

2 OBJETIVOS

Uno de los elementos que influyen en el desarrollo de la glomerulosclerosis es la alteración de los lípidos que junto a factores de riesgo como la hiperglucemia, la hipertensión y la hiperinsulinemia modulan el curso o evolución de ésta a lo largo del tiempo. El objetivo de este trabajo consiste en elucidar los mecanismos patológicos que provocan el desarrollo de una glomerulosclerosis incipiente en un modelo experimental espontáneo de diabetes mellitus tipo II, hiperlipidemia, obesidad, e insuficiencia renal: la rata Zucker obesa a diferentes edades. Asimismo, intentamos averiguar el papel que tienen las alteraciones del metabolismo lipídico utilizando dos fármacos que están introducidos ampliamente en la clínica. Uno de ellos es un inhibidor del enzima de conversión de la angiotensina II, el quinapril, fármaco que en estudios previos en nuestro laboratorio demostró que era capaz de reducir y/o prevenir la nefropatía. El segundo fármaco que utilizamos fue la atorvastatina, inhibidor del enzima hidroximetil-coenzima A reductasa, principal enzima implicado en la regulación de la síntesis del colesterol.

Para ello se estudiaron diferentes parámetros bioquímicos, la área glomerular, el número de lesiones focales, la ultraestructura glomerular, la expresión de diferentes citocinas, factores de transcripción y diferentes marcadores de lesión renal que pudieran ayudarnos a definir mejor el desarrollo de la glomerulosclerosis en la rata Zucker obesa. Se utilizaron como controles negativos los homólogos heterocigotos Fa/fa, que nos permitieron discernir si la causa de las lesiones observadas correspondía al colesterol y/o al genotipo de las ratas Zucker obese.

El presente estudio se estructuró en los siguientes objetivos concretos:

OBJETIVO 1

Evaluación de parámetros bioquímicos en suero y orina para la determinación del estadio clínico en el que se encontraban cada uno de los grupos experimentales.

Determinación de parámetros ponderables (peso e ingesta) y su relación con la edad, progresión de la enfermedad y tratamiento.

Valoración de la proteinuria, la creatinina y las proteínas en sangre. Correlación de los diferentes parámetros clínicos con el desarrollo de la proteinuria y la glomerulosclerosis y su relación con los diferentes tratamientos.

Análisis de factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la glomerulosclerosis en cada uno de los grupos experimentales: grado de dislipemia, disglicemia, hiperinsulinemia e hipertensión sistémica.

OBJETIVOS

OBJETIVO 2

Análisis histológico de las lesiones segmentarias y focales y estudio de la área glomerular.

Recuento de las lesiones segmentarias y focales glomerulares.

Determinación del aumento de la área en los glomérulos de las ratas con nefropatía respecto a las áreas de los controles sanos y tratamientos como marcador de estadios previos al desarrollo de la glomerulosclerosis.

Valoración de la lesión podocitaria y/o alteración de la membrana basal glomerular como indicadores del estado de la barrera de filtración glomerular mediante la tinción inmunohistoquímica de la desmina (marcador de lesión podocitaria) y microscopía electrónica.

OBJETIVO 3

Determinación de la expresión a nivel de ARN de citocinas glomerulares implicadas en el desarrollo de la glomerulosclerosis.

Valoración de la expresión de TGF- 1 y PDGF-B en el glomérulo las RZL, RZO y grupos tratados como principales citocinas implicadas en el desarrollo de la nefropatía diabética.

Inmunolocalización de las células productoras de TGF- 1.

OBJETIVO 4

Análisis de diferentes marcadores histológicos de lesión renal.

Determinar la localización del daño tisular en nuestro modelo experimental (glomérulo y/o túbulointersticial) mediante el análisis inmunohistoquímico de proliferación celular (Ki-67), la actividad quimiotáctica (IL-8 e IP-10), la infiltración de monocitos/macrófagos en el glomérulo (ED⁺1) y el grado de activación del NF- B.

Análisis del papel potencial de estos marcadores en el desarrollo y/o la progresión de la enfermedad y en los tratamientos.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL IN VIVO

3.1.1 Modelo de Diabetes Mellitus tipo II: Rata Zucker Obese

Todos los estudios en ratas se han llevado a término teniendo en cuenta la Directiva del Consejo, de 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE) que regula la estabulación y manipulación de los animales de laboratorio y el Decreto del DOG 214/1997, de 30 de julio, por el cual se regula la utilización de animales para la experimentación y otras finalidades científicas.

Durante todo el estudio las ratas se mantuvieron individualizadas en jaulas de metacrilato (Panlab SA, Barcelona, España) y se han estabulado a temperatura constante de 20°-22°C y con un ciclo de luz / oscuridad de 17 / 7 horas. La fase activa de la experimental empezó después de un período de adaptación de 15 días, en el cual las ratas se alimentaron con una dieta estándar de mantenimiento (AO4. Panlab SA, Barcelona, Spain) y agua *ad libitum*. En el estudio experimental se utilizó el tipo de Dieta D estándar de mantenimiento AO4 (Panlab, Barcelona, Spain), cuya composición se refleja en la siguiente tabla 6.

Análisis (%)	Dieta AO4
Humedad	12
Proteínas	17.9
Lípidos	3.1
Fibra	3.8
Minerales	5.2
Sodio (mg/Kg)	1900
Hidratos de Carbono	58.5

Tabla 6. Composición de la dieta de alimentación A04

3.1.1.1 Diseño experimental

El estudio se ha realizado con 80 ratas Zucker (IFFA CREDO, Lyon, France) de 8 semanas de edad; 24 control (Zucker *Lean*, ZL) y 56 Zucker Obese. A partir de les Zucker *Obese* se formaron 3 grupos (ZO, ZOQ, ZOA). Todas las ratas se distribuyeron de forma aleatoria para conseguir un número total por grupo: 24 ZO, 16 ZOQ y 16 ZOA. Fueron todas alimentadas con dieta estándar para rata (AO4, Panlab, Barcelona). El grupo ZOQ recibió una dosis oral diaria de Quinapril (10 mg/Kg) en una solución al 0.01% en el agua de bebida. El grupo ZOA recibió una dosis oral diaria de Atorvastatina (10 mg/Kg.) embebida en la misma dieta sólida de la rata.

