PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Fisiología.

LISINOPRIL DISMINUYE DE MANERA PARCIAL LA PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL A TRAVÉS DEL AUMENTO DE CICLOOXIGENASA-2 VÍA JNK/c-Jun.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ciencias Fisiológicas.

José Miguel Erpel N.

Tutores
Dr. Carlos P. Vio L.
Dra. Victoria Velarde A.

Mayo 2014

ACTA DE COMITÉ DE TESIS I

LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL FUE FINANCIADA POR:

- Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) con la Beca de Doctorado 2009-2012 y la beca de apoyo de Tesis Doctoral 24110155. 2011-2012.

- Proyecto de Financiamiento Basal 12/2007.

- Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (FONDECYT) con el proyecto regular 1080590 del Dr. Carlos Vio.

ÍNDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCIÓN 16
1.1 Insuficiencia Renal Crónica 16
1.2 Sistemas Renina Angiotensina y Calicreina Cinina. 17
1.3 Enzima Convertidora de Angiotensina I. 20
1.4 Ciclooxigenasas 23
1.5 Vía MAPK JNK/c-Jun 25
1.6 Hipótesis. 30
1.7 Objetivo General. 30
1.8 Objetivos Específicos. 30
2. MATERIALES Y MÉTODOS. 32
2.1 Cultivo Celular. 32
2.2 Modelo Animal y Análisis Funcional 32
2.3 Estudio Morfológico. 33
2.4 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia para Microscopía Óptica. 34
2.5 Electroforesis e "immunoblotting". 35
2.6 Análisis Morfométrico. 35
2.7 Fármacos. 36
2.8 Análisis Estadístico. 39
3. DISEÑO EXPERIMENTAL. 40
3.1 Evaluar si la disminución inducida por lisinopril en la progresión de la enfermedad renal es mediada por COX-2 y PGE_2 en el riñón de animales con IRC. 40
3.2 Estudiar en animales con IRC, si la vía JNK/c-Jun se activa posterior a la administración de lisinopril. 40
3.3 Evaluar si la administración de lisinopril a animales con IRC produce un aumento en los niveles de COX-2 y PGE_2 renales y determinar si este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun. 41
3.4 Evaluar el efecto morfofuncional de la inhibición de la vía JNK/c-Jun en animales con IRC. 41
3.5 Estudiar la activación de la vía JNK/c-Jun a través de la fosforilación de JNK posterior a la administración de lisinopril en células mTAL. 42
3.6 Evaluar si la administración de lisinopril genera un aumento en los niveles de COX-2 vía JNK/c-Jun en células mTAL. 42
3.7 Evaluar la expresión de ECA como receptor en células mTAL y su participación en el aumento de COX-2 dependiente de la administración de lisinopril. 43
3.8 Estudiar la participación de los receptores de Bradicinina B1, B2 y angiotensina AT1 en el aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril célula mTAL. 43
3.9 Estudiar la participación de los receptores de Bradicinina B1, B2 y angiotensina AT1 en el aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril en animales IRC. 44
4. RESULTADOS 45
4.1 Lisinopril aumenta la Velocidad de Filtración Glomerular (VFG) en animales con IRC, este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato. 45
4.2 La administración de lisinopril disminuye la excreción urinaria de proteínas, este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato 48
4.3 La administración de lisinopril disminuye los niveles del factor quimioatrayente Osteopontina en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato. 50

4.4 La administración de lisinopril disminuye la infiltración de macrófagos en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato. 53
4.5 La administración de lisinopril disminuye el colágeno intersticial en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato. 57
4.6 La administración de lisinopril aumenta la expresión proteica de COX-2 en animales con IRC. 60
4.7 Lisinopril aumenta los niveles proteicos y fosforilados de JNK/c-Jun en animales con IRC. 63
4.8 La administración de lisinopril aumenta la cantidad de células p-c-Jun positivas por campo en animales con IRC. 66
4.9 El aumento proteico de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun en animales Sham y con IRC. 68
4.10 El aumento de PGE_2 generado por lisinopril es dependiente de la vía JNK/c-Jun en animales con IRC. 73
4.11 La administración de lisinopril mejora la estructura renal y la VFG de los animales con IRC. Este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun. 75
4. 12 La administración de lisinopril disminuye el factor quimioatrayente Osteopontina en los animales con IRC. Este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun. 79
4.13 La administración de lisinopril disminuye el colágeno intersticial en los animales con IRC. Este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun. 82
4.14 La administración de lisinopril aumenta los niveles proteicos de COX-2 en células mTAL. 86
4.15 La administración de lisinopril aumenta los niveles proteicos de JNK y p-JNK en células mTAL. 89
4.16 Anisomicina aumenta los niveles proteicos de la vía JNK/c-Jun. Este efecto es prevenido con la administración de SP600125 en células mTAL. 91
4.17 El aumento en los niveles proteicos de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun. 97
4.18 Evaluación de presencia de ECA en células mTAL 100
5. DISCUSIÓN 102
5.1 Caracterización de la Vía *in vitro* 102
5.2 Caracterización de la Vía *in vivo* 107
5.3 COX-2 en la enfermedad Renal 111
5.4 Efectos funcionales generados por la administración de lisinopril. 114
5.5 Osteopontina. 117
5.6 Infiltración celular en el Riñón 118
5.7 Fibrosis y progresión del daño renal. 119
6. CONCLUSIONES 122
6.1 Modelo Propuesto: 123
7. BIBLIOGRAFÍA. 124
8.0 ANEXO 135
8.1 El aumento de COX-2 en respuesta a la estimulación con lisinopril es dependiente del receptor B1 de Bradicinina en células mTAL. 135
8.2 El agonista del receptor B1R, Des-Arg-BK, aumenta los niveles proteicos de COX-2 en células mTAL. 138
8.3 El aumento de COX-2 inducido por lisinopril es independiente de los receptores B2 y AT1 en animales IRC. 141
4.22 El aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril es dependiente del Receptor B1 de Bradicinina en animales con IRC. 146
8.4 Lisinopril regula la vía de señalización JNK/c-Jun a través del receptor B1 de Bradicinina 151

8.5 Diuresis, FE K^+ y FE Na^+ en animales IRC y Sham. 153

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clearance de creatinina en animales sometidos a Nx 5/6 tratados con lisinopril, celecoxib o meclofenamato……..…….…..…47

Figura 2: La inhibición de COX-2 y PGE_2 aumentan de manera significativa la excreción de proteínas urinarias en animales IRC tratados con lisinopril……...…..….49

Figura 3 A: Lisinopril disminuye el factor quimioatrayente Osteopontina en los animales con IRC. Este efecto es revertido tras la inhibición de la COX-2 y PGE_2…….....51

Figura 3 B: Cuantificación Morfométrica del factor quimioatrayente Osteopontina...……52

Figura 4 A: Lisinopril disminuye la infiltración de Macrófagos en animales con IRC. Este efecto es revertido tras la inhibición de la COX-2 y PGE_2……..…….55

Figura 4 B: Cuantificación Morfométrica de Células ED-1 positivas por campo……56

Figura 5 A: La inhibición de COX-2 y PGE_2 previene la disminución en los niveles de colágeno intersticial inducido por lisinopril en animales sometidos a IRC.....58

Figura 5 B: Cuantificación Morfométrica del colágeno intersticial…….59

Figura 6: Efecto de lisinopril sobre los niveles proteicos de COX-2 en animales con IRC……...…..61

Figura 7: Lisinopril aumenta la distribución de COX-2 en el Asa Ascendente de Henle en cortes de riñón de ratas con IRC……..……..62

Figura 8: Expresión proteica de JNK y p-JNK en animales con IRC. Efecto de lisinopril sobre los niveles proteicos de la vía JNK/c-Jun…….…….64

Figura 9: Expresión proteica de c-Jun y p-c-Jun en animales con IRC. Efecto de lisinopril sobre los niveles proteicos de la vía JNK/c-Jun……...……..65

Figura 10: Distribución de p-c-Jun en cortes histológicos de riñón de rata de animales sanos y con IRC. Efecto de lisinopril sobre la distribución de p-c-Jun…….……67

Figura 11: Efecto de SP600125 en los niveles proteicos de COX-2 en animales Sham e IRC tratados con lisinopril o anisomicina……...…….....……69

Figura 12 A: Efecto de SP600125 sobre la distribución de COX-2 en el tejido renal de animales con Nx 5/6, en respuesta a lisinopril o anisomicina…….……..71

Figura 12 B: Cuantificación Morfométrica de la expresión proteica de COX-2. Efecto de anisomicina y SP600125 sobre los niveles proteicos de COX-2….....72

Figura 13: Excreción Urinaria de 13, 14-dihidro-15 keto PGE_2 en animales sometidos a Nx 5/6. ……..……...…….....74

Figura 14: La disminución parcial de la velocidad de filtración glomerular en animales con IRC es mediada por la vía JNK/c-Jun. …….…….……....76

Figura 15: La disminución parcial del daño estructural en animales con IRC es mediada por la vía JNK/cJun.……..……..…….....78

Figura 16 A: La disminución del factor quimioatrayente Osteopontina en animales con IRC es mediado por la vía JNK/c-Jun. …….……....80

Figura 16 B: Cuantificación Morfométrica del factor quimioatrayente Osteopontina…….81

Figura 17 A: La disminución del factor del colágeno intersticial en animales con IRC es mediado por la vía JNK/c-Jun. ……..……...……...…….……84

Figura 17 B: Cuantificación Morfométrica del colágeno intersticial……...85

Figura 18: Lisinopril aumenta los niveles de COX-2 de manera significativa en dosis igual o superior a 100 nM hasta 500 nM……...88

Figura 19: Efecto de lisinopril en los niveles proteicos de JNK y p-JNK en células mTAL…….....90

Figura 20: Lisinopril y anisomicina aumentan de manera significativa los niveles de JNK y p-JNK……..……..93
.
Figura 21: Lisinopril y anisomicina aumentan de manera significativa las células p-c-Jun (+) por campo……..…….....95-96

Figura 22 A: El aumento en los niveles proteicos de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun. ……..……..…98

Figura 22 B: Inmunofluorescencia de COX-2: Efecto en células mTAL de la vía JNK/c-Jun en COX-2. …….……..…….....99

Figura 23: Expresión proteica de ECA en diferentes modelos experimentales……101

ANEXO
RESULTADOS PRELIMINARES

Figura 24: El aumento de COX-2 en respuesta a lisinopril es dependiente del receptor B1 de Bradicinina en células mTAL……..…137

Figura 25: Curva concentración respuesta de niveles de COX-2 tras la administración del agonista del receptor B1R en células mTAL……...140

Figura 26: El aumento de COX-2 inducido por lisinopril es independiente de los receptores B2 y AT1……...……...142

Figura 27 A: El aumento en la distribución de COX-2 inducido por lisinopril es independiente de los receptores B2 y AT1 en animales con IRC……...…....144

Figura 27 B: Cuantificación Morfométrica de la distribución de COX-2……..145

Figura 28: El aumento de COX-2 inducido por lisinopril es dependiente del receptor B1 de Bradicinina…….……..147

Figura 29 A: El aumento en la distribución de COX-2 inducido por lisinopril es dependiente del receptor B1 de Bradicinina…...…….149

Figura 29 B: Cuantificación Morfométrica de la expresión de COX-2……150

Figura 30: El aumento en los niveles proteicos de JNK y p-JNK es dependiente del receptor B1 de Bradicinina……..……..…….**.....**152

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diuresis y Fracción excretada de Na^+ y K^+ en animales IRC tratados con lisinopril, celecoxib y meclofenamato ….……...…….155

Tabla 2: Diuresis y Fracción excretada de Na^+ y K^+ en animales IRC tratados con lisinopril, anisomicina y SP600125**……...……..**…….156

Tabla 2: Diuresis y Fracción excretada de Na^+ y K^+ en animales Sham tratados con lisinopril, anisomicina, SP600125, celecoxib y meclofenamato**...**……..……157

ABREVIATURAS.

AINES:	Antiinflamatorios no esteroidales.
Ang II:	Angiotensina II.
AT1:	Receptor de Angiotensina 1.
B2R:	Receptor B2 de Bradicinina.
B1R:	Receptor B1 de Bradicinina.
BK:	Bradicinina.
CC:	Calicreina.
COX-2:	Ciclooxigenasa-2.
CK2:	Caseína Quinasa 2.
DABK:	Des-Arg-Bradicinina
DE:	Desviación estándar
ECA:	Enzima Convertidora de Angiotensina I.
EIA:	Inmuno ensayo enzimático.
GB:	Modelo Goldblatt
HOE-140:	Antagonistas del receptor B2
H-E:	Hematoxilina-Eosina
IHQ:	Inmunohistoquímica
iECA:	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina.
IRC:	Insuficiencia Renal Crónica.
JNK:	Proteína quinasa c-Jun N-terminal.
mTAL:	Células medulares del Asa Ascendente Gruesa de Henle.
Nx 5/6:	Nefrectomía 5/6.
OPN:	Osteopontina.
PAP:	Complejo peroxidasa antiperoxidasa.
PGE_2:	Prostaglandina E_2.
PGs:	Prostaglandinas
SRA:	Sistema Renina Angiotensina.
SCC:	Sistema Calicreina Cininas.
VFG:	Velocidad de filtración glomerular

RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (IRC) corresponde a una situación clínica caracterizada por la pérdida irreversible de la función renal, de carácter progresivo y de múltiples etiologías. Los sistemas vasoactivos como el Sistema Renina Angiotensina (SRA) y el Sistema Calicreina Cininas (SCC) son fundamentales para la homeostasis renal, ejerciendo funciones en la regulación de iones como sodio y potasio, en la diuresis, el transporte de agua a nivel del túbulo colector y en la regulación de la presión arterial renal, por lo que un desbalance entre estos sistemas podría llevar a una patología renal. El SRA ha sido caracterizado como un sistema hipertensor en el que la Angiotensina II (Ang II), un potente vasoconstrictor, activa al receptor AT1, generando un aumento de la resistencia periférica, la presión arterial, fibrosis e inflamación. Por otra parte, el Sistema Calicreina Cininas (SCC), ha sido descrito como un sistema renoprotector. Este efecto ha sido atribuido a la Bradicinina (BK), la que mediante la activación de sus receptores B1 o B2 estimula diferentes efectos fisiológicos como el aumento del flujo sanguíneo medular, la natriuresis y la reducción de la fibrosis. Uno de los mediadores más importante de estos dos sistema es la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA), responsable de transformar la angiotensina I (Ang I) en Ang II y de degradar la BK a BK-1,7, generando una disminución del efecto del SCC y un aumento del SRA. En relación a la ECA, se han descrito 2 tipos, una circulante y otra tisular, siendo esta última la forma más abundante. Además, algunos autores han caracterizado la función de la ECA tisular atribuyéndole un rol como receptor.

La ECA tisular se localiza en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, con su extremo COOH terminal hacia el intracelular. Se ha sugerido que diversas enzimas como la Casein Kinasa 2, MKK7, JNK y Ciclooxigenasa 2 (COX-2) interactúan y regulan a la ECA por este segmento. Más aun, en estudios realizados en los últimos años, se ha mostrado la relación que existe entre la ECA y la vía JNK.

La COX-2 no solo interactúa con la ECA sino que además es regulada por ambos sistemas vasoactivos. Se ha descrito que bajo ciertas condiciones experimentales la COX-2 puede ser modulada por el receptor AT1 de angiotensina y por el receptor B2 de BK. Más aún, se ha demostrado que inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (iECA) al unirse a la ECA, aumentan la expresión de COX-2 mediante la activación de la vía JNK. Por otra parte, ha sido reportado que la administración de iECAs mejora la función renal en pacientes con IRC, Nefropatía Diabética y en otros modelos experimentales, atribuyendo sus efectos benéficos en gran medida a los cambios en la presión arterial y flujo sanguíneo, sin estar de todo claro la participación de COX-2, PGE_2 o la vía JNK/c-Jun.

Estos antecedentes nos permitieron postular que "La disminución inducida por lisinopril en la progresión del daño renal es mediada por un aumento de COX-2 y PGE_2 vía JNK/c-Jun en un modelo de Insuficiencia Renal Crónica". Para probar esta hipótesis se planteó como objetivo general estudiar si el efecto que posee la administración de lisinopril sobre los niveles de COX-2 y PGE_2 es mediado por el receptor ECA y la vía JNK/c-Jun. Además, se planteó evaluar cómo este proceso genera una disminución en el daño renal inducido por la Nefrectomía 5/6 (Nx 5/6).

Los resultados obtenidos mostraron que lisinopril aumentó los niveles proteicos de COX-2 en animales IRC. Este aumento fue dependiente de la vía JNK/c-Jun evaluado tras la administración de un activador (anisomicina) y un antagonista (SP600125) de la vía. La administración de lisinopril y por consiguiente el aumento de COX-2 y PGE_2 previno parcialmente la disminución de la tasa de filtración glomerular, el aumento en la excreción urinaria de proteínas, la deposición de colágeno intersticial, la infiltración de macrófagos y el aumento en los niveles del factor quimioatrayente Osteopontina, siendo esto importante para la recuperación parcial de la

funcionalidad y estructura renal. Estos efectos no se observaron posterior a la administración de inhibidores de las COXs como celecoxib y meclofenamato.
En células mTAL (células inmortalizadas del Asa de Henle) lisinopril aumentó los niveles proteicos de COX-2. Se observó además que el efecto de lisinopril fue similar al del activador de la vía, aumentando los niveles proteicos de JNK. Originalmente se postuló que el aumento de COX-2 en respuesta a la administración de lisinopril era mediado por su interacción con la ECA como receptor. Sin embargo, en células mTAL no fue posible identificar la expresión de ECA, aun así, se observó un aumento en los niveles de COX-2 en respuesta a la administración de lisinopril. Este resultado nos hizo plantear de manera preliminar una nueva hipótesis en la cual se postuló a otro receptor como mediador del efecto. Los receptores evaluados fueron B1 y B2 de BK y el AT1 de Ang II, observándose de manera preliminar que tanto en células mTAL como en animales IRC la co-administración de lisinopril con Leu-8 (antagonista del receptor B1 de BK), previno el aumento en los niveles de COX-2 y JNK obtenidos con lisinopril. La administración de antagonistas de los receptores B2 (HOE-140) o AT1 (losartan) en presencia de lisinopril no produjo diferencias en los niveles de COX-2 en comparación con la administración solo de lisinopril. Con la finalidad de caracterizar cómo lisinopril interaccionaba con el receptor B1 de la BK, se comparó de manera preliminar su efecto con un agonista selectivo del receptor Des-Arg-Bradicinina (DABK), observándose que ambos presentaban efectos similares. De hecho se observó un efecto aditivo entre el lisinopril y DABK a las concentraciones utilizadas.

ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) is a clinical condition resulting from the progressive loss of kidney function that can be caused by multiple etiologies, either congenital or acquired. In this context, vasoactive systems of renal origin are critical to homeostasis, performing functions in ion and water excretion and in the regulation of blood pressure. The main vasoactive systems are the Renin Angiotensin System (RAS), which is a system that induces an increase in blood pressure by increasing the interaction of the AT1 receptor with its agonist angiotensin II (Ang II), a potent vasoconstrictor. This interaction leads to an increase in peripheral resistance, blood pressure, fibrosis and inflammation. On the other hand, the Kallikrein Kinins System (KKS) has been described as a renoprotective system, effect attributed to Bradykinin (BK), a peptide that interacts with its receptors B1 or B2 producing different physiological effects such as regulation of medullary blood flow, natriuresis, and anti-fibrosis, among others. One of the most important mediators of these two systems is the angiotensin I-converting enzyme (ACE), who is responsible for transformation of angiotensin I (Ang I) to Ang II and of BK to BK-1-7, generating a decrease in the effects of the KKS and an increase in the effects of the RAS. Regarding ACE two isoforms have been described, one that is bound to membranes and one that circulates in blood, the former being the most abundant one. Based on this and other results, some authors have postulated that tissue ACE can act as a receptor.

Tissue ACE is localized in the plasma membrane of different cell types, with its COOH-terminal end towards the intracellular space. It has been suggested that casein kinase 2 (CK2) MKK7, JNK and Cyclooxygenase 2 (COX-2) interact with and regulate ACE through this segment. Even more, in studies performed during the last years, a relation between ACE and the JNK pathway has been demonstrated. .

COX-2 not only interacts with ACE but is regulated by both vasoactive systems as well. It has been described that under certain experimental conditions COX-2 can be modulated by the activation of the angiotensin AT1 and/or the B2 receptors. Even more, it has been shown that the administration Angiotensin I Converting Enzyme inhibitors (ACEi) produce an increase in the expression of COX-2 through the activation of JNK using ACE as a receptor. Moreover it has been reported that the administration of ACEi improves renal function in patients with CRF, diabetic nephropathy and other experimental models, attributing these beneficial effects to changes in blood pressure and blood flow, without being all clear the involvement of COX-2, its product PGE2 or the JNK / c-Jun pathway.

This background allowed us to postulate that "The reduction in the progression of renal damage induced by an ACEi (lisinopril) in a model of CRF is partly mediated by the increase in COX-2 and PGE_2 through of JNK/c-Jun pathway". For this purpose we proposed as a general goal to study whether the effect of lisinopril administration on levels of COX-2 and PGE2 were mediated by the activation of the JNK/c-Jun pathway and ACE as a receptor. In addition, we also assessed how this process caused a decrease in renal damage generated by the 5/6 nephrectomy.

The results showed that lisinopril increased protein levels of COX-2 in CRF animals. This increase was dependent on the protein increase of JNK/c-Jun assessed following administration of an agonist (anisomycin) and an antagonist (SP600125) of the pathway. Lisinopril administration and therefore the increase in COX-2 and PGE2 partially prevented the decrease in glomerular filtration rate, the increase in urinary protein excretion, interstitial collagen deposition, macrophage infiltration and increased in the levels of the chemoattractant factor Osteopontin, this being important for the partial recovery of renal function and

structure. These effects were not observed following administration of COXs inhibitors such as celecoxib and meclofenamate.

In mTAL cells (immortalized cell of the Loop of Henle) lisinopril increased protein levels of COX-2. It was also observed that the effect of lisinopril was similar to the agonist of the pathway, increasing the protein levels of JNK. Originally it was postulated that the COX-2 increase in response to the administration of lisinopril was mediated by its interaction with ACE as a receptor. However, in mTAL cells we were unable to identify the expression of ACE, even so, an increase in the levels of COX-2 in response to the administration of lisinopril was observed.

These results led us to raise a new hypothesis in which the administration of lisinopril increased levels COX-2 by a receptor different from ACE receptor. For this reason, AT1, B1 and B2 receptors were evalluated, observing that in both mTAL cells and animals with CRF the co administration of Leu-8 (B1 receptor antagonist) prevented the increase induced by lisinopril in protein levels of COX-2 and JNK. The administration of B2 (HOE-140) and AT1 (losartan) receptor antagonists had no effect on the increase induced by lisinopril in the levels of COX-2, suggesting a new independent signaling mechanism. With the aim of confirming whether lisinopril interacted with the B1 receptor, its effect was compared with the effect of a selective agonist of this receptor Des-Arg-bradykinin (DABK), observing that both had similar effects. Even more, an additive effect was observed at doses that by themselves did not induce changes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Insuficiencia Renal Crónica

La insuficiencia renal crónica (IRC) corresponde a una situación clínica derivada de la pérdida permanente de la función renal, tiene carácter progresivo y es provocada por múltiples etiologías, tanto de carácter congénito como adquirido. La IRC es un problema de salud pública en Chile y el mundo. En nuestro país, el número de pacientes con enfermedad renal crónica ha aumentado progresivamente, llegando en el año 2010 a tener una prevalencia de 9.050 pacientes en total y una incidencia de 592 por millón de individuos en la población (PMP). (Encuesta Nacional de Salud 2010. Ministerio de Salud Chile). Este aumento es importante, si se considera que la incidencia ha aumentado sostenidamente, tanto en el número como en la tasa de personas que requieren hemodiálisis en los últimos años, (7.094 que equivale a una tasa de 473 PMP para el año 2000 y 16.231 que equivale a una tasa de 944 PMP para el año 2011 respectivamente, Sociedad Chilena de Nefrología. Dr. Hugo Poblete Badal. Registro de Diálisis. XXXI Cuenta de Hemodiálisis Crónica al 31 de agosto de 2011). Esto representa un incremento de 78,1% en el número de pacientes en hemodiálisis en este período siendo la mortalidad bruta anual de pacientes en diálisis aproximadamente el 11,6% (Poblete, 2005). En Chile sólo 1.314 pacientes (13,9%) logran ingresar a programas de trasplante. Se estima que un 22% del presupuesto del programa de Garantías en Salud (GES) del MINSAL, es utilizado en el tratamiento de la IRC terminal (Encuesta nacional de salud 2010).

1.2 Sistemas Renina Angiotensina y Calicreina Cinina.

En condiciones fisiológicas, los sistemas vasoactivos como el Sistema Renina Angiotensina (SRA) y el Sistema Calicreina Cininas (SCC) son fundamentales para la homeostasis renal, ejerciendo funciones en la regulación de iones como sodio y potasio, diuresis, transporte de agua a nivel del túbulo colector y en la regulación de la presión arterial renal, por lo cual un desbalance entre éstos podría llevar a una patología renal (González y col., 2011).

Dentro de las funciones que ejercen los SRA y SCC se encuentran la regulación del tono vasomotor, homeostasis iónica, hemodinamia glomerular, regulación de la presión arterial (Hipotensor SCC e Hipertensor SRA) y regulación en la síntesis de insulina (Xu y col., 2012; Vio y col., 1992, 1998). Adicional a los efectos funcionales se ha descrito la importancia de los SRA y SCC sobre la arquitectura cardiovascular y renal. (Xu y col., 2012). Uno de los componentes más importante del SRA, es la Angiotensina II (Ang II) la cual proviene de la Angiotensina I producto de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). Dentro de sus acciones clásicas se encuentran vasoconstricción y liberación de Aldosterona de la Glándula Suprarrenal, sin embargo, se han descrito diferentes funciones de este péptido que lo convierten en una auténtica citoquina capaz de participar en el daño renal y vascular (Fraune y col., 2012). Dentro de estas funciones se encuentra la inducción de proliferación e hipertrofia celular, modulación de la producción de matriz extracelular y respuesta inflamatoria a través de sus acciones quimiotácticas que inducen el reclutamiento de células inflamatorias (Mennuni y col., 2013). A nivel vascular, Ang II regula la hipertrofia/hiperplasia, migración celular y la expresión de genes proinflamatorios (Mennuni y col., 2013). Diferentes autores han estudiado la expresión de Ang II en

modelos patológicos, encontrando que los niveles tisulares de Ang II están elevados en comparación con animales sanos. Este aumento de Ang II es concordante con la progresión de la patogenia tanto de enfermedades cardiovasculares (hipertensión arterial, infarto de miocardio y arterioesclerosis) como renales (Mennuni y col., 2013; Mezzano, 2001; Alcázar y col., 2003).

En la actualidad, se considera que las múltiples acciones de la Ang II, tanto a nivel circulatorio como a nivel tisular, son mediadas por dos subtipos principales de receptores: el receptor AT1 y el receptor AT2. Ambos pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana los cuales comparten aproximadamente el 30% de su secuencia de aminoácidos (Stanton, 2013).

La distribución del receptor AT1 ha sido estudiada extensamente, reconociéndose en la actualidad que está presente en la mayoría de los tejidos en humanos, primates y roedores, siendo además el tipo predominante en los adultos (Stanton, 2013). Se caracteriza por acoplarse a proteínas Gαq/11 aunque también se puede acoplar a Gαi/0, Gα12/13. Esto le permite activar fosfolipasas como la A, la D, y la C. Esta última genera inositol 1, 4,5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol, una molécula que activa a la proteína quinasa C (PKC) que fosforila diferentes proteínas que participan en acciones tales como: la contracción de músculo liso y la secreción de aldosterona, así como el crecimiento y la proliferación celular (Simoes y col., 2013). De esta forma el receptor AT1 es el encargado de mediar la mayoría de las acciones conocidas de Ang II como son la vasoconstricción y el incremento en la proliferación celular (Lombardi y col., 2001).

El receptor AT2 se expresa de manera predominante durante la etapa fetal, disminuyendo su expresión de manera considerable al momento del nacimiento, siendo aun detectando en bajos niveles en diferentes tejidos, por ejemplo: nervioso, cardíaco, y renal (Padia y col.,

2013). Las vías de señalización del receptor AT2 no se conocen del todo, sin embargo, existe evidencia que apoya el acoplamiento del receptor AT2 a proteínas G inhibidoras (Gαi/2 Gαi/3) lo cual provoca la activación de fosfatasas tanto de serina-treonina como la PP2A, así como de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1. Este acoplamiento provoca la desfosforilación de proteínas activadas por el acoplamiento del receptor AT1 con Gαq (AT1-Gαq), siendo éste un mecanismo por la cual el receptor AT2 antagoniza las acciones del receptor AT1 (Padia y col., 2013).

Por otra parte el SCC también es un sistema con múltiples funciones conocidas siendo algunas de ellas antagónicas al SRA. Uno de sus efectores más importante de este sistema es la Bradicinina (BK), este péptido vasoactivo es generado a partir de su sustrato Cininogeno por acción de la Calicreina (CC), la cual es una proteasa que se encuentra a nivel plasmático y tisular. La CC tisular es sintetizada, en las células del túbulo conector en donde favorece la producción de BK, la cual puede antagonizar los diversos efectos de la Ang II, de esta manera BK inhibe la proliferación celular, estimula la actividad de colagenasas e inhibe la fibrosis ventricular, renal y vascular (Pathak y col., 2013; Schanstra y col., 2002).

Se conocen dos receptores que regulan el efecto de la BK, el receptor B1 (B1R) y el Receptor B2 (B2R). El B1R, se une de modo selectivo a los metabolitos Des-Arg-BK (DABK), o Des-Arg- Calidina (DACL) y su expresión es menor que la del B2R que se expresa en casi todos los tejidos. El B1R está en el músculo liso de vasos sanguíneos y es inducido de forma positiva por la inflamación (Regoli y col., 1990; Dray y col., 1993). Durante situaciones de estrés, como traumatismo, aumento de presión tisular o inflamación, pueden predominar los efectos del B1R sobre el B2R. Se ha reportado que las citoquinas como IL-1 son responsables de la inducción de este receptor en diversos tejidos (Riad y

col., 2008). El B1R puede ser antagonizado de manera selectiva por el péptido Des-Arg-Leu-8 (Leu-8) (Vianna y col., 1998).

El B2R se encuentra expresado de manera constitutiva en los diversos tejidos del organismo. Es un receptor acoplado a proteína G el cual puede activar a las fosfolipasas A2 y C. Ha sido descrito como parte de la vía de señalización que conduce a la activación de Ciclooxigenasa-2 en células vasculares de musculo liso (VSMC) y células medulares del Asa Ascendente gruesa de Henle (mTAL), posterior a la administración de BK (Rodriguez y col., 2004). Diversos autores han señalado la importancia de este receptor en la progresión de la fibrosis renal, es así como se han observado mayores niveles de colágeno intersticial en ratones *Knock Out* (KO) para el B2R, en comparación con animales silvestres tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (Shantra y col., 2002). El B2R puede ser antagonizado de manera selectiva mediante un péptido denominado HOE-140 (Tschöpe y col., 2004).

1.3 Enzima Convertidora de Angiotensina I.

La Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA) es una ectoenzima con un extremo amino extracelular y un carboxilo terminal intracelular, posee tres a cinco residuos de serina, uno de los cuales está ubicado en una región de 13 aminoácidos altamente conservada en la región COOH terminal (Ser1270) intracelular. La ECA cataliza la conversión de Angiotensina I (Ang I) en Ang II y la degradación de BK a BK 1-7 y luego a BK 1-5. En humanos y roedores se expresan dos formas distintas de ECA, una somática la cual es abundante en las células endoteliales del pulmón y riñón (aunque el riñón tiene una cantidad 5 veces mayor que el pulmón, por mg de peso) y otra isoenzima expresada casi de

forma exclusiva en testículos (Fuch y col., 2005). La actividad de la ECA somática está involucrada en la regulación de la presión arterial además de presentar efectos proliferativos y pro-fibróticos (Fleming y col., 2006).

