATERIAL Y METODOS.-Se estudió el efecto agudo de T₃ (10 mM) sobre las curvas dosis-respuesta a angiotensina II (AII) y fenilefrina (Fe) en riñón aislado y perfundido de rata. Además en riñones tratados y no tratados con T₃ la respuesta a AII y Fe fue analizada en las siguientes situaciones: 1) sin tratamiento, 2) después de L-NAME (10-4M), 3) después de azul de metileno (10-5M), 4) después de tetraetilamonio (3x10-3M). Todos los inhibidores fueron añadidos a la solución de perfusión 30' antes de la administración de los vasoconstrictores.

RESULTADOS.-El tratamiento con T₃ produce una marcada atenuación de la curva dosis respuesta a AII y Fe. La administración de L-NAME o de TEA mejoran la respuesta a ambos VC aunque no se llega a normalizar. El azul de metileno no modifica significativamente el efecto inhibidor de la T₃.

CONCLUSIONES.-Estos resultados indican que la T₃ tiene un importante efecto antivasoconstrictor en la vasculatura renal en el cual parecen estar implicados el factor hiperpolarizante derivado de endotelio y el óxido nítrico, aunque dicho efecto no parece estar mediado por el GMPc.

EFFECTO VASODILATADOR E HIPOTENSOR DEL L-NAME A DOSIS ALTAS EN DISTINTAS PREPARACIONES Y EN RATA ENTERA.

Wangenstein R, de Gracia MC*, Osuna A*, Lorente O, Vargas F. Dpto de Fisiología. Facultad de Medicina. Serv. de Nefrología y U. Experimental. H. U. "Virgen de las Nieves". Granada.

Introducción. El L-NAME es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) que provoca una elevación del tono vascular al impedir la formación de óxido nítrico (NO). **Objetivos.** 1. Analizar el efecto de dosis altas de L-NAME sobre el lecho vascular renal y cuartos traseros. 2. Estudiar el efecto de dosis crecientes de L-NAME en rata entera.

Material y métodos. A) Se administraron dosis crecientes de L-NAME desde 10⁻⁶ M hasta 5.10⁻³ M en riñón aislado y perfundido de rata precontraído con fenilefrina 10⁻⁶ M. En cuartos traseros se infundió la dosis de 5.10⁻³ M. B) Se realizaron curvas dosis-respuesta a vasoconstrictores (fenilefrina, angiotensina II y cloruro bórico) y vasodilatadores (nitroprusiato (NP) y acetilcolina (Ach)) en presencia de L-NAME 5.10⁻³ M en riñón aislado y perfundido. C) En ambas preparaciones se infundieron distintos inhibidores 15 minutos antes de comenzar la infusión de L-NAME: azul de metileno (AM) 10⁻⁵ M, KCl 80 mM, tetraetilamonio (TEA) 3.10⁻³ M, indometacina 10⁻⁵ M y ouabaina 10 µM + BaCl₂ 30 µM. En riñón aislado se infundió arginina 5.10⁻³ M y D-NAME 5.10⁻³ M. D) En rata entera anestesiada con Inactin se administraron dosis bolus crecientes de L-NAME desde 50 mg/kg hasta 500 mg/kg.

Resultados. A) Se obtuvieron respuestas vasoconstrictoras crecientes en las dosis de L-NAME 10⁻⁶, 10⁻⁵ y 10⁻⁴ M, pero en las dosis de 10⁻³ y 5.10⁻³ M, las respuestas fueron vasodilatadoras. En cuartos traseros también se obtuvo una respuesta vasodilatadora. B) Las curvas dosis-respuesta a todos los vasoconstrictores estaban atenuadas en presencia de L-NAME 5.10⁻³ M. La curva dosis-respuesta a Ach estaba atenuada, mientras que la de NP estaba potenciada. C) La presencia de AM o de indometacina no atenuaba la vasodilatación producida por L-NAME. Tanto el KCl como la ouabaina + BaCl₂ inhibían dicha vasodilatación. La arginina producía una vasodilatación mucho menor que la del L-NAME a la misma concentración, pero con D-NAME se obtuvo una vasodilatación similar a la del L-NAME. D) En la rata entera, se produjeron descensos crecientes de presión arterial a partir de la dosis de 100 mg/kg.