MATERIAL Y METODOS

El sacrificio se realizó en tres etapas: 16, 24 y 32 semanas de edad. En la primera se sacrificaron las ratas Zucker Lean (n = 8) y ZO (n= 8). Y en la segunda y tercera etapa se sacrificaron respectivamente 8 ratas de cada grupo.

	tratamiento	dosis	grupo	16 semanas edad (1)	24 semana edad (2)	32 semana edad (3)
Zucker lean	Sin tratar		ZL	8	8	8
Zucker obesa	Sin tratar		ZO	8	8	8
Zucker obesa	Quinapril	10 mg/Kg/dia	ZOQ		8	8
Zucker obesa	Atorvastatina	10 mg/Kg/dia	ZOA		8	8

Tabla 7. Diseño experimental.

Número de animales utilizados por grupo en función de la edad del sacrificio y el grupo al que pertenecen. El tratamiento con quinapril y atorvastatina se inicia a las 16 semanas de edad.

3.1.1.2 Metodología

Después del período inicial de adaptación, y antes de iniciar el tratamiento correspondiente a cada grupo se realizan las determinaciones basales (medida del peso y de la presión sistólica).

Una vez se ha iniciado el estudio, se controlaban el peso y la ingesta semanalmente. Mensualmente se realizan los siguientes controles:

- ✓ La presión arterial sistólica determinada en la cola de las ratas despiertas, a una temperatura de 37° mediante el método de *Tail-Cuff*.
- ✓ La proteinúria medida mediante el método del Ácido Sulfosalicílico en muestras de orina de 24 horas. Para la obtención de la orina, las ratas se someten a un ayuno de 24h previas a una estancia en la jaula metabólica donde la rata continuaba sin comer y con agua *ad libitum*. El ayuno es necesario para evitar contaminaciones fecales en la orina.
- ✓ Para las determinaciones finales, se llevan a cabo a las 16, 24 y 32 en las semanas de edad, las ratas son anestesiadas con una inyección intraperitoneal de una dosis de 1ml por cada 400g de peso corporal de una mezcla de 1ml de Atropina (1mg/ml), 2ml de Diazepam (10mg/2ml) y 2.5ml de Ketolar (50 mg/ml) con la finalidad de obtener:
 1. Una muestra de sangre para la determinación bioquímica del suero (urea, creatinina, aclaramiento de la creatinina, triglicéridos, colesterol, proteínas totales y albúmina) con un autoanalizador estándar (Technicon Instruments, Tarry -Town, NY)

2. Los riñones utilizados en el aislamiento de los glomérulos destinados a estudios moleculares (dicha técnica se explica en 1.2.1).
3. Muestras de riñón, hígado, bazo, corazón aorta y pulmón para el análisis histológico.

3.1.1.2.1 Análisis Histológico

Las muestras de tejido extraídas en la necropsia se conservan en formol al 4% (pH 7.2) y se incluyen en parafina para hacerse secciones de 3-4 μm de grosor. De cada muestra se hacen tinciones de hematoxilina-eosina valorándose el porcentaje de glomérulos que tenían lesiones focales. Para ello se sigue el método descrito por Kasiske y col¹⁹⁹ en el cual se examinan unos 100 \pm 20 glomérulos contenidos en cada sección. Por cada animal, el número de lesiones segmentarias se expresa como un porcentaje del total de glomérulos contados.

Se congela el tejido (-70°) y se guarda muestra del cortex del riñón en tampón de cocodilato (microscopía electrónica).

Todas las determinaciones son llevadas a cabo por un patólogo que desconoce el grupo al que ha asignando cada rata.

3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL IN VITRO

3.2.1 Técnica del aislamiento glomerular

La técnica utilizada consiste en una modificación de la técnica descrita previamente por Ikeda²⁰⁰ y puesta a punto en nuestro laboratorio²⁰¹, que se procede a detallar seguidamente:

Una vez anestesiada la rata, se practica una incisión en la cavidad abdominal siguiendo la línea media. A continuación se canula la aorta abdominal, justo antes de la bifurcación para, en primer lugar, obtener muestras de sangre para el análisis bioquímico y en segundo lugar, perfundir los riñones con 20-30 ml de serum fisiológico a 4 °C. Los riñones se extraen rápidamente y se guardan en tampón salino de fosfato a pH7.2 (PBS) (BioMérieux, France) suplementado con un 2% de suero bobino fetal (FBS) (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 4°C hasta que su procesamiento. Para maximizar la viabilidad de los glomérulos es importante minimizar el tiempo transcurrido entre la extracción y el procesamiento de los riñones.

Todo el procesamiento renal hasta la obtención de una solución de glomérulos aislados se realiza en condiciones estériles y sobre una bandeja con hielo picado. (4°C aproximadamente) para evitar contaminaciones y muerte celular.

Dentro de una cápsula de petri y en PBS suplementado con el 10% de FBS, los riñones perfundidos se decapsulan y se separa el córtex real, el cual se fragmenta en trozos de 1-2 mm de diámetro. Estos trozos son disgregados en una cápsula de petri con una espátula de vidrio. La solución resultante se digiere mecánicamente haciéndola pasar por dos filtros de nylon estériles con la ayuda de la espátula que nos permita disgregar el tejido hasta conseguir una consistencia pastosa y el PBS facilitaba el proceso de filtración. El primero, de 100 µm de diámetro de poro, retiene los túbulos y los restos de tejido conectivo, dejando pasar a los glomérulos. El segundo es de 75 µm de diámetro de poro y por tanto en su superficie quedaban retenidos los glomérulos, mientras que el resto de tejido y células sanguíneas se eluían al limpiar la malla con PBS.

Para decapsular los glomérulos, la solución obtenida se pasa por una aguja de 0.9 mm de diámetro. Finalmente los glomérulos se dejan sedimentar durante 12 minutos a 4°C en tubos de poliestireno de fondo cónico para eliminar los restos celulares y de tejido. Pasado este tiempo y, en función de la cantidad de *pellet* obtenido, se vuelve a pasar solución de lavado o se descarta el sobrenadante y el *pellet* se congela en nitrógeno líquido, obteniéndose un *pellet* seco que se guarda a -70°C. El grado de pureza de la suspensión glomerular (inexistencia de contaminación tubular) y la eliminación de la cápsula de Bowman se controlan mediante la observación al microscopio óptico.