El gen de la ECA humano se encuentra localizado en el cromosoma 17q23. En 1990, Rigat y colaboradores describieron un polimorfismo en dicho gen que consistía en la presencia (inserción, I) o ausencia (deleción, D) de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 del gen de la ECA, con la particularidad de que dicho polimorfismo explicaba un 47% de la variabilidad fenotípica de ECA plasmática. Concretamente, se vio que el alelo D se asociaba a niveles plasmáticos de ECA aumentados. Posteriormente se describió un método sencillo de detección del polimorfismo mediante amplificación de ADN genómico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores específicos. Estudios en familias han demostrado que el polimorfismo I/D es en realidad un marcador genético que se encuentra fuertemente ligado a una variante funcional (ECA S/s) cuya identidad molecular se desconoce. Los niveles plasmáticos de ECA tienen una variabilidad intra-individuo muy baja que contrasta con aquella que se observa inter-individuo que es elevada. Además, se ha demostrado que presentan una concordancia intrafamiliar importante y que están determinados genéticamente (Borah y col., 2012).

Así como en el pasado se estableció que un desbalance entre el SRA y el SCC contribuía a la génesis y progresión de la hipertensión arterial, hoy existe abundante evidencia que demuestra que el aumento local de Ang II, contribuye a la lesión túbulo intersticial renal y a la progresión del daño renal (Mezzano y col., 2001). El aumento de Ang II se explica por el aumento de ECA en estos modelos experimentales (González-Villalobos y col., 2013).

Concordante con esto, parte importante de los efectos benéficos de los inhibidores de la ECA (iECA) se explican por la inhibición en la formación de Ang II, inhibición de la

degradación de BK, (Cruden y col., 2004; Gainer y col., 1998; Hornig y col., 1997; Squire y col., 2000; Soski y col., 2013;Taal y Brenner, 2000; Whrigt, 2008), estimulación del remodelamiento vascular (Nauli 2011), mejora de la función endotelial (Fleming y col., 2005) y disminución en la progresión de la arterioesclerosis (Fleming y col., 2005).

En la actualidad existen estudios en donde se muestra que los iECA interactúan de manera alostérica con los receptores B1 y B2 de BK. Es así como se ha descrito que los iECA tienen un efecto agonista con el B1R uniéndose a una molécula de Zn ubicada en el segundo *loop* extracelular. Esta interacción directa de los iECA con el receptor B1 de BK es consecuente con lo reportado por Erdos en donde plantea que los iECA, incluso en ausencia de ECA activan al receptor B1. Algunos estudios han reportado que esta activación lleva a la liberación de óxido nítrico en células endoteliales de origen humano vía óxido nítrico sintasa de la misma forma que los agonistas DABK o DACL (Erdos y col., 2010).

Al analizar la estructura de los receptores ECA y B1, se ha descrito que los cinco aminoácidos de la secuencia canónica de ECA (HEXXH), contienen sitios de unión de residuos de Zinc en los dominios N y C terminal importantes para la unión de los iECA. Por otra parte, al analizar la secuencia del segundo *loop* extracelular del receptor B1 (HEAWH) descrita como el sitio de unión para los agonistas del receptor B1, se evidencia una alta similitud con la secuencia de la ECA, sugiriendo así que esta secuencia del receptor B1 sería el sitio de unión de los iECA (Erdos y col., 2010).

1.4 Ciclooxigenasas

La ciclooxigenasa (COX) o prostaglandina H2 sintasa (PGHS) es una enzima que cataliza los dos primeros pasos en la biosíntesis de las prostaglandinas (PGs) a partir de su sustrato el ácido araquidónico (AA). Estos son la oxidación del AA a un endopoeróxido cíclico como PGG_2 y su posterior reducción a PGH_2. La PGH_2 es transformada por una serie de enzimas y mecanismos no enzimáticos en los prostanoides PGE_2, PGF_2, PGD_2, PGI_2 y TXA_2 (Paul y col., 2013).

La actividad de la COX ha sido estudiada en diversos modelos experimentales, y su secuencia fue clonada en 1988. (Vane y col., 1998). En la década de los 90 se generó el descubrimiento de una segunda forma de COX, la Ciclooxigenasa-2 (COX-2), (Vane y col., 1998). Algunos autores han planteado incluso la posibilidad de la existencia de una tercera isoforma: la COX-3, que se encontraría en el cerebro, mientras que para otros no sería más que la COX-2 pero con funciones más propias de la COX-1 (Kahn y cols. 2012).

La COX-1 desarrolla un papel importante en la síntesis de los prostanoides en condiciones fisiológicas, regula la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. El gen de la COX-1 tiene aproximadamente 22 kb, posee 11 exones y proviene de una duplicación de un gen común. Se encuentra en el cromosoma 9 y su región promotora no tiene caja TATA (Rouzer y col., 2009). En la célula, COX-1 se localiza en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. Aunque la COX-1 es constitutiva en diversos tejidos, sus niveles de expresión fluctúan durante el desarrollo. La estructura proteica de ambas ciclooxigenasas es similar, con una homología superior al 90%. El peso molecular de la COX-1 es aproximadamente de 69,05 kDa y los exámenes cristalográficos han demostrado diferencias estructurales derivadas de la secuencia de

aminoácidos. En su estructura se distinguen dos dominios, un dominio se une a las membranas y está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al lugar con actividad enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxigenación y otro la perooxidación (Sidhu y col., 2010; Gierse 2010). Aunque la existencia de varias isoformas de la COX había sido postulada a mediados de los años setenta, no fue hasta comienzo de los noventa cuando se obtuvieron evidencias concretas de una segunda isoforma de la COX, la cual no se encuentra presente normalmente en la célula pero se expresa posterior a la exposición de la célula a agentes como lipopolisacáridos (LPS) o citocinas proinflamatorias. Bajo estos antecedentes se denominó a COX-2 la forma inducible y a COX-1 la forma constitutiva (Mansferrer y col., 1992). La COX-2 posee un gen de menor tamaño, ubicado en el cromosoma 1, de aproximadamente 8,3 kb y contiene 10 exones. Su región promotora contiene sitios de unión que reconocen a glucocorticoides, interleucina-6 y a otras citoquinas (Leclerc y col., 2013). A nivel celular, la COX-2 se encuentra localizada en la región perinuclear y en la membrana nuclear (Plewka y col., 2013). Diferentes estudios han demostrado que se expresa constitutivamente en diferentes puntos del aparato genital masculino y femenino (Plewka y col., 2013), riñón (Vio y col., 1997, 1999, 2001) y durante procesos relacionados con la ovulación, implantación ovular, inducción del parto y reproducción (Plewka y col., 2013). Ha sido descrita en diferentes tipos de neuronas (Yun y col., 2011) y participa en la transformación cancerosa, en este caso a través de mecanismos de resistencia a la apoptosis (Roberts y col., 2011), incluso se ha caracterizado la participación de la COX-2 en la regeneración del epitelio gástrico (Rakoff y col., 2007), en la organogénesis renal (Dinchuk y col., 1995) y en el desarrollo post-natal renal (Morham y col., 1995). El mecanismo de acción en estos casos no es simplemente el de la formación de

las prostaglandinas sino también el acoplamiento o la interferencia con funciones de otras proteínas. Su peso molecular es de 69,09 kDa. Estructuralmente la COX-1 y la COX-2 son parecidas, pero el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente. Su estructura tridimensional consta de tres dominios independientes: uno similar al factor de crecimiento epidérmico 2, otro en la membrana y otro en donde se encuentran los dominios enzimáticos (Abdel-Aziz y cols., 2011).

Además de las diferencias génicas comentadas de distribución, regulación, expresión y estructura, ambas enzimas se activan por diferentes estímulos, utilizando diferentes rutas celulares (Leclerc y col., 2013; Yun y col., 2011; Fleming 2005).

Dentro de los productos derivados de la COX-2 se encuentra la PGI_2 y la PGE_2 las cuales poseen importantes efectos fisiológicos. La PGI_2 es mediadora del efecto antifibrótico de BK (Robertson y col., 2013), vasodilatadora y anti-agregante plaquetaria, lo que explica porqué su inhibición aumentaría la incidencia de infarto al miocardio y trombosis arterial (Rudic y col., 2005). Por otra parte, la PGE_2 dentro de sus funciones favorece la excreción de sodio a nivel renal (Rodríguez y col., 2004) y regula el flujo sanguíneo renal resultando en importantes cambios presores en el sistema cardiovascular (Green y col., 2012).

1.5 Vía MAPK JNK/c-Jun

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), son una familia de enzimas involucrada en el proceso de transducción celular posterior a estímulos. Esta familia de serina/treonina quinasas, desde hace unos años, ha recibido creciente atención por su participación en la regulación génica (Saadeddin y col., 2009; Barr y Bogoyevitch, 2001). Las diferentes MAPKs son activadas por estímulos específicos resultando en la regulación de sustratos específicos, por ejemplo: los factores de crecimiento pueden promover la

activación de las MAPKs reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Estas quinasas fosforilan directamente a factores de transcripción como Elk. Por otra parte, los estímulos generados por el estrés pueden activar otras tres familias de MAPKs incluyendo las MAPKs grandes (BMK/ERK5), la proteína quinasa de 38 kDa (p38 MAPK) y la proteína quinasa c-Jun N-terminal (JNK MAPKs) (Osaki y col., 2013; Frueh y col., 2013; Lewis y col., 1998; Widmann y col., 1999).

En particular, es de interés para este trabajo, la vía mediada por las MAPKs del tipo JNK. Existen tres genes que codifican para JNK MAPK, *JNK*1 (Derijard y col., 1994), *JNK*2 (Kallunki y col., 1994) y *JNK*3 (Gupta y col., 1996), también conocidos como *SAPK*y, *SAPK*a, *SAPK*b, respectivamente (Osaki y col., 2013; Kyriakis y col., 1994). *JNK*1 y *JNK*2 están expresadas de manera ubicua a diferencia de *JNK*3 que está restringida principalmente a los testículos y al cerebro (Yang y col., 1997). Las distintas isoformas de JNK MAPK resultan de un *splicing* alternativo de los tres genes *JNK* (Osaki y col., 2013, Gupta y col., 1996).

La activación de la vía JNK MAPK ha sido evaluada por la fosforilación del factor de transcripción c-Jun producto de la fosforilación de JNK. Esta fosforilación ocurre en respuesta a los estímulos extracelulares generados por factores de crecimiento, citoquinas, estrés celular, hiperosmolaridad, radiación UV e isquemia reperfusión entre otros (Hah y col., 2013; Kallunki y col., 1994; Minden y col., 1994). Esta cascada de señales comienza con la activación de un receptor, para luego reclutar moléculas adaptadoras y así activar a las proteínas G. Esto es generalmente seguido por tres o cuatro niveles de proteínas quinasas. Las MAPKKKKs (GCK, NIK, HPK) fosforilan y activan a las MAPKKKS (DLK, MLK) las cuales a su vez fosforilan y activan a las MAPKKs (MKK4, MKK7) para luego esta generar el mismo efecto y activar a las MAPKs (JNKs), las cuales son las

encargadas de fosforilar y activar proteínas específicas como por ejemplo factores de transcripción como c-Jun, ATF2 y Elk1 (Hah y col., 2013; Barr y Bogoyevitch, 2001). c-Jun actúa en el complejo de la "proteína activadora 1" (AP-1), el cual ha sido implicado en distintos procesos celulares, como proliferación, diferenciación y transformación entre otros (Barr y Bogoyevitch, 2001). La actividad de c-Jun en ratas puede ser aumentada mediante la fosforilación en las Ser 63 y Ser 73 por JNK MAPK (Pulverer y col., 1992). Se sugiere que estas fosforilaciones aumentan la estabilidad de c-Jun prolongando su vida media (Musti y col., 1997). c-Jun a su vez puede heterodimerizar con ATF2 el cual es otro sustrato activado por JNK MAPK llevando a un aumento en la expresión del propio gen de *c-Jun* (Van Dam y col., 1995), mostrando así el control que ejerce JNK MAPK a distintos niveles de señalización.

En estudios realizados en la última década se ha mostrado la relación que existe entre la ECA tisular y la vía JNK MAPK (Fleming, 2006). Se demostró que la Caseína Quinasa 2 (CK2), una proteína rio arriba de JNK, fosforila a la ECA en la Ser1270 del extremo carboxilo terminal posterior a la unión de un iECA a la ECA. La inhibición o mutación de la CK2 y por tanto la disminución de su actividad produce un aumento en la unión y secreción de la ECA (Fleming, 2006), aunque no es la única proteína asociada a la porción citoplasmática de ECA en células endoteliales ya que al realizar experimentos de inmunoprecipitación de células que sobreexpresan ECA y utilizando columnas de afinidad con péptidos específicos de la porción citoplasmática, se demostró la asociación de la ECA con proteínas como MKK7, JNK y COX-2 (Fleming, 2006).

La unión de los iECA como ramipril o peridonpril a la ECA, aumenta la fosforilación de la Ser1270 dependiente de CK2, activando la vía JNK lo que resulta en la fosforilación de c-Jun y posterior translocación de este al núcleo. Esta translocación de c-Jun al núcleo

aumenta los niveles de factor de transcripción AP-1 seguido de un aumento en la expresión de ECA (Fleming, 2006).

Estudios del mismo grupo han descrito la participación de esta cascada de señales en el aumento de COX-2 en células epiteliales de pulmón y células endoteliales de vena de cordón umbilical (Fleming, 2005). Los iECA estimulan la vía JNK aumentando la fosforilación de c-Jun y sucesivamente a AP-1 el cual estimula la expresión de COX-2. Farmacológicamente la vía JNK/c-Jun puede ser modulada a través de anisomicina (activador de la vía) y SP600125 (antagonista de la vía).

Bajo estos antecedentes entendemos que la homeostasis renal depende de manera importante de dos sistemas vasoactivos denominados SRA y SCC. Estos sistemas son regulados mediante la ECA, la cual transforma la Ang I en Ang II y degrada la BK a BK 1-5, lo que explica en parte el efecto benéfico que conlleva la administración de iECA. Además, entendemos que una enzima importante activada por el SCC es la COX-2, la cual se ha descrito que posee efectos benéficos a nivel renal e intestinal. Algunos antecedentes muestran que COX-2 puede ser inducida tras la administración de un iECA posterior a la activación de la vía JNK/c-jun, dependiente de la función que ejercería ECA como receptor.

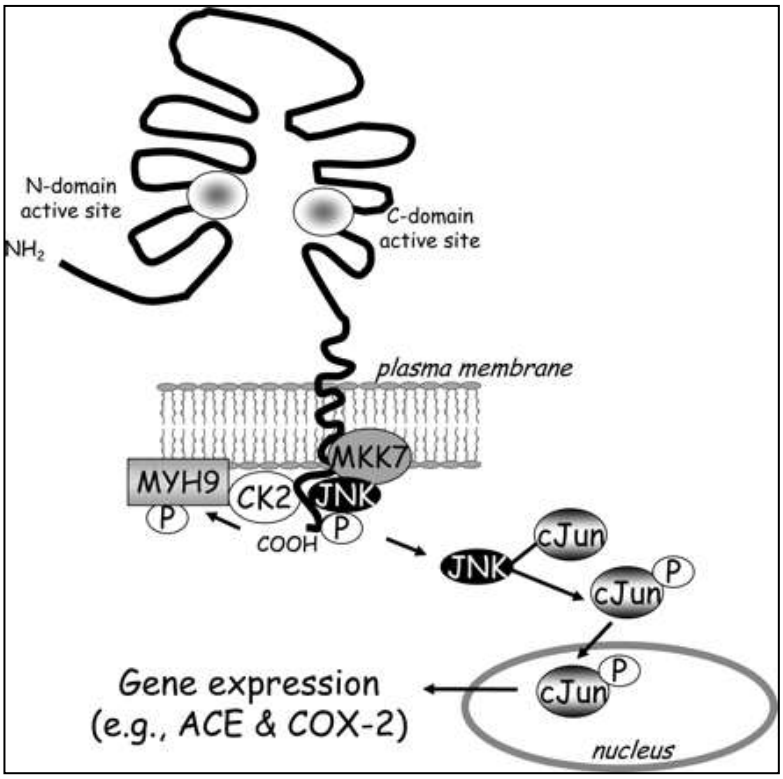


Figura 1. Señalización de los iECA en células endoteliales de vena de cordón umbilical. La unión de los iECA a la ECA activa una cascada de señales que comienza con la fosforilación de ECA en la Ser 1270 por acción de CK2. JNK se activa a través de MKK7 llevando a la acumulación de p-c-Jun en el núcleo y al aumento de la actividad de AP-1, a su vez este aumento genera un incremento en la expresión de ECA y COX-2 en células endoteliales (Fleming 2006).

1.6 Hipótesis.

Sobre las evidencias presentadas anteriormente del efecto benéfico mostrado por los iECA y su participación en la regulación de COX-2 se plantea la siguiente hipótesis general:

La disminución inducida por lisinopril en la progresión del daño renal es mediada por un aumento de COX-2 y PGE_2 vía JNK/c-Jun en un modelo de Insuficiencia Renal Crónica.

1.7 Objetivo General.

Estudiar si el efecto que posee la administración de lisinopril sobre los niveles de COX-2 y PGE_2 es mediado por la activación del receptor ECA y la vía JNK/c-Jun y determinar si este proceso disminuye parcialmente la progresión el daño renal inducido por la Nefrectomía 5/6.

1.8 Objetivos Específicos.

Objetivo 1: Evaluar si la disminución inducida por lisinopril en la progresión de la enfermedad renal es mediada por COX-2 y PGE_2 en el riñón de animales con IRC.

Objetivo 2.- Evaluar si la administración de lisinopril en animales con IRC produce un aumento en los niveles de COX-2 y PGE_2 en el riñón y determinar si este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun.

Objetivo 3.- Evaluar el efecto morfofuncional de la inhibición de la vía JNK/c-Jun en animales con IRC.

Objetivo 4.- Evaluar si la administración de lisinopril genera un aumento en los niveles de COX-2 vía JNK/c-Jun en células mTAL.

Objetivo 5.- Evaluar la expresión de ECA en células mTAL y su participación en el aumento de COX-2 dependiente de la administración de lisinopril.

Objetivo 6.- Estudiar si el aumento de COX-2 por la administración de lisinopril es dependiente de los receptores de Bradicinina B1, B2 o angiotensina AT1 en células mTAL.
No fue estudiado, ver resultados preliminares.

Objetivo 7.- Estudiar si el aumento de COX-2 por la administración de lisinopril es dependiente de los receptores de Bradicinina B1, B2 o angiotensina AT1 en animales IRC.
No fue estudiado, ver resultados preliminares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Cultivo Celular.

Se utilizaron células mTAL (células del segmento medular del Asa Ascendente Gruesa de Henle). Célula donadas por Dr. NR Ferreri (Eng y col., 2007) Estas células fueron caracterizadas para la expresión de COX-2 posterior a la administración de BK (Rodríguez y col., 2004). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37ºC en una atmósfera humedecida con 5% de CO_2, 95% O_2. Cada 2-3 días los medios de cultivos se reemplazaron con medio de cultivo fresco. Los cultivos se monitorearon rutinariamente para asegurar que estuvieran libres de contaminación por micoplasma, hongos o bacterias. Las células se colectaron al alcanzar un 60-70% de confluencia para luego utilizarlas para Western blot e Inmunofluorescencia.

2.2 Modelo Animal y Análisis Funcional

El manejo de los animales en este estudio se realizó en conformidad con los "Guiding Principles in the Care and Use of the Laboratory Animals" adoptados por la American Physiological Society. Los procedimientos fueron aprobados por el comité de Ética y Cuidado de Animales de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC).

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley (200-250 g) las cuales se dividieron en dos grupos experimentales: Cirugía simulada (Sham) y sometidas a Nefrectomía 5/6 (Nx 5/6) (en una primera etapa se ligan dos de las tres ramas arteriales que entran al riñón izquierdo, lo que produce la muerte del tejido de los polos de dicho riñón. Posterior a 7 días se extirpa el riñón derecho). El modelo desarrolla hipertensión arterial e Insuficiencia Renal

Crónica al cabo de 4 semanas. Posterior al desarrollo de la patología los animales se trataron diariamente por 4 semanas con los distintos fármacos. Los animales recibieron agua *ad libitum* y comida controlada (25 g/día en adultas) dieta con un contenido normal de sodio (0,3% sodio) y de potasio (0,5% potasio) bajo condiciones de luz y temperatura controlada en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas (PUC).

24 horas antes del sacrificio se colectó orina mediante jaula metabólica y durante el sacrificio se extrajeron muestras sanguíneas para medir creatinina sérica. La creatinina sérica se midió mediante autoanalizador Beckmann. Las proteínas urinarias se cuantificaron con el método de Bradford (Read, 1981).

Como anestesia de corta duración se utilizó ketamina: xylazina (25:2,5 mg/kg, i.p.). Como analgesia post quirúrgica se utilizó Ketoprofeno (2 mg/kg) o Buprenorfina (0,04 mg/kg) por 3 días y se supervisó la evolución de la rata durante las primeras 72 horas post cirugía. El sacrificio de los animales se realizó por sobredosis de ketamina: xylazina. Cada grupo experimental fue de 5 animales. Las drogas de absorción oral se administraron por sonda bucogastrica (*Gavage)* y las drogas subcutáneas se administraron mediante la implantación de una bomba de infusión Alzet.

2.3 Estudio Morfológico.

Los riñones se extrajeron bajo anestesia ketamina: xylazina (25:2,5 mg/kg, i.p.) para los estudios morfológicos y bioquímicos. Todas las muestras de tejidos se codificaron y se estudiaron sin conocer los códigos (*blind observer*).

Las tinciones utilizadas para el estudio morfológico fueron Hematoxilina Eosina, la cual está fundamentada para la descripción del tejido histológico bajo las distintas condiciones

experimentales. El colorante hematoxilina tiñe estructuras basófilas (núcleo) en color azul-violeta, mientras que la eosina tiñe componentes acidofilos (citoplasma) de color rosado.

Brevemente, para la tinción de HE los tejidos se desparafinaron e hidrataron en agua destilada, luego se tiñeron por 2 minutos en hematoxilina de Bayer, se basificaron por 10 minutos en agua corriente. Posteriormente, se tiñeron con eosina acuosa por 1 minuto, se deshidrataron, aclararon y montaron.

Se utilizó la tinción de Sirius Red, la cual está basada en la tinción de las fibras de colágeno a través del colorante rojo sirio en una solución saturada de ácido pícrico al 1%. El colágeno se tiñe de color rojo y el citoplasma de color amarillo. Para la tinción con Sirius Red, los tejidos se desparafinaron e hidrataron en agua destilada, luego se colocaron por 2 minutos en ácido fosfomolíbdico al 0,2%, se lavaron en agua destilada y luego se incubaron en sirius red al 1% en ácido pícrico saturado por 45 minutos. Por último, los cortes se lavaron en HCl 0,1N por 2 minutos para luego ser deshidratados, aclarados y montados en la resina sintética Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

2.4 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia para Microscopía Óptica.

Los cortes de tejido fijados en Bouin e incluidos en paraplast (6-7 μm), se incubaron sucesivamente en: antisuero de conejo contra el antígeno deseado (OPN 1:50, ED-1 1:100, COX-2 1:500) por 24 h., suero de cabra anti-IgG de conejo 1:20 por 30 min., complejo peroxidasa antiperoxidasa de conejo (1:150) por 30 min., tinción con 3-3‘-diaminobencidina en *buffer* Tris pH 7,6 e hidroperóxido. Para la inmunofluorescencia se utilizaron ALEXA Flúor 568. Los anticuerpos utilizados funcionan en el fijador Bouin o en

Formalina al 10%.

2.5 Electroforesis e "immunoblotting".

Se prepararon geles de SDS poliacrilamida según el método de Laemmli para separar las muestras por peso. Una vez separadas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se trató con leche descremada para bloquear los sitios de unión inespecíficos y luego con el anticuerpo deseado. El segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se reveló mediante quimioluminiscencia. Se utilizó anticuerpo anti β-actina como control de carga.

2.6 Análisis Morfométrico.

Los antígenos a estudiar se marcaron por Inmunohistoquímica (IHQ), luego se realizó una medición del área total del corte y del área correspondiente a la proteína en estudio obteniendo el área total de la proteína expresándolo en μm^2. Las células se caracterizaron de acuerdo al antígeno que presentaron (COX-2 y Osteopontina). Para la tinción de Sirius Red se realizó una medición total de área del corte y una medición del área de la tinción de color rojo obteniendo un área total de la tinción expresado en μm^2. Se define el umbral de tinción rojo en base al animal Sham quien expresa colágeno de manera constitutiva. (Shanstra y col., 2002). Las proteínas ED-1 y c-Jun fueron analizadas en base a las células positivas por campo. Los campos son equivalentes a 64.400 μm^2 para el aumento 40X y 25.760 μm^2 para el aumento 100X. Las imágenes de las figuras histológicas son un área representativa del campo cuantificado. Para el análisis morfométrico cuantitativo de microscopía de luz, se usó el *software* "C-Imaging".

2.7 Fármacos.

Se utilizaron diferentes fármacos con la finalidad de poder modular las distintas variables a analizar.

Lisinopril: Es un inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (iECA) activo por vía oral. Se utiliza para el tratamiento de la Hipertensión, Insuficiencia Cardiaca, Infarto, Nefropatía Diabética entre otras. Químicamente es el éster del enalaprilato con la lisina. En la mayor parte de los pacientes el lisinopril y enalapril son equivalentes. Las propiedades farmacológicas del lisinopril son similares a las de los demás iECAs. A diferencia del enalapril, lisinopril no es un pro-fármaco, sino que es activo como tal. El lisinopril posee un efecto antihipertensivo lento, pero una vida media mayor que el enalapril y captopril, por lo que se recomienda dosis únicas diarias. (Goa y col., 1997). Se utilizó en concentración de 50 nM a 1 μM en células mTAL. En animales se administró en una dosis de 10 mg/kg/día, mediante *Gavage* (Ahn y col., 2012).

Anisomicina: Es un antibiótico, inhibidor de la síntesis proteica el cual estimula el estrés celular dependiente del retículo endoplasmático. Se ha descrito como un potente dador de especies reactivas de oxígeno (ROS). Es ampliamente utilizado como activador de la vía JNK/c-Jun (Croons y col., 2009). En células mTAL se utilizó en concentración de 1 μM y en animales se administró en dosis de 10 mg/kg/día mediante *Gavage* (Jonkman y col., 2009).

SP600125: Es un inhibidor competitivo reversible de la Caseína Kinasa 2 proteína rio

arriba de JNK, que puede ser desplazado por ATP. Se ha caracterizado por su alta capacidad para inhibir la fosforilación de JNK (20 veces mayor que otros antagonistas) y por ende su activación. Se ha reportado que puede inhibir la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria como IL-2, IFN-γ y TNF-α, entre otros (Bennett y col., 2009).

En células mTAL se utilizó en concentración de 5 μM y en animales se administró en dosis de 30 mg/kg/día mediante *Gavage*. (Bennett y col., 2009).

Celecoxib: es un inhibidor altamente selectivo de la enzima COX-2, teniendo una selectividad 20 veces mayor por la COX-2 que por la COX-1 y por lo tanto, inhibe la producción de prostaglandinas. Es metabolizado por vía la enzima citocromo P450 CYP2C9. Gran parte del fármaco es excretado por orina en forma de metabolitos, y el 14% es excretado por heces, sin cambios. Su vida media es de unas 11 horas (McCormack PL, 2011).

En animales se administró en dosis de 20 mg/kg/día mediante *Gavage* (Vio y col., 2012).

Meclofenamato: Es un antiinflamatorio no esteroidale (AINE) capaz de inhibir las COXs. Inhibe tanto COX-1, como COX-2. Además, se ha descrito que antagoniza de manera directa los efectos de las Prostaglandinas (PGs) compitiendo por la unión a sus receptores (Clarck y col., 1999).

En animales se administró en dosis de 5 mg/k/día mediante *Gavage* (Opay y col., 2006).

Losartan: Es un antihipertensivo tipo ARA II (antagonista de los receptores AT1 de Ang II y sinérgico con los receptores AT2). Se absorbe bien por vía oral, pero sufre un importante

efecto de primer paso hepático, por lo que su biodisponibilidad es sólo del 33%, y alcanza su $C_{máx}$ al cabo de 1 h. Se une en un 99% a proteínas plasmáticas y se biotransforma rápidamente en el hígado por el citocromo P450 (CYP 3A4 y CYP 2C9); el 14% de la dosis administrada se convierte en un metabolito activo, su derivado 5-carboxílico, denominado E-3174. Éste alcanza su $C_{máx}$ al cabo de 2-4 horas y presenta una depuración renal más lenta (0,4 frente a 1,1 ml/s) y una vida media más prolongada (9 h) que el losartán, por lo que es responsable de muchas de las acciones de éste. Este fármaco es utilizado en el tratamiento de enfermedades renales y cardiovasculares (Zaiken y col., 2013).

En células mTAL se utilizó en concentración de 2 μM y en animales se administró en dosis de 40 mg/k/día mediante *Gavage*. (Álvarez y col., 2002).

HOE-140: Es un decapéptido sintético que se une selectivamente al receptor B2, antagonizando los efectos de BK (Wirth y col., 1991). En células mTAL se utilizó en concentración de 1 μM y en animales se administró en dosis de 0,5 mg/kg/día mediante bomba de infusión subcutánea Alzet (Tschöpe y col., 2004).

Des-Arg-Leu-8: Antagonista selectivo del receptor B1 de BK. Este es un antagonista competitivo por el receptor. Se ha mostrado que la unión de este péptido inhibe la señalización celular dependiente del receptor B1 (Vianna y col., 1998). En células mTAL se utilizó en concentración de 0,5 μM y en animales se administró en dosis de 20 μg/kg/día mediante bomba de infusión subcutánea Alzet (Rupnaj y col., 1997).

Des-Arg-BK: Agonista selectivo del receptor B1 de BK, se ha descrito su unión a la

secuencia del segundo *loop* extracelular del receptor B1 (HEAWH) (Erdos y col., 2010). En células mTAL se utilizó en dosis concentración de 40-200 nM (Gougat y col., 2004).

2.8 Análisis Estadístico.

Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparaciones entre grupos seguido por el *test* de Tukey. Todos los valores se expresaron como promedio ± error estándar (EE). Se consideraron valores de *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,001 para indicar una diferencia significativa. Los *test* estadísticos se realizaron con el *software* Prism de GraphPad, versión 5.0 para Mac (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA., USA).

3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.1 Evaluar si la disminución inducida por lisinopril en la progresión de la enfermedad renal es mediada por COX-2 y PGE_2 en el riñón de animales con IRC.

Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 200g, las cuales se sometieron a Nx 5/6 para generar IRC. Con el fin de evaluar el papel benéfico que pudiera poseer COX-2 en la enfermedad renal se utilizaron los siguientes grupos experimentales: Sham; IRC; IRC + lisinopril (10 mg/kg/día); IRC + celecoxib (20 mg/kg/día) e IRC + lisinopril (10 mg/kg/día) + celecoxib (20 mg/kg/día). Del mismo modo para descartar un papel que pudiera estar ejerciendo COX-1 en la enfermedad renal, se realizaron los siguientes grupos experimentales: Sham; IRC; IRC + lisinopril (10 mg/kg/día); IRC + meclofenamato (5 mg/kg/día) e IRC + lisinopril (10 mg/kg/día) + meclofenamato (5 mg/kg/día). Se incluyeron animales Sham + lisinopril (10 mg/kg/día); Sham + meclofenamato (5 mg/kg/día) y Sham + celecoxib (20 mg/kg/día).

Se recolectaron muestras de sangre y orina antes del sacrificio para evaluar la Creatininemia y Creatininuria. La estructura renal se evalúo mediante tinción de HE. Se utilizó tinción de colágeno total (Sirius Red) para evaluar fibrosis. De la misma forma se realizó IHQ para Osteopontina y Macrófagos (ED-1) para evaluar infiltración.