Conclusiones. El L-NAME a dosis altas produce una potente vasodilatación en distintas preparaciones, atenuando las respuestas a vasoconstrictores, y potenciando las respuestas a vasodilatadores no dependientes de endotelio. Esta vasodilatación no está mediada por NO ni prostaglandinas, y parece deberse a un efecto hiperpolarizante. El L-NAME también tiene un efecto hipotensor en la rata entera.

EFFECTO DEL LOSARTAN SOBRE ACTIVACIÓN DE PLAQUETAS HUMANAS.

J.L. Guerra, M. Montón, S. Casado, J.A. Rodríguez-Feo, A.M. Jiménez, F. González-Fernández, L. Rico, R. García, J. Gómez, J. Farré, A. Nuñez, A. López-Farré. Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Estudios previos han demostrado que el losartán podría bloquear el receptor del Tromboxano A₂ (TXA₂) sobre la pared vascular. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del losartán sobre la activación de plaquetas humanas. Las plaquetas fueron obtenidas de 15 voluntarios sanos varones de edades comprendidas entre los 26 y 40 años. La activación de las plaquetas fueron medidas por cambios en la transmisión de luz del plasma rico en plaquetas estimuladas por un análogo del TXA₂, U46619 (5x10⁻⁶ mol/L). La agregación de plaquetas estimuladas por el U46619 fue significativamente inhibida por losartán de forma dosis dependiente. Sólo altas dosis de EXP3174 (5x10⁻⁵ mol/L), el metabolito activo del losartán in vivo, fue capaz de atenuar la activación de plaquetas inducidas por el U46619. Captopril (5x10⁻⁵ mol/L), un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II, no modificó la agregación de las plaquetas inducida por el U46619. Además, la unión del [H³]-U46619 sobre los receptores de TXA₂ de las plaquetas fue desplazada de forma competitiva por losartán, mientras que sólo altas dosis del EXP 3174 (5x10⁻⁵ mol/L) desplazó la unión del [H³]-U46619. El Captopril no modificó el desplazamiento de la unión del [H³]-U46619 sobre los receptores de las plaquetas. A pesar que las plaquetas expresan receptores de tipo AT-1, determinado mediante Western blot, la Angiotensina II de forma exógena no produjo ninguna modificación de la agregación de plaquetas estimulada por U46619. En conclusión, el losartán disminuyó la agregación de plaquetas humanas desplazando la intracción del TXA₂ con su receptor plaquetario. Este efecto fue independiente de los receptores de tipo AT-1 de la Angiotensina II. El EXP 3174 mostró una potencia menor que el losartán en reducir la activación de plaquetas por este mecanismo TXA₂-dependiente. El Captopril y la Angiotensina II exógena no tuvieron efecto sobre la activación de plaquetas humanas. Estos resultados sugieren que independientemente de la acción de la Angiotensina II, el losartán redujo la activación de plaquetas inhibiendo la acción del TXA₂.

17

EXPRESION DE LA OXIDO NITRICO SINTASA EN CELULAS ENDOTELIALES Y MESOTELIALES DE PERITONEO HUMANO. REGULACION POR EL LIPOPOLISACARIDO DE E.COLI.

M. Arriero, J.A. Rodriguez-Feo, A. Reyero, A. Cedrán, O. Frieyro, L. Sánchez de Miguél, M. Montón, J.I. Guerra-Cuesta, A. López-Farré, S. Casado. Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.

Los cambios en la expresión de la Oxido Nítrico Sintasa endotelial (NOSe) en el peritoneo durante situaciones en las que se producen un proceso inflamatorio, como es el caso de la peritonitis, podrían estar relacionados con la disfunción mesotelial demostrada en estas patologías. Recientemente hemos demostrado en células endoteliales bovinas, la existencia de una proteína citosólica que se une a la región 3'-UTR del ARNm de la NOSe que no se codifica para proteína y que podría estar implicada en la estabilización del ARN mensajero de (ARNm) de esta enzima.

En el presente trabajo intentamos analizar el efecto de la endotoxina sobre la expresión de la NOSe en células endoteliales y mesoteliales peritoneales y asociada con la presencia en el tejido peritoneal de la proteína involucrada en la depresión del ARNm de la NOSe. Se utilizaron muestras de peritoneo humano que se incubaron a diferentes tiempos con Lipopolisacárido de E. Coli (LPS, 10µg/ml) para simular una situación de inflamación. Se determinó por medio de Northern Blot la vida media del ARNm de la NOSe y por Western Blot e inmunohistoquímica la expresión de la NOSe. Mediante geles de retardo se midió la unión de la proteína citosólica con el ARNm de la NOSe y su identificación se realizó mediante técnicas de "Cross-linking".