El recuento glomerular, se realiza mediante un microscopio invertido (Olimpus). Una alícuota de 20 μl de *pellet* glomerular obtenido y resuspendido con un volumen conocido de PBS se coloca en una placa de petri reticulada (Nunc, Roskilde, Denmark) que facilita el recuento de los glomérulos. En general, el número medio de glomérulos obtenidos con esta técnica es de unos 30.000 por rata.

3.2.2 Análisis morfométrico

Una de los primeros cambios observadas tras un insulto renal es el aumento del tamaño glomerular. Por otro lado, se sabe que la hipertrofia renal precede al desarrollo de la glomerulosclerosis ya sea debida a factores hemodinámicos como la hipertensión glomerular o factores no hemodinámicos como el aumento de la matriz extracelular. Para obtener una aproximación de la evolución del daño renal y la incidencia de los fármacos se estudian las áreas del glomérulo renal y del oville glomerular como una medida del grado de afectación.

3.2.2.1 Ambito de estudio

Se incluyen es el estudio morfométrico todas las ratas del grupo experimental. Los parámetros evaluados son el área glomerular, el área del oville de capilar glomerular y la expresión de desmina.

3.2.2.2 Metodología

Para analizar la área glomerular, se toman fotografías de cada uno de los glomérulos (50-75 glomérulos por corte) a un aumento de 20X (Microscopio óptico, Zeiss). Posteriormente, se traza manualmente el borde exterior del glomérulo, la cápsula de Bowman, en una videocámara (Hamamatsu Photonics KN, Hamamatsu-City, Japan). La captación digital de las imágenes y la posterior morfometría son realizadas con el software OpenLab (Improvision, Coventry, UK), el cual convierte 100 pixels en $88.968 \mu\text{m}^2$.

3.2.3 Microscopía electrónica

Se fija un corte de 1mm^3 de tejido renal en una solución de formaldehído (2%) –glutaraldehído (2.5%) y con tampón de Karnoski con cocodilato (0.2mol/L, pH7.4). Después de 48 horas, las muestras se embeben en araldito. Las secciones ultrafinas se contrastan con citrato y se observan en el microscopio electrónico (Zeiss EM900).

3.2.4 Estudio inmunohistoquímico

Marcadores de proliferación celular: Ki-67

Una de las características más importantes que diferencian unas nefropatías de otras es el grado de proliferación. Para conocer este parámetro en la nefropatía experimental sufrida por la rata Zucker Obese se realizó un estudio con un marcador de proliferación celular. Para tal fin, se escogió el Ki-67 que es una proteína no histónica nuclear expresada en las células que están proliferando. Presenta un pico de expresión en las fases G₂ y M del ciclo celular dejando de expresarse posteriormente al inicio de G₀/G₁.

Quimicinas: IL-8 e IP-10

Uno de los mecanismos principales que producen la lesión en el glomérulo es la infiltración de células inflamatorias. Estas células secretan una gran cantidad de citocinas que son responsables en gran parte de la acumulación de ECM que conduce finalmente a las lesiones focales observadas en la corteza renal. La IP-10 y la IL-8 son dos moléculas con actividad quimioactante (quimiocinas) que actúan principalmente sobre los monocitos. Nosotros realizamos esta técnica para estudiar la capacidad de adhesión de los monocitos por parte de algunas células del glomérulo como son las células endoteliales, mesangiales y vasculares.

Marcadores de las células monocitos/macrófagos: ED⁺ 1

En el glomérulo lesionado, a menudo se produce infiltración de monocitos/macrófagos que participan activamente en la lesión glomerular. En concreto, pueden dañar el endotelio mediante la liberación de radicales libres de oxígeno, secretando citocinas y sustancias vasoactivas que activan a las células endoteliales y moléculas quimiotácticas que facilitan una infiltración continua. Los macrófagos parece que también contribuyen a la expansión de la matriz, secretando mediadores (TGF- β , PDGF y EGF) que afectan a la síntesis de ésta. Por todas estas razones se consideró interesante realizar la tinción con el anticuerpo monoclonal ED⁺ 1 que está dirigido contra un antígeno citoplasmático presente en los monocitos y macrófagos.

Marcadores de la lesión podocitaria: Desmina

Se ha visto que el daño celular podocitario se evidencia con el aumento de expresión del filamento intermedio desmina. Existen algunos modelos experimentales de glomerulosclerosis donde se ha propuesto como mecanismo inicial una lesión inicial y progresiva de estas células endoteliales.

Proliferación de matriz extracelular: TGF- β_1

Una de las principales características de la nefropatía diabética es la expansión de la matriz mesangial. La citocina proesclerótica más importante es el Transforming Growth Factor, TGF- β_1 , siendo una de los candidatos más probables como mediador de la progresión de la enfermedad. Se estudió la expresión de esta citocina para evaluar su presencia en el riñón de la rata Zucker Obese.

3.2.4.1 Ámbito de estudio

La técnica se realizó en los grupos de ratas - ZL y ZO, ZOQ y ZOA - con 32 semanas de edad.

3.2.4.2 Metodología

Método de estreptoavidina-biotina-peroxidasa de tejido fijado en formol e incluido en parafina.

Se realizan cortes de 3 μm en el microtomo que se recogen en portas tratados con xileno (Sigma Aldrich). Se desparafina con Xileno realizando tres cambios del mismo cada cinco minutos. Posteriormente, se rehidrata el tejido con una serie de diluciones de Alcohol decrecientes (100%, 95%, 80%, 70%) cada 3 minutos y un lavado de 5 minutos con agua destilada.

Se realizan dos pretratamientos del tejido diferentes en función del anticuerpo primario utilizado (Tabla): uno de ellos es un tratamiento en el autoclave de 120° durante 8 minutos con tampón Citrato 0.1 M a pH 6 y otro es un tratamiento en el autoclave de 100° durante 5 minutos con tampón EDTA 0.1M a pH8. Al finalizar, en ambos casos, se realiza un lavado de 5 minutos con agua destilada.

Para realizar el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena se trata el corte con H₂O₂ al 3% en Metanol durante 10 minutos. Posteriormente, se hacen dos lavados de 5 minutos con agua destilada seguidos de un lavado con PBS secando las secciones alrededor del tejido.