3.2 Estudiar en animales con IRC, si la vía JNK/c-Jun se activa posterior a la administración de lisinopril.

Para responder a este objetivo se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 200-250g de las cuales un grupo fue sometido a Nx 5/6 para generar IRC y el otro grupo fue operado de

manera simulada (Sham). Los animales se dividieron en grupos más pequeños para someterlos a distintos tratamiento: Sham; Sham + lisinopril (10 mg/kg/día); IRC e IRC + lisinopril (10 mg/kg/día). La activación de la vía se evaluó midiendo, en lisados de riñón completo, la fosforilación de JNK (p-JNK (Tyr185)) y c-Jun (p-c-Jun (Ser63)) con anticuerpos específicos.

3.3 Evaluar si la administración de lisinopril a animales con IRC produce un aumento en los niveles de COX-2 y PGE_2 renales y determinar si este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun.

Para desarrollar este objetivo se utilizaron ratas macho Sprague Dawley 200-250g., a las cuales se les administraron distintas combinaciones de tratamientos: Sham; Sham + lisinopril (10 mg/kg/día); Sham + anisomicina (activador de la vía JNK/c-Jun, 10 mg/kg) ; Sham + SP600125 (antagonista de la vía JNK/c-Jun, 30 mg/kg/día); IRC; IRC + lisinopril (10 mg/kg/día); IRC + SP600125 (30 mg/kg/día); IRC + anisomicina (10 mg/kg); IRC +lisinopril (100 mg/kg/día) + SP600125 (30 mg/kg/día); IRC + lisinopril (10 mg/kg/día) + anisomicina (10 mg/kg/día), e IRC + SP600125 (30 mg/kg/día) + anisomicina (10 mg/kg/día). Estos animales se sacrificaron, se les extrajo los riñones para ser analizados a través de Western *blot* e Inmunohistoquímica evaluando así el nivel proteico de COX-2. Los niveles urinarios de PGE_2 se midieron mediante un inmunoensayo enzimático (EIA).

3.4 Evaluar el efecto morfofuncional de la inhibición de la vía JNK/c-Jun en animales con IRC.

Este objetivo evaluó el posible desmedro de la función y estructura renal generado por la

inhibición de JNK, para lo cual se utilizó SP600125. Los grupos experimentales fueron los siguientes: Sham; Sham + SP600125 (30 mg/kg/día); IRC; IRC + SP600125 (30 mg/kg/día). Se recolectaron muestras de sangre y orina antes del sacrificio para evaluar la Creatininemia y Creatininuria. La estructura renal se evalúo mediante tinción de H-E. Se utilizó tinción de colágeno total (Sirius Red) para evaluar fibrosis. De la misma forma se realizó IHQ para Osteopontina y Macrófagos (ED-1) para evaluar infiltración.

3.5 Estudiar la activación de la vía JNK/c-Jun a través de la fosforilación de JNK posterior a la administración de lisinopril en células mTAL.

Para responder este objetivo se utilizó células mTAL (células inmortalizadas del Asa de Henle), las cuales se dividieron en tres grupos experimentales. Células mTAL (control); células mTAL + lisinopril (100 nM) y células mTAL + vehículo (Suero Fisiológico). La activación de la vía se evaluó por la medición de la fosforilación de JNK (p-JNK (Tyr185)) y c-Jun (p-c-Jun (Ser63)) utilizando anticuerpos específicos.

3.6 Evaluar si la administración de lisinopril genera un aumento en los niveles de COX-2 vía JNK/c-Jun en células mTAL.

Para desarrollar este objetivo se utilizaron células mTAL, las cuales se dividieron en distintos grupos experimentales: mTAL (control); células mTAL + lisinopril (100 nM); células mTAL + SP600125 (5 μM); células mTAL + anisomicina (1 μM); células mTAL + lisinopril (100 nM) + SP600125 (5 μM); células mTAL + lisinopril (100 nM) + anisomicina (1 μM) y células mTAL + SP600125 (5 μM) + anisomicina (1 μM). En estos distintos grupos experimentales se analizaron los niveles proteicos de COX-2, a través de

Western *blot*.

3.7 Evaluar la expresión de ECA como receptor en células mTAL y su participación en el aumento de COX-2 dependiente de la administración de lisinopril.

Para caracterizar la expresión de ECA en células mTAL, se lisaron células control y tratadas con lisinopril (100 nM) y se evaluó el nivel proteico de ECA mediante la técnica de Western *blot*. Se utilizaron como controles positivos animales sometidos a los modelos Nx 5/6 y Goldblatt (Hipertensión Reno-vascular).

3.8 Estudiar la participación de los receptores de Bradicinina B1, B2 y angiotensina AT1 en el aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril célula mTAL.

Con el objetivo de evaluar la participación de los receptores B1, B2 y AT1 en el aumento de COX-2 dependiente de la administración de lisinopril, se realizaron los siguientes grupos experimentales: células mTAL control, células mTAL + lisinopril (100 nM); células mTAL + HOE-140 (antagonista del receptor B2 de BK, 1 μM); células mTAL + Des-Arg-Leu-8 (Leu-8) (antagonista del receptor B1 de BK, 0,5 μM); células mTAL más losartan (antagonista del receptor AT1 de Ang II, 2 μM); células mTAL más lisinopril (100 nM) + HOE-140 (1 μM); células mTAL + lisinopril (100 nM) + Leu-8 (0,5 μM) y células mTAL + lisinopril (100 nM) + losartan (2 μM). Estos distintos grupos experimentales se analizaron a través de Western *blot* para evaluar los niveles proteicos de COX-2.

3.9 Estudiar la participación de los receptores de Bradicinina B1, B2 y angiotensina AT1 en el aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril en animales IRC.

Con el fin de determinar si el aumento de COX-2 producido por la administración de lisinopril es dependiente de los receptores involucrados en los SRA y SCC, se antagonizaron de manera selectiva los receptores B1, B2 y AT1. Se realizaron los siguientes grupos experimentales: Sham, IRC, IRC + lisinopril (10 mg/k/día); IRC + HOE-140 (500 ug/k/día); IRC + losartán (40 mg/k/día); IRC + Leu-8 (20 µg/k/día); IRC + lisinopril (10 mg/k/día) + HOE 140 (500 ug/k/día); IRC + lisinopril (10 mg/k/día) + losartán (40 mg/k/día); IRC + lisinopril (10 mg/k/día) + Leu-8 (20 µg /k/día).

Se recolectaron tejidos renales con el objetivo de evaluar mediante Western *blot* los niveles proteicos de COX-2.

4. RESULTADOS

Objetivo 1: Evaluar si la disminución inducida por lisinopril en la progresión de la enfermedad renal es mediada por COX-2 y PGE_2 en el riñón de animales con IRC.

4.1 Lisinopril aumenta la Velocidad de Filtración Glomerular (VFG) en animales con IRC, este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato.

Para evaluar el papel que tendría COX-2 y PGE_2 en la prevención de la progresión del daño renal obtenido tras la administración de lisinopril (10 mg/kg/día) posterior a la Nx 5/6, los animales se trataron con celecoxib (20 mg/kg/día) un inhibidor específico de COX-2, o con meclofenamato (5 mg/kg/día) un inhibidor genérico de las COXs. Los animales con IRC mostraron valores de VFG (0,46 ± 0,13 ml/min) menores a los de los animales Sham (1,26 ± 0,27 ml/min) corroborando así la patología renal (disminución de más del 50% de la VFG) (Flores y col., 2009), por otra parte animales con IRC que recibieron tratamiento con lisinopril (0,95 ± 0,07 ml/min) presentaron valores de la VFG significativamente mayores que los animales IRC pero no de los animales Sham. Este efecto observado fue prevenido en animales con co-administración de celecoxib (0,58 ± 0,14 ml/min) o meclofenamato (0,52 ± 0,25 ml/min) respectivamente. Los animales IRC tratados solo con celecoxib (0,40 ± 0,04 ml/min), meclofenamato (0,29 ± 0,13 ml/min) o celecoxib más meclofenamato (0,44 ± 0,16 ml/min) no presentaron una VFG significativamente diferente a la de los animales IRC. En todos los grupos experimentales la VFG fue significativamente menor que la de los animales Sham, corroborando que aunque la condición patológica de los animales

tratados con lisinopril mejora, esta no alcanza a ser semejante a la condición Sham. $P<$ 0,05. (Figura 1).

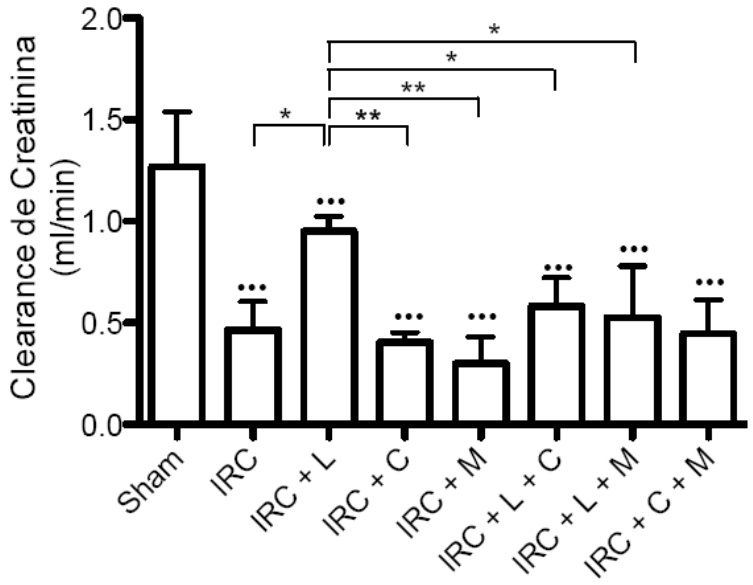


Figura 1: Clearance de creatinina en animales sometidos a Nx 5/6 tratados con lisinopril, celecoxib o meclofenamato. La creatinina fue cuantificada en plasma y orina de los diferentes grupos como se describe en "métodos". La depuración de creatinina se calcula de acuerdo a la fórmula: (Creatinina orina x volumen colectado)/ (Creatinina plasma x tiempo de colección). L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras.**P*< 0,05, ***P*< 0,005, ****P*< 0,001. •••*P*<0,001 vs. Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

4.2 La administración de lisinopril disminuye la excreción urinaria de proteínas, este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato.

Los animales con IRC presentaron un aumento significativo de la excreción urinaria de proteínas (61,9 ± 12,5 mg/16hrs) en comparación con los animales Sham (19,9 ± 3,28 mg/16hrs). Sin embargo, cuando los animales con IRC se trataron con lisinopril la proteinuria (27,0 ± 9,75 mg/16hrs) no presentó diferencias significativas en relación a los animales Sham. Por el contrario, la proteinuria en los animales IRC tratados con lisinopril más meclofenamato (55,0 ± 11,72 mg/16hrs) o lisinopril más celecoxib (45,6 ± 14,62 mg/16hrs) no presentó diferencias significativas en comparación a los animales IRC. Por otra parte, la proteinuria de los animales IRC tratados con celecoxib (69,6 ± 11,84 mg/16hrs), meclofenamato (61,3 ± 4,97 mg/16hrs), o la combinación de celecoxib más meclofenamato (87,66 ± 12,01 mg/16hrs) no fue estadísticamente diferente a la de los animales IRC (Figura 2).

Tanto la VFG como la excreción urinaria de proteínas corroboran que los animales con IRC tratados con lisinopril presentaron una menor progresión de la enfermedad renal tras ser sometidos a Nx 5/6 en comparación con los animales sin tratamiento, efecto que fue prevenido con la administración de celecoxib y meclofenamato.

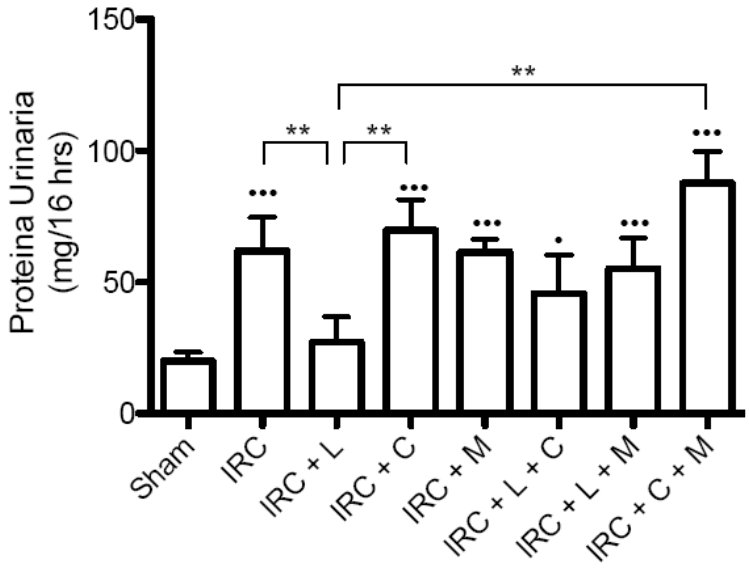


Figura 2: La inhibición de COX-2 y PGE_2 aumentan de manera significativa la excreción de proteínas urinarias en animales IRC tratados con lisinopril. Cuantificación de Proteínas urinarias por el método de Bradford. L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P*< 0,005. •*P*< 0,05. •••*P*< 0,001 vs Sham Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

4.3 La administración de lisinopril disminuye los niveles del factor quimioatrayente Osteopontina en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato.

Al evaluar el factor quimioatrayente de macrófagos Osteopontina (OPN) mediante IHQ, en animales Sham se encontró expresado en bajas cantidades en el nefrón distal y el Asa Ascendente Gruesa de Henle. En animales con IRC esta expresión aumentó de forma considerable en Asa Ascendente y túbulos renales, este aumento no presentó cambios por la administración de celecoxib y meclofenamato. En contraste, animales tratados con lisinopril presentaron una menor distribución de OPN siendo semejante a lo observado en los animales Sham y diferenciándose ampliamente de los animales IRC. La co-administración de lisinopril más celecoxib o meclofenamato previno los efectos observados por la administración de lisinopril, presentándose un aumento en la expresión de OPN en zonas tubulares (Figura 3A).

Al cuantificar las áreas de tinción de Osteopontina se observó que los animales con IRC (6.523 ± 1970 μm^2) presentaron un área significativamente mayor en comparación con los animales Sham (1.417 ± 216 μm^2). Los animales IRC tratados con lisinopril (2.537 ± 850 μm^2) presentaron un área significativamente menor que los animales con IRC, este efecto fue prevenido al co-administrar celecoxib (5.147 ± 1832 μm^2) o meclofenamato (4.938 ± 1173 μm^2) siendo semejante a la condición IRC. Al administrar celecoxib (5.649 ± 1474 μm2), meclofenamato (5.728 ± 2136 μm^2) o la combinación de celecoxib más meclofenamato (6.225 ± 1605 μm^2) no se observaron diferencias significativas en el área en relación a los animales IRC (Figura 3B).

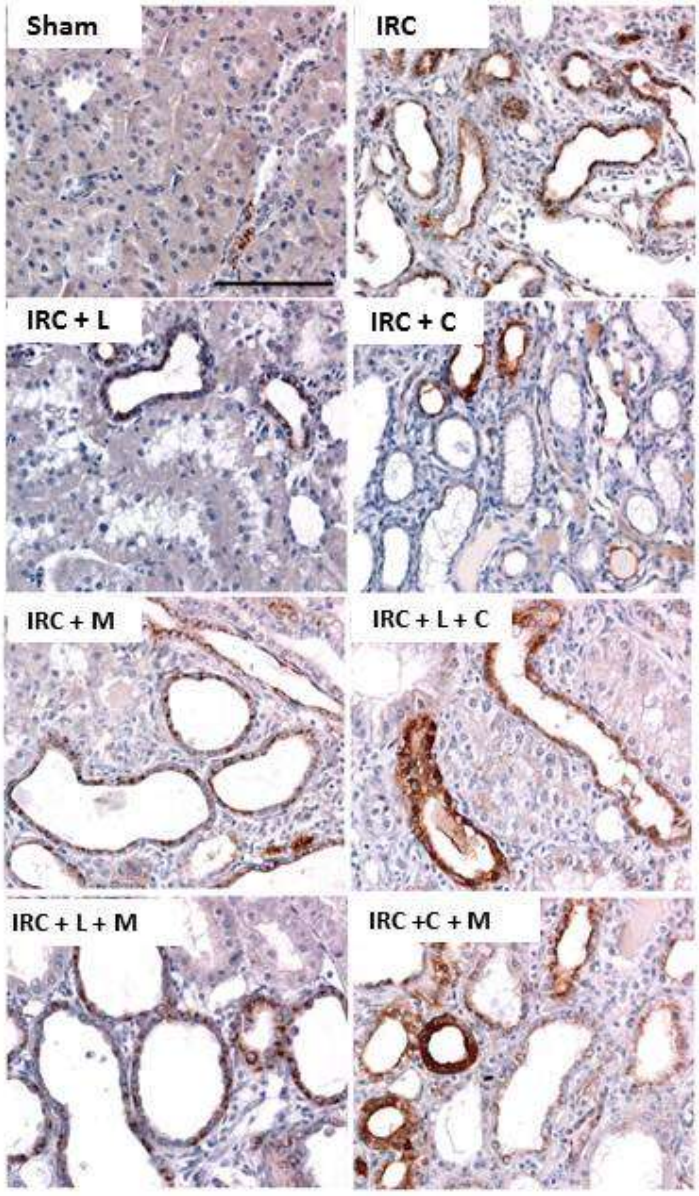


Figura 3 A: Lisinopril disminuye el factor quimioatrayente Osteopontina en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la inhibición de la COX-2 y PGE_2. IHQ para OPN. IRC: Insuficiencia Renal Crónica, L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Barra de escala 100 μm. (n=4).

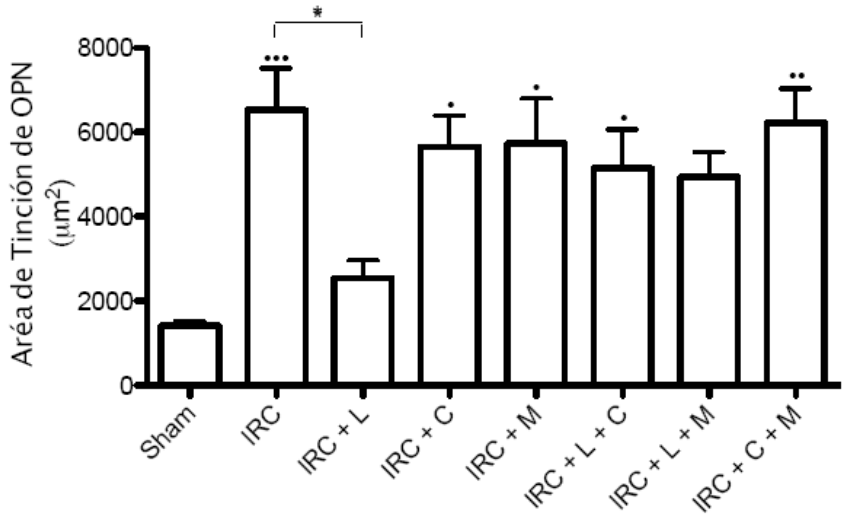


Figura 3 B: Cuantificación Morfométrica del factor quimioatrayente Osteopontina. El área de la tinción para OPN se cuantificó con el *software* "C-Imaging"**.** L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras.**P*< 0,05 vs IRC. •*P*< 0,05, ••*P*< 0,005, •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=4).

4.4 La administración de lisinopril disminuye la infiltración de macrófagos en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato.

Con la finalidad de estudiar el rol inflamatorio dentro de esta patología y la implicancia de COX-2 y PGE_2, se cuantificó el factor ED-1, el que es un marcador específico para macrófagos, evaluando de esta manera la infiltración bajo las distintas condiciones experimentales.

Se observó que todas las condiciones presentaron una mayor cantidad de macrófagos en relación a los animales Sham. Sin embargo, los animales tratados con lisinopril presentaron un menor número de estos en relación a la condición IRC. Dicho efecto fue prevenido al co-administrar lisinopril más celecoxib o lisinopril más meclofenamato. Los animales IRC tratados con celecoxib, meclofenamato o celecoxib más meclofenamato mostraron una infiltración de macrófagos similar a la de los animales IRC. (Figura 4A).

Al realizar la cuantificación de estos macrófagos se observó que todas las condiciones experimentales presentaron un aumento significativo en relación a los animales Sham (2 ± 1,4 células ED-1 (+) por campo), pero los animales IRC tratados con lisinopril (18 ± 3,0 células ED-1 (+) por campo) presentaron una disminución significativa en relación a los animales IRC (47 ± 6,2 células ED-1 (+) por campo). La disminución de esta infiltración observada con la administración de lisinopril se previno con la co-administración de celecoxib (37 ± 4,3 células ED-1 (+) por campo) o meclofenamato (39 ± 5,1 células ED-1 (+) por campo) (Figura 4B).

La administración de celecoxib (35 ± 4,0 células ED-1 (+) por campo), meclofenamato (42 ± 4,6 células ED-1 (+) por campo) o celecoxib más meclofenamato (57 ± 8,8 células ED-1 (+) por campo), no produjo cambios significativos con respecto a lo observado en los animales IRC. (Figura 4B). Estos resultados son concordantes con la disminución del factor quimioatrayente OPN.

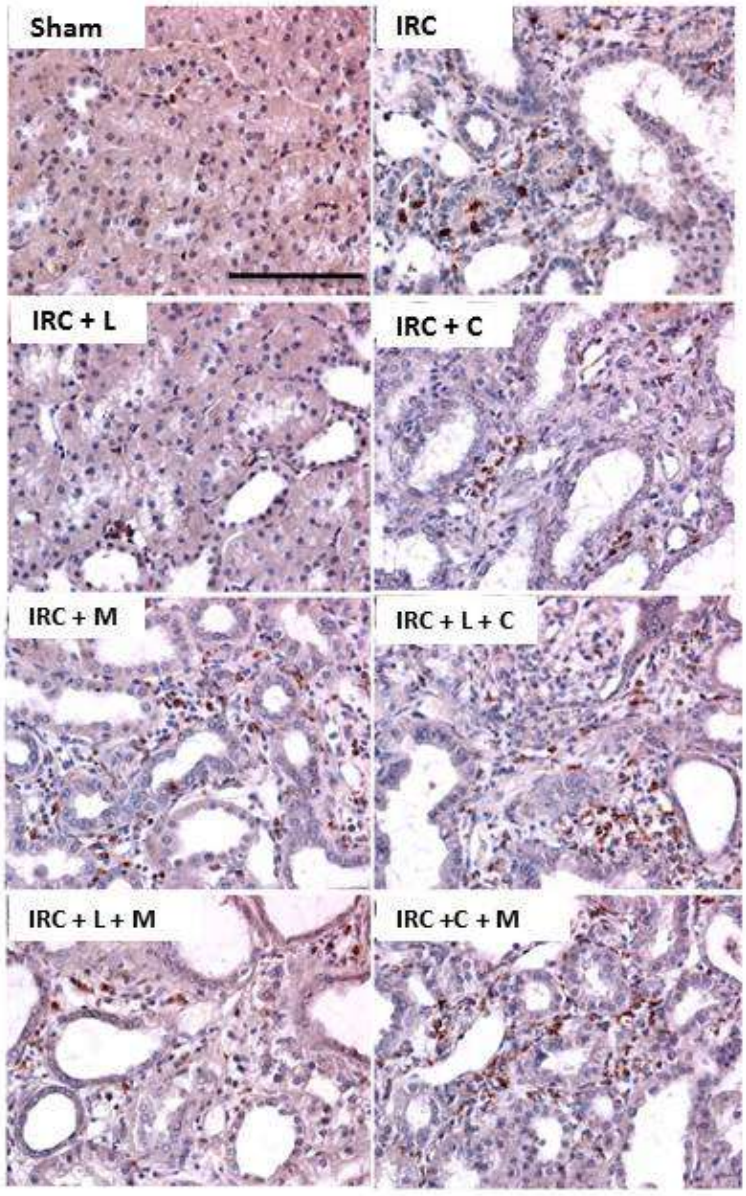


Figura 4 A: Lisinopril disminuye la infiltración de Macrófagos en animales con IRC. Este efecto es revertido tras la inhibición de COX-2 y PGE_2. IHQ para ED-1. L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Barra de escala 100 μm. (n=4).

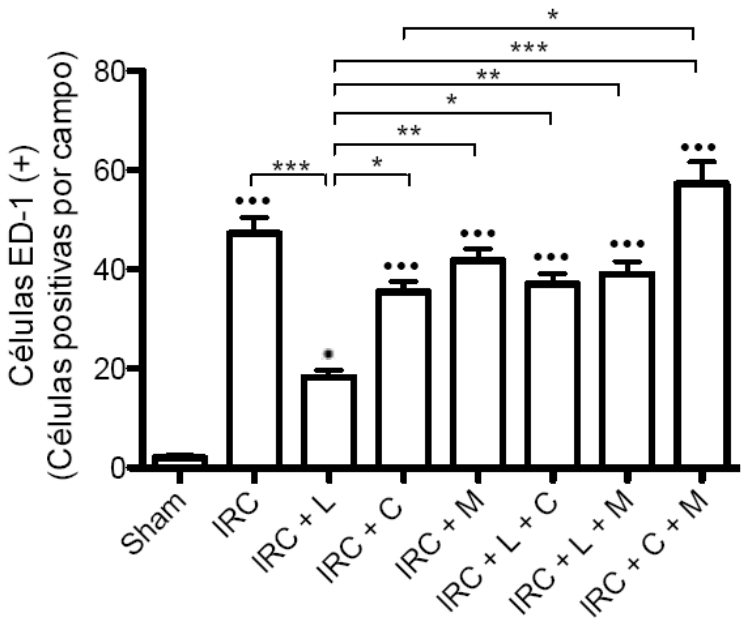


Figura 4 B: Cuantificación Morfométrica de Células ED-1 positivas por campo. L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. **P*< 0,05, ***P*< 0,005, ****P*< 0,001. •*P*< 0,05, •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

4.5 La administración de lisinopril disminuye el colágeno intersticial en los animales con IRC. Este efecto es prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato.

Los animales con IRC presentaron abundantes depósitos de colágeno intersticial en comparación con los animales Sham. Por otra parte, los animales con IRC tratados con lisinopril presentaron niveles de colágeno intersticial menores que los observados en los animales IRC, siendo semejantes a los de los animales Sham. La co-administración de celecoxib y meclofenamato previno la disminución del colágeno intersticial logrado con el tratamiento con lisinopril. Los animales IRC tratados con celecoxib y meclofenamato presentaron niveles de colágeno similares a los animales IRC sin tratamiento (Figura 5A).

Al cuantificar la tinción de Sirius Red mediante morfometría se pudo observar que los animales de los grupos IRC (8.009 ± 555 μm^2) presentaron niveles de colágeno intersticial significativamente mayores en comparación con los observados en animales Sham (3.962 ± 367 μm^2). Los niveles de colágeno intersticial en los animales IRC tratados con lisinopril (4.288 ± 691 μm^2) fueron significativamente menores en comparación con los animales IRC. Este efecto fue prevenido tras la co-administración de celecoxib (7.914 ± 1036 μm^2) y meclofenamato (7.341 ± 632 μm^2). Los animales con IRC a los cuales se les administro celecoxib (8.930 ± 1140 μm^2) y meclofenamato (7.738 ± 1093 μm^2) no presentaron una disminución significativa de los depósitos de colágeno intersticial en relación a los animales con IRC (P<0,001) (Figura 5B).

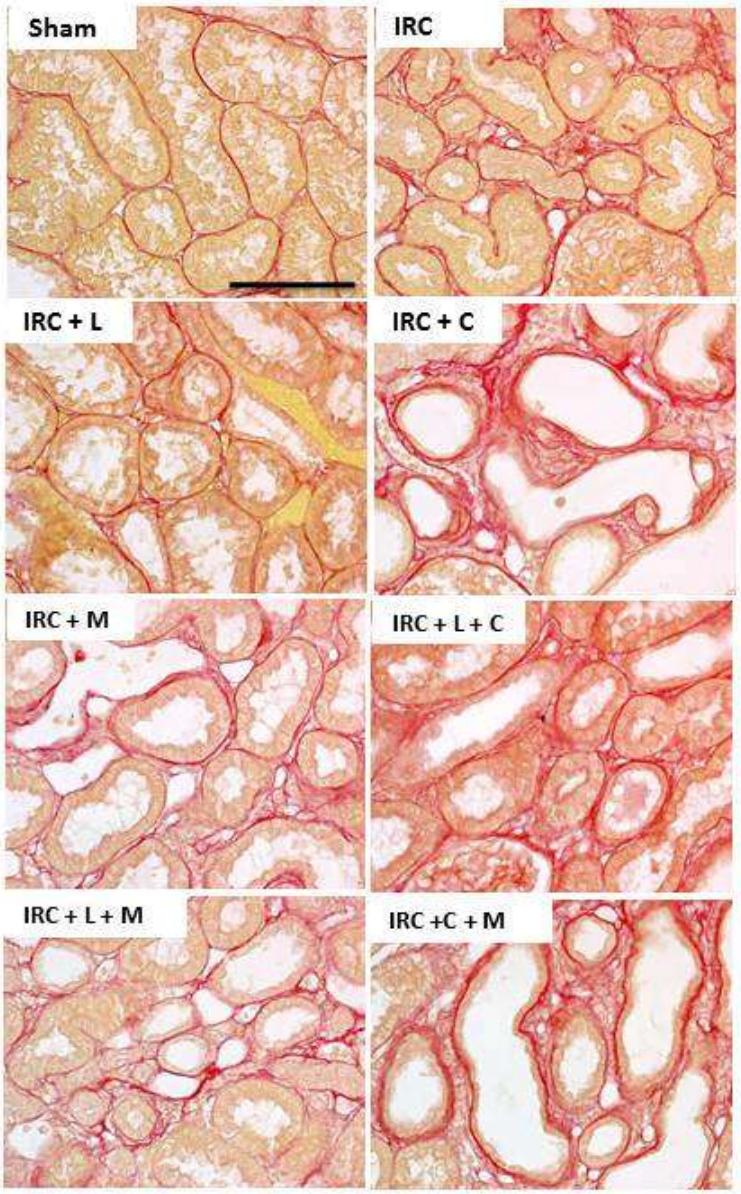


Figura 5 A: La inhibición de COX-2 y PGE_2 previene la disminución en los niveles de colágeno intersticial inducido por lisinopril en animales con IRC. Tinción de Sirius Red en cortes renales fijados en Bouin. L: lisinopril, C: celecoxib; M: meclofenamato. Barra de escala 100 μm. (n=4).

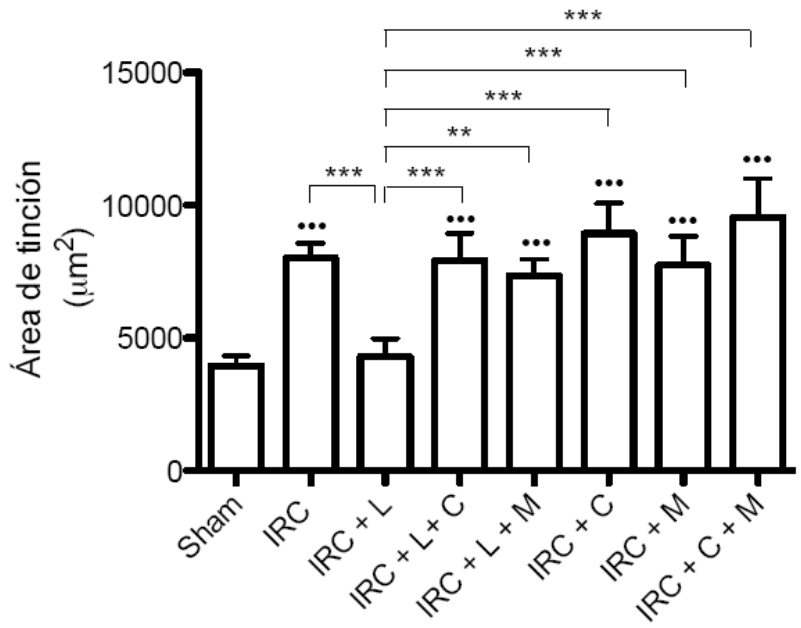


Figura 5 B: Cuantificación Morfométrica del colágeno intersticial. El área de la tinción para colágeno se cuantificó con el *software* "C-Imaging. L: lisinopril, C: celecoxib, M: meclofenamato. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P*< 0,005, ****P*< 0,001. •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

Objetivo 2.- Evaluar si la administración de lisinopril en animales con IRC produce un aumento en los niveles de COX-2 y PGE_2 en el riñón y determinar si este efecto es mediado por JNK.