El LPS acorta la vida media del ARNm de la NOSe, reduciendo su expresión en células endoteliales y mesoteliales del peritoneo humano. En condiciones basales, muestras de peritoneo humano expresaban proteínas citosólicas que se unieron a la región 3'UTR del ARNm de la NOSe. Dichas proteínas se identificaron, determinándose que el complejo ARNm proteína estaba constituido por una sola proteína de 60 Kda. Tras la incubación de muestras de peritoneo humano con LPS, la capacidad de unión de la proteína citosólica de 60KDa al ARNm de la NOSe, aumentó de forma significativa. La interacción de esta proteína de 60KDa ocurrió sobre una zona específica dentro de la región 3-UTR de la NOSe que ocupaba una longitud de 38 bases.

Tanto las células endoteliales y mesoteliales peritoneales expresan NOSe. El LPS disminuyó la expresión de la NOSe disminuyendo la vida media de su ARNm. Este efecto se asoció con una mayor interacción entre una proteína citosólica de 60 KDa y una región específica del ARNm de la NOSe localizada en la región 3'UTR. Futuros estudios determinarán la relación de este complejo proteico de 60KDa en la regulación de la expresión de la NOSe en las células peritoneales y en particular su implicación en la disfunción peritoneal asociada a situaciones de inflamación.

RENOPROTECCION LIGADA A BLOQUEO DE LA ACCION DE ANGIOTENSINA II. ¿INHIBIDORES DE LA ENZIMA DE CONVERSION, ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II O AMBOS? RESULTADOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEFRITIS PROLIFERATIVA CRONICA.

Segarra A, Arbós MA, Buscà B, Argelaguer X, Alvarez E, Griera E, Quiles MT, Schwartz S and Piera LL. Unidad de Investigación Servicio de Nefrología. CIBBIM. Hospital Valle Hebrón. Barcelona.

Objetivos: Análisis comparativo del efecto renoprotector de la inhibición de la acción de la angiotensina II utilizando un inhibidor de la enzima de conversión, un antagonista de receptor A de la angiotensina II o ambos asociados.

Método: A las 14 semanas de haber inducido una glomerulonefritis proliferativa mediante la administración de antc anti Thy1.1, 30 ratas Wistar macho fueron asignadas aleatoriamente para recibir tratamiento con enalapril (grupo 1), losartán(grupo 2) o enalapril + losartán (grupo 3) desde la semana 14 a la 20. Un cuarto grupo de 10 animales no recibió tratamiento y sirvió como control.

Los animales fueron sacrificados la semana 20 y se comparó la gravedad de la insuficiencia renal y la extensión de las lesiones de fibrosis intersticial observada en los 4 grupos utilizando técnicas inmunohistoquímicas y RT PCR para cuantificar la expresión de ARN m de colágeno III y TGF beta1.

Resultados: A las 14 semanas, todos los animales presentaron insuficiencia renal y proteinuria. A las 20 semanas, los 3 grupos de animales tratados presentaron cifras de creatinina sérica y proteinuria significativamente inferiores a los controles. Los animales del grupo 3 presentaron cifras de TAS y excreción urinaria de proteínas significativamente inferiores a la que se observaron en los grupos 2 y 3 mientras que la concentración sérica de creatinina fue similar en los tres grupos. A nivel histológico, los animales del grupo III presentaron una expresión de TGF beta1 y preproendotelina significativamente inferior pero no se observaron diferencias en la expresión de colágeno tipo III ni en la extensión de las lesiones de fibrosis intersticial.

Conclusiones: El efecto renoprotector de la inhibición de la acción de la angiotensina II obtenido por bloqueo del receptor A de la angiotensina es comparable al obtenido mediante inhibición de la enzima de conversión. La asociación de ambos, produce una mayor reducción en la excreción urinaria de proteínas y en la expresión de ARN de TGF b1 y preproendotelina que no se traduce en un menor grado de fibrosis intersticial.

19

EL BLOQUEO COMBINADO ANGIOTENSINA II -ENDOTELINA 1 REDUCE LA FIBROSIS INTERSTICIAL Y PRESERVA LA FUNCION RENAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEFRITIS PROLIFERATIVA CRONICA.