MATERIAL Y METODOS

Para eliminar la tinción de fondo no-específica, las secciones son incubadas durante 30 minutos en un suero supresor compuesto por una dilución 1/700 de albúmina bobina (DAKO) al 2% en PBS. Posteriormente, se decanta e incuba el anticuerpo primario (Tabla) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se realizaran tres lavados de tres minutos con PBS.

Ac primario	Dilución	Pretratamiento	Origen
ED1	1/200	EDTA pH8	Biogenensis, New Fields, UK
D33 (Desmina)	1/50	Tampón Citrato	Dako, Glostrup, Denmark
Ki-67	1/10	Tampón Citrato	Novocastra, Newcastle, UK
IL-8	10 mg/ml		Inmunogenex, Los Angeles, USA
IP-10	10 mg/ml		Santa Cruz, California, USA
TGF- β_1	1/20	Tampón Citrato	R&D, Minneapolis, MN, USA

Se secan las secciones alrededor de todo el tejido y se incuba con el anticuerpo secundario marcado con biotina (DAKO), diluido 1/700 en PBS, durante 30 minutos. Se realizan tres lavados de tres minutos con PBS.

Se revela con Diaminobencidina (DAB) al 0.05% en PBS y una dilución de H₂O₂ 1/1000 durante un tiempo no superior a 10 minutos. Se realiza un lavado de 5 minutos con agua destilada. Se contrasta en Hematoxilina de Harris. Lavando en agua corriente durante 5-10 minutos. Finalmente, se deshidrata en alcoholes de gradación progresiva hasta xileno. Y se monta en el medio DPX.

Se examinan cerca de 30 glomérulos por animal por un observador que no tenga conocimiento previo del grupo al que pertenecen los animales. Se asignan cuatro categorías según la intensidad de la tinción: negativa, tinción leve, tinción moderada y tinción intensa.

3.2.5 Análisis de la expresión de ARN de factores de crecimiento

3.2.5.1 Hibridación *in situ* del TGF- β_1

Para la localización de las células productoras de ARN de TGF- β_1 se llevó a cabo la hibridación *in situ* de los cortes con sondas de ARN.

3.2.5.1.1 Ámbito de estudio

Fueron incluidos en este experimento, las secciones de riñón de parafinados de las ratas que llevaban 24 semanas de tratamiento (32 semanas de edad).

3.2.5.1.2 Metodología

Preparación de la sonda de hibridación:

Se sintetizan sondas de ARN (ribosondas) sentido y antisentido a partir de la linealización del plásmido PCR3 (Invitrogen, San Diego, CA) que contiene un fragmento de amplificación del TGF- α producido mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente se marcan con biotina con un kit de marcaje de ARN no-radioactivo (Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación del tejido:

Se realizan cortes de tejido de 5 μ m que son fijados al 4% con formol. Dichos cortes son montados con 3-aminopropiltriethoxy-silano en portaobjetos tratados previamente con Dietilpircarbonato (DEPC, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA).

Se pasa a la desparafinización del tejido con xileno, y rehidratación a posteriori mediante una serie decreciente de soluciones de etanol. Posteriormente se trata con una sal de citrato (SSC; 1X0.15 mol/l y Citrato trisódico 0.015mol/l, pH 7.0) durante 10 minutos a 60°C y se realizan lavados con agua DEPC. Después se procedd a la digestión del tejido con Proteinasa K (5 μ g/ml) en solución Tris (0.05mol/L) durante 60 minutos a 37°C. Se realiza un lavado con agua DEPC.

Hibridación y revelado:

La prehibridación se lleva a cabo con una solución compuesta de sal 0.6mol/l, Formamida 30% y ADN de esperma de salmón, 150 μ g/ml. La hibridación se realiza con 100 μ l de sonda marcada con Biotina 200ng/ml en una cámara húmeda durante toda la noche. Posteriormente, se realizan durante 5 minutos a 37°C los siguientes lavados: dos, con tampón 4 X SSC al 30% de Formamida; dos, con tampón 2 X SSC al 30% de Formamida; dos, con tampón 0.2 X SSC al 30% de Formamida y uno con una solución salina de Tris al 2% de Tritón durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La detección de la sonda se realiza con un conjugado de la Fosfatasa alcalina (DAKO) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza un lavado con la solución salina de Tris al 2 % de Tritón de 5 minutos. Como substratos del enzima se añaden Nitrobluetetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3- indolil fosfato durante 120 minutos a 37°C en una cámara oscura (R&D Systems). Los tejidos son rehidratados en series de etanol.

La especificidad de la reacción se asegura de las siguientes maneras: (a) comprobando la desaparición de la señal cuando se pre-incubaba con RNAsa (100 μ g/ml) añadida en Tris al 0.05

MATERIAL Y METODOS

mol/L con Proteinasa K; (b) usando una sonda sentido; (c) realizando la técnica en ausencia de la sonda.

Examen inmunohistoquímico:

Las tinciones se evalúan por un patólogo que no conoce la procedencia de cada una de las muestras. La distribución de la tinción se estudia por separado: en células endoteliales, células mesangiales, células epiteliales, túbulo distal, endotelio de arteriolas e intersticio. Las secciones se evalúan semicuantitativamente atendiendo a la siguiente escala: = tinción negativa; + = tinción débil; ++ = tinción moderada y +++ = tinción intensa.

3.2.5.2 Cuantificación del TGF- β_1 y PDGF-B mediante la técnica de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En numerosos estudios se destaca la importancia de los factores de crecimiento: TGF- β_1 (que actúa favoreciendo la acumulación de la matriz extracelular) y el PDGF-B (uno de los factores mitogénicos más importantes caracterizados en células humanas, de rata y ratón)²⁰². En concreto el TGF- β_1 es considerado por muchos autores como una posible diana terapéutica. El PDGF-B es un factor que permite que la célula pueda abandonar su estado quiescente (G_0) y entrar en fase G_1 , adquiriendo la competencia para responder a factores de crecimiento. Es por ello que se ha considerado importante el estudio de la expresión de estos factores al nivel de ARN.

3.2.5.2.1 Ámbito de estudio

Este estudio se realiza con los glomérulos aislados de cada una de las ratas incluidas en la experimental *in vivo*. Se cogió, de cada rata, una alícuota de 10.000 glomérulos para la *extracción de ARN total*. Posteriormente se *retrotranscribió a cADN* para realizar la semicuantificación de la expresión de dos citocinas: TGF- β_1 y PDGF-B, mediante la técnica de la Amplificación de la Polimerasa de tipo competitiva (*RT-PCR competitiva*).