4.6 La administración de lisinopril aumenta la expresión proteica de COX-2 en animales con IRC.

Para este objetivo en las mismas ratas utilizadas para el objetivo anterior, se evaluó el nivel proteico de COX-2 en homogenizados de riñón. Los resultados muestran que tras la administración de lisinopril (10 mg/kg/día) por 4 semanas a las ratas con IRC, aumentaron de manera significativa los niveles proteicos de COX-2 (1,98 ± 0,42 veces de Sham) en comparación con animales Sham (1.00) e IRC (1,35 ± 0,18 veces de Sham) ($P< 0,05$) (Figura 6). De la misma forma se puede observar que la distribución de células positivas para COX-2 por Asa Ascendente de Henle fue mayor en los animales tratados con lisinopril en comparación con los animales Sham e IRC (Figura 6).

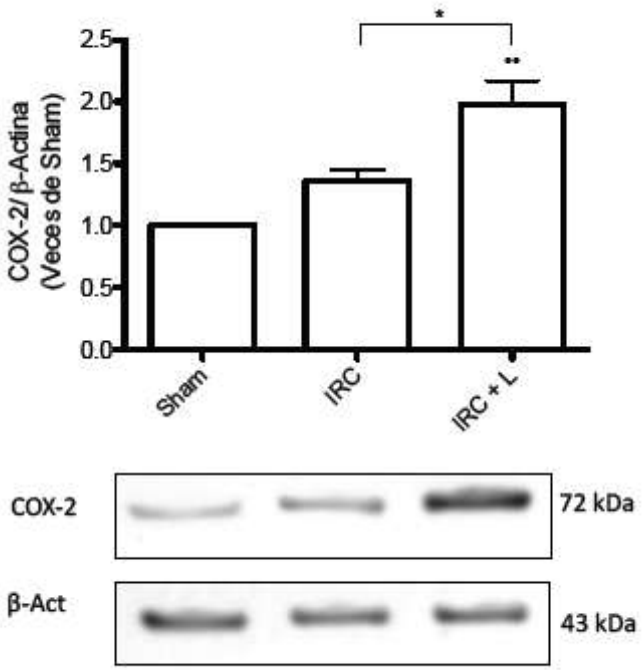


Figura 6: Efecto de lisinopril sobre los niveles proteicos de COX-2 en animales con IRC. Se separaron por electroforesis las proteínas de homogenizados de riñones de los animales con los diferentes tratamientos. Bajo el gráfico se muestran western blots representativos para COX-2 y β-actina que fue utilizada como control de carga. L: lisinopril. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. **P*< 0,05. ••*P*< 0,005 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

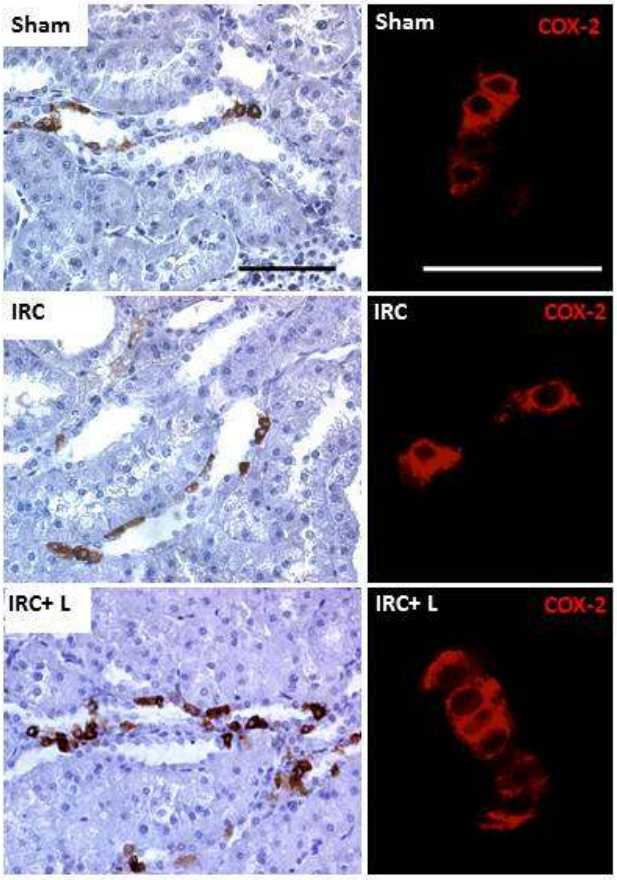


Figura 7: Lisinopril aumenta la distribución de COX-2 en el Asa Ascendente de Henle en cortes de riñón de ratas con IRC. Se realizó inmunohistoquímica para COX-2 en cortes de riñón fijados en Bouin, utilizando el método de PAP, siendo contrastada con Hematoxilina (columna de la izquierda). Para la inmunofluorescencia se utilizó Alexa Flúor 568 (columna de la derecha). L: lisinopril. Barra de escala 100 μm. (n=4).

4.7 Lisinopril aumenta los niveles proteicos y fosforilados de JNK/c-Jun en animales con IRC.

Con la finalidad de identificar el mecanismo por el cual lisinopril aumenta los niveles proteicos de COX-2 y su efecto benéfico en la progresión del daño renal, se evaluó la participación de la vía JNK/c-Jun. Los animales con IRC se trataron con lisinopril (10 mg/kg/día) durante 4 semanas mediante gavage para evaluar su efecto sobre los niveles de JNK en sus formas fosforilada y total, además de la proteína rio abajo c-Jun en sus formas fosforilada y total. La administración de lisinopril generó un aumento significativo en el nivel de proteína total de JNK (2,01 ± 0,25 veces de Sham) (Figura 8A) y en los niveles de p-JNK (2,16 ± 0,44 veces de Sham) (Figura 8B) en relación a los animales Sham (1,00) y a los animales con IRC no tratados (JNK: 0,83 ± 0,08 veces de Sham) (Figura 8A), (p-JNK: 0,90 ± 0,19 veces de Sham) (Figura 8B). Por otra parte, se observó que los animales IRC tratados con lisinopril presentaron niveles significativamente más altos de c-Jun (1,76 ± 0,16 veces de Sham) en comparación con los animales Sham (1,00) (P<0,001) y animales con IRC (1,01 ± 0,10 veces de Sham) (P< 0,05) (Figura 9A). De la misma forma, se puede observar que los niveles de p-c-Jun en los animales tratados con lisinopril (2,00 ± 0,10 veces de Sham) aumentaron de manera significativa en relación a los animales Sham (1,00) y animales con IRC (1,19 ± 0,13 veces de Sham) (Figura 9B). Estos resultados demuestran que los niveles proteicos de JNK y de c-Jun son modulados por lisinopril en animales con IRC.

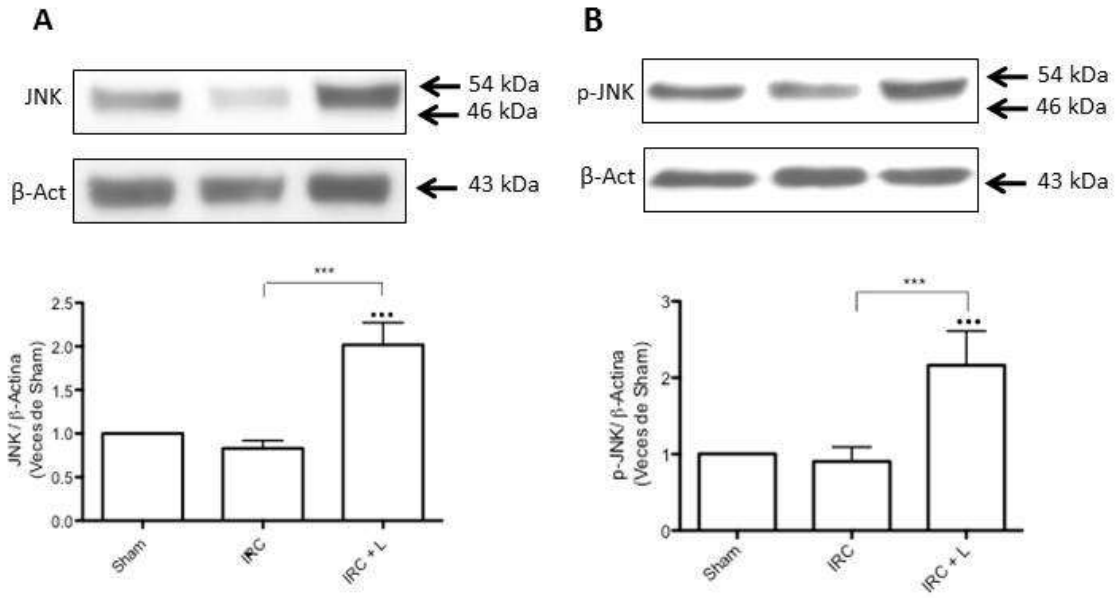


Figura 8: Expresión proteica de JNK y p-JNK en animales con IRC. Efecto de lisinopril sobre los niveles proteicos de la vía JNK/c-Jun. Efecto de lisinopril en los niveles proteicos de JNK (A) y p-JNK (B). Sobre los gráficos se muestran western blots representativos para JNK y p-JNK. Se usó β-actina como control de carga. L: lisinopril. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P< 0,001. •••P< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

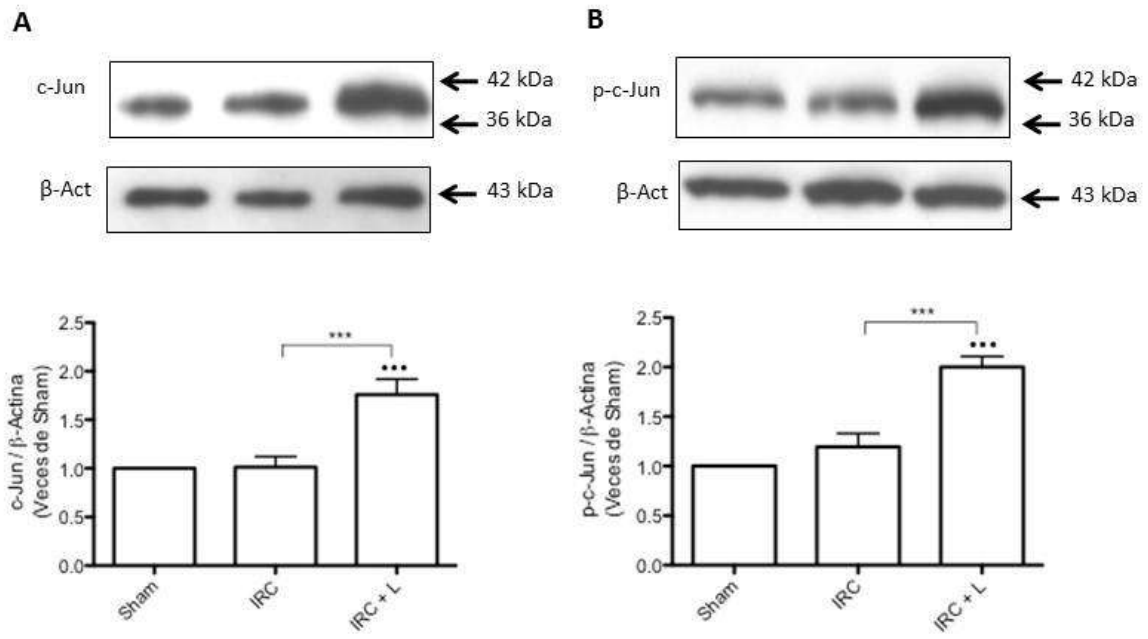


Figura 9: Expresión proteica de c-Jun y p-c-Jun en animales con IRC. Efecto de lisinopril sobre los niveles proteicos de la vía JNK/c-Jun. Efecto de lisinopril en los niveles de la proteína total de c-Jun (A) y su forma fosforilada (B) en homogeneizados de riñón de animales con diferentes tratamientos. Sobre el gráfico se muestran western blots representativos para c-Jun, p-c-jun y β-actina usada como control de carga. L: lisinopril. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ****P*< 0,001 vs IRC. •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

4.8 La administración de lisinopril aumenta la cantidad de células p-c-Jun positivas por campo en animales con IRC.

Para corroborar el aumento en los niveles proteicos obtenidos mediante la técnica de Western *blot* y para evaluar la localización de las células que expresan los componentes de la vía, se realizó inmunohistoquímica para p-c-Jun. Se cuantificó la cantidad de células positivas para p-c-Jun por campo en cortes de riñones de rata. En los animales IRC tratados con lisinopril (14,4 ± 6,1 células p-c-Jun (+) por campo) se observó un número significativamente mayor de células p-c-Jun positivas por campo en comparación con los animales Sham (1,6 ± 1,2 células p-c-Jun (+) por campo) y animales sometidos a IRC (2,4 ± 1,2 células p-c-Jun (+) por campo) (Figura 10B) (P<0,001). La marca de p-c-Jun está localizada en el núcleo de las células tubulares sugerentes de Asa de Henle. No se apreció marca de p-c-Jun en intersticio o alguna otra estructura celular (Figura 10A).

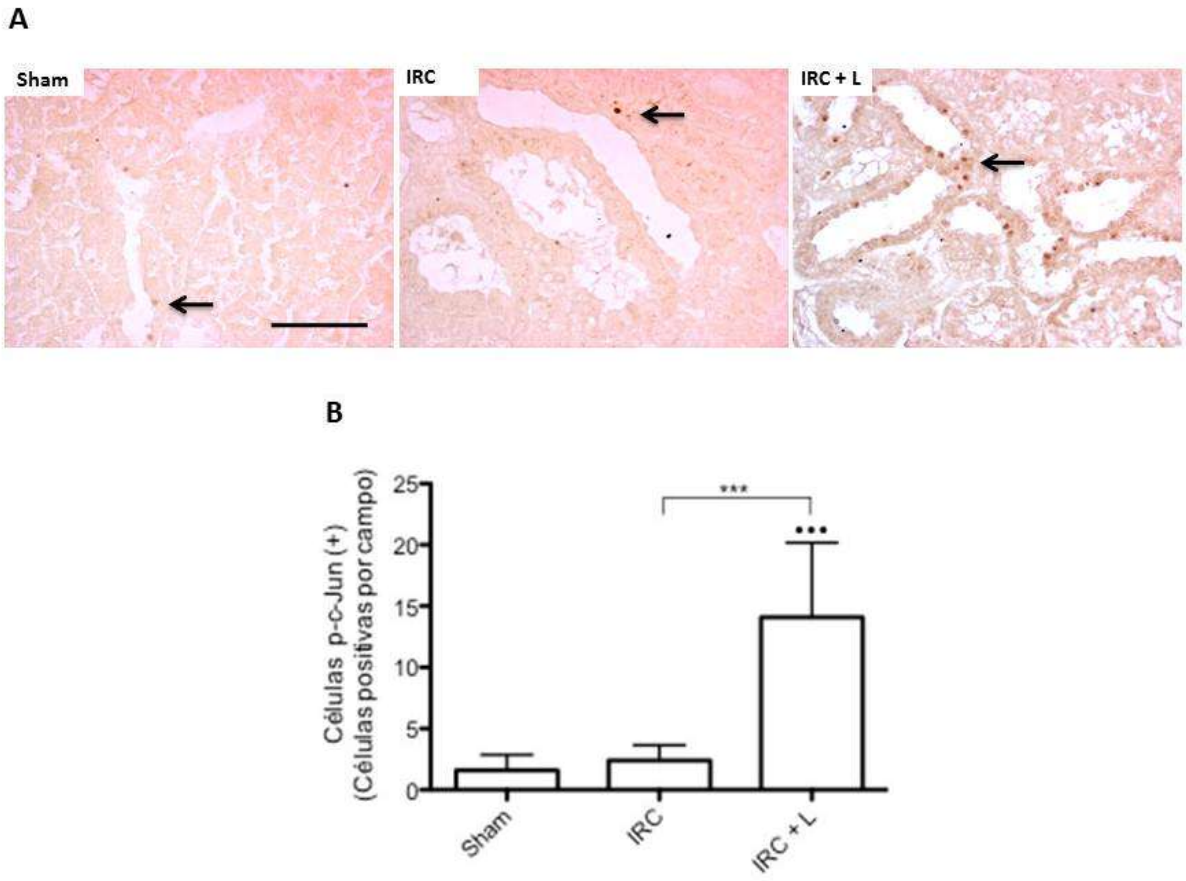


Figura 10: Distribución de p-c-Jun en cortes histológicos de riñón de rata de animales sanos y con IRC. Efecto de lisinopril sobre la distribución de p-c-Jun. (A) Se muestran inmunohistoquímicas representativas para los niveles de p-c-Jun. Flecha indica célula positiva para p-c-Jun. En B se muestra la cuantificación de las células p-c-Jun positivas por campo. L: lisinopril. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P< 0,001 vs IRC, •••P< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. Barra de escala 100 μm. (n=4).

4.9 El aumento proteico de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun en animales Sham y con IRC.

Una vez caracterizado el efecto de lisinopril sobre los niveles de COX-2 y la vía JNK/c-Jun, se evaluó si el aumento de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun. Mediante Western *blot* e IHQ se observó que los animales tratados con anisomicina (activador de la vía JNK/c-Jun) (2,32 ± 0,45 veces de Sham), al igual que aquellos tratados con lisinopril (2,08 ± 0,18 veces de Sham), presentaron niveles proteicos de COX-2 significativamente mayores en comparación con los animales Sham (1,00) e IRC (0,91 ± 0,10 veces de Sham) (P<0,001). La COX-2 en los animales que recibieron simultáneamente anisomicina más SP600125 (antagonista de la vía JNK/c-Jun) (1,27 ± 0,10 veces de Sham) o lisinopril más SP600125 (1,00 ± 0,07 veces de Sham) no presentaron diferencias significativas con los animales Sham e IRC previniendo de manera significativa el aumento observado con los tratamientos individuales, demostrando así que el aumento de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun (P<0,05) (Figura 11A).

De igual forma que se utilizaron animales con IRC se evaluó el efecto de lisinopril, anisomicina y SP600125 en animales Sham. Los animales tratados con lisinopril (2,13 ± 0,13 veces de Sham) y anisomicina (2,00 ± 0,12 veces de Sham) aumentaron de manera significativa los niveles proteicos de COX-2 en comparación con animales Sham (1,00) y tratados con SP600125 (1,01 ± 0,25 veces de Sham) (P< 0,001) (Figura 11B).

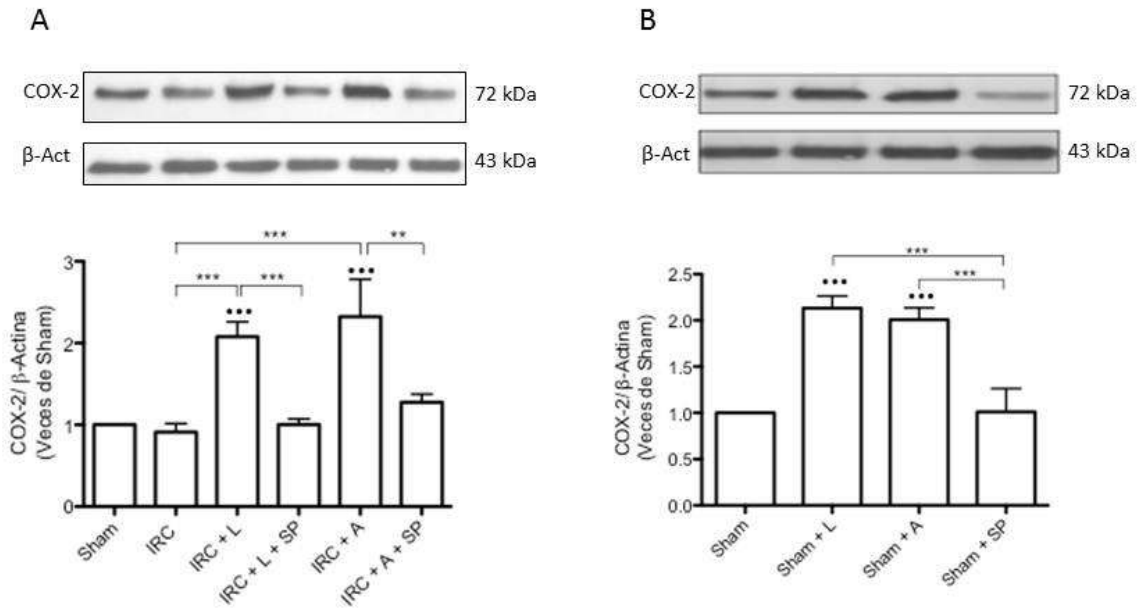


Figura 11: Efecto de SP600125 en los niveles proteicos de COX-2 en animales Sham e IRC tratados con lisinopril o anisomicina. Las proteínas de los homogenizados de riñón de rata de los diferentes grupos se separaron por electroforesis y la banda correspondiente a COX-2 se cuantificó por densitometría. Sobre el gráfico se muestran western blots representativos para COX-2 y β-actina usada como control de carga. L: lisinopril, A: Anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras, ***P*< 0,005, ****P*< 0,001. •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

Mediante IHQ se evaluó la distribución de COX-2 en los animales Sham, IRC y bajo los distintos tratamientos experimentales (Figura 12A). A nivel histológico se encontró la tinción para COX-2 en el Asa de Henle en donde el número de células por Asa fue mayor en los animales tratados con lisinopril y anisomicina que en los animales Sham e IRC. En los animales co-tratados con lisinopril más SP600125 o anisomicina más SP600125 se observó un número de células teñidas menor que en animales a los que se les trató con lisinopril o anisomicina de forma individual (Figura 12A).

La cuantificación del área inmunoteñida muestra que en los animales tratados con anisomicina (3.776 ± 534 μm^2) al igual que lo observado con lisinopril (4.018 ± 421 μm^2), las áreas de tinción de COX-2 fueron significativamente mayores que en los animales Sham (1.417 ± 216 μm^2) o IRC (637 ± 143 μm^2) respectivamente (P<0,001) (Figura 12B).

Los niveles de COX-2 en animales tratados con lisinopril más SP600125 (1.496 ± 484 μm^2) o anisomicina más SP600125 (1.004 ± 151 μm^2) fueron significativamente menores que a los observados en animales con los tratamientos individuales (P<0,05) (Figura 12B).

Estos experimentos corroboran lo observado mediante Western blot.

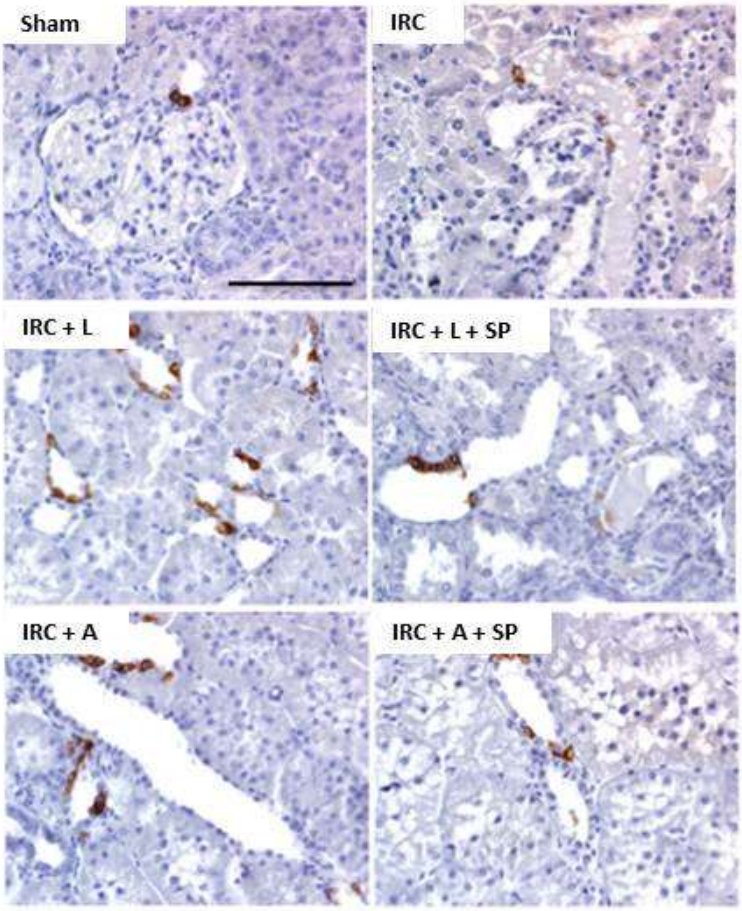


Figura 12 A: Efecto de SP600125 sobre la distribución de COX-2 en el tejido renal de animales con Nx 5/6, en respuesta a lisinopril o anisomicina. Se realizó inmunohistoquímica para COX-2 utilizando el método de PAP y siendo contrastada con Hematoxilina. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Barra de escala 100 μm. (n=4).

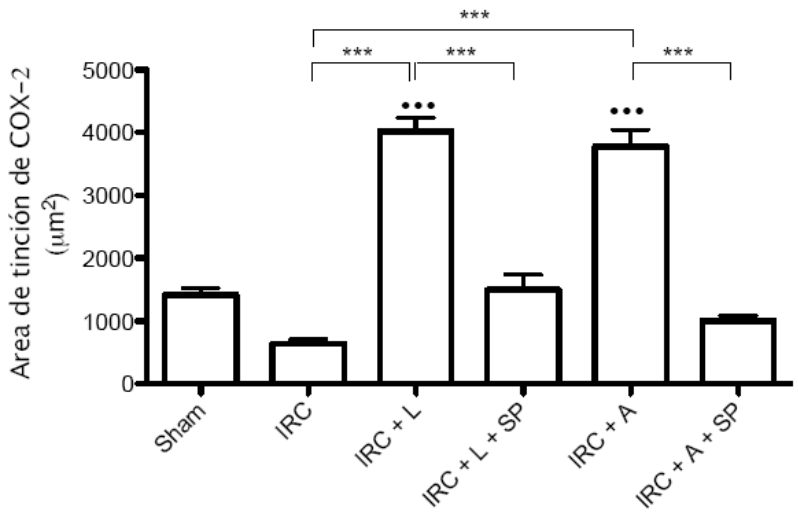


Figura 12 B: Cuantificación Morfométrica de la expresión proteica de COX-2. Efecto de anisomicina y SP600125 sobre los niveles proteicos de COX-2. El área de las células teñidas para COX-2 se cuantificó con el *software* "C-Imaging". L: lisinopril, A: anisomicina. SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ****P*< 0,001. •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4)

4.10 El aumento de PGE_2 generado por lisinopril es dependiente de la vía JNK/c-Jun en animales con IRC.

Uno de los productos primarios del metabolismo del ácido araquidónico es la PGE_2, la cual tiene directa relación con los niveles de COX-2. Debido a que la PGE_2 tiene una vida media aproximada de 30 segundos, se utiliza un metabolito estable derivado de la PGE_2 para cuantificar los niveles de ésta en la orina de los animales. El metabolito utilizado es 13, 14-dihidro-15-keto PGE_2 y es directamente proporcional a la concentración de PGE_2. Los resultados mostraron que los niveles de este metabolito no se modificaron significativamente en animales IRC (1,71 ± 0,15 ng/16 hrs.) en comparación con los animales Sham aun cuando se observó una disminución (2,98 ± 1,06 ng/16 hrs.) (P>0,05). De igual forma los animales tratados con lisinopril (3.50 ± 1,10 ng/16 hrs) y anisomicina (2,87 ± 0,85 ng/16 hrs) no presentaron diferencias significativas en los niveles de 13,14-dihidro-15-keto PGE_2 con la condición Sham (2,98 ± 1,06 ng/16 hrs.), pero presentaron niveles de 13,14-dihidro-15-keto PGE_2 significativamente superiores a los animales con IRC (1,71 ± 0,15 ng/16 hrs.). Al co-administrar SP600125 (2,15 ± 0,74 ng/16 hrs) se observó una disminución en los niveles de 13, 14-dihidro-15-keto PGE_2 en comparación con la administración individual de lisinopril o anisomicina (Figura 13).

Estos experimentos demuestran que la administración de lisinopril aumenta los niveles de COX-2 y PGE_2 por un mecanismo mediado por la vía JNK/c-Jun.

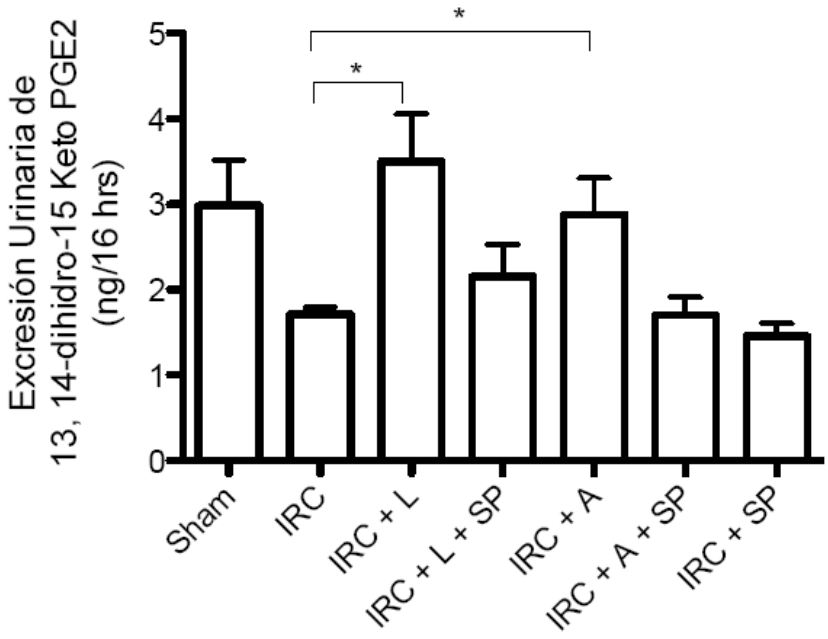


Figura 13: Excreción Urinaria de 13, 14-dihidro-15 keto PGE_2 en animales sometidos a Nx 5/6. Inmunoensayo Enzimático para la cuantificación de un metabolito de PGE_2, 13,14-dihydro-15-keto PGE_2. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. *P< 0,05, vs IRC. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

Objetivo 3.- Evaluar el efecto Morfofuncional de la inhibición de la vía JNK/c-Jun.

4.11 La administración de lisinopril mejora la estructura renal y la VFG de los animales con IRC. Este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun.

Como ya fue descrito en este estudio, la administración de lisinopril disminuye la progresión de la enfermedad renal, efecto que fue prevenido con la inhibición de COX-2 y PGE_2. Por otra parte para poder caracterizar que este efecto es también dependiente de la vía JNK/c-Jun se evaluó farmacológicamente el efecto de la inhibición o activación de la vía sobre los parámetros fisiológicos renales. Animales sometidos a Nx 5/6, mostraron una VFG (0,53 ± 0,11 ml/min) significativamente menor que la de los animales Sham (1,44 ± 0,05 ml/min), evidenciando así la patología renal. Los animales con IRC que recibieron el tratamiento con lisinopril (0,88 ± 0,10 ml/min), anisomicina (0,84 ± 0,16 ml/min) o la co-administración de lisinopril más anisomicina (0,84 ± 0,07 ml/min), presentaron una VFG significativamente mayor en comparación con los animales IRC (P<0,005). Los animales tratados con SP600125 (0,41 ± 0,08 ml/min) no presentaron diferencias significativas en relación a los animales con IRC. Los animales a los que se les trató con la co-administración de lisinopril más SP600125 (0,46 ± 0,05 ml/min) o anisomicina más SP600125 (0,40 ± 0,15 ml/min), presentaron una VFG significativamente menor que la de aquellos grupos con los tratamientos individuales con lisinopril o anisomicina (Figura 14).