Segarra A, Arbós MA, Buscà B, Argelaguer X, Alvarez E, Griera E, Quiles MT, Schwartz S and Piera LL. Unidad de Investigación Servicio de Nefrología. CIBBIM. Hospital Valle Hebrón. Barcelona.

Objetivo: Analizar la eficacia del bloqueo combinado de la síntesis de angiotensina II y de los receptores A de la endotelina 1 en la prevención del desarrollo de fibrosis intersticial progresiva en un modelo de glomerulonefritis proliferativa crónica.

Métodos: Animales: 80 ratas Wistar macho de 250 grs de peso. Ocho semanas después de haber inducido una glomerulonefritis proliferativa mesangial crónica mediante la inyección intraperitoneal de dos dosis de antc anti Thy 1.1, los animales con excreción urinaria de proteínas > 200 mg/día fueron aleatoriamente asignados a 1 de 4 grupos: un grupo control que no recibió tratamiento (grupo 0) y tres grupos de intervención que fueron tratados con el inhibidor específico de los receptores A de la endotelina FR 139137 asociado a enalapril (grupo 1), enalapril (grupo2) o FR 139137 en monoterapia (grupo 3) desde la semana 10 a la semana 20.

A la semana 20, los animales fueron sacrificados y se comparó la gravedad de la insuficiencia renal y la extensión de las lesiones de fibrosis intersticial observada en los 4 grupos utilizando técnicas inmunohistoquímicas, RT PCR y Northern Blott para colágeno III, TGF beta1, receptor A de la endotelina y pre-proendotelina.

Resultados: Dos semanas después de la segunda dosis de anti thy 1, todos los animales presentaban insuficiencia renal, proteinuria y cifras tensionales elevadas sin diferencias significativas entre los 4 grupos. A las 20 semanas, los animales de los grupos 1,2 y 3 presentaban cifras de creatinina y proteinuria significativamente inferiores que las del grupo control. Los animales del grupo 1, presentaban cifras de tensión arterial, proteinuria creatinina, extensión de fibrosis intersticial y expresión de colágeno III, TGF beta 1 y RR A ET -1 significativamente inferiores a las de los demás grupos mientras que los grupos II y III, presentaban lesiones intersticiales similares y grados de insuficiencia renal y proteinuria comparables.

Conclusiones: El bloqueo combinado angiotensina II - endotelina 1, preservó la función renal y redujo la extensión de las lesiones de fibrosis intersticial en un modelo experimental de glomerulonefritis proliferativa crónica. Los efectos observados podrían ser consecuencia de un mayor efecto hipotensor, de una acción directa a nivel intersticial o de ambos.

EFFECTO COMPARATIVO DE 4 FARMACOS INMUNOSUPRESORES SOBRE EL INFILTRADO INTERSTICIAL Y LA EXPRESION RENAL DE TGF b1, PREPROENDOTELINA Y COLAGENO TIPO III EN LA FASE TARDIA DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEFRITIS PROLIFERATIVA CRONICA.

Segarra A, Arbós MA, Buscà B, Argelaguer X, Alvarez E, Griera E, Quiles MT, Schwartz S and Piera LL. Unidad de Investigación Servicio de Nefrología. CIBBIM. Hospital Valle Hebrón. Barcelona.

Objetivos: Determinar el efecto de 4 fármacos inmunosupresores sobre las lesiones intersticiales y la síntesis de mediadores profibrogénicos en la fase tardía de un modelo experimental de glomerulonefritis proliferativa crónica.

Métodos: Ocho semanas después de haber inducido una glomerulonefritis proliferativa mesangial crónica mediante la inyección intraperitoneal de dos dosis de antc anti Thy 1.1, 50 ratas Wistar macho de 250 grs de peso. fueron aleatoriamente asignadas a uno de 5 grupos de 10 animales: El grupo 1 no recibió tratamiento y sirvió como grupo control. Los grupos 2 a 5 fueron los grupos de intervención y fueron tratados desde la semana 8 a la 16 con prednisona (0,25 mg/día), azathioprina (0,20 mg/día), tacrolimus (0,02 mg/día) y micofenolato (0,01 mg/día) respectivamente. Los animales fueron sacrificados la semana 16 y se comparó la gravedad de la insuficiencia renal y la extensión de las lesiones de fibrosis intersticial observada en los 5 grupos utilizando técnicas inmunohistoquímicas y RT PCR semicuantitativo para colágeno III y TGF beta1.