3.2.5.3 Metodología

La PCR es un método simple de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro*, en el que el número de moléculas generadas se duplica tras cada ciclo del proceso, de tal forma que si empieza con una sola doble cadena de ADN, después de 20 ciclos se dispondría de un 10^6 de copias del fragmento amplificado. Para su realización se requieren unos reactivos básicos, que se someten a diferentes cambios cíclicos de temperatura. Estos son: la muestra o molde de ADN a amplificar, dos oligonucleótidos, llamados cebadores o primers, cada uno de ellos complementarios a cada una de las hebras del ADN molde al que flanquean, con una corta distancia entre ellos; una cantidad

abundante de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (trifosfato de desoxiadenosina, ATP; trifostato de desoxicitosina, dCTP, trifosfato de desoxiguanidina, dGTP y trifosfato de desoxitimidina, dTTP) y una enzima, una ADN polimerasa, que se encargará del proceso de síntesis de las nuevas copias de ADN a partir del ADN molde. Básicamente, el proceso se realiza mezclando los productos descritos en un tubo eppendorf de 0.5 ml, al que sometemos a una serie de ciclos en los que varia la temperatura de incubación. Cada ciclo consta de tres pasos o reacciones: *Desnaturalización* de la muestra de ADN bicatenaria en las que se separan las dos hebras por calentamiento de las mismas a 95°C. *Renaturalización o unión de los cebadores* a las secuencias complementarias del ADN de la muestra por descenso de la temperatura (entre 37°C y 60°C). *Polimerización, síntesis o extensión*, en el que la temperatura (72°C) se adecua para que pueda actuar la enzima y copiar el ADN molde mediante la adición al extremo 3' del cebador de los distintos deoxinucleótidos según las reglas de la complementariedad, sintetizándose el nuevo ADN en la dirección 5' a 3'.²⁰³

3.2.5.3.1 Extracción del ARN total según una modificación del Método de Chomczynski²⁰⁴

A cada alícuota de 10.000 glomérulos se le añade 1ml de GTC (Solución de Guanidine Thyocianate, Citrato Sódico y Sarcasil al 35%, pH 8) y 8 µl de -Mercapto Etanol (Sigma Aldrich). Después de resuspender la muestra, se pasa la misma por una jeringa de insulina (25 G 5/8 0.5 x 16).

Posteriormente se vierte la solución resultante en un eppendorf que contene 400µl de Etanol al 95%. Se invierte varias veces dejándose a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifuga 20 minutos a 14.000 revoluciones por minuto (r.p.m.).

Se descarta el sobrenadante y se vuelve a añadir una solución que contene 300µl de GTC, 30µl de NaAc (2M, pH 4), 215µl Fenol (Sigma Aldrich) y 86 µl de Cloroformo (Sigma Aldrich). Se agita vigorosamente. Pasados 10 segundos se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 14.000 r.p.m.

Se procede a recuperar el *pellet* y se le añade 1Volumen de Isopropanol (Sigma Aldrich). Se deja la solución a -20^a C durante una hora. El ARN se precipita mediante la centrifugación a 14.000 r.p.m. durante 25 minutos.

Se descarta nuevamente el sobrenadante. Para conseguir la eliminación total del Alcohol que hubiese impedido una buena resuspensión de la extracción con una solución de DEPC, se realiza un lavado con Etanol al 75% y una aspiración al vacío (SpeedVac System, SAVANT). Posteriormente se resuspende el *pellet* en 40 µl de una solución de DEPC (Sigma Aldrich).

MATERIAL Y METODOS

3.2.5.3.2 Cuantificación del ARN

Se comprueba la integridad del ARN mediante un gel de agarosa al 1%. Paralelamente, se efectúa una lectura en el espectrofotómetro (Ultraspec III, Pharmacia LKB) a las longitudes de onda de 260 nm, 280 nm y 320 nm. Esto permite conocer la concentración de la extracción, además de la pureza de la misma.

3.2.5.3.3 Retrotranscripción

La Retrotranscripción se realiza utilizando Ready To Go, You Prime First Strand Beads kit (Pharmacia Biotech, Sweden). Se incuban 5 µg de ARN en un volumen final de 30 µl. a 65°C durante 10 minutos dejando la muestra, finalmente, 2 minutos en hielo. Posteriormente, la solución que contiene el ARN se pasa a un eppendorf que contiene una alícuota de Buffer, dNTP, Transcriptasa Murina Reversa y RNasa/Dnasa-Free BSA liofilizadas. Se añaden 0.2 µg de Random hexanucleótidos como cebadores de la reacción. Finalmente, se incuba la muestra a 37°C durante 60 minutos.

3.2.5.3.4 Cebadores

La secuencia de los cebadores del TGF- 1 que se escogieron fue la publicada por Shankland y col.²⁰⁵ El cebador sentido del TGF- 1 corresponde a las posiciones número 1142 a la 1168 y el antisentido a las posiciones número 1520 a la 1546. Los dos cebadores se construyen entre el intrón #5 y #6. Después de comprobar que el grado de homología del PDGF-B entre rata y ratón era prácticamente del 100%, se utilizaron los oligonucleótidos publicados por Akai y col.²⁰⁶ para la amplificación de la citocina del PDGF-B. El cebador sentido se encuentra situado en el exón #2 y el antisense en el #4. Como gen constitutivo se escogió a la molécula de ciclofilina, ya que es un gen que se expresa con un nivel similar al de las citocinas y no tiene prácticamente pseudogenes, hecho que previene la amplificación de zonas del genómico que no interesen. Los cebadores de esta molécula se encuentran en el exón #3 y el #5 respectivamente. Para el diseño de estos oligonucleótidos fue utilizado el programa Oligo 5.0

Los cebadores que se utilizaron para la construcción de los competidores estaban contruidos mediante la unión del cebador de la citocina en su extremo más exterior a un cebador específico para el fragmento exógeno (proveniente del oncogen v-erbBB), diseñado por Clontech (PCR MIMIC)

Tabla 8. Secuencias de los cebadores.