El resultado de este experimento sugiere que la regulación de la vía JNK/c-Jun inducida por lisinopril y anisomicina previene parcialmente la disminución en la velocidad de filtración glomerular consecuente del modelo de daño estudiado, efecto antagonizado por la administración de SP600125.

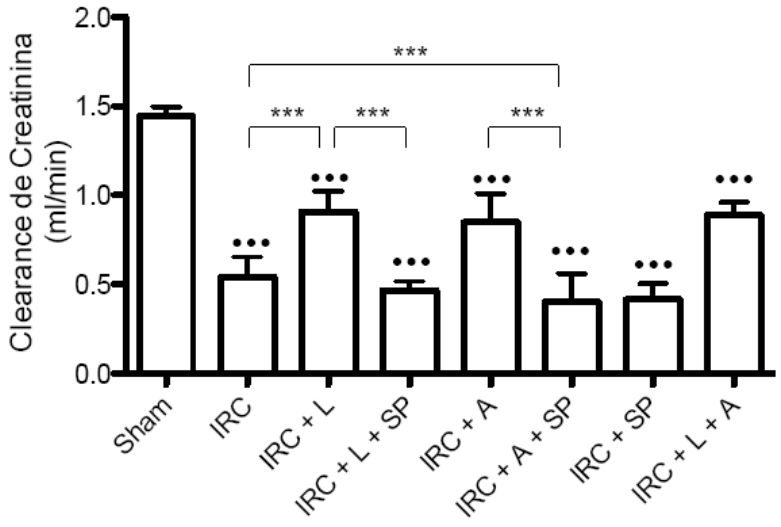


Figura 14. La disminución parcial de la velocidad de filtración glomerular en animales con IRC es mediada por la vía JNK/c-Jun. La creatinina fue cuantificada en plasma y orina como se describe en "métodos". La depuración de creatinina se calcula de acuerdo a la fórmula: (creatinina en orina x volumen colectado)/ (creatinina en plasma x tiempo de colección). L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P< 0,001. •••P< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

Al realizar el análisis histológico mediante la tinción de HE, se evidenció que los animales con IRC presentaban marcados signos de daño estructural como: dilatación tubular, hipertrofia glomerular, pérdida del ribete en cepillo en los túbulos proximales y depósito tubular de proteínas. En los animales tratados con lisinopril, anisomicina o lisinopril más anisomicina, se observó menor grado de dilatación tubular, glomérulos de tamaño fisiológico y un menor grado de depósitos de proteína. A diferencia de lo anterior, los animales tratados con SP600125 eran semejantes en estructura histológica a los animales con IRC. Cuando se co-administró lisinopril más SP600125 o anisomicina más SP600125, los animales presentaron alteraciones semejantes a aquellas descritas para los grupos IRC o IRC más SP600125. (Figura 15).

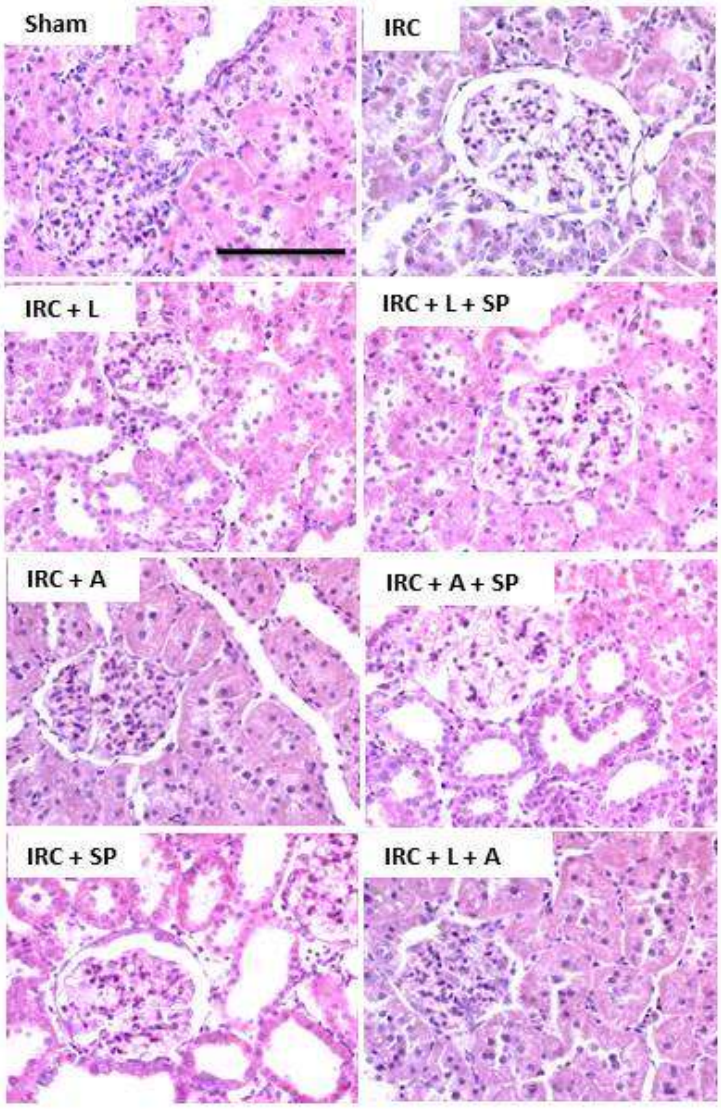


Figura 15: La disminución parcial del daño estructural en animales con IRC es mediada por la vía JNK/cJun. Lisinopril y anisomicina disminuyen el daño observado en cortes histológicos en ratas IRC. Tinción de Hematoxilina Eosina. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Barra de escala 100 μm. (n=4).

4. 12 La administración de lisinopril disminuye el factor quimioatrayente Osteopontina en los animales con IRC. Este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun.

Al evaluar el factor quimioatrayente de macrófagos Osteopontontina (OPN) mediante inmunohistoquímica, se puede evidenciar su expresión en las distintas condiciones experimentales. En los animales Sham se encontró expresada en bajas cantidades en el nefrón distal y el Asa Ascendente Gruesa de Henle. En animales con IRC su distribución aumentó de forma considerable en asa ascendente y túbulos renales, lo cual no fue diferente en animales IRC tratados con SP600125.

Por otra parte, animales tratados con lisinopril, anisomicina o lisinopril más anisomicina, presentaron una menor distribución OPN, asemejándose a lo observado en los animales Sham y diferenciándose ampliamente de los animales IRC (Figura 16A).

Al cuantificar las áreas de localización de OPN se observó que los animales con IRC (4.018 ± 421 μm^2) e IRC más SP600125 (4.472 ± 977 μm^2), presentaron áreas significativamente mayores en comparación con los animales Sham (1.524 ± 185 μm^2). Los animales tratados con lisinopril (1.788 ± 1.040 μm^2), anisomicina (2.007 ± 1.061 μm^2) o lisinopril más anisomicina (1.424 ± 1.009 μm^2), presentaron áreas significativamente menores en relación a los animales con IRC. En los animales a los que se les co-administró lisinopril más SP600125 (3.996 ± 903 μm^2) o anisomicina más SP600125 (4.254 ± 489 μm^2), el área de OPN fue mayor a los observado en los animales tratados sólo con lisinopril o anisomicina (Figura 16B).

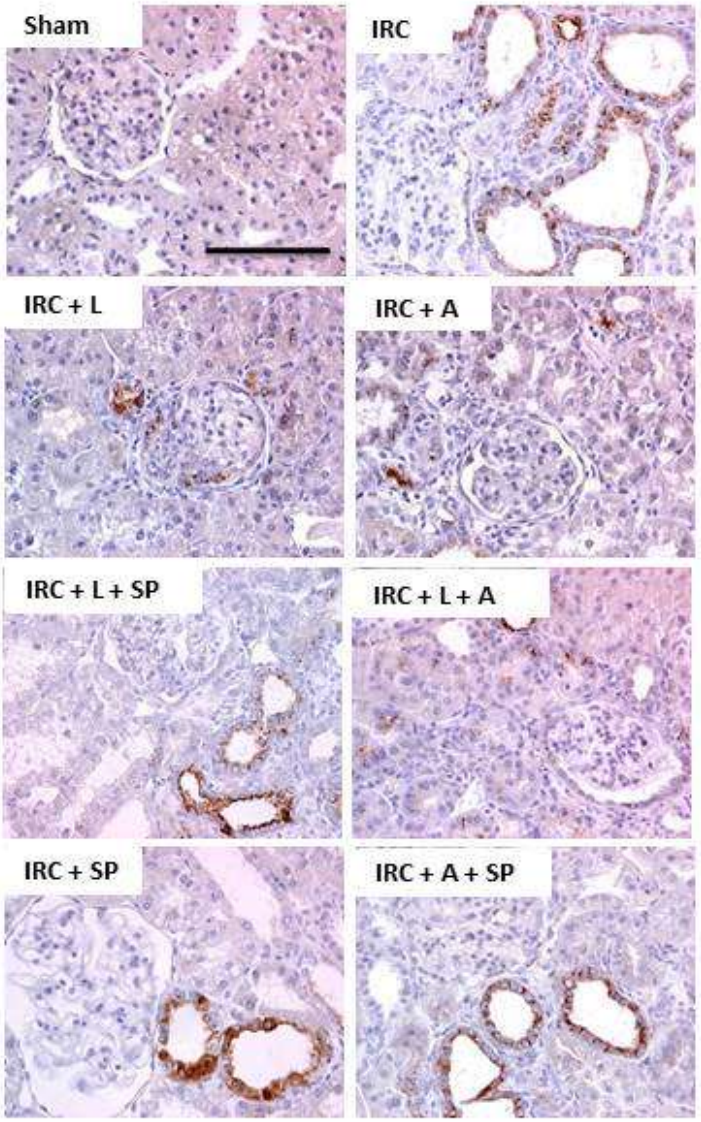


Figura 16 A: La disminución del factor quimioatrayente Osteopontina en animales con IRC es mediado por la vía JNK/c-Jun. Inmunohistoquímica para OPN. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Barra de escala 100 μm. (n=4).

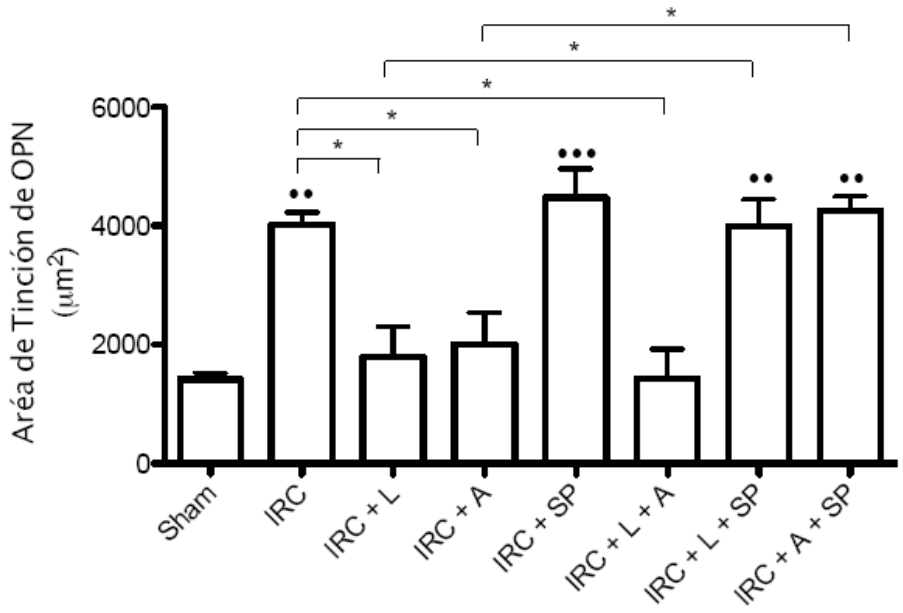


Figura 16 B: Cuantificación Morfométrica del factor quimioatrayente Osteopontina. El área de la tinción para osteopontina se cuantificó con el *software* "C-Imaging". L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras.**P*< 0,05. ••*P*< 0,005, •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=4).

4.13 La administración de lisinopril disminuye el colágeno intersticial en los animales con IRC. Este efecto es mediado por la vía JNK/c-Jun.

Mediante la tinción de Sirius Red, se evaluó la cantidad de colágeno total bajo las distintas condiciones experimentales. Se ha descrito que un aumento del colágeno intersticial es consecuente con la progresión de la enfermedad renal (Shantra y col., 2002). Los animales con IRC presentaron abundantes depósitos de colágeno intersticial al igual que los animales IRC tratados con SP600125. Esta condición no se observó en los animales tratados con lisinopril, anisomicina, o lisinopril más anisomicina pese a que presentan alteraciones renales estructurales. Los animales con co-administración de lisinopril más SP600125 o anisomicina más SP600125 presentaron niveles de colágeno intersticial semejantes a los de los animales IRC y mayores a los de los animales con el tratamiento individual de lisinopril o anisomicina. (Figura 17A).

Al cuantificar las áreas de tinción de colágeno obtenidas con Sirius Red, se observó que los animales IRC (8.250 ± 193 μm^2) presentaron niveles de colágeno intersticial significativamente mayores en comparación con los observados en animales Sham (3.847 ± 527 μm^2). Los depósitos de colágeno intersticial en los animales IRC tratados con lisinopril (4.137 ± 620 μm^2), anisomicina (4.801 ± 630 μm^2) o la combinación de lisinopril más anisomicina (3.940 ± 2507 μm^2) fueron significativamente menores en comparación con los animales IRC. En los animales a los que se les co-administró lisinopril más SP600125 (7.341 ± 632 μm^2) o anisomicina más SP600125 (7.828 ± 1010 μm^2) los niveles de los depósitos de colágeno intersticial fueron significativamente mayores a los observados con la administración individual de lisinopril o anisomicina (P<0,001). Por último, no se

observaron cambios significativos en los animales IRC tratado solo con SP600125 (8.497 ± 542 μm^2) en comparación con los animales IRC (Figura 17B).

Estos experimentos muestran que el efecto obtenido con la administración de lisinopril en la estructura y función renal son dependientes tanto de la vía JNK/c-Jun como del aumento en los niveles de COX-2 y PGE_2.

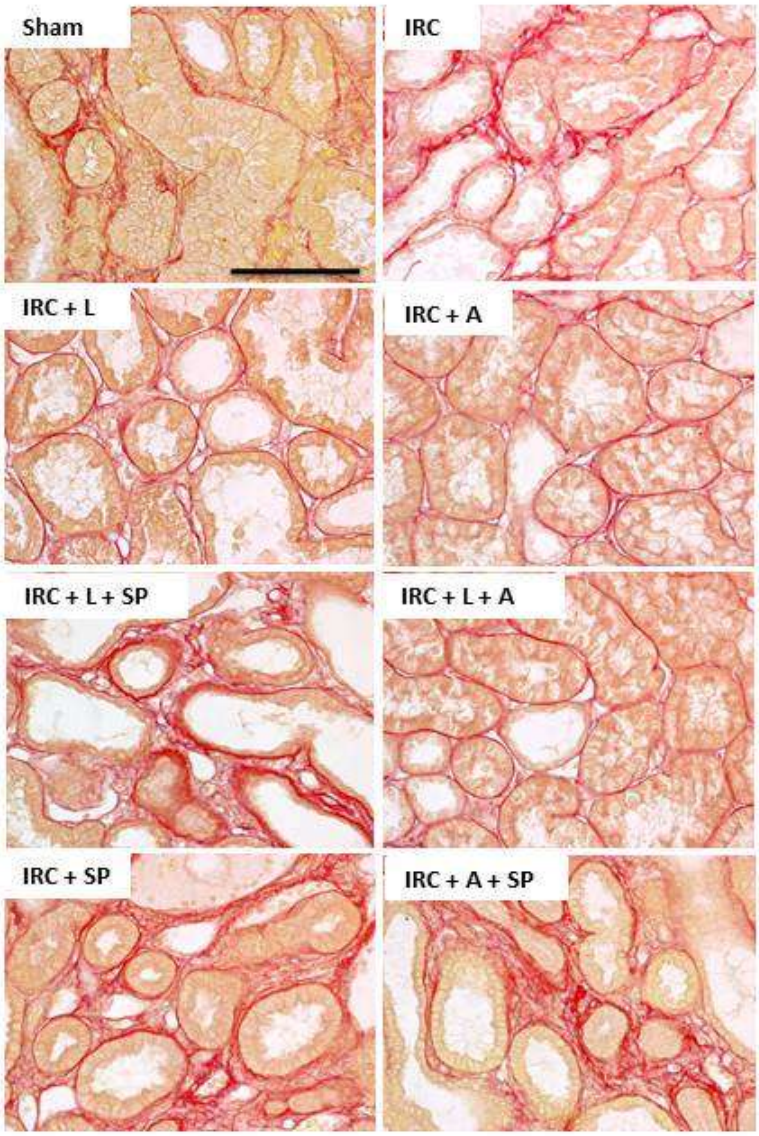


Figura 17 A: La disminución del factor del colágeno intersticial en animales con IRC es mediado por la vía JNK/c-Jun. Tinción de Sirius Red. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Barra de escala 100 μm. (n=4).

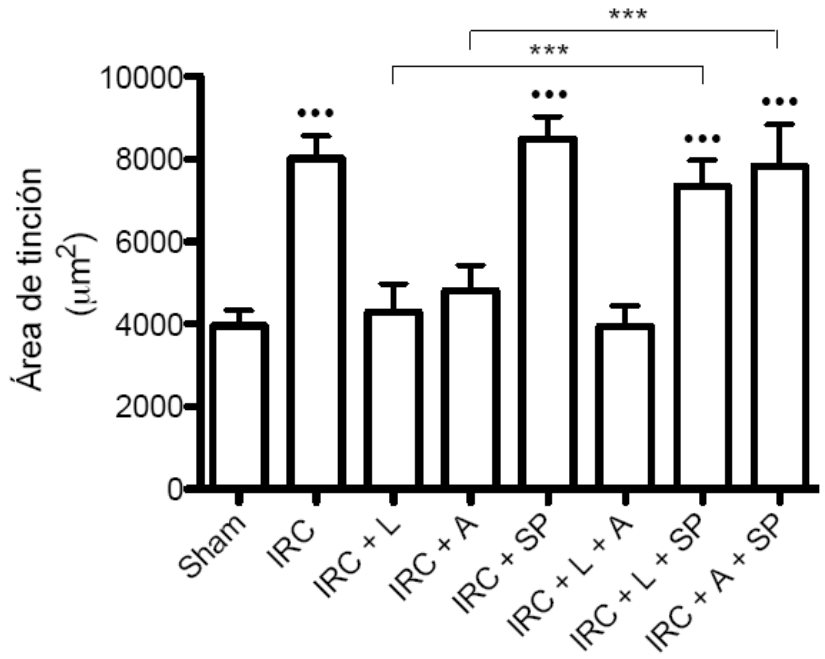


Figura 17 B: Cuantificación Morfométrica del colágeno intersticial. El área de la tinción para colágeno se cuantificó con el *software* "C-Imaging". L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ****P*< 0,001. •••*P*< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4)

Objetivo 4.- Evaluar si la administración de lisinopril genera un aumento en los niveles de COX-2 vía JNK/c-Jun en células mTAL.

4.14 La administración de lisinopril aumenta los niveles proteicos de COX-2 en células mTAL.

Para evaluar si la vía de señalización propuesta *in vivo* se podía replicar en un tipo de célula renal, se utilizaron células medulares del Asa Ascendente Gruesa de Henle (mTAL) y se evaluaron objetivos semejantes a los evaluados in vivo.

En primer lugar se evaluó la participación de COX-2 en la vía activada por lisinopril, las células mTAL se sometieron a diferentes condiciones experimentales. Primero se realizó una curva concentración respuesta a lisinopril y se evalúo el nivel proteico de COX-2 (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μM). Se observó que a 50 nM (0,86 ± 0,12 veces del control) no hubo cambios significativos en comparación con la condición control (1,00) (P>0,05) a diferencia de las concentraciones de 100 nM (1,92 ± 0,22 veces del control), 250 nM (1,83 ± 0,13 veces del control) y 500 nM (1,59 ± 0,21 veces del control) (P<0,001), en donde se observó un aumento significativo en comparación a las células control (P<0,05). De los niveles de COX-2 en células estimuladas con 1 μM de lisinopril (1,33 ± 0,08 veces del control) aunque aumentaron, no presentaron diferencias significativas con la condición control. De forma análoga, las condiciones de 100 nM, 250 nM, 500 nM y 1 μM no presentan diferencias significativas entre sí (Figura 18A).

En base a la observación microscópica mediante inmunofluorescencia se pudo observar que el número de células positivas para COX-2 fue mayor en las condiciones de 100 nM y 250 nM en relación a la condición control. Las condiciones de 500 nM y 1 μM no presentaron diferencias significativas en relación a las concentraciones de 100 nM y 250 nM de

lisinopril (Figura 18B).

Basado en estos resultados se estableció 100 nM de lisinopril como la concentración con mayor efecto en células mTAL, además es concordante con lo descrito en la literatura en relación a las concentraciones de lisinopril utilizadas en cultivo celular (Saijonmaa y col., 1998).

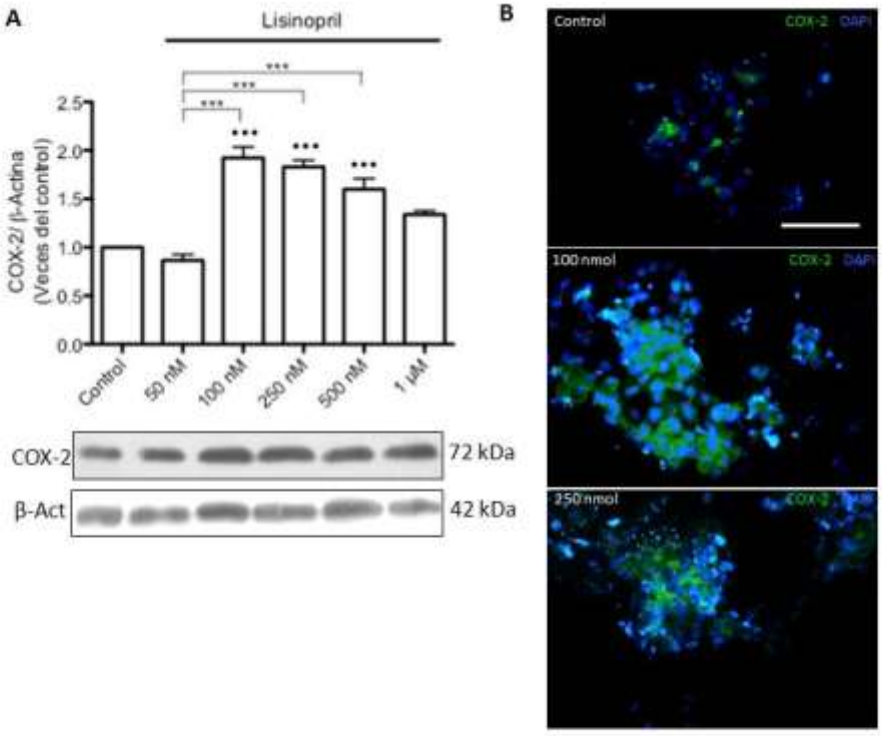


Figura 18: Lisinopril aumenta los niveles de COX-2 de manera significativa en dosis igual o superior a 100 nM hasta 500 nM. A: Curva concentración respuesta de niveles de COX-2 tras la administración de lisinopril por 24 horas en células mTAL. El gráfico muestra la densitometría del western blot de COX-2 para la curva dosis respuesta, bajo este se muestra un western blot representativo. Se utilizó como control de carga β-Actina. B: Inmunofluorescencia para COX-2, Verde: COX-2, Azul: Tinción nuclear DAPI. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ****P*< 0,001 vs 50 nM, •••*P*< 0,001 vs control. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. Barra de escala 100 µm. (n=3).

4.15 La administración de lisinopril aumenta los niveles proteicos de JNK y p-JNK en células mTAL.

Con la finalidad de caracterizar en células mTAL el mecanismo por el cual lisinopril aumenta los niveles de COX-2 y al igual que *in vivo* se cuantificaron los niveles proteicos de JNK y p-JNK. Se realizó una curva concentración respuesta (50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μM) y se evalúo el nivel proteico de JNK y p-JNK 24 horas después respectivamente. La administración de 50 nM (1,18 ± 0,13 veces del control) no presenta cambios significativos en los niveles proteicos de JNK en comparación con la condición control (1,00) a diferencia de las concentraciones de 100 nM (2,29 ± 0,06 veces del control), 250 nM (2,51 ± 0,20 veces del control), 500 nM (2,36 ± 0,24 veces del control) y 1 μM (2,21 ± 0,22 veces del control), donde se observó un aumento significativo (P<0,001) (Figura 19A).

Al evaluar los niveles proteicos de p-JNK se observó que la administración de 50 nM (1,40 ± 0,11 veces del control) de lisinopril no presentó un aumento significativo en relación a la condición control (1,00) (P>0,05). La administración de 100 nM (2,21 ± 0,30 veces del control), 250 nM (2,25 veces del control ± 0,20), 500 nM (2,44 veces del control ± 0,25) y 1 μM (2,23 ± 0,28 veces del control) de lisinopril respectivamente, presentaron aumentos significativos en relación a la condición control (P<0,001) (Figura 19B).

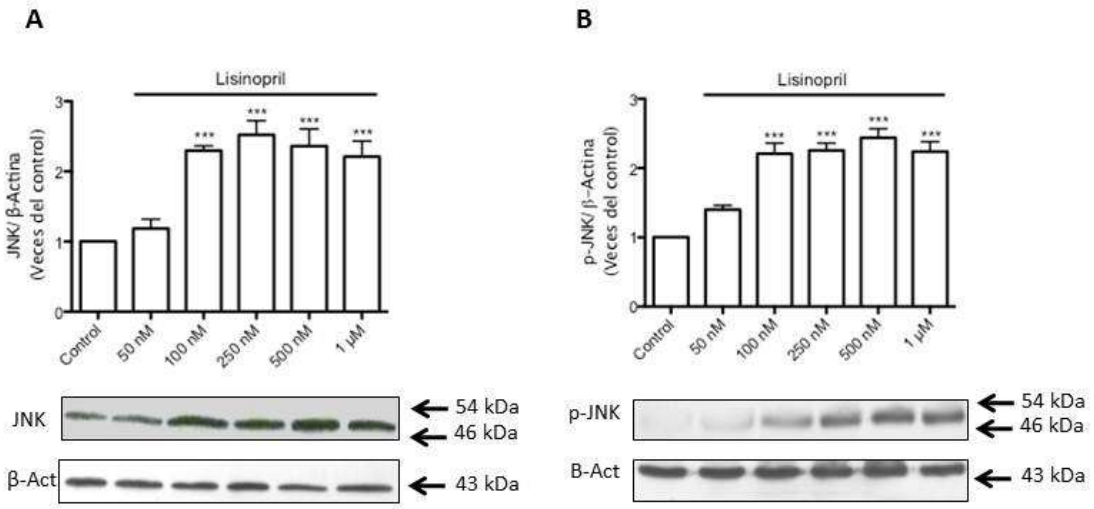


Figura 19: Efecto de lisinopril en los niveles proteicos de JNK y p-JNK en células mTAL. Las células se estimularon con diferentes concentraciones de lisinopril por 24 horas y se cuantificó por Western blot los niveles de JNK (A) y p-JNK (B). Bajo los gráficos se muestran western blots representativos. Se utilizó β-Actina como control de carga. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ****P*< 0,001 vs control. Análisis estadístico; ANOVA, post-*hoc test* Tukey. (n=3).

4.16 Anisomicina aumenta los niveles proteicos de la vía JNK/c-Jun. Este efecto es prevenido con la administración de SP600125 en células mTAL.

Al igual como se describió *in vivo*, se utilizaron herramientas farmacológicas que permitieran demostrar la participación de la vía JNK/c-Jun en el efecto de lisinopril. Para ello se utilizó anisomicina y SP600125 en células mTAL en periodos de incubación de 24 horas.

Se pudo observar que al tratar las células mTAL con los distintos fármacos se producen cambios en el nivel proteico total de JNK. Las células tratadas con lisinopril (2,13 ± 0,37 veces del control), anisomicina (2,14 ± 0,19 veces del control) y lisinopril más anisomicina (2,07 ± 0,24 veces del control) aumentan de manera significativa los niveles proteicos totales de JNK en comparación con las células control (1,00) y las tratadas con SP600125 (1,27 ± 0,17 veces del control) (P<0,05). La co-administración de lisinopril más SP600125 (1,50 ± 0,34 veces del control) no presentó cambios significativos en relación a las células control (Figura 20A).

Con respecto a los niveles proteicos de p-JNK, las células tratadas con lisinopril (2,88 ± 0,24 veces del control) y anisomicina (2,59 ± 0,29 veces del control) aumentaron la fosforilación de JNK de manera significativa en comparación con las células control (1,00), efecto que no se observó con la administración de SP600125 (0,94 ± 0,11 veces del control). Al co-administrar lisinopril más anisomicina (2,61 ± 0,09 veces del control) no se observó una diferencia significativa con la administración individual de estos fármacos. La co-administración de lisinopril más SP600125 (0,89 ± 0,14 veces del control) previno de manera significativa el aumento de p-JNK observado con la administración individual de lisinopril (P<0,05) (Figura 20B). Estos resultados son consistentes con lo descrito *in vivo*

donde de igual forma se observó un aumento significativo en p-JNK y JNK al tratar los animales con lisinopril.