Resultados: A las 8 semanas, todos los animales presentaron insuficiencia renal y proteinuria. Durante el seguimiento, los grupos 1 a 4, presentaron insuficiencia renal progresiva y proteinuria persistente mientras en el grupo 5, la función renal se mantuvo estable. A las 16 semanas, la cifra de creatinina sérica fue de 2.16 (0.3), 2.3(0.6), 2.11(0.4), 1.98 (0.1) y 1.68 (0.47) respectivamente (p<0.001) y la excreción urinaria de proteínas fue de 0.52 (0.17), 0.82(0.21), 0.72 (0.22), 0.45 (0.11) y 0.21 (0.1) respectivamente (p<0.001). En relación a las demás grupos, en el grupo 5 se apreció una fibrosis intersticial significativamente menor y menor expresión de TGF beta 1 y colágeno III.

Conclusiones: En la fase crónica de inflamación y fibrosis intersticial asociada a glomerulonefritis proliferativa, el micofenolato mofetil fue el único fármaco inmunosupresor capaz de entelecer la progresión de la insuficiencia renal y de reducir significativamente la expresión de TGF beta 1 y colágeno III.

18

20

TRATAMIENTO DE LA NEFROPATIA LUPICA EXPERIMENTAL (NZB/WF) CON RAPAMICINA Y MICOFENOLATO MOFETIL.

Piñera C, Ramos A. ¹Buella L. ²de Cos MA. ³Setién MA. ⁴de Francisco ALM. Arias M. Servicios de Nefrología. ¹Patología. ²Farmacología HUM Valdecilla. Santander. España. **INTRODUCCION:** Ratonés NZB/WF; desarrollan una enfermedad autoinmune similar al lupus humano, caracterizada por aparición de múltiples autoAc y el desarrollo de glomerulonefritis mortal. En su patogénesis juegan un papel central las células linfoides. Por ello, la actual búsqueda de alternativas terapéuticas incluye ensayos con los nuevos inmunosupresores. Micofenolato mofetil (MMF) es un inhibidor potente, selectivo, no competitivo y reversible del IMPD, inhibiendo la síntesis de novo de purinas, efecto más potente en los linfocitos que en otras células, habiéndose comprobado que *in vitro* bloquea la formación de Ac. Rapamicina se une a FKBP12 formando complejos RAP-inmunofilina, que bloquean la función de la proteína mTOR, interfiriendo la progresión del ciclo celular de fase G1 a S provocada por los factores de activación.

OBJETIVO: Evaluar las modificaciones clínicas serológicas y anatomopatológicas de la enfermedad autoinmune en los ratones NZB/WF, tratados con MMF o rapamicina.

MÉTODOS: Se emplearon ratones hembras, que recibieron tratamiento a partir de las 12 semanas de vida. A) Terapéuticas administradas (vía ip): 1) MMF (30 mg/Kg/día), 2) rapamicina (1 mg/Kg/día), 3) dexametasona (1 mg/Kg/día), 4) dosis equivalentes del solvente empleado en administración de MMF y rapamicina. 5) animales no tratados. (Cada grupo con 5 animales). B) Evaluación de la enfermedad: 1) Niveles séricos de Ac anti-ssDNA analizados mediante ELISA. 2) Proteinuria. 3) Valoración semi-cuantitativa por microscopía óptica de cortes de tejido renal teñidos con hematoxilina-eosina. 4) Control de niveles plasmáticos de fármacos por técnica EMIT.

RESULTADOS: (D.O. = densidad óptica. Prt = Proteinuria)

Tratamiento	10 semanas				36 semanas			
	Prot	ssDNA	dsDNA	AP	Prot	ssDNA	dsDNA	AP
Unidades	mg/dl	D.O.	D.O.	mg/dl	D.O.	D.O.	D.O.	LG
MMF	5±0	57±6	117±7	100±0	2014±309	2520±181	+++	
Rapamicina	20±14	84±32	122±7	30±0	143±18	148±3	0	
Dexametasona	15±14	468±886	354±517	100±0	539±734	603±791	0	
Solvente	15±14	121±8	121±8	1366±1097	1107±938	1359±899	+++	
No tratados	15±14	88±19	115±6	2000±0	1210±262	2024±790	++++	

La lesión glomerular (LG) se caracteriza por aumento de matriz mesangial y de su densidad celular. Presencia de infiltrados de apariencia inmunoblástica de localización perivascular y en pelvis renal. Los niveles plasmáticos de MMF estuvieron entre 8 y 25 µg/ml y de rapamicina por encima de 30 ng/ml.