	sentido	antisentido
TGF- 1	5' CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC 3'	5' CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC 3'
PDGF-B	5' CTG TAT GAA ATG CTG AGC GAC CA 3'	5' GCA TTG CAC ATT GCG GTT ATT GC 3'
Ciclofilina	5' TGA GCA CTG GGG AGA AAG G 3'	5' AAA ATG CCC GCA AGT CAA A 3'

	sentido	antisentido
TGF-erb	5' CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC CGC AAG TGA AAT CTC CTC CG 3'	5' CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC TTG AGT CCA TGG GGA GCT TT 3'
PDGF -erb	5' CTG TAT GAA ATG CTG AGC GAC CAG ACC GCA AGT GAA ATC TCC TCC G 3'	5' GCA TTG CAC ATT GCG GTT ATT GCT TGA GTC CAT GGG GAG CT T T 3'
Ciclo-erb	5' TGA GCA CTG GGG AGA AAG GCG CAA GTG AAA TCT CCT CCG 3'	5' AAA ATG CCC GCA AGT CAA ATT GAG TCC ATG GGG AGC TTT 3'

El tamaño del producto esperado de los amplímeros: TGF- - 405 pares de bases (pb), PDGF-B - 343 pb, ciclofilina -400 pb, TGF- -erb - 609 pb, PDGF-erb - 609 y ciclofilina-erb - 593 pb.

3.2.5.3.5 Generación del fragmento competidor

Para la realización de la PCR competitiva es necesario generar un fragmento que se coamplifique con la muestra problema. A esta molécula se la denomina fragmento competidor.

Para la generación del fragmento competidor se puede partir de dos estrategias: la construcción de un fragmento homólogo o de un fragmento heterólogo.

Un fragmento homólogo es un fragmento de ADN de la misma procedencia que la muestra que queremos analizar, con alguna inserción o delección que los diferencie. El inconveniente de este tipo de fragmentos es la posibilidad de la formación de heteroduplex que puede acontecer durante los últimos ciclos de la amplificación, momento en que la concentración del producto es muy alta. Este hecho puede complicar la cuantificación de los productos de la PCR.

Los fragmentos heterólogos son secuencias de ADN totalmente diferentes a la muestra salvo en sus dos extremos, que contienen secuencias iguales al transcrito que queremos analizar, de manera que ambas moléculas tienen los mismos cebadores. Una manera de construir un fragmento heterólogo es ligando la secuencia complementaria a los cebadores en los extremos del fragmento de ADN. Otra forma de obtención del ADN estándar es amplificando un ADN heterólogo usando cebadores "compuestos". En el presente estudio experimental se utilizó esta última opción de construcción: se utilizó una secuencia del oncogen *v-erbB* generada con la digestión de los enzimas de restricción:

MATERIAL Y METODOS

(BamHI y EcoR). A esta se le añadieron los cebadores de la citocina que se quería estudiar (PCR MIMIC, Clontech, Palo Alto).

En este tipo de PCR se realizan dos amplificaciones sucesivas como muestra la figura 28. En la primera reacción, se amplifica un fragmento heterólogo de ADN (secuencia del oncogen v-erbB) mediante dos cebadores compuestos. Éstos están formados por un ADN sintético complementario a los cebadores de la citocinas ligados conjuntamente a los cebadores del fragmento genérico (oncogen v-erbB). Durante la primera amplificación, se incorpora el cebador específico para la citocina en el fragmento del oncogen. Posteriormente, se diluye el producto de la PCR para ser utilizado en una segunda amplificación donde intervienen únicamente los cebadores para las citocinas. De esta manera, se asegura que la secuencia de estos cebadores es incorporada definitivamente a los extremos del ADN heterólogo.

La primera reacción se realiza en un volumen final de 50 μ l, bajo las siguientes condiciones finales de reacción: Buffer de PCR 1X, dNTP 0.4mM, CIMg 1.5mM, cebador sense 0.5 μ M, cebador antisense 0.5 μ M y 0.1 ng del fragmento de v-erbB. Los parámetros de amplificación son los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C y una sucesión de 28 ciclos de: Desnaturalización: 45 segundos a 94°C; Unión de los cebadores: 45 segundos a 50°C y Polimerización: 90 segundos a 72°C. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer 480. La segunda reacción se realiza en un volumen final de 100 μ l y con 2 μ l de la reacción de PCR primera. Las condiciones de amplificación son las mismas que las llevadas a cabo en las PCR competitivas para la determinación de las citocinas (ver apartado 1.2.2.2.6)

Los productos de ambas amplificaciones se visualizan en un gel de agarosa al 1.8 %, donde se recorta la banda del gel, purificándose, posteriormente, con una resina (JETSORB, Genomed) que retiene al ADN y elimina la agarosa tras varios lavados.

Finalmente se determina la concentración de ADN obtenida mediante la comparación de la intensidad de la banda en un gel de agarosa, con una serie de diluciones de un marcador de ADN (X 174 /Hae-III) (Clontech, Palo Alto, USA). Una vez conocida la concentración de amplificado se convierte a unidades molares usando la aproximación de que 1ng de un ADN de 300pares de bases es equivalente a 5×10^3 attomoles (1 attomol equivale a 10^{-18} moles). Se realizan alícuotas de trabajo de 100 attomoléculas/ μ l.

3.2.5.3.6 PCR competitiva

La PCR competitiva permite estimar el número de transcritos de TGF- β_1 y de PDGF-B en cada una de las muestras. Para poder comparar la expresión de ARN de las citocinas en diferentes muestras de glomérulos se requiere que todas las reacciones de RT-PCR ofrezcan una sensibilidad de detección equivalente. Para ello se han de valorar: la dificultad de cuantificar la concentración de ARN, la eficiencia de la RT y las variaciones entre tubos de la reacción de la amplificación de la polimerasa.

Para solventar los dos primeros problemas, se cuantificó la cantidad de ciclofilina (gen constitutivo) que había en cada muestra. De esta manera los valores finales de la cuantificación de la citocina, podían ser referidos a una cantidad constante de ciclofilina. Para eludir las diferencias de eficiencia de la PCR, tanto de la cuantificación de la ciclofilina como la de las citocinas, construimos un fragmento competidor (técnica descrita en 1.2.2.2.5) que excediese en 200pb el fragmento amplificado de cADN de la muestra y que pudiese competir por los cebadores con la muestra procedente de la reacción de retrotranscripción (RT) en una misma reacción de PCR. La diferencia de tamaño permite que ambos productos amplificados puedan ser distinguido en un gel de agarosa.