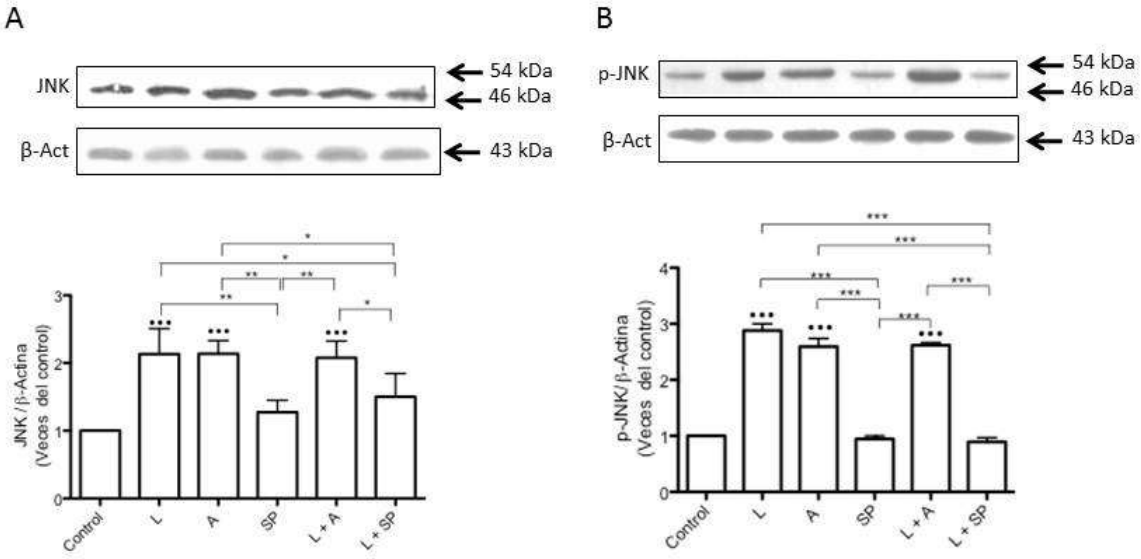
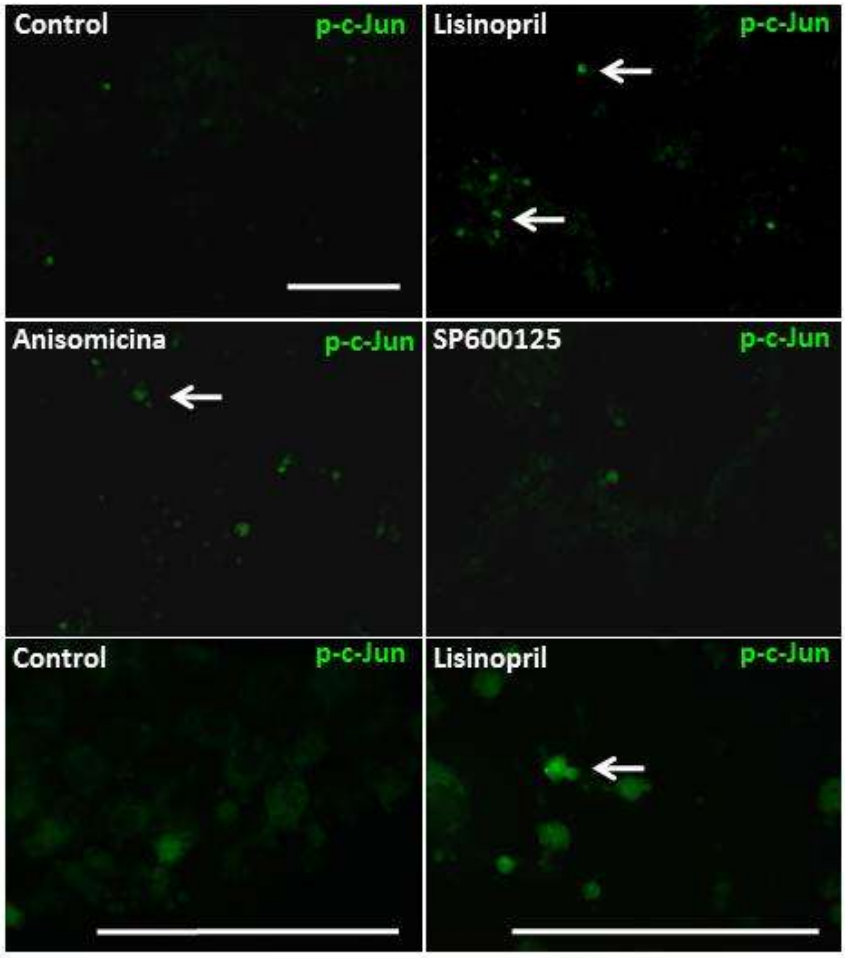


Figura 20. Lisinopril y anisomicina aumentan de manera significativa los niveles de JNK y p-JNK. A y B muestran la densitometría de los niveles proteicos de JNK y p-JNK respectivamente, sobre estos gráficos se muestran western blots representativos para ambas condiciones. Se utilizó como control de carga β-Actina Total. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. **P*< 0,05, ***P*< 0,005, ****P*< 0,001. •••*P*< 0,001 vs control. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test Tukey*. (n=3).

Al estudiar por inmunofluorescencia los niveles de p-c-Jun se observa que las células tratadas con lisinopril (8,2 ± 1,3 células (+) por campo) o anisomicina (6,5 ± 1,2 células (+) por campo), presentan una mayor distribución de marca positivas por campo en comparación con las células control (1,7 ± 0,9 células (+) por campo) o con las tratadas solo con SP600125 (2,0 ± 1,4 células (+) por campo). Al co-administrar lisinopril más anisomicina (6,8 ± 1,9 células (+) por campo) no se observa un aumento al observado para cada uno de forma independiente, sin embargo, en células tratadas con lisinopril más SP600125 (3.5 ± 2,0 células (+) por campo) se observó una disminución en el número de células por campo comparado con lisinopril por sí solo. Como era de esperar, la inmunofluorescencia sugiere una localización nuclear de p-c-Jun (Figura 21 A y B).

La administración de lisinopril aumentó los niveles proteicos de JNK y la distribución de células p-c-Jun positivas por campo al igual como lo hace anisomicina, el activador de la vía utilizado como control positivo. Estos resultados son consistentes con lo observado en los experimentos *in vivo*.

A


Control
p-c-Jun
Lisinopril
p-c-Jun
Anisomicina
p-c-Jun
SP600125
p-c-Jun
Control
p-c-Jun
Lisinopril
p-c-Jun

B

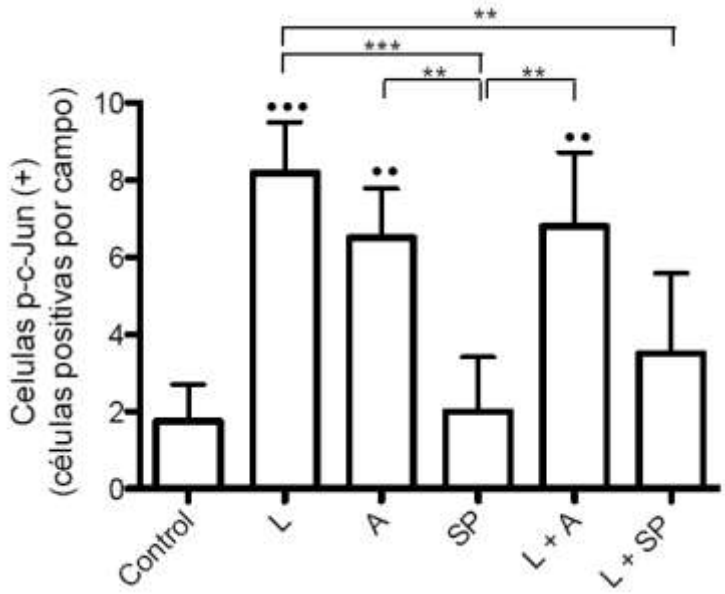


Figura 21: **Lisinopril y anisomicina aumentan de manera significativa las células p-c-Jun (+) por campo.** A: Inmunofluorescencia para p-c-Jun en células mTAL. Se muestran fotos representativas de cada tratamiento. La flecha indica células mTAL con marca positiva para p-c-Jun. Barra de escala 100 μm. B: Cuantificación de células positivas para p-c-Jun por campo en células mTAL. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P*< 0,005, ****P*< 0,001. ••*P*< 0,005, •••*P*< 0,001 vs control. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=4).

4.17 El aumento en los niveles proteicos de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun.

Para evaluar el efecto que tendría la activación o inhibición de la vía JNK/c-Jun sobre los niveles proteicos de COX-2, células mTAL se incubaron con anisomicina y lisinopril en presencia o ausencia de SP600125 durante 24 horas y luego se realizó Western blot e inmunofluorescencia para COX-2. Se observó que tras la administración de lisinopril (2,85 ± 0,28 veces del control), anisomicina (2,75 ± 0,16 veces del control) o lisinopril más anisomicina (2,42 ± 0,28 veces del control), aumentaron de manera significativa los niveles proteicos de COX-2 en comparación con las células control (1,00) y las células tratadas con SP600125 (1,38 ± 0,41 veces del control) (Figura 22A) (P<0,001).

La cuantificación proteica obtenida se corroboró con los niveles observados en la inmunofluorescencia, en donde se evidencio niveles proteicos de COX-2 más altos en las células tratadas con lisinopril y anisomicina, en comparación con las células control y tratadas con SP600125 (Figura 22B).

Estos resultados demuestran que el aumento de los niveles proteicos de COX-2 en células mTAL tras la administración de lisinopril o anisomicina son dependiente de la vía JNK/c-Jun y son consistentes con lo observado en los experimentos *in vivo* donde se observó un efecto similar de anisomicina y SP600125 sobre los niveles proteicos de COX-2.

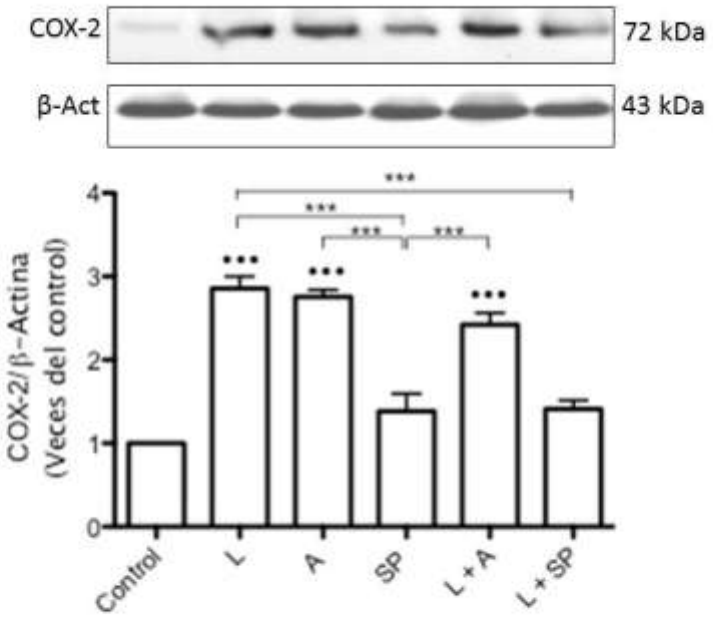


Figura 22 A: El aumento en los niveles proteicos de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun. El gráfico representa los niveles proteicos de COX-2 posterior a la administración de los distintos tratamientos. Sobre el gráfico se muestran western blots representativos para COX-2 y β-Actina utilizada como control de carga. L: lisinopril, A: anisomicina, SP: SP600125. Las barras representan el promedio ± EE de las densitometría de COX-2 en las diferentes muestras. ****P*< 0,001. •••*P*< 0,001 vs control. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=3).

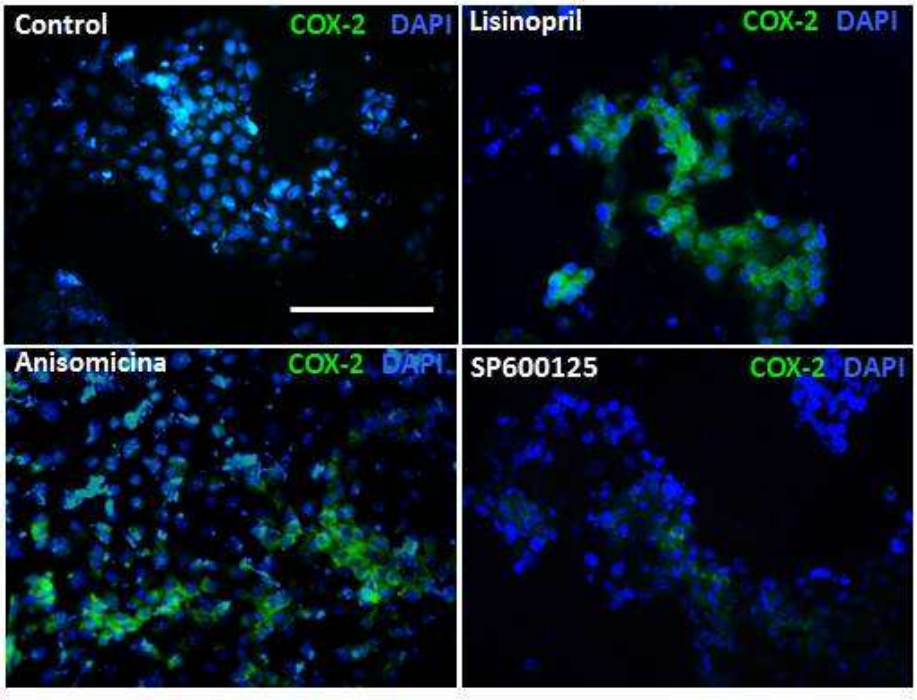


Figura 22 B: Inmunofluorescencia de COX-2: Efecto en células mTAL de la vía JNK/c-Jun en COX-2. Inmunofluorescencia para COX-2 en células mTAL fijadas en etanol. Verde: COX-2, Azul: Tinción nuclear DAPI. Barra de escala 100 μm. (n=4).

Objetivo 5.- Evaluar la expresión de ECA como receptor en células mTAL y su participación en el aumento de COX-2 dependiente de la administración de lisinopril.

4.18 Evaluación de presencia de ECA en células mTAL

Con la finalidad de evaluar la participación de la ECA como el receptor responsable de la señalización celular activada por lisinopril, se evaluó mediante Western blot la presencia de esta proteína en células mTAL. Mediante los estudios realizados no se detectó la presencia de ECA en este tipo celular. Como controles positivos se utilizaron muestras de animales Sham (1,00) sometidos a modelos experimentales Nx 5/6, (1,54 ± 0,08 veces de Sham) y Goldblatt (1,45 ± 0,08 veces de Sham), en donde se sabe que ECA está expresada (P<0,001) (Figura 23).

Este resultado cambia parcialmente la hipótesis de trabajo en donde se planteó que el efecto generado por lisinopril sobre los niveles de JNK/c-Jun y COX-2 era dependiente de la ECA. Sin embargo los efectos observados por lisinopril en los niveles de JNK/c-Jun y COX-2 se sostienen aun no siendo posible detectar ECA en nuestro modelo.

En base a estos resultados se planteó un nuevo objetivo de trabajo que propone caracterizar el receptor involucrado en la señalización dependiente de lisinopril. Como ANEXO al final de la Tesis se encuentran resultados preliminares relacionados con estos objetivos.

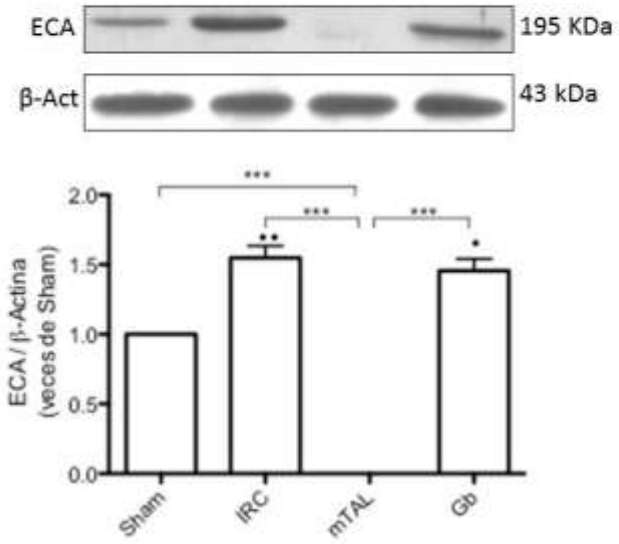


Figura 23: Expresión proteica de ECA en diferentes modelos experimentales. El gráfico representa los niveles proteicos de ECA en riñón de los distintos modelos experimentales. Densitometría de ECA, sobre el gráfico se muestran western blots representativos para ECA y β-Actina utilizada como control de carga. Sham: Cirugía simulada, IRC: Insuficiencia Renal Crónica, Gb: Modelo Goldblatt. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ****P*< 0,001 vs mTAL. •*P*< 0,05, ••*P*< 0,005 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey. (n=3).

5. DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de la Vía *in vitro*

En los últimos años, un gran número de publicaciones hacen referencia a los efectos benéficos que genera la administración de iECAs en pacientes con alteraciones renales severas (Heerspink y col., 2013; Mancini 2000). Muchos de esos efectos han sido atribuidos a distintos mecanismos: aumento en los niveles de BK (Schanstra col., 2002) y por ende natriuresis, inhibición de la proliferación celular, estimulación de colagenasas e inhibición de la fibrosis ventricular, renal y vascular (Schanstra col., 2002) o bien disminución en los niveles de Ang II, lo que trae consigo una disminución de moléculas pro-inflamatorias (MCP-1, RANTES, OPN), disminución de la proliferación celular, la síntesis de colágeno y la fibrosis renal (Mezano y col., 2001). En esta Tesis, hemos caracterizado un mecanismo independiente a los mencionados con anterioridad, el cual se basa en el aumento de la enzima Ciclooxigenasa-2. Esta enzima juega un papel importante en la reparación del daño epitelial intestinal (Fukata y col., 2007), implantación y ovulación, desarrollo perinatal renal y vascular, desarrollo en etapas especificas del linfocito T (Smith y col., 2001), la secreción de renina a través del aumento de PGE_2 vía receptor EP4 (Chen y col., 2010), la retroalimentación túbulo glomerular (Ichihara y col., 1999) y la excreción de sodio (Rodríguez y col., 2000). El efector a nivel renal de la activación de esta enzima es principalmente la PGE_2, la cual ha sido relacionada con diversos efectos benéficos como por ejemplo el aumento en la excreción de sodio, (Rodriguez y col., 2004) y la regulación del flujo sanguíneo medular (Green y col., 2012).

Este estudio muestra que tanto en células inmortalizadas del Asa Ascendente Gruesa de Henle (mTAL), como en animales con IRC inducida por Nx 5/6, la administración de lisinopril, un iECA, aumenta significativamente los niveles proteicos de COX-2 de manera concentración dependiente. El aumento observado en los niveles de COX-2 es dependiente de la vía JNK/c-Jun en células mTAL, puesto que al bloquear con SP600125, un inhibidor de la activación de JNK, el efecto de lisinopril sobre COX-2 es prevenido de manera significativa y al administrar anisomicina, un activador de la vía, se observa un efecto similar al de lisinopril en los niveles de COX-2, efecto que también es inhibido por SP600125. Por otra parte, la actividad basal de la vía JNK/c-Jun no parece relevante en los modelos utilizados ya que la administración de SP600125 no afecta los niveles de JNK y c-Jun en la condición control o en animales IRC sin tratamiento adicional, concordando parcialmente con lo descrito por el grupo de Fleming.

Existen diferencias relevantes entre los resultados de Fleming y los presentados en este estudio. Fleming describe un aumento de p-JNK y no de JNK en su modelo *in vitro* mientras que en este trabajo se sugiere un aumento no solo de forma fosforilada sino también de la proteína total. Esto puede deberse a que en los experimentos de Fleming las células eran estimuladas por dos horas con ramipril lo que describe un efecto agudo; a diferencia de nuestro modelo donde la estimulación es por 24 horas con lisinopril lo que puede describirse como un efecto crónico.

Además, ensayos de inmunofluorescencia para p-c-Jun en células mTAL en presencia de lisinopril y anisomicina, mostraron una localización nuclear, consistente con observaciones de otros autores donde se describe que la fosforilación de c-Jun promueve su traslocación al nucleó y su función como factor de trascripción (Juhász y col., 2013).

Originalmente en este trabajo se planteó que lisinopril podría señalizar a través de ECA, la cual, según los trabajos de Fleming (2006), puede actuar como receptor. En esos estudios se caracterizó que la unión de los iECA, como ramipril o peridonpril, a la ECA aumenta la fosforilación de la Ser1270 dependiente de CK2, activando JNK lo que resulta en la fosforilación de c-Jun y posterior translocación de éste al núcleo. Esta translocación de c-Jun al núcleo aumenta los niveles del factor de transcripción AP-1 seguido de un aumento en la expresión de ECA y COX-2 (Fleming 2006). Esta hipótesis fue descartada de manera parcial para nuestro modelo, ya que aunque se observó la regulación de COX-2 por un iECA esta regulación parece ser independiente de ECA. En estas células inmortalizadas del Asa ascendente gruesa de Henle no fue posible detectar la expresión proteica de ECA mediante técnicas como Western blot a diferencia de las proteínas de la vía de señalización JNK/c-Jun que si fueron detectadas. Aunque actualmente no existen reportes de expresión de ECA en células mTAL, a diferencia del modelo de cordón umbilical utilizado por el grupo de Fleming, el fundamento de utilizar células mTAL en estos experimentos se basó en la descripción de la expresión para COX-2 realizada en estudios anteriores de nuestro grupo (Rodríguez y col., 2004; Eng y col., 2007). Por otra parte, en modelos animales, ECA ha sido descrita en glomérulo, tubulointerticio (Mizuiri y col., 2011) y arteriolas renales (Soler y col., 2008) por lo que podía estar presente o ser estimulada en este tipo celular. Debido a que no pudimos detectar ECA en células mTAL, se planteó de manera preliminar evaluar si existía otro receptor involucrado en la señalización de la vía JNK/c-Jun y COX-2. Para esto y de forma preliminar se evaluó de manera farmacológica los receptores AT1 para angiotensina y B2 para Bradicinina. El primero se ha descrito que participa en aumentos de COX-2 y activación de la vía JNK/c-jun en el sistema cardiovascular, contracción del musculo liso dependiente de la señalización de fosfolipasa

C, Inositol tri-fosfato y proteína quinasa C, en la hipertrofia cardiovascular dependiente de las proteínas ERK1/2, c-fos, p70, y PHAS-1, formación de la matriz extracelular dependiente de las proteínas JNK/AP-1, RhoGEF y Talina. (Mehta y col., 2007). Por otra parte, el B2 ha sido descrito como responsable del aumento de COX-2 en células mTAL tras la administración de BK, esto último sugirió un mecanismo por el cual se pudiese regular el transporte iónico en el Asa Ascendente Gruesa de Henle a través del receptor B2 (Rodríguez y col., 2004).

Contrastando los resultados obtenidos por Rodríguez y col., en donde la infusión exógena de BK aumentó los niveles proteicos de COX-2 mediante el receptor B2 en células mTAL, nuestro modelo celular muestra de manera preliminar que el bloqueo del receptor B2 no previene el aumento de COX-2 inducido por lisinopril, sugiriendo un nuevo mecanismo que pudiera aumentar los niveles de COX-2 en células mTAL independiente de los receptores B2 y AT1. La ausencia de efecto posterior a la administración de los antagonistas para B2 (HOE-140) o AT1 (losartan), sugirió que dichos receptores no participaban en la señalización activada por lisinopril aun estando presentes. Habiendo descartado de manera preliminar la participación de los receptores B2 y AT1 en el aumento de COX-2 dependiente de lisinopril en células mTAL, se decidió evaluar la participación del receptor B1 de BK, (descrito como responsable del aumento de COX-2 en células glomicas (Lu y col., 2010) y en venas de cordón umbilical (Errasi y col., 2001). En este contexto, se encontró de manera preliminar que la administración de Leu-8 (antagonista del receptor B1) previno el aumento en los niveles de COX-2 tras la administración de lisinopril. Estos antecedentes sugieren que el receptor activado por lisinopril en células mTAL que media la vía JNK/c-Jun y COX-2 es el receptor B1 de BK. Esta posible hipótesis es consistente con lo planteado por el grupo de Erdos, en donde se sostiene que el

receptor B1 de BK puede ser activado directamente por iECAs en ausencia de ECA (Erdos y col., 2010).

Por otra parte, se podría especular que lisinopril está inhibiendo a la ECA y con ello aumentar los niveles de BK y de DABK. Así, tanto DABK, que es el agonista endógeno del receptor B1 (Errasi y col., 2001) como BK a altas concentraciones, podrían ser los verdaderos activadores del receptor B1. Esta especulación podría ser cierta en el modelo *in vivo*, sin embargo resulta más débil en el modelo *in vitro*, si recordamos que no se detectó la expresión de ECA en estas células y que además se ha descrito que las células inmortalizadas del Asa de Henle no expresan BK (Rodríguez y col., 2004). Por lo tanto, la administración de lisinopril no generaría el aumento de DABK, a diferencia de otros modelos donde hay BK (De Vechiss y col., 2011). Además, la administración exógena del agonista B1 (DABK) permitió sugerir que la activación del receptor B1 es responsable del aumento significativo en los niveles de COX-2. Este efecto es semejante al efecto observado con la administración de lisinopril.

Puesto que a las concentraciones utilizadas de lisinopril y DABK no fue posible observar un efecto aditivo sobre los niveles de COX-2, y para corroborar que ambos sustratos estarían utilizando la misma vía de activación, se utilizó la mitad de la concentración para ambos compuestos; concentraciones que por sí solas no habían presentado aumentos de los niveles de COX-2. El aumento observado en los niveles de COX-2 al administrar lisinopril y DABK de forma conjunta muestra un efecto aditivo y sugiere que pueden estar utilizando el mismo blanco proteico. En estudios realizados en células endoteliales se ha reportado que la activación de la COX-2 lleva a la liberación de óxido nítrico (NO) vía óxido nítrico sintasa (NOS) de la misma forma que los agonistas Des-Arg-Leu-9 o Des-Arg-Calidina 10 (Erdos y col., 2010). En el caso de las células mTAL no se estudió el efecto en la

producción de NO pues no estaba dentro de los objetivo del estudio. Sin embargo, debido a que se ha descrito que en algunas células del asa de Henle se expresa nNOS, podría ser interesante evaluar su participación en futuros experimentos.

Al analizar la estructura de los receptores ECA y B1, se ha descrito que el pentámero de la secuencia canónica de ECA (HEXXH), contiene sitios de unión a residuos de Zinc en los dominios N y C terminal importantes para la unión de los iECA. Por otra parte al analizar la secuencia del segundo loop extracelular del receptor B1 (HEAWH) descrita como el sitio de unión para los agonistas del receptor B1, es posible determinar que presenta una alta homología con la secuencia encontrada en la ECA, sugiriendo así que esta secuencia del receptor B1 podría ser el sitio de unión de los iECA (Erdos y col., 2010), como lisinopril.

5.2 Caracterización de la Vía *in vivo*

Para evaluar el efecto protector de la activación de la vía de señalización utilizada por lisinopril se utilizó un modelo *in Vivo* de Nx 5/6. En este modelo solo existe 1/6 de función renal en los animales, puesto que se extirpa el riñón derecho y se ligan dos de las tres ramas arteriales que irrigan al riñón izquierdo (Hewitson 2012). Este procedimiento quirúrgico emula el desarrollo de una Insuficiencia Renal Crónica, la cual es una situación clínica derivada de la pérdida progresiva y permanente de la función renal, que es provocada por múltiples etiologías, tanto congénitas como adquiridas (Hewitson 2012). En estos animales la administración de lisinopril aumentó los niveles proteicos totales y fosforilados de JNK, mostrando que el tratamiento por 4 semanas con lisinopril genera un cambio en los niveles basales de la proteína JNK y de su forma activa p-JNK de manera equivalente. Al evaluar

una proteína río abajo de JNK como c-Jun, se observó que lisinopril también generó un aumento significativo en los niveles proteicos tanto de c-Jun como p-c-Jun. Mediante inmunohistoquímica, se logró identificar que la distribución de p-c-Jun se ve restringida al núcleo de células tubulares.

En diversos modelos experimentales se ha descrito que la activación de la vía JNK/c-Jun genera aumentos en los niveles proteicos de COX-2 (Pang y col., 2012; Kohlstedt y col., 2005). Quisimos corroborar que lisinopril estaba activando esta vía y por ello se utilizaron un activador y antagonista de la vía como herramientas farmacológicas para su estudio. Se ha descrito que Anisomicina, mediante la estimulación del estrés celular activa la vía JNK/cJun. Este activador, al igual que lisinopril estimuló los niveles proteicos de COX-2. Fue interesante observar que al utilizar lisinopril y el activador de la vía JNK no se observó un efecto sinérgico, lo que podría deberse a que a las concentraciones individuales de lisinopril y anisomicina utilizadas la expresión de COX-2 pudiera estar en su máximo nivel y que por ese motivo no se observó un efecto aditivo de los dos fármacos. Así, una manera de evaluar esta hipótesis en animales, sería utilizando concentraciones menores de ambos fármacos (Ahn y col., 2012; Jonkman y col., 2009). La participación de esta vía en los aumentos de COX-2 *in vivo* tras la administración de lisinopril y anisomicina es corroborada con la administración del antagonista de JNK SP600125, en donde el aumento significativo en los niveles de COX-2 por parte de lisinopril y anisomicina es prevenido tras su co-administración.

Las COXs son enzimas fundamentales para la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico participando en la formación de PGG_2, un metabolito intermedio inestable, el cual es transformado rápidamente a PGH_2, debido a la actividad peroxidasa de la enzima. A partir de este precursor se origina la PGE_2, la cual participa en procesos relacionados a

inflamación, fertilidad, integridad de la mucosa gástrica, modulación del sistema inmune entre otros (Iñiguez y col., 2008). Se consideró que para entender si los efectos morfo-funcionales obtenidos en esta tesis y discutidos más adelante eran dependientes de la PGE_2 es necesario la cuantificación de la excreción urinaria del metabolito estable de la PGE_2 (13, 14-dihidro-15-ceto PGE_2). Bajo esta perspectiva, fue interesante observar que los niveles de PGE_2 aumentaron en respuesta a lisinopril y anisomicina en animales IRC, llegando a ser semejantes a los animales Sham. De esta forma fue esperable que el bloqueo de la vía JNK con SP600125, previniera de manera significativa los aumentos obtenidos con los tratamientos individuales, corroborando así que los aumentos de COX-2 y PGE_2 inducidos por lisinopril o anisomicina en este modelo son mediados por la vía JNK/c-Jun. Por otra parte si la producción de PGE_2 sólo dependiera de la masa renal funcional, sería esperable que en animales IRC los niveles de PGE_2 fueran 1/6 de los observados en los animales Sham, sin embargo esto no fue así. La explicación para esta discordancia es que el tejido que permanece funcional, aumentaría la síntesis de PGE_2 y otros componentes (Novikov y col., 2006). Al correlacionar los niveles de COX-2 y PGE_2, es interesante destacar que en animales con IRC los niveles de COX-2 no presentan una disminución significativa en comparación con los animales Sham; no obstante al cuantificar la excreción del metabolito de PGE_2, se observa una tendencia a la disminución en los animales IRC aunque sin alcanzar significancia. Estos antecedentes podrían explicarse debido a que los animales con IRC presentan una disminución en la VFG comparado con los animales Sham, lo que podría estar disminuyendo la excreción urinaria del metabolito.

Con la finalidad de caracterizar de manera preliminar al receptor involucrado en la activación de JNK, COX-2 y PGE_2 dependientes de lisinopril, se evaluó *in vivo* de forma análoga a lo que se realizó *in vitro,* la participación de los recetores B1, B2 y AT1, para lo

cual se trató a los animales por 4 semanas con diversos fármacos como Leu-8 (antagonista B1), HOE-140 (antagonista B2) y losartán (antagonista AT1) respectivamente. La ausencia de efecto de los antagonistas HOE-140 y losartán, permitió descartar de manera preliminar la participación del receptor B2 y AT1 en el aumento de COX-2 dependiente de lisinopril, contrastando con lo descrito en el sistema cardiovascular para AT1, donde este receptor es el responsable de la activación de la vía JNK/c-Jun y aumento de COX-2 (Metha y col., 2007) y en células mTAL, donde la activación del B2 genera un aumento en los niveles de COX-2 (Rodríguez y col., 2004). Estos resultados son explicados en base a que en células mTAL el aumento de COX-2 fue inducido por la administración exógena de BK y en el sistema cardiovascular la activación de la vía JNK/c-Jun inducida por el daño tisular era prevenida con losartán. Por otra parte, la prevención del aumento de COX-2 tras la administración de Leu-8, sugiere que el efecto de lisinopril es mediado por el receptor B1 de BK y la vía JNK/c-jun.

En los experimentos *in vivo* a diferencia de los *in vitro*, no es posible descartar la participación de ECA como blanco de lisinopril (Fleming 2006), debido a que no contamos con un modelo que tuviese mutada la ECA tisular, sin embargo estos resultados permiten sugerir que *in vivo* el aumento de COX-2 dependiente de lisinopril es mediado principalmente por el receptor B1 de BK y no por el B2 o el AT1 puesto que sus antagonistas no tuvieron efecto significativo en la distribución tisular de COX-2. Los resultados tanto *in vivo*, como *in vitro*, permiten sugerir que la vía de señalización dependiente de lisinopril, aumenta los niveles de COX-2 y PGE_2, por medio de la activación del receptor B1 de BK vía JNK/c-Jun, postulando así un nuevo mecanismo de señalización celular para COX-2 dependiente de un iECA como lisinopril en un modelo de IRC y células inmortalizadas del Asa Ascendente Gruesa de Henle.