CONCLUSION: El tratamiento de las ratonas NZB/WF, con micofenolato mofetil, aunque no impide la aparición de autoAc, si es capaz de aminorar las lesiones renales propias de la enfermedad autoinmune. El tratamiento con rapamicina de las ratonas NZB/WF, evita la aparición de Ac anti-ssDNA y anti-dsDNA, así como el desarrollo de lesiones renales típicas de la enfermedad.

NEFROPATIA CRÓNICA INDUCIDA POR ISQUEMIA FRÍA EN UN MODELO DE TRASPLANTE RENAL SINGÉNICO. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DEL PAF.

J. Herrero, J. Torras, JM Cruzado, N. Lloberas, M. Riera, E. Condom, M. Merlos, X. Fulladosa, J. Alsina, JM Grinyó, Lab. Nefrología Esp. UB. S. Nefrología. Hosp. Bellvitge. CSUB. L'Hospitalet. Barcelona.

Entre los factores no inmunológicos que intervienen en el desarrollo de la nefropatía crónica del trasplante (NCT) se encuentra la isquemia fría aunque su efecto en ausencia de aloreactividad no ha sido estudiado. En riñón nativo habíamos demostrado que la administración crónica de un antagonista del PAF (UR12670) ofrecía protección sobre la lesión renal crónica provocada por isquemia caliente. Nos planteamos pues, estudiar si la isquemia fría es capaz de inducir NCT y si la administración crónica de UR12670 ofrece protección frente a esta lesión.

Diseño: Se utilizó un modelo de trasplante renal (Tx) inmediato o tras 5 horas de preservación en EC a 4°C (IF) entre ratas singénicas. Se administró ciclosporina (CsA, 5mg/Kg) durante 15 días post-Tx. Experimentos preliminares mostraron que 5h de IF + CsA ofrecen un grado de insuficiencia renal post-Tx similar a la de la clínica humana con una supervivencia aceptable. **Grupos:** Sy(n=9): Tx sin IF; SyI(n=10): Tx tras IF; SyUr(n=9): Tx tras IF+ UR12670 (20 mg/Kg/día) desde el día del Tx hasta el fin del estudio. **Seguimiento:** 24 semanas. Cada 4 semanas se determinó creatinina plasmática (Cr, µmol/L) y proteinuria (Prt, mg/24h). Sobre el tejido renal (24 sem.) se valoró el daño glomerular y se realizó análisis semicuantitativo de 0 a +3 de la lesión túbulo-intersticial (Hist= atrofia tubular+infiltrado+fibrosis).

Resultados: Los animales trasplantados tras IF (SyI) desarrollaron insuficiencia renal y lesiones histológicas compatibles con NCT. En cambio, los tratados con UR12670 (SyUr) mantuvieron una función renal estable y similar a la de aquellos que no sufrieron isquemia (Sy). La administración crónica de UR12670 se asoció a una reducción significativa de las lesiones túbulo-intersticiales inducidas por la IF.

	Cr0	Prt0	Cr20	Prt20	Cr24	Prt24	Hist.
Sy	45±2	11±2	68±2	13±1	75±4	14±1	0.6±0.2
SyI	45±2	10±1	124±25 ^{ab}	37±7 ^{ab}	153±39 ^a	46±7 ^a	4.8±0.6 ^{ab}
SyUr	46±3	10±1	79±6	21±3	84±7	32±8	2.5±0.7
p	0.861	0.742	0.031	0.002	0.051	0.004	0.003

medias±sem; a p<0.05 vs Sy b p<0.05 vs SyUr ANOVA / Kruskal Wallis

Conclusiones: En un modelo de trasplante renal singénico, la isquemia fría induce aparición de NCT. El tratamiento crónico con el antagonista del receptor del PAF (UR12670) es capaz de atenuar la NCT inducida por isquemia fría.

EFFECTO PROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO SOBRE EL FRACASO RENAL AGUDO POST ISQUEMIA CALIENTE.