Para cuantificar el cADN, ensayos de PCR competitiva son llevados a cabo por triplicado añadiendo cantidades decrecientes de fragmento competidor, como describen Peten et al²⁰⁷. Se añade en todas las reacciones 1 μ l de cADN procedente de un *pool* de 10.000 glomérulos. Las condiciones de amplificación para cada una de las muestras eran las siguientes.

	Buffer	dNTP	ClMg	Cebador	Taq	Cebadores
ciclofilina	1X	0.4 mM	1.0 mM	0.5 μ M	2U	
TGF-	1X	0.4 mM	1.5 mM	0.5 μ M	2U	
PDGF-B	1X	0.4 mM	1.5 mM	1 μ M	2U	

Concentraciones finales en el tubo de reacción. Volumen final de 10 μ l

Se utiliza un termociclador Perkin Elmer 480 para las amplificaciones. Se realizan todas las amplificaciones con 35 ciclos. Las condiciones para el TGF- β_1 son: Desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 °C y la siguiente sucesión ciclos: Desnaturalización (30 segundos a 94°C), Unión de los cebadores (20 segundos a 60°C), Polimerización (20 segundos a 72°C) y una extensión final (72°C durante 10 minutos). Las condiciones de amplificación para el PDGF y la ciclofilina son las mismas que para el TGF- β_1 excepto la temperatura de unión de los cebadores que es para la primera citocina de 58°C y para la segunda de 62°C.

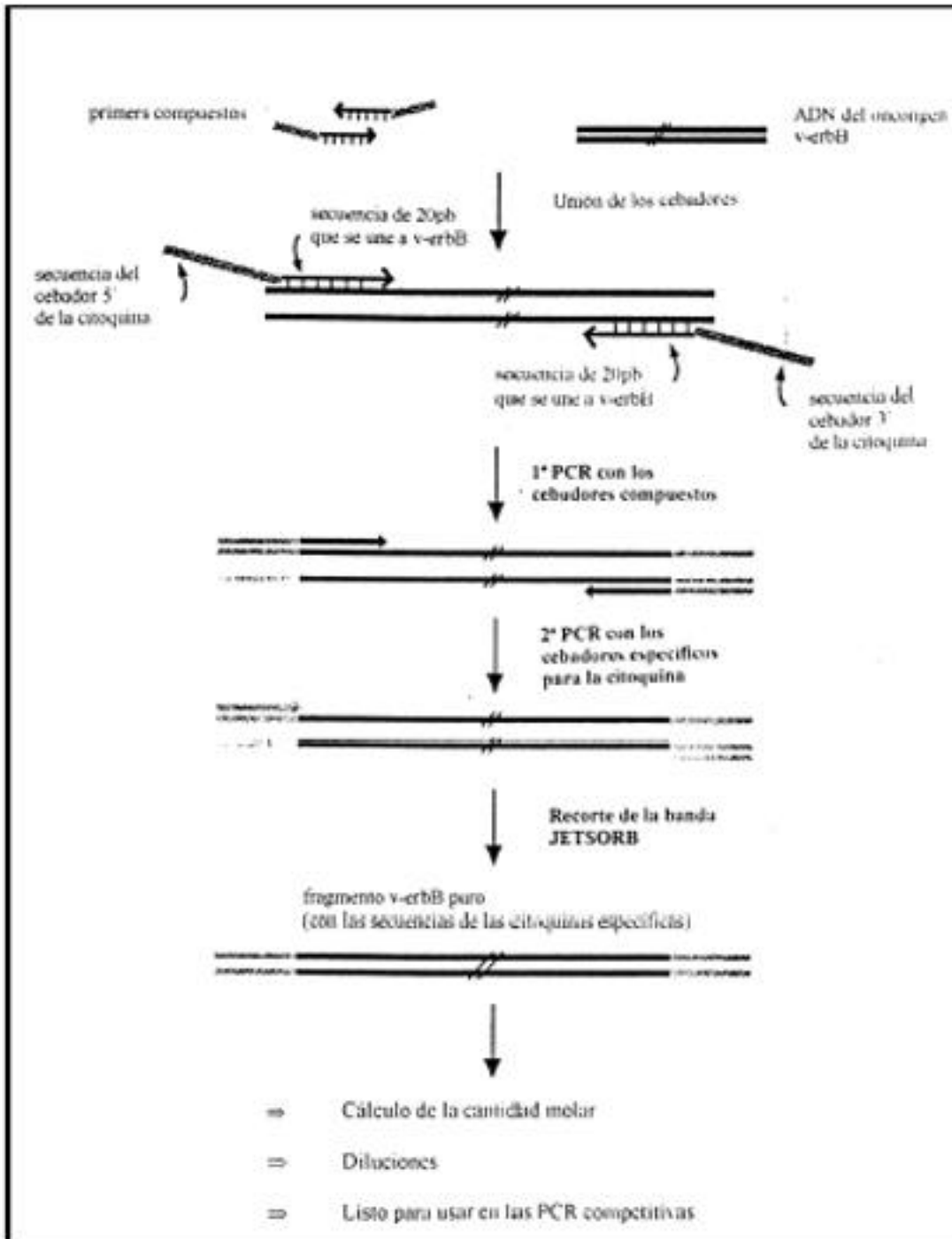


Figura 29. Generación del fragmento competidor

Los productos de la reacción son analizados en un gel de electroforesis al 2% (Agarosa MS-8, Pronadisa, Madrid). Después de la electroforesis las bandas amplificadas teñidas con Bromuro de Etidio son captadas por una videocámara y cuantificadas mediante un programa de densitometría digital (1D Manager, ver 2.0, TDI, Madrid).

El cociente de la densitometría del fragmento competidor respecto al de la muestra problema ofrece una relación hiperbólica que se aproxima a una asíntota cuando una de las dos especies está en exceso. Por esta relación, los resultados son más precisos cuando el fragmento competidor y el cADN se amplifican alrededor de concentraciones equivalentes²⁰⁸. Para realizar las determinaciones de la concentración de cADN con precisión se realiza previamente una dilución seriada que comprendiese un rango alto de concentraciones (diluciones de 10). Una vez seleccionada la concentración para la cual el fragmento competidor tiene una señal equivalente a la muestra se realizan de nuevo unas diluciones seriadas más precisas (diluciones de 2).