5.3 COX-2 en la enfermedad Renal.

COX-2 se encuentra localizada en la región perinuclear y en la membrana nuclear (Plewka y col., 2013). Diferentes estudios han demostrado que se expresa constitutivamente en diferentes puntos del aparato genital masculino y femenino (Plewka y col., 2013), riñón (Vio y Col., 1997, 1999, 2001) y durante procesos relacionados con la ovulación, implantación ovular, inducción del parto y reproducción (Plewka y col., 2013). Ha sido descrita en diferentes tipos de neuronas (Yun y col., 2011) y participa en la transformación cancerosa, en este caso a través de mecanismos de resistencia a la apoptosis (Roberts y col., 2011). Diferentes estudios han descrito diversas funciones de COX-2 en el proceso patológico, por ejemplo, se ha descrito que su inhibición estaría asociada a una disminución de marcadores inflamatorios como TGF-β y colágeno tipo III (Wang y cols., 2000). Por el contrario, nuestros datos muestran a que la inhibición de COX-2 y PGE_2 mediante celecoxib y meclofenamato a nivel renal favorecerían los depósitos de colágeno total en el intersticio, favoreciendo así la progresión de la fibrosis renal. A pesar que los resultados encontrados por Wang son opuestos a los obtenidos en este estudio, es importante considerar que las diferencias entre ambos modelos de estudios son importantes. En el estudio de Wang, se administra un inhibidor de COX-2 (SC58236) durante el desarrollo post-natal, hasta el día 21 en ratones C57Bl/6J, esta inhibición generaría alteraciones estructurales al disminuir los niveles de colágeno tipo III, generando alternaciones en la glomerulogénesis y desarrollo cortical. Por otra parte, nuestro modelo utiliza ratas adultas, sometidas a un modelo de daño de Nx 5/6, en donde los niveles de colágeno basal son altos, indicando una regulación diferente durante el desarrollo embrionario y el estadio adulto. En relación a la medición de colágeno estas fueron diferentes ya que el estudio de Wang utilizó

inmunohistoquímica para colágeno tipo III, mientras que en esta tesis se utilizó Sirius Red, que detecta el colágeno total, sin diferenciar el sub-tipo de colágeno involucrado en la fibrosis del modelo. Por otra parte, reportes clásicos en el estudio de COX-2 han descrito que en animales KO para COX-2 durante el desarrollo postnatal desarrollan severas alteraciones morfofuncionales a nivel renal y cardiovascular (Dinchuk y col., 1995).

La expresión de COX-2 en el modelo de Nx 5/6 utilizado en esta tesis no presento diferencias significativas en relación a los animales Sham, diferenciándose así de modelos como la Uropatía Unilateral Obstructiva (UUO), en donde se ha reportado que posterior a las 48 h., COX-2 desaparece (Sanchez y col., 1999). Estas diferencias podrían ser atribuibles a los diferentes niveles de enzimas vasoactivas encontrados en los distintos modelos. Así, se ha descrito que altos niveles de Bradicinina aumentan los niveles proteicos de COX-2 (Rodríguez y col., 2004), situación que no es replicable en un modelo de UUO debido a que los altos niveles de ECA reducen los niveles de Bradicinina y aumentan los niveles de Ang II.

Por otra parte, los resultados de este estudio se oponen en parte a lo publicado por Ghosh, quien describió que la administración de un iECA como enalapril disminuye el daño renal mediante la disminución de COX-2 y fosfolipasas en un modelo de Nx 5/6. En este estudio se administró enalapril 4 semanas después de la Nx contralateral total, por un período de 12 semanas, 8 más que nuestro modelo. Los resultados planteados por este grupo mostraron una disminución significativa de COX-1, COX-2, TNFα, IL-1β, y fosfolipasa A2 posterior a la administración de enalapril. Además, mostraron que la administración de enalapril previene el aumento en la progresión del daño renal, siendo esto concordante con nuestros resultados. En base al aumento en la función renal y disminución de COX-1, COX-2, IL y fosfolipasa A2, es que se postuló que los efectos benéficos a nivel renal eran dependientes

de este proceso. En el presente estudio, observamos que a las 4 semanas posteriores a la Nx, los niveles de COX-2 no presentan una disminución significativa en comparación con los animales Sham, lo que pudiera ser explicado en comparación al otro estudio, solo por la diferencia en la temporalidad de su medición. En otro aspecto en nuestros experimentos se inhibió de forma directa la COX-2 mediante celecoxib y meclofenamato, observándose que su inactivación favorecía la progresión del daño renal mediante el aumento tisular del factor quimioatrayente OPN, aumento en la infiltración de macrófagos y depósitos de colágeno intersticial, experimentos que no fueron planteados por el grupo de Ghosh (Ghosh y col., 2012), indicando que en la etapa temprana del daño renal COX-2 pudiera estar jugando un rol importante en la prevención de la progresión del daño renal.

Los resultados del modelo *in vitro* mostrados en este trabajo, sugieren mecanismos similares a los reportados por Rodríguez en células mTAL. Desde aquí es posible discutir que los estudios de Rodríguez apuntan al aumento de COX-2 debido a la infusión de BK y receptor B2, a diferencia de lo observado en nuestro estudio en donde resultados preliminares sugieren que administración de lisinopril aumenta la distribución tisular de COX-2 por un mecanismo que podría ser dependiente del receptor B1 de BK, pero que no ha sido probado. Esto puede sugerir que tanto la administración de BK como lisinopril presentan mecanismos diferentes en su señalización, teniendo en común el aumento de COX-2 tras su administración. Al extrapolar los resultados *in vitro* al modelo *in vivo* no es posible descartar el efecto que tendría BK sobre los niveles de COX-2 ya que ha sido descrito que la tanto administración de iECAs como el lisinopril, aumentan los niveles de BK (Tom y col., 2002).

Sin embargo, de existir un aumento de BK en nuestro modelo, es posible plantear que el mecanismo es independiente del descrito por Rodriguez, esto debido a que los resultados

preliminares sugieren que el aumento tisular obtenido en COX-2 posterior a la administración de lisinopril parece ser prevenido por el bloqueo del receptor B1 de BK, pero esto no ha sido probado aún.

5.4 Efectos funcionales generados por la administración de lisinopril.

La Nx 5/6 es un modelo altamente invasivo y dañino (Hewitson 2012); al sólo contar teóricamente con 1/6 de la función renal, los animales se deterioran progresiva e irreversiblemente. Este modelo se establece con una temporalidad de 28 días cuya corroboración es un clearance de creatinina significativamente menor al de animales con operación ficticia, valor que deja bajo manifiesto una clara falla renal. El objetivo de este estudio fue evaluar y caracterizar la respuesta funcional y estructural a los distintos tratamientos que presentaban estos animales.

Así, la administración de lisinopril o anisomicina tuvieron importantes repercusiones en la VFG observada en los animales con IRC. La VGF en los animales con estos tratamientos fue significativamente mayor en comparación con los animales IRC, sin embargo de ningún modo se alcanzó el valor de la condición Sham, manteniendo una VFG significativamente menor. Esta VFG más alta debida a la administración de lisinopril o anisomicina depende de la vía JNK/c-Jun, ya que la administración de SP600125 en presencia de estos fármacos previenen de manera significativa los aumentos en la VFG obtenidos con los tratamientos individuales. La ausencia de efecto de SP600125 en animales con IRC sin tratamiento sugiere que esta vía no participa de forma importante en esta condición patológica y que por tanto requiere de ser activada para observar su efecto benéfico. Con el fin de evaluar si los efectores finales en el proceso de prevención de la progresión del daño renal inducido

por lisinopril son COX-2 y PGE_2 como fue planteado como hipótesis, se utilizaron los inhibidores de las COXs celecoxib y meclofenamato. Se utilizaron dos inhibidores, buscando caracterizar la participación tanto de COX-2, como de COX-1 y PGE_2. La VFG también se vio afectada al administrar celecoxib o meclofenamato corroborando la participación de COX-2 y PGE_2 en la mejora observada y sugiriendo que la vía que activa a COX-2 es JNK/c-Jun. Este aumento de la VFG podría estar dado por alguno de los efectos de la PGE_2 como son la regulación del flujo plasmático renal, la vasodilatación arteriolar y/o el aumento de la permeabilidad hídrica, factores que influyen de manera directa en la VFG. (Rudic y col., 2005). Estos experimentos permitieron descartar el efecto de COX-1 en la señalización dependiente de lisinopril y regulación sobre las PGs y la VFG ya que no se observaron diferencias significativas en la VFG cuando se administró celecoxib, un inhibidor selectivo de COX-2 o meclofenamato, un inhibidor no selectivo de COX-1 y COX-2, sugiriendo fundamentalmente la participación de COX-2 y no de COX-1.

La disminución en la proteinuria, observada en respuesta a lisinopril en este trabajo fue semejante a los descrito previamente (Bilic y col., 2011), corroborando el efecto que poseen los iECAs sobre la excreción de proteínas renales. En el trabajo de Bilic y colaboradores se postula que una hipoperfusión y disminución de la resistencia favorecen la retención de estas proteínas. Por otra parte, celecoxib y meclofenamato previnieron los efectos de lisinopril, lo que se contrapone a los resultados de algunos estudios en donde se plantea que la administración de inhibidores selectivos de la COX-2 como rofecoxib disminuyen la proteinuria en pacientes con Nefropatía Diabética (Vogt y col., 2009). Esto podría explicarse debido a que la Nefropatía Diabética presenta un aumento en la filtración glomerular generada por la diuresis osmótica (Bilic y col., 2011), lo que conlleva una mejor conservación de la función renal en comparación con un modelo de IRC, caracterizado por

fibrosis glomerular y tubular, disminución de la filtración glomerular, oliguria y anuria en las etapas terminales (Bilic y col., 2011). De hecho, en algunos estudios se ha reportado que pacientes con Nefropatía Diabética presentan un menor grado de proteinuria comparado con los IRC (Hirano y col., 2003), concluyendo que al comparar estos estudios las magnitudes de daño y proteinuria son diferentes, lo que abre la posibilidad de evaluar si la diminución de la proteinuria observada tras la administración de lisinopril en nuestro modelo es replicable en modelos con patologías renales menos progresivas e invasivas.

Este estudio aporta nuevos antecedentes acerca de la importancia que tendría COX-2 y PGE_2 en la progresión de la enfermedad renal, involucrando nuevas vías de señalización en su regulación. Este estudio también evidencia que la inhibición de la COX-2 en un modelo de IRC favorecería la progresión de la patología mediante alteraciones estructurales y funcionales, sugiriendo que esta enzima es importante como mediador de la progresión del daño renal a través de PGE_2. En este sentido la literatura hoy en día es controversial, existiendo antecedentes que sugieren que COX-2 participaría en la progresión del daño renal y la progresión del cáncer colónico (Parfiniewics y col., 2012) mientras que otros estudios postulan que su efecto sería más bien benéfico y que es necesaria en procesos de homeostasis, siendo incluso catalogada como "un kit de primeros auxilios en el epitelio gástrico" (Rakoff-Nahoum y col., 2007), concordando estos últimos con los antecedentes planteados en este trabajo. Las alteraciones funcionales se correlacionan con las alteraciones estructurales observadas en los animales IRC sometido a las diferentes condiciones experimentales.

5.5 Osteopontina.

Osteopontina (OPN) corresponde a una glicoproteína, fosforilada y altamente ácida, aislada originalmente del tejido óseo, pero que también se puede encontrar en los túbulos renales. Esta proteína es una molécula de adhesión celular y un importante factor quimioatrayente de macrófagos. Algunos estudios muestran que OPN puede sobre-expresarse en respuesta a la infusión de Ang II (Yu y Cols, 2000), asociando su expresión con la infiltración de macrófagos durante el desarrollo de patologías glomerulares y túbulo-intersticiales (Mazzali y cols, 2002).

En este estudio los niveles de OPN observados en los animales IRC fueron significativamente mayores que en los animales Sham; sin embargo los animales tratados con lisinopril y anisomicina presentaron niveles de OPN significativamente menores en comparación con los animales IRC. Este efecto fue prevenido por SP600125, lo que mostraría que el efecto obtenido tras la administración de lisinopril es dependiente de la vía JNK/c-Jun.

Con el fin de evaluar el rol de COX-2 y PGE_2 en la expresión de OPN, los animales fueron tratados con lisinopril más celecoxib y lisinopril más meclofenamato. En estos animales el efecto obtenido con la administración individual de lisinopril es prevenido, lo que demuestra que el efecto de lisinopril, dependiente de la vía JNK/c-Jun es además dependiente de COX-2 y PGE_2. Este resultado contrasta con lo descrito en cultivo de plaquetas y células mesangiales, en donde se describió que un aumento del mRNA de COX-2 y posterior aumento de PGE_2 conlleva un aumento de diferentes factores quimioatrayentes como OPN. Además el mismo estudio señaló que la administración de AINES como ibuprofeno, el cual es un potente inhibidor de la PGE_2, no genera aumentos

de OPN, indicando que es necesaria una concentración local de PGE_2 para la inducción de OPN. Las células mesangiales y las plaquetas en esta condición fueron estimuladas con factores pro-inflamatorios (Goppelt-Struebe y col., 2000). Por otra parte Jain describió que el aumento de OPN estimula la activación de proteína quinasa C y de los factores nucleares α y κ generando el aumento en la expresión de COX-2 y PGE_2 en células de tumor prostático (Jain y col., 2006), indicando una regulación directa entre OPN y COX-2.

La distribución de OPN a nivel renal está descrita a nivel tubular presentando una expresión perinuclear, no presentando patrones de expresión diferentes a los descritos en la literatura (Xu y col., 2013). Diversos estudios han mostrado que este factor pudiera tener patrones de expresión diferencial dependiendo del tipo de daño y modelo estudiado. Un ejemplo de esto es el modelo de administración de LPS (Madsen y cols. 1997), el cual muestra que un marcaje puntiforme correspondería a túbulos proximales y un marcaje apical en túbulos dístales. No obstante, en este modelo no es posible evaluar dichas diferencias debido al daño que presenta el tejido.

5.6 Infiltración celular en el Riñón.

De igual forma que la expresión de OPN, los niveles de células ED-1 (+) (Macrófagos), se vieron disminuidos de manera significativa tras la administración de lisinopril. Este efecto fue prevenido tras la administración de celecoxib y meclofenamato, evidenciando así que el efecto en la disminución de la infiltración de macrófagos obtenida con la administración de lisinopril es dependiente de los niveles de COX-2 y PGE_2. Aunque los mecanismos no están del todo claro en la literatura, las células ED-1 (+) poseen gran importancia

fisiológica, participarían de manera importante en la respuesta fibro-proliferativa. Factores fibrinogénicos como TGF-β y FGF son liberados por los macrófagos infiltrativos, los cuales juegan un papel clave en la patogénesis de la fibrosis en diversos tejidos (Liu y col., 2007). Otros estudios han reportado que COX-2 es necesaria para regular los niveles de macrófagos, debido a que en animales KO para COX-2 la infusión de TGF-β no aumentó el número de macrófagos en un modelo de daño de músculo esquelético, a diferencia de los animales silvestres en donde TGF-β aumentó de manera significativa los niveles de macrófagos (Shen y col., 2008).

Esta disminución de la infiltración de macrófagos se correlaciona con la disminución de los niveles de OPN, generando una disminución en la respuesta inflamatoria lo que lleva a una disminución en los niveles de colágeno intersticial observados bajo las mismas condiciones experimentales, mostrando así una prevención de la progresión del daño estructural dependiente de la administración de lisinopril, la vía JNK/c-Jun y COX-2/PGE_2.

5.7 Fibrosis y progresión del daño renal.

La Fibrosis renal es la consecuencia inevitable de una acumulación excesiva de matriz extracelular que se produce en prácticamente todos los tipos de enfermedad renal crónica. La patogénesis de la fibrosis renal es un proceso progresivo que en última instancia conduce a la insuficiencia renal terminal, una enfermedad devastadora que requiere diálisis o trasplante de riñón. En una visión simplista, la fibrosis renal representa un fallido proceso de cicatrización de heridas del tejido renal después de una lesión crónica y sostenida.

Varias rutas celulares, como la activación de fibroblastos así como la transición epitelio-mesénquima, han sido identificadas como las vías principales para la generación de las células productoras de matriz en condiciones de enfermedad (Li y col., 2006). Uno de los factores que contribuye de manera importante a esta cicatrización es el colágeno, el cual en este estudio fue cuantificado mediante la tinción de Sirius Red, que no hace distinción entre los diferentes tipos de colágeno.

Los animales sometidos a Nx 5/6 presentan evidentes cambios en los depósitos de colágeno intersticial en comparación con los animales Sham. Con respecto a este parámetro la participación de la vía JNK/c-Jun es fundamental. Estas observaciones se correlaciona con lo descrito en corazón, donde la administración de lisinopril genera una disminución de la fibrosis cardiaca del ventrículo izquierdo posterior a un infarto al miocardio (Ahmad y col., 2008). Del mismo modo que en la evaluación de la funcionalidad renal, se evaluó la importancia que tendrían en este proceso COX-2 y PGE_2. Los resultados sugieren que el efecto observado con la administración de lisinopril es mediado por COX-2 y PGE_2, siendo concordante con lo descrito por Liu, en donde en tejido pulmonar se estudió el rol de la fibrosis y su relación con COX-2. Este estudio mostro que la progresión de la fibrosis pulmonar por el consiguiente aumento y activación de los fibroblastos inhibe la expresión de COX-2 y genera una disminución significativa en los niveles de PGE_2. A su vez, la adición exógena de un agonista de PGE_2 como sulprostone revirtió de forma parcial la progresión de la fibrosis, demostrando una relación directa entre la progresión de la fibrosis pulmonar y COX-2 (Liu y col., 2010). Nuestros resultados al igual que los descritos a nivel pulmonar, nos permiten caracterizar que la disminución en la progresión de la fibrosis renal generada por un iECA como lisinopril es dependiente de COX-2 y PGE_2. Estos resultados se correlacionan con la disminución de la infiltración de macrófagos, la expresión del factor

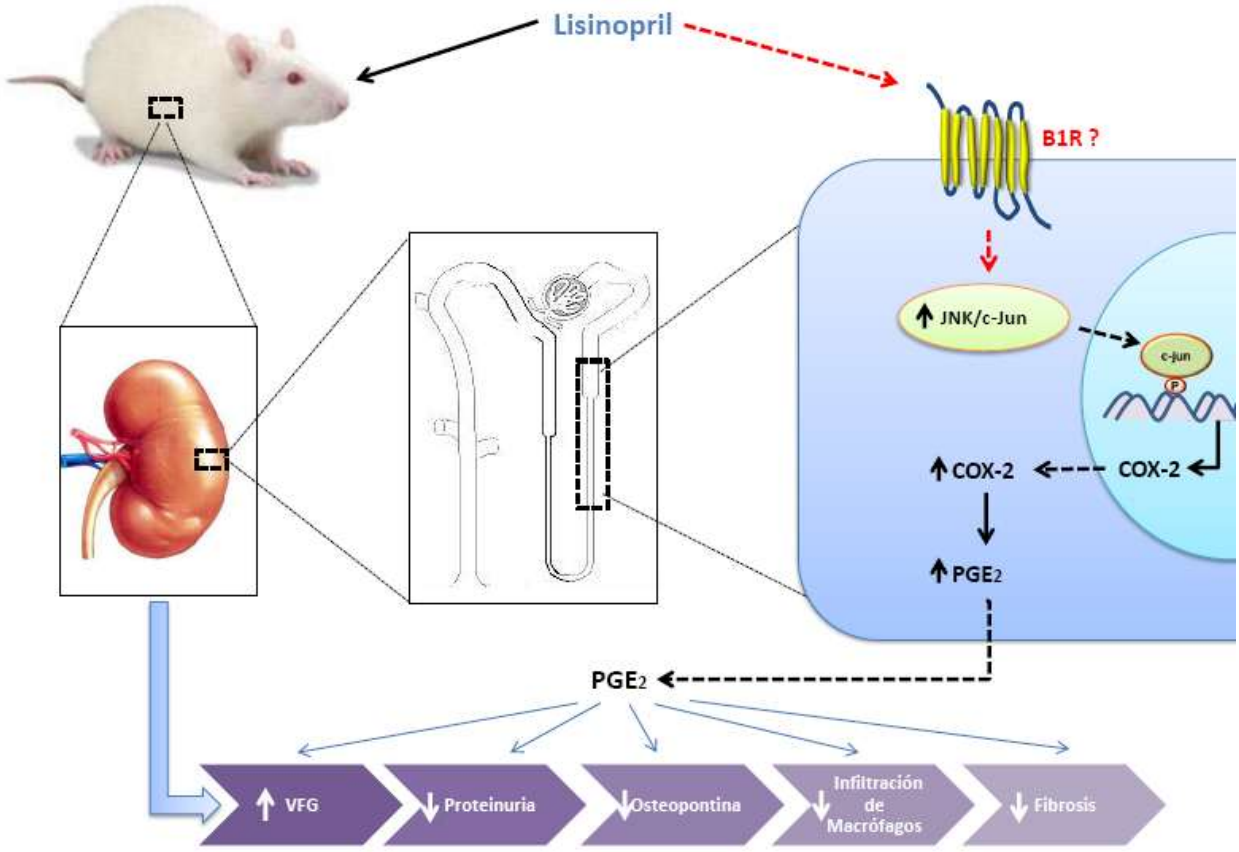
quimioatrayente osteopontina y los cambios morfofuncionales descritos previamente, aportando así nuevos antecedentes en el mecanismo de acción de un iECA como el lisinopril, los cuales son independientes de sus efectos presores.

6. CONCLUSIONES

En conclusión podemos decir que en los modelos experimentales utilizados, daño renal inducido por Nx 5/6 y células en cultivo permanente del Asa ascendente gruesa de Henle (mTAL), el tratamiento con lisinopril presentó un aumento significativo de los niveles de COX-2 y PGE_2, siendo este aumento dependiente de la vía JNK/c-Jun. De manera preliminar se sugiere que esta señalización estaría mediada por la activación del receptor B1 de BK. Originalmente se planteó a ECA como el efector involucrado en la señalización dependiente de la administración de los iECA. Esta hipótesis perdió fuerza al no poder detectar la proteína en células mTAL. La señalización generada por la administración de lisinopril trae consigo una serie de cambios morfofuncionales a nivel renal. En primer lugar el daño funcional evaluado mediante *clearance* de creatinina y proteinuria presento una mejora significativa en los animales tratados con activadores de la vía JNK/c-Jun, a diferencia de los animales en donde este tratamiento no estaba presente. Estos efectos funcionales estarían siendo mediados en última instancia, por la PGE_2. Dicho efecto observado a nivel funcional, se correlaciona a nivel estructural con menores niveles de ED-1, OPN y Colágeno intersticial en aquellos animales tratados con activadores de la vía en comparación a las otras condiciones experimentales.

Finalmente, los resultados preliminares sugieren que la administración de un iECA como el lisinopril se relaciona con el receptor B1 de BK, la vía JNK/c-Jun y los niveles de COX-2 y PGE_2. Experimentos adicionales son necesarios para poner a prueba esta posible hipótesis.

6.1 Modelo Propuesto:



Modelo: La administración de lisinopril aumenta los niveles proteicos de COX-2 dependiente de la vía JNK/c-Jun. La administración de un iECA como el lisinopril aumenta los niveles proteicos y fosforilados de la vía JNK/c-Jun, lo que conlleva a un aumento en los niveles de COX-2 y PGE_2. Este efecto podría ser mediado por el receptor B1 de BK (línea roja, aún en estudio) e independiente de los receptores ECA, B2 y AT1. El aumento de COX-2 y PGE_2 a nivel funcional produce un aumento de la VFG y una disminución en la proteinuria, lo que se correlaciona con la disminución de OPN, la infiltración de macrófagos y los depósitos de colágeno intersticial. Este modelo fue realizado en células del segmento medular del Asa Ascendente Gruesa de Henle (mTAL) y Ratas SD sometidas a Nx 5/6. **Nota: Ver resultados preliminares.**

7. BIBLIOGRAFÍA.

Abdel-Aziz AA, ElTahir KE, Asiri YA. (2011). Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. Part 1: Molecular docking study. Eur J Med Chem. 46(5):1648-55.

Ahmad M, White R, Tan J, Huang BS, Leenen FH. (2008). Angiotensin-converting enzyme inhibitors, inhibition of brain and peripheral angiotensin-converting enzymes, and left ventricular dysfunction in rats after myocardial infarction. J Cardiovasc Pharmacol. 51(6):565-72.

Ahn JH, Hong HC, Cho MJ, Kim YJ, Choi HY, Eun CR, Yang SJ, Yoo HJ, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kim NH. (2012). Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the development of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rats. Diabetes Metab J. 36(2):128-35

Alcázar R, Ruiz-Ortega M, Egido J. (2003). Angiotensin II: a key peptide in vascular and renal failure. Nefrología. 23 Suppl 4:27-35.

Álvarez BV, Ennis IL, De Hurtado MC, Cingolani HE. (2002). Effects of antihypertensive therapy on cardiac sodium/hydrogen ion exchanger activity and hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Can J Cardiol. 18(6):667-72.

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(24):13681-6.

Bilic M, Munjas-Samarin R, Ljubanović D, Horvatić I, Galesić K. (2011). Effects of ramipril and valsartan on proteinuria and renal function in patients with nondiabetic proteinuria. Coll Antropol. 35(4):1061-6.

Borah PK, Shankarishan P, Hazarika NC, Mahanta J. (2012). Hypertension subtypes and angiotensin converting enzyme (ACE) genepolymorphism in Indian population. J Assoc Physicians India. 60:11, 15-7.

Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A. (2001). Role of renocorticalcyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula dense control of renin secretion. J Am Soc Nephrol. 12:867-874.

Chen L, Kim SM, Eisner C, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Li L, Chen M, Sequeira Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Schnermann J, Briggs JP. (2010). Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is Gsalpha-dependent. J Am Soc Nephrol. 21(6):986-92.

Croons V, Martinet W, Herman AG, Timmermans JP, De Meyer GR. (2009). The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosisin rabbit atheroscl erotic plaques through p38 mitogen-activated proteinkinase. J Pharmacol Exp Ther. 329(3):856-64.

Cruden LM, Witherow F N, Webb DJ, Fox KA, Newby DE. (2004). Bradykinin Contributes to the Systemic Hemodynamic Effects of Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Patients with Heart Failure. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1043-1048.

Derijard B., M. Hibi, I.-H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, R.J. Davis. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell 76 1025–1037.

De Vecchis R, Di Biase G, Ariano C, Cioppa C, Giasi A, Ciccarelli A, Pucciarelli A, Cantatrione S. (2011). ACE-inhibitor therapy at relatively high doses and risk of renal worsening in chronic heart failure. Arq Bras Cardiol. 97(6):507-16.

Dinchuk JE, C. B., Foch RJ, Johnston JJ, Jaffee BD. (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxigenase II. Nature 378, 406-409.

Dray A, Perkins M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. Trends Neurosci. 16(3):99-104.

Eng B, Mukhopadhyay S, Vio CP, Pedraza PL, Hao S, Battula S, Sehgal PB, McGiff JC, Ferreri NR. (2007). Characterization of a long-term rat mTAL cell line. Am J Physiol Renal Physiol. 293(4):F1413-22

Erdos EG, Tan F, Skidgel RA. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. Hypertension. 55(2):214-20.

Erdos EG. (1996). News about ACE, or, the Separate Lives of "Siamese Twin" Domains. J Clin Invest 97:588-588.

Errasti AE, Rey-Ares V, Daray FM, Rogines-Velo MP, Sardi SP, Paz C, Podestá EJ, Rothlin RP. (2001). Human umbilical vein: involvement of cyclooxygenase-2 pathway in bradykinin B1 receptor-sensitized responses. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 364(2):149-56.

Ferreri NR, an SJ, McGiff JC. (1999). Cyclooxygenase-2 expression and function in the medullary thick ascendinglimb. Am J Physiol 277:F360-F368.

Ferreri NR, McGiff JC, Vio CP, Carroll MA. (2003). TNFalpha regulates renal COX-2 in the rat thick ascending limb (TAL). Thromb Res 110:277-280.

Fleming I. (2006). Signaling by the Angiotensin-Converting Enzyme, Circ Res.; 98:887-896.

Fleming I. (2005). Angiotensin-Converting Enzyme Is Involved in Outside-In Signaling in Endothelial Cells, Circ Res.; 94:60-67.

Fraune C, Lange S, Krebs C, Hölzel A, Baucke J, Divac N, Schwedhelm E, Streichert T, Velden J, Garrelds IM, Danser AH, Frenay AR, van Goor H, Jankowski V, Stahl R, Nguyen G, Wenzel UO. (2012). AT1 antagonism and renin inhibition in mice: pivotal role of targeting angiotensin II in chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 303(7).

Frueh J, Maimari N, Homma T, Bovens S, Pedrigi RM, Towhidi L, Krams R. (2013) Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium. Cardiovasc Res. 99(2):334-41.

Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, Xu R, Inoue H, Arditi M, Dannenberg AJ, Abreu MT. (2006). Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. Gastroenterology. 131(3):862-77.

Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ. (1998). Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. N Engl J Med 339:1285-1292.

Gierse JK. (2010). Purification of recombinant human COX-1 and COX-2. Methods Mol Biol. 644:21-9.

Ghosh SS, Krieg R, Massey HD, Sica DA, Fakhry I, Ghosh S, Gehr TW. (2012). Curcumin and enalapril ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. Am J Physiol Renal Physiol. 302(4)

Goa KL, Haria M, Wilde MI. (1997). Lisinopril. A review of its pharmacology and use in the management of the complications of diabetes mellitus. Drugs. 53(6):1081-105.

Gonzalez AA, Liu L, Lara LS, Seth DM, Navar LG, Prieto MC. (2011). Angiotensin II stimulates renin in inner medullary collecting duct cells via protein kinase C and independent of epithelial sodium channel and mineralocorticoid receptor activity. Hypertension. 57(3):594-9.

Gonzalez-Villalobos RA, Janjoulia T, Fletcher NK, Giani JF, Nguyen MT, Riquier-Brison AD, Seth DM,Fuchs S, Eladari D, Picard N, Bachmann S, Delpire E, Peti-Peterdi J, Navar LG, Bernstein KE, McDonough AA. (2013). The absence of intrarenal ACE protects against hypertension. J Clin Invest. 1; 123(5):2011-23

Goppelt-Struebe M, Wiedemann T, Heusinger-Ribeiro J, Vucadinovic M, Rehm M, PrölsF.(2000).Cox2 and osteopontin in cocultured platelets and mesangial cells: role of glucocorticoids. Kidney Int. 57(6):2229-38.

Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T,Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrié P, Finance O, Le Fur G. (2004). SSR240612 [(2R)-2-[((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6 dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor:biochemical and pharmacological characterization. J Pharmacol Exp Ther. 309(2):661-9.

Gupta S., T. Barrett, A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh,H.K. Sluss, B. De´rijard, R.J. Davis. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors, EMBO J. 15 2760–2770.

Hah YS, Kang HG, Cho HY, Shin SH, Kim UK, Park BW, Lee SI, Rho GJ, Kim JR, Byun JH. (2013). JNK signaling plays an important role in the effects of TNF-α and IL-1β on in vitro osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. Mol Biol Rep. 40(8):4869-81.

Heerspink HL, de Zeeuw D. (2013) Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. Br J Clin Pharmacol. 76(4):536-50.

Hewitson TD. (2012). Fibrosis in the kidney: is a problem shared a problem halved? 5 Suppl 1:S14.

Hirano T, Sakaue T, Misaki A, Murayama S, Takahashi T, Okada K, Takeuchi H, Yoshino G, Adachi M. (2003). Very low-density lipoprotein apoprotein CI is increased in diabetic nephropathy: comparison with apoprotein CIII. Kidney Int. 63(6):2171-7.

Hornig B, Kohler C, Drexler H. (1997). Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. Circulation 95:1115-1118.

Ichihara A, Imig J, Navar G. (1999). Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure. Hypertension 34:843-847.

Iñiguez MA, Cacheiro-Llaguno C, Cuesta N, Díaz-Muñoz MD, Fresno M. (2008) Prostanoid function and cardiovascular disease. Arch Physiol Biochem. 114(3):201-9.

Jain S, Chakraborty G, Kundu GC. (2006). The crucial role of cyclooxygenase-2 in osteopontin-induced protein kinaseC alpha/c-Src/IkappaB kinase alpha/beta-dependent prostate tumorprogression and angiogenesis. Cancer Res. 66(13):6638-48.

Jonkman S, Everitt BJ. (2009). Post-learning infusion of anisomycin into the anterior cingulate corteximpairs instrumental acquisition throughan effect on reinforcer valuation. Learn Mem. 16(11):706-13.