M. Riera, J. Torras, I. Herrero, J.M. Cruzado, M. Fatjó, N. Lloberas, J. Alsina, J.M. Grinyó. Lab. Nefrología Exp., S. Nefrología, Hosp. Bellvitge, Dpt. Medicina, UB, C.S.U.B., Hospitalet, Barcelona.

Introducción: El preconditionamiento isquémico en el que se somete a los animales a periodos breves de isquemia antes de una isquemia caliente prolongada ofrece un efecto protector de los tejidos frente a la lesión de isquemia-reperusión. Estudios previos han mostrado que el preconditionamiento isquémico es eficaz en el corazón, el hígado y el intestino.

Objetivo: Evaluar si el preconditionamiento isquémico renal ofrece protección sobre el fracaso renal agudo post-isquemia caliente. Asimismo establecer el tiempo óptimo de preconditionamiento renal.

Método: Isquemia caliente renal bilateral de 40 minutos en ratas Sprague-Dawley. Tiempos de preconditionamiento crecientes. Seguimiento durante 7 días. Medida de la creatinina los días 0, 1, 2, 3 y 7. Histología convencional al sacrificio.

Resultados: * = p < 0,05 vs Control, # = p < 0,05 PI - 15 vs PI - 10 | PI - 20; \$ = p < 0,05 vs PI - 20

GRUP	Preo.	Reperf.	isc.cal.	Crea 1	Crea 2	Crea 3	Crea 7
Control	0 min	0 min	40 min	289 ± 19	329 ± 70	245 ± 80	56 ± 5
PI - 5	5 min	10 min	40 min	210 ± 11 *	113 ± 7 * \$	78 ± 3 *	48 ± 2 *
PI - 10	10 min	10 min	40 min	228 ± 20 *	159 ± 20 *	94 ± 9 *	48 ± 2 *
PI - 15	15 min	10 min	40 min	167 ± 24 * #	85 ± 6 * \$	67 ± 3 *	46 ± 2 *
PI - 20	20 min	10 min	40 min	255 ± 22	211 ± 47 *	136 ± 40 *	49 ± 3
P				0.0035	0.0001	0.0031	0.18

La creatinina del grupo Control siguió empeorando en el segundo día, mientras que en todos los grupos de preconditionamiento mejoró significativamente. El grupo PI - 15 es el que mostró los mejores resultados. Este grupo mostró menos lesiones histológicas de necrosis tubular aguda que el grupo sin preconditionamiento (Control: 2.9 ± 0.4, PI - 15: 1.7 ± 0.2, p < 0.035).

Conclusiones: El preconditionamiento isquémico ofrece un efecto protector del fracaso renal agudo post isquemia caliente. El tiempo óptimo de preconditionamiento renal es de 15 minutos.

INFLUENCIA DE LA MASA NEFRÓNICA EN EL DESARROLLO DE NEFROPATIA CRONICA DESPUES DE ISQUEMIA RENAL CALIENTE.

JM Cruzado, J Torras, M Riera, I Herrero, E Condom, M Hueso, L Espinosa, N Lloberas, J Bover, J Alsina, JM Grinyó. Servicio de Nefrología. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet.

Aunque es conocido que la lesión de isquemia-reperusión (IRI) combinada con nefrectomía contralateral induce lesiones renales similares a las que definen el rechazo crónico, las consecuencias de IRI renal bilateral no se han estudiado. Ratas Sprague-Dawley macho se sometieron a isquemia renal caliente de 60 min y se siguieron durante 52 semanas. Grupos experimentales: 2NK: operación "sham" con 2 riñones normales (n=7); 1NK: monorreño sin isquemia (n=8); 2WIK: isquemia bilateral (n=11); 1WIK: monorreño con isquemia (n=12). Cada 4 semanas se determinó proteinuria (mg/d), s-Col (mg%) y s-Crea (mg%). Al final del estudio se determinó el GFR (aclaramiento de inulina, ml/min). El tejido renal se procesó para microscopía óptica, inmunohistoquímica TGFβ1 y RT-PCR TGFβ1. Se incluyeron ratas adicionales para estudio de histología y apoptosis a 24 h, función renal e histología a 7 d y mRNA TGFβ1 e histología 16 y 32 semanas.