A partir de los resultados se realiza una recta de regresión en la que el eje de ordenadas era el logaritmo decimal de la densidad óptica (DO) de la molécula diana respecto a la DO del fragmento competidor que se había coamplificado en el mismo tubo de reacción. El eje de abscisas representa el logaritmo de la concentración del estándar. La concentración de cADN glomerular se obtiene del análisis de la regresión lineal de los triplicados.

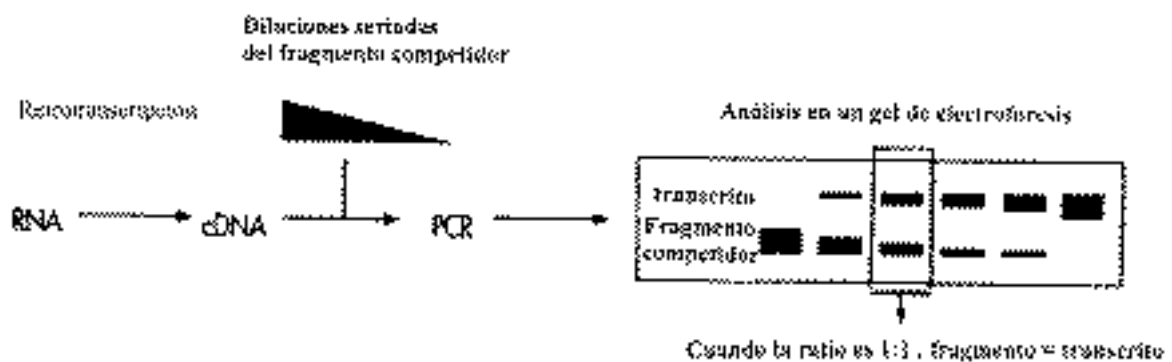


Figura 30. Protocolo de cuantificación de citocinas mediante PCR-competitiva.

Para comprobar que las moléculas amplificadas son aquellas para las cuales se habían diseñado los cebadores, se realizó la secuenciación de algunos de los amplificados de las reacciones de PCR.

3.2.6 Análisis por Southwestern in situ del factor de transcripción NF- B

Algunos estudios recientes demuestran que existe una correlación entre la sobreexpresión de las quimiocinas IL-8 e IP-10 y la activación del factor de transcripción NF-kB. Una vez realizado el análisis de la expresión de dichas moléculas (en los glomérulos de las ratas) y viendo que se da una expresión clara en los estados patológicos creímos interesante estudiar los niveles de expresión de este factor de transcripción.

3.2.6.1 Ámbito de aplicación

Se añadieron las secciones de riñón de las ratas sacrificadas en el tercer período de sacrificio (semana 32).

3.2.6.2 Metodología

Se utiliza una sonda de ADN sintética 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (Genosys Biotechnology, London, UK), la cual contiene una secuencia de NF-kB. Dicha sonda se marca con digoxigenina (Boehringer Mannheim).

Las muestras de riñón se parafinan al 4% de Formaldehído en un tampón fosfato salino (PBS). Se realizan cortes de 4µm, fueron desparafinados y rehidratados. Posteriormente, las muestras son incubadas con Levamisole (Sigma) para eliminar la fosfatasa alcalina endógena y fijadas con Formaldehído al 0.2 % durante 30 minutos a 28°C. Las preparaciones fueron digeridas con 0.5% de pepsina A (433 U/mg; Sigma) en HCl 1N durante 30 minutos a 37°C y fueron lavadas dos veces con una solución de albúmina de suero bovino y HEPES (10mM HEPES, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM de ditiotreitól (DTT), 1mM ácido etilenodiamino tetra- acético (EDTA), y 0.25% de BSA, pH7.4).

Posteriormente, las secciones son incubadas con 0.1 mg/ml de DNAasa I en HEPES-BSA durante 30 minutos a 30°C y son lavadas en una solución de HEPES que contiene 10mM EDTA en lugar de MgCl₂ para finalizar la reacción. Finalmente los cortes se pasan por un gradiente de alcoholes (70%, 90% y 100%).

Las sondas marcadas son diluidas en una solución de HEPES-BSA que contiene 0.5 µg/ml de poly (dI-dC) (Farmacia LKB, Piscataway, NJ, USA) en una concentración establecida empíricamente (100pM); 100 µl de esta solución es añadida al corte de tejido a 37° durante toda la noche en una cámara húmeda.

Para la detección de la señal las muestras son lavadas dos veces con una solución de HEPES-BSA y una solución de lavado (Tween 0.03% en *buffer* 1, que consiste en ácido maleico 0.1M, NaCl

0.15M, pH 7.5). Posteriormente, se incubó durante una hora en una solución bloqueante (SSC 0.1X, SDS 0.1% diluido 1/10 en una solución de lavado). Las preparaciones son lavadas una vez más en una solución de lavado e incubadas toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con una fosfatasa alcalina (1/250 en solución bloqueante; Boehringer Mannheim). Posteriormente, las preparaciones son lavadas en un *buffer 2* (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.1M, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5) a temperatura ambiente. La fosfatasa alcalina se visualiza con una solución de detección (45 µl de solución NBT y 35 µl de X-Fostato en 10 ml de *buffer 2* DIG-Labeled Nucleic Acid, Boehringer Mannheim). El color se revela en la oscuridad durante 1 hora. La reacción es interrumpida mediante la incubación en una solución de TE (Tris 10mM y EDTA 1mM, pH8.0). Las secciones se montan en glicerol.

Los controles negativos fueron: (a) ausencia de sonda, (b) utilización de una sonda mutada del NF- κ B (sense: AGT TGA GGC TCC TTT CCC AGG C-3'), marcada con digoxigenina y utilizada en la misma concentración que la sonda normal.

3.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Todos los valores obtenidos se han expresado como una media \pm error estándar de los diferentes grupos descritos.

Todo el análisis estadístico se ha realizado con el programa informático SPSS para Windows (versión 6.0.1, 2 Mayo 1994, 1250352 SERC). Se utilizan los test de Levene para el análisis de la normalidad, el test de Wilcoxon para el análisis de signos, el test de Sheffé para la comparación de medias (matriz de coeficientes de contraste y ANOVA). Para el análisis de la regresión múltiple se ha utilizado el análisis de regresión lineal multivariante.

En el conjunto de los análisis experimentales, los valores de $p < 0.05$ se han considerado estadísticamente significativos.