

Tesi doctoral presentada per En/Na

Marta PUIGMULÉ RAURICH

amb el títol

**"Caracterització dels sistemes renals de ratolí i humà
(PCT3 I HK-2). Mecanismes moleculars implicats en la
nefrotoxicitat produïda per la CsA en el túbul proximal
renal"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 29 de maig de 2008

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CONCLUSIONS

1. CARACTERITZACIÓ DELS SISTEMES CEL·LULARS TUBULARS RENALS

1. En cèl·lules PCT3 i HK-2 els fàrmacs SANDIMMUN® i el Cremophor® EL són molt tòxics a dosis elevades, concretament a 20 i 50 μ M. La toxicitat causada per la CsA (CALBIOCHEM®) comença a evidenciar-se a partir de la dosi 10 μ M. Aquesta toxicitat en cap cas és tant elevada com en la resta de fàrmacs.

2. La concentració 10 μ M de CsA és una dosi llindar que provoca la disminució de la viabilitat cel·lular 24 hores després del tractament. Dosis inferiors no afecten a la viabilitat cel·lular sigui quina sigui la durada del tractament. Dosis superiors de CsA causen un augment de la toxicitat cel·lular de manera temps dependent. La CsA només és tòxica en cèl·lules d'origen renal (PCT3, PR10 i HK-2).

3. El rang de concentracions de CsA entre 0 i 1 μ M provoquen una disminució de l'activitat deshidrogenasa mitocondrial (MTT) durant els 5000 primers segons després del tractament en cèl·lules PCT3 i HK-2. Després de 2-7 h de tractament les cèl·lules PCT3 i HK-2 recuperen l'activitat deshidrogenasa mitocondrial perduda en els moments inicials.

6. El tractament de cèl·lules HK-2 i PCT3 amb la dosi 10 μ M de CsA durant 24 hores produeix una disminució del percentatge de cèl·lules en fase S. Aquesta disminució correlaciona amb un augment del nombre cèl·lules en fase G0/G1 per la línia cel·lular HK-2 i amb un augment del nombre de cèl·lules en fase G2/M per les cèl·lules HK-2.

7. El tractament de cèl·lules HK-2 amb CsA provoca una disminució del consum d'oxigen. El consum d'oxigen disminueix al augmentar el temps de tractament seguint el model de cinètica doble recíproca o de Michaelis-Menten.

8. El tractament amb CsA de cèl·lules HK-2 i PCT3 crescudes en un medi lliure de sèrum i de factors de creixement apareix l'apoptosi a les concentracions de 100 i 1.000 nM. Quan es creixen les cèl·lules en un medi de cultiu complet es detecta apoptosi a les dosis de 10 i 20 μ M. Els factors de creixement i el sèrum retarden l'aparició de la mort cel·lular per apoptosi. Les cèl·lules PCT3 són més sensibles a l'apoptosi que les cèl·lules HK-2.

2. ESTUDI PROTEÒMIC DIFERENCIAL I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES IMPLICADES EN LA TOXICITAT RENAL PRODUÏDA PER LA CsA

1. El tractament de les cèl·lules PCT3 durant 24h amb la dosi de CsA 10 μ M provoca l'aparició de la majoria de canvis d'expressió proteica. L'expressió proteica pot augmentar, disminuir, aparèixer o desaparèixer respecte la situació control.

2. L'anàlisi proteòmic comparatiu entre cèl·lules PCT3 i cèl·lules PCT3 tractades amb 10 μ M de CsA detecta 72 proteïnes diferencialment expressades, 38 de les quals han estat identificades. Un 34% de les proteïnes identificades augmenten la seva expressió al ser sotmeses al tractament amb la CsA i el 66% la disminueixen.

3. Amb l'ajut de diferents eines informàtiques, les proteïnes identificades s'han classificat en 6 categories diferents: metabolisme de proteïnes (20%), resposta al dany cel·lular (21%), organització cel·lular i citoesquelet (20%), metabolisme energètic (13%), cicle cel·lular (11%) i metabolisme d'àcids nucleics (7%).

4. L'anàlisi de gels bidimensionals pot revelar canvis proteics importants des d'un punt de vista fisiopatològic, que poden passar desapercibuts analitzant gels d'una dimensió.

5. El comportament de l'expressió de les proteïnes α -B-cristalina, RACK-1 i NACA en cèl·lules PCT3 tractades amb la dosi de 10 μ M de CsA és molt similar al comportament observat en ronyons de ratolins tractats amb CsA.

6. El mapa proteic de les cèl·lules HK-2 s'assembla al mapa proteic de les cèl·lules PCT3. Aquest estudi ens ha permès validar les cèl·lules PCT3 com a model per a l'estudi de la toxicitat causada per la CsA.

3. ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES CICLOFILINES A I B. ESTUDI DE L'EFECTE DE LA CsA EN ABSÈNCIA DELS SEUS RECEPTORS, LA CyPA I LA CyPB

1. La disminució de la viabilitat dels clons cel·lulars amb una de les dues ciclofilines interferides s'inicia a la concentració 20 μ M de CsA.

2. La mort cel·lular per apoptosi en els clons cel·lulars amb la CypA o la CypB interferida és present a les dosis de 10 i 20 μ M de CsA.

3. Els clons que presenten un 75% de la CypA interferida s'adhereixen a la placa més lentament que la resta de clons. Com a conseqüència arriben més tard a la confluència.

4. L'anàlisi proteòmic comparatiu entre els clons interferits amb la CypA i els clons control negatiu detecta 49 proteïnes diferencials de les quals 25 han estat identificades. D'aquestes un 12% presenten la seva expressió augmentada i un 88% disminuïda. L'anàlisi proteòmic comparatiu entre els clons interferits amb la CypB i els clons control negatiu detecta 68 proteïnes diferencials de les quals 21 han estat identificades. D'aquestes un 9.5% presenten la seva expressió augmentada i un 90.5%

disminuïda. De totes aquestes proteïnes 13 són comunes quan es silencien les ciclofilines, 11 són comunes a la interferència de les ciclofilines i al tractament cel·lular amb CsA. Tres proteïnes són exclusives de la interferència de la CypB i 2 de la CypA.