Los grupos 1WIK y 2WIK presentaron fracaso renal agudo (FRA) severo (sCreatinina 3.1±0.3 vs 3±0.5, respectivamente), con severas lesiones histológicas y extensa apoptosis en células tubulares renales, no existiendo diferencias entre ambos grupos a las 24h. La sCreatinina a los 7 días fue superior en el grupo 1WIK respecto al 2WIK (0.8±0.1 vs 0.5±0.1; p=0.01). A partir de la semana 8, las ratas 1WIK desarrollaron proteinuria progresiva. En cambio las ratas 2WIK presentaron una proteinuria leve, similar a las 1NK. Únicamente las ratas 1WIK desarrollaron insuficiencia renal crónica (sCreatinina 2±0.5 vs 0.7±0.03 en las 2WIK) e hipercolesterolemia a lo largo del seguimiento. El GFR a las 52 semanas fue inferior (p=0.0001) en el grupo 1WIK (0.3±0.05) respecto al 1NK (0.8±0.1), al 2WIK (1.1±0.1) y al 2NK (1±0.1). Así mismo, únicamente las ratas 1WIK desarrollaron un progresivo aumento del porcentaje de glomeruloesclerosis (4.9±1.5, 12.6±3.1, 31.2±6.8 a las 16, 32 y 52 semanas, respectivamente), siendo del 0±0, 1±0.6, y 2.7±1 en el grupo 2WIK, y del 1±0.6, 1.4±0.5 y 1.8±0.5 en el grupo 1NK. Además, el grupo 1WIK presentó una severa fibrosis intersticial y una creciente (p=0.02) expresión de mRNA TGFβ1 (OD β-actina) a lo largo del seguimiento (7.8±1, 8.8±0.8 y 13.3±1 a las 16, 32 y 52 semanas) respecto al grupo 2WIK (5.6±1, 5.7±1 y 7.6±0.7, a las 16, 32 y 52 semanas).

En este modelo de FRA severo inducido por un episodio de isquemia renal caliente prolongada, hemos demostrado que la masa nefrónica es un factor determinante en la modulación de la expresión de mRNA TGFβ1, así como para el desarrollo de insuficiencia renal crónica y glomeruloesclerosis.

25

•

CARVEDILOL Y LABETALOL INHIBEN EL STRESS OXIDATIVO INDUCIDO POR CICLOSPORINA Y TACROLIMUS SOBRE CELULAS MESANGIALES EN CULTIVO

L.M. Ruiz-Muñoz, A. Solís, N. Quintanilla, B. Bralo, J.J. Amenábar, P. Gómez-Ullate, I. Lampreabe.

Servicio de Nefrología, Hospital de Cruces-Baracaldo y Facultad de Medicina, Universidad del País Vasco, Lejona, Vizcaya.

Introducción: Los Metabolitos Reactivos Oxigenados (MRO) están implicados en la patogenia de la nefrotoxicidad de los inmunosupresores. La nefroprotección de otros fármacos puede estar basada en acciones antioxidantes a nivel celular.

Objeto del estudio: Evaluar la producción *in vitro* de H₂O₂ por células mesangiales expuestas a diferentes concentraciones de Ciclosporina A (CSA) y Tacrolimus (TCM), valorando un posible efecto regulador del carvedilol (CV) y labetalol (LB)

Material y métodos: El H₂O₂ fue cuantificado por microfluorimetría, valorando la conversión oxidativa del diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) al metabolito fluorescente 2',7'-DCF. Cada tipo de ensayo se evaluó tres veces por cuadruplicado.

Resultados: La CSA a dosis de 400 nM indujo una producción significativamente más importante de H₂O₂ frente a la obtenida con 200 y 100 nM (p<0.01) a las 24 horas. Con TCM a 70 nM se observó un efecto similar (p<0.05) frente a 30 y 6 nM. Se constató un significativo (p<0.05) efecto inhibitorio de CV y LB (ambos a 100 μM) en los registros de producción de H₂O₂ para cada una de las tres concentraciones de CSA y TCM evaluadas, sin grandes diferencias entre los resultados obtenidos con ambos hipotensores.

Conclusión: Las generación de MRO por células mesangiales expuestas a CSA y TCM es minimizada por CV y LB. Esto sugiere un papel nefroprotector de ambos fármacos en la viabilidad de los injertos previniendo el deterioro renal no ligado a fenómenos inmunológicos.