Juhász K, Zvara A, Lipp AM, Nimmervoll B, Sonnleitner A, Balogi Z, Duda E. (2013). Casein kinase 2-interacting protein-1, an inflammatory signaling molecule interferes with TNF reverse signaling in human model cells. Immunol Lett. 152(1):55-64.

Kallunki T., B. Su, I. Tsigelny, H.K. Sluss, B. De´rijard, G. Moore, R. Davis, M. Karin. (1994). JNK2 contains a specificity- determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation, Genes Dev. 8, 2996–3007.

Kyriakis J.M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E.A. Rubie, M.F. Ahmad, J. Avruch, J.R. Woodgett. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases, Nature 369, 156–160.

Leclerc P, Wähämaa H, Idborg H, Jakobsson PJ, Harris HE, Korotkova M. (2013). IL-1β/HMGB1 complexes promote The PGE2 biosynthesis pathway in synovial fibroblasts. Scand J Immunol. 77(5):350-60.

Lewis T.S., P.S. Shapiro, N.G. Ahn. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades, Adv. Cancer Res. 74, 49–139.

Li MX, Liu BK. (2007). Epithelial to mesenchymal transition in the progression of tubulointerstitial fibrosis. Chin Med J (Engl). 120(21):1925-30.

Liu F, Mih JD, Shea BS, Kho AT, Sharif AS, Tager AM, Tschumperlin DJ. (2010). Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. J Cell Biol. 190(4):693-706.

Liu H, Yao YM, Yu Y, Dong N, Yin HN, Sheng ZY. (2007). Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages. Shock. 27(1):55-60.

Lombardi DM, Viswanathan M, Vio CP, Saavedra JM, Schwartz SM, Johnson RJ. (2001). Renal and vascular injury induced by exogenous angiotensin II is AT1 receptor-dependent. Nephron 87:66-74.

Lu DY, Leung YM, Huang SM, Wong KL. (2010). Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. J Cell Biochem. 110(1).

Maeda Y, Fukushima K, Omichi R, Kariya S, Nishizaki K. (2013). Time courses of changes in phospho- and total- MAP kinases in the cochlea after intense noise exposure. PLoS One. 8(3)

Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. (2002). Osteopontin--a molecule for all seasons. QJM. 95(1):3-13.

McCormack PL. (2011). Celecoxib: a review of its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Drugs. 71(18):2457-89.

Mancini GB. (2000). Long-term use of angiotensin-converting enzyme inhibitors to modify endothelial dysfunction: a review of clinical investigations. Clin. Inv. Med. 23(2):144-61.

Madsen, KM., Zhang, L., Henning, RH, Tio, RA., Suurmeijer, AJ, Boomsma, F., Van Gilst WH. (1997). Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. Circulation. 105, 1548-1550.

Másferrer JL, Siebert K, Zweifel B, Needleman P. (1992). Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 89:3917-3921.

Mehta PK, Griendling KK. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 292(1):C82-97.

Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M. (2013). Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. J Hum Hypertens.

Mezzano S, Droguett A, Burgos ME, Ardiles LG, Flores CA, Aros CA, Caorsi I, Vio CP, Ruiz-Ortega M, Egido J. (2003). Renin-angiotensin system activation and interstitial inflammation in human diabetic nephropathy. Kidney Int 64(s86):S64-S70.

Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. (2001). Angiotensin II and Renal Fibrosis. Hypertension 38:635-638.

Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Aoki T, Ohashi Y, Miyagi M, Sakai K, Shibuya K, Hase H, Aikawa A. (2011). Increased ACE and decreased ACE2 expression in kidneys from patients with IgA nephropathy. Nephron Clin Pract. 117(1):c57-66.

Minden A., A. Lin, T. Smeal, B. De´rijard, M. Cobb, R. Davis, M. Karin. (1994). c-Jun N-terminal phosphorylation correlatos with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases, Mol. Cell. Biol. 14, 6683–6688.

Musti A.M., M. Treier, D. Bohmann. (1997). Reduced ubiquitindependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases, Science 275, 400–402.

Nauli SM. (2011). An ACE inhibitor improves vascular outcomes in a PKD model. Am J Physiol Renal Physiol. 301(5):F958.

Novikov IuV, Shormanov IS. (2006). Renal vascular system in right heart overload with varying circulatorycompensation. Angiol Sosud Khir. 12(3):13-9.

Opay AL, Mouton CR, Mullins JJ, Mitchell KD. (2006). Cyclooxygenase 2 inhibition normalizes arterial blood pressure in CYP1A1REN2 transgenic rats with induci bleANG II-dependent malignanthypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 291(3):F612-8.

Osaki LH, Gama P. (2013). MAPKs and Signal Transduction in the Control of Gastrointestinal Epithelial Cell Proliferation and Differentiation. Int J Mol Sci. 14(5):10143-61

Padia SH, Carey RM. (2013) AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. Pflugers Arch. 465(1):99-110.

Pang T, Wang J, Benicky J, Sánchez-Lemus E, Saavedra JM. (2012). Telmisartan directly ameliorates the neuronal inflammatory response to IL-1β partly through the JNK/c-Jun and NADPH oxidase pathways. J Neuroinflammation. 9:102.

Parfiniewicz B, Pendzich J, Gruchlik A, Hollek A, Weglarz L. (2012). Impact of celecoxib on soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble e-cadherin concentrations in human colon cancer cell line cultures exposed to phytic acid and TNF-alpha. 69(6): 1283-90.

Pathak M, Wong SS, Dreveny I, Emsley J. (2013). Structure of plasma and tissue kallikreins. Thromb Haemost. 109(6)

Paul AG, Chandran B, Sharma-Walia N. (2013). Cyclooxygenase-2-prostaglandin E2-eicosanoid receptor inflammatory axis: a key player in Kaposi's sarcoma-associated herpes virus associated malignancies. Transl Res. Pii: S1931-5244(13)00077-7

Plewka A, Madej P, Plewka D, Kowalczyk A, Miskiewicz A, Wittek P, Leks T, Bilski R. (2013). Immunohistochemical localization of selected pro-inflammatory factors in uterine myomas and myometrium in women of various ages. Folia Histochem Cytobiol. 51(1):73-83.

Poblete H. (2011). Registro de Dialisis, XXXI cuenta de Hemodialisis Crónica. Sociedad Chilena de Nefrología.

Pulverer B.J., J.M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, J.R. Woodgett. (1992). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases, Nature 353, 670–673.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. (2007). Prostaglandin-secreting cells: a portable first aid kit for tissue repair. J Clin Invest 117:83-86.

Regoli D, Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S. (1990). Kinin receptor subtypes. J Cardiovasc Pharmacol. 15 Suppl 6:S30-8.
Riad A, Walther T, Yang J, Altmann C, Escher F, Westermann D, Spillmann F, Schultheiss HP, Tschöpe C. (2008). The cardiovascular influence of interleukin-1 beta on the expression of bradykinin B1 and B2 receptors. Int Immunopharmacol. 8(2):222-30.

Roberts HR, Smartt HJ, Greenhough A, Moore AE, Williams AC, Paraskeva C. (2011). Colon tumour cells increase PGE (2) by regulating COX-2 and 15-PGDH to promote survival during the microenvironmental stress of glucose deprivation. Carcinogenesis. 32(11):1741-7.

Robertson L, Andras A. (2013) Prostanoids for intermittent claudication. Cochrane Database Syst Rev. 30 (4).

Rodríguez F, Llinás M, González J, Rivera J, Salazar F. (2000). Renal changes induced by cyclooxygenase inhibitor during normal and low sodium intake. Hypertension 36:276- 281.

Rodriguez JA, Vio CP, Pedraza PL, McGiff JC, Ferreri NR. (2004). Bradykinin regulates cyclooxygenase-2 in rat renal thick ascending limb cells. Hypertension 44:230-235.

Rouzer CA, Marnett LJ. (2009). Cyclooxygenases: structural and functional insights. J Lipid Res. 50 Suppl:S29-34.

Rudic RD, Brinster D, Cheng Y, Fries S, Song WL, Austin S, Coffman TM, FitzGerald GA. (2005). COX-2-derived prostacyclin modulates vascular remodeling. Circ Res 96:1240 1247.

Saijonmaa O, Fyhrquist F. Saijonmaa O. (1998). Upregulation of angiotensin converting enzyme by atrial natriuretic peptideand cyclic GMP in human endothelial cells. Cardiovasc Res. 40(1):206-10.

Schanstra, J P, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, Pecher C, Bader M, Girolami JP, Bascands JL. (2002). In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. J Clin Invest110:371-379.

Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. (2008). Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. J Cell Physiol. 214(2):405-12.

Sidhu RS, Lee JY, Yuan C, Smith WL. (2010). Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. Biochemistry. 49(33):7069-79

Simões E Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. (2013). Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. Br J Pharmacol. 169(3):477-92.

Smith WL, Langenbach R. (2001). Why there are two cyclooxygenase isozymes. J Clin Invest. 107(12):1491-5.

Soler MJ, Ye M, Wysocki J, William J, Lloveras J, Batlle D. (2009). Localization of ACE2 inthe renal vasculature: amplification by angiotensin II type 1 recept or blockade usingtelmisartan. Am J Physiol Renal Physiol. 296 (2):F398-405.

Squire IB, O'Kane KP, Anderson N, Reid JL. (2000). Bradykinin B (2) receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men. Hypertension 36:132-136.

Stanton RC. (2013). Combination Use of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors andAngiotensin Receptor Blockers in Diabetic Kidney Disease. Curr Diab Rep. 13(4):567-73.

Taal MW, Brenner BM. (2000). Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. Kidney Int 57:1803-1817.

Tom B, Dendorfer A, de Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH. (2002). Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. Br J Pharmacol. 137(2):276-84.

Tschöpe C, Spillmann F, Rehfeld U, Koch M, Westermann D, Altmann C, Dendorfer A, Walther T, Bader M,Paul M, Schultheiss HP, Vetter R. (2004). Improvement of defective sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport in diabeticheart of transg enic rats expressing the human kallikrein-1 gene. FASEB J. 18(15):1967-9.

Van Dam H., D.Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich, P. Angel. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents, EMBO J. 14, 1798–1811.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 38:97-120.

Vianna RM, Calixto JB. (1998). Characterization of the receptor and the mechanisms underlying theinflammatory response induced by des-Arg9 BK in mouse pleurisy. Br J Pharmacol. 123(2):281-91.

Vio CP, An SJ, Cespedes C, McGiff JC, Ferreri NR. (2001). Induction of cyclooxygenase-2 in thick ascending limb cells by adrenalectomy. J Am Soc Nephrol 12:649-658.

Vio CP, Balestrini C, Recabarren M, Cespedes C. (1999). Postnatal development of cyclooxygenase-2 in the rat kidney. Immunopharmacology 44:205-210.

Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Másferrer JL. (1997). Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. Hypertension 30:687-692.

Vio CP, Jeanneret VA. (2003). Local induction of angiotensin-converting enzyme in the kidney as a mechanism of progressive renal diseases. Kidney Int 64(s86):S57-S63.

Vio CP, Loyola S, Velarde V. (1992). Localization of components of the kallikrein-kinin system in the kidney: relation to renal function. Hypertension 19:10-16.

Vio CP, Olavarria V, Gonzalez C, Nazal L, Cordova M, Balestrini C. (1998). Cellular and functional aspects of the renal kallikrein system in health and disease. Biol Res 31:305-322.

Vio CP, Quiroz-Munoz M, Cuevas CA, Cespedes C, Ferreri NR. (2012). Prostaglandin E2 EP3 receptor regulates cyclooxygenase-2 expression in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 303(3):F449-57

Vio CP. (2000). Regulation of cyclooxigenase-2 in the kidney: a shift in the paradigm. J Physiol 523:36-37.

Vogt L, de Zeeuw D, Woittiez AJ, Navis G. (2009). Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces proteinuria in renal patients. Nephrol Dial Transplant. 24(4).

Wang JL, Cheng HF, Harris RC. (1999). Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin Content and lowers Blood Pressure in a model of renovascular hypertension. Hypertension 34:96- 101.

Wang JL, Cheng HF, Shappell S, Harris RC. (2000). A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. Kidney Int 57:2334–2342.

Widmann C., S. Gibson, M.B. Jarpe, G.L. Johnson. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, Physiol. Rev. 79, 143 180.

Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W,Knolle J. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivostudies. Br J Pharmacol. 102(3):774-7.

Wu MS, Yang CW, Chang CT, Bens M, Vandewalle A. (2003). Cyclosporin increases the density of angiotensin II subtype 1 (AT1) receptors in mouse me dullary thick ascendinglimb cells. Nephrol Dial Transplant. 18(8):1458-65.

Xu X, Tu L, Jiang W, Feng W, Zhao CX, Wang DW. (2012). Bradykinin prevents the apoptosis of NIT-1 cells induced by TNF-α via thePI3K/Akt and MAPK signaling pathways. Int J Mol Med. 29(5):891-8.

Yang D.D., C.-Y. Kuan, A.J. Whitmarsh, M. Rincon,T.S. Zheng, R.J. Davis, P. Rakic, R.A. Flavell. (1997). Absence of excitotoxicity induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene, Nature 389, 865– 870

Yang T, Endo Y, Huang YG, Samrt A, Briggs JP, Schnermann J. (2000). Renin expression in COX-2 knockout mice on normal or low salt diets. Am J Physiol 279:F819-F825.

Yang T, Pham S, Sun D, Smart A, Schnermann J, and Briggs J. (1998). Regulation of cyclooxygenase expresión in the kidney by dietary salt intake. Am J Physiol 274:F481-F489.

Yun CH, Kim JG, Park BS, Lee HM, Kim DH, Kim EO, Park JJ, Park JW, Damante G, Kim YI, Lee BJ. (2011). TTF-1 action on the transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in the rat brain. PLoS One. 6(12).

Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris R, McKanna J. (1997). Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. Am J Physiol 273:F994-F1002.

Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, and McKanna JA. (1999). Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. Am J Physiol 273:F994-F1002.

8.0 ANEXO

RESULTADOS PRELIMINARES.

Esta parte del trabajo corresponde a experimentos preliminares con n=1 o n =2 por lo que no es posible extraer conclusiones. Se incluyen en el texto pese a que se requiere trabajo adicional para sacar conclusiones, con el propósito de sugerir posibles explicaciones a los resultados obtenidos.

Objetivo 6.- Estudiar si el aumento de COX-2 en respuesta a la administración de lisinopril es dependiente de los receptores de Bradicinina B1R, B2R o angiotensina AT1 en células mTAL

8.1 El aumento de COX-2 en respuesta a la estimulación con lisinopril es dependiente del receptor B1 de Bradicinina en células mTAL.

Originalmente se planteó que la señalización generada por lisinopril era dependiente del receptor ECA. Esta idea fue modificada posterior a los experimentos mostrados con anterioridad en donde no se detectaron niveles proteicos de ECA en mTAL (Figura 23).

Con el objetivo de identificar de manera preliminar el receptor involucrado en la regulación de la vía JNK/c-Jun y COX-2 tras la administración de lisinopril en células mTAL y generar una línea de investigación futura, se evaluó de forma farmacológica el receptor involucrado en la señalización. Los receptores analizados fueron los receptores B1 y B2 de BK y el receptor AT1 de Ang II. Para ello las células se incubaron con sus respectivos antagonistas Leu-8 (0,5 μM), HOE-140 (1 μM) y losartan (2 μM) durante 24 horas.

Mediante Western blot se cuantificaron los niveles de COX-2 corroborando que las células tratadas con lisinopril (2.04 ± 0.2 veces del control) presentaron un aumento en relación a las células control (1.00). Al evaluar los niveles de COX-2 en células tratadas con lisinopril

más HOE-140 (1.67 ± 0.3 veces del control) o lisinopril más losartan (2.02 ± 0.3 veces del control) no se observaron diferencias en relación a las células tratadas sólo con lisinopril (2.04 ± 0.2 veces del control). Por otra parte, los niveles proteicos de COX-2 en las células tratadas con lisinopril más Leu-8 (1.16 ± 0.1 veces del control) fueron menores a los de las células tratadas con lisinopril. Estos resultados sugieren que el aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril es dependiente del receptor B1 de BK e independiente de los receptores B2 de BK o AT1 de Ang II en células mTAL (Figura 24).

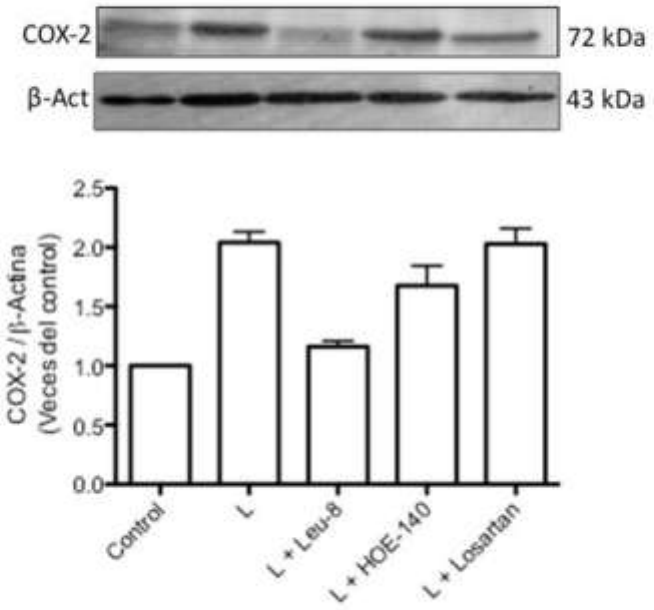


Figura 24: El aumento de COX-2 en respuesta a lisinopril es dependiente del receptor B1 de BK en células mTAL. Las proteínas se separaron por electroforesis y se realizó un Western blot para COX-2. Sobre el gráfico se muestra western blots para COX-2 y β-actina usada como control de carga. L: lisinopril, Leu-8: Des-Arg-Leu-8. (n=2).

8.2 El agonista del receptor B1R, Des-Arg-BK, aumenta los niveles proteicos de COX-2 en células mTAL.

Para corroborar que se requiere de la activación del receptor B1 en la regulación de la vía JNK/c-Jun y COX-2, las células mTAL se trataron con dosis crecientes de Des-Arg-BK (DABK), un agonista selectivo del receptor B1. Los resultados muestran que la administración de DABK a 80 nM (1,74 veces del control), 120 nM (1,96 veces del control), 160 nM (1,98 veces del control) y 200 nM (1,76 veces del control) aumenta los niveles de COX-2 en comparación con la condición control (1,00). La concentración de 40 nM (1,22 veces del control) de DABK, no produjo cambios en los niveles de COX-2, observándose niveles similares a los del control. (Figura 25A). En base a este resultado se utilizó la concentración de 80 nM de DABK para experimentos posteriores coincidiendo con las dosis utilizadas por diversos estudios en cultivo celular (Gougat y col., 2004).

Al evaluar los niveles proteicos de COX-2 posterior a la administración de DABK (2,21 veces del control), se observó un aumento similar lo obtenido con la administración de lisinopril (2,41 veces del control). La administración de lisinopril (100 nM) más DABK (80 nM) (2,39 veces del control), no presentó un aumento mayor al observado con ambos compuestos de forma independiente, sugiriendo que a las concentraciones utilizadas no existiría un efecto de sumación. En base a esto, se administró lisinopril (50 nM) más DABK (40 nM) (concentraciones que no presentaron aumentos por si solas en los niveles de COX-2, Figuras 18 y 25A). Bajo estas condiciones se observó un aumento en los niveles de COX-2 (2,20 veces del control) en comparación a la condición control (1.00), llegando a presentar niveles similares a los obtenidos con las dosis máximas de cada uno de forma

individual (Figura 25B). Este experimento sugiere que al utilizar el 50% de las dosis máximas de lisinopril y DABK se genera un efecto de sumación, activando la misma vía de señalización. Finalmente, al administrar DABK más Leu-8 (1,17 veces del control) se previno el aumento de COX-2 obtenido con la administración de DABK (Figura 25B).

Los resultados en las células mTAL sugieren una interacción directa de lisinopril con el receptor B1, por lo cual se realizaron los experimentos preliminares para evaluar esta nueva hipótesis *in Vivo*.

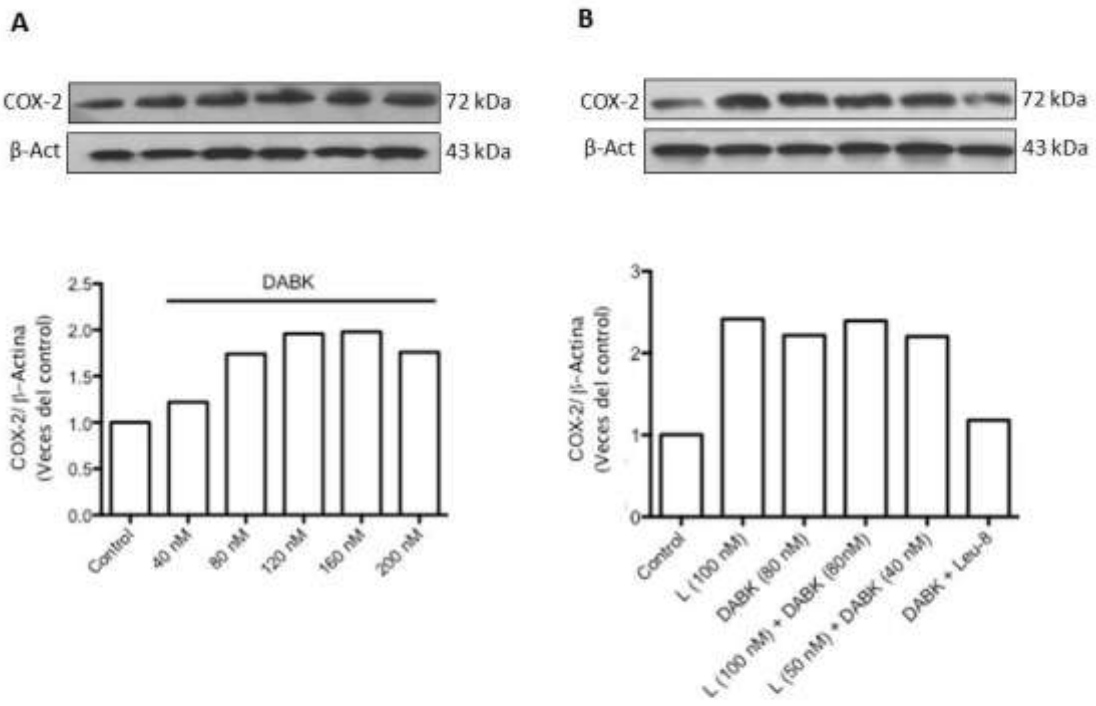


Figura 25: Curva concentración respuesta de niveles de COX-2 tras la administración del agonista del receptor B1 en células mTAL. En (A) el gráfico muestra la densitometría del western blot de COX-2 para la curva concentración respuesta, sobre éste se muestra un western blot representativo para COX-2 y β-Actina la cual fue utilizada como control de carga. En (B) se observa que lisinopril y DABK presentan un efecto sumativo a concentraciones de 50 nM y 40 nM respectivamente sobre los niveles de COX-2. L: lisinopril, DABK: Des-Arg-Leu-BK, Leu-8: Des-Arg-Leu 8. (n=1).

Objetivo 7.- Estudiar si el aumento de COX-2 por la administración de lisinopril es dependiente de los receptores de Bradicinina B1, B2 o angiotensina AT1 en animales IRC.

8.3 El aumento de COX-2 inducido por lisinopril es independiente de los receptores B2 y AT1 en animales IRC.

Con la finalidad de evaluar el receptor involucrado con la vía JNK/c-Jun y posterior aumento de COX-2 y PGE_2 en animales IRC se analizó la participación de los receptores B2 de BK y AT1 de Ang, los cuales han sido descritos como parte de la activación de COX-2.

Mediante Western *blot* se cuantificó los niveles de COX-2 corroborando que los animales tratados con lisinopril (2,08 veces de Sham) presentaron niveles más altos en relación a los animales Sham (1,00) e IRC (0,84 veces de Sham). Este efecto no se previno con la co-administración de lisinopril más HOE-140 (1,98 veces de Sham) o lisinopril más losartan (2,10 veces de Sham), manteniendo un aumento en los niveles de COX-2 en comparación con los animales Sham e IRC. Los niveles de COX-2 en animales tratados solo con HOE-140 (1,22 veces de Sham) o losartan (1,13 veces de Sham) no presentaron diferencias en relación a los animales Sham o IRC (Figura 26). Estos resultados sugieren que los receptores B2 y AT1 no están involucrados en el aumento de COX-2 dependiente de lisinopril en animales con IRC.

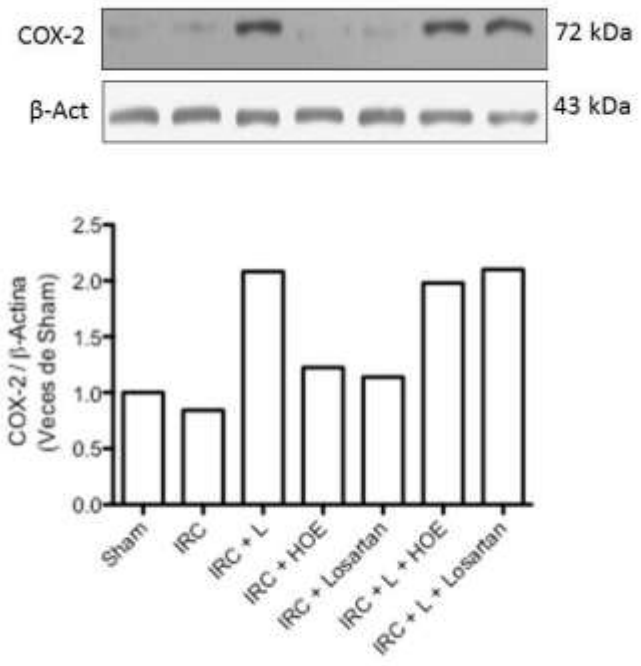


Figura 26: El aumento de COX-2 inducido por lisinopril es independiente de los receptores B2 y AT1. Las proteínas de los homogenizados renales se separaron por electroforesis y la banda de COX-2 fue identificada mediante Western blot. Sobre el gráfico se muestra western blot para COX-2 y β-Actina usada como control de carga. L: lisinopril, HOE: HOE-140. (n=1).

A través de inmunohistoquímica se midieron los niveles de COX-2 bajo las distintas combinaciones experimentales. Se observó que la distribución de COX-2 está referida al Asa de Henle en donde se aprecia que el número de células positivas para COX-2 por Asa fue mayor en los animales IRC tratados con lisinopril en comparación con los animales Sham e IRC. Los animales a los que se les administró lisinopril más HOE-140, lisinopril más losartan o lisinopril más HOE-140 más losartan presentaron un aumento en el número de células positivas similar al de los animales tratados solo con lisinopril. Animales IRC tratados con HOE-140 o losartan no presentaron aumentos en las células positivas en relación a los animales Sham e IRC (Figura 27A).

Al realizar la cuantificación Morfométrica se observó que en los animales IRC tratados con lisinopril (3.810 ± 1448 μm^2), lisinopril más HOE-140 (2.930 ± 1158 μm^2), lisinopril más losartan (3.272 ± 920 μm^2) y lisinopril más HOE-140 más losartan (2.871 ± 847 μm^2) COX-2 aumentó de manera significativa en relación a los animales Sham (1.282 ± 218 μm^2) e IRC (1.029 ± 3641 μm^2). Los animales con IRC tratados con HOE-140 (1.312 ± 456 μm^2) y losartan (958 ± 323 μm^2), no presentaron diferencias significativas con los animales Sham o IRC (Figura 27B).

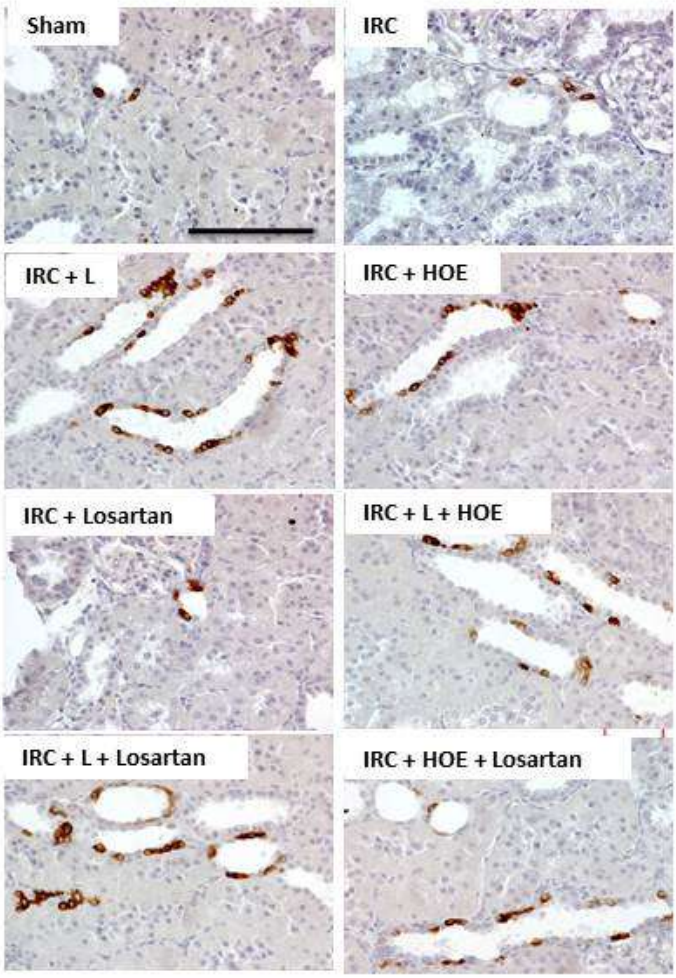


Figura 27 A: El aumento en la distribución de COX-2 inducido por lisinopril es independiente de los receptores B2 y AT1 en animales con IRC. Se realizó IHQ para COX-2 en cortes de riñón fijados en Bouin, utilizando el método de PAP y contrastada con Hematoxilina. L: lisinopril, HOE: HOE-140. Barra de escala 100 μm. (n=4).

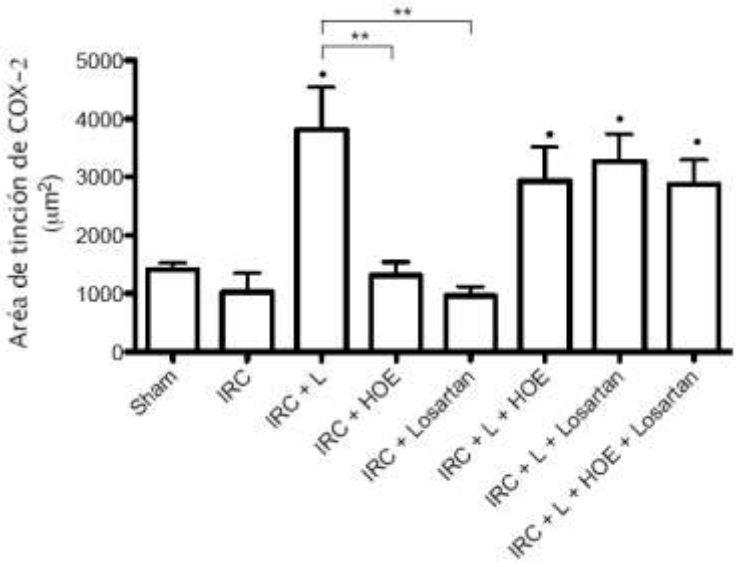


Figura 27 B: Cuantificación Morfométrica de la distribución de COX-2. El área de la tinción para osteopontina se cuantificó con el *software* "C-Imaging". L: lisinopril, HOE: HOE-140. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P*< 0,005. •*P*< 0,05 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=4).

4.22 El aumento de COX-2 inducido por la administración de lisinopril es dependiente del Receptor B1 de Bradicinina en animales con IRC.

Debido a que con el experimento anterior se sugirió que los receptores B2 y AT1 no participan en la acción de lisinopril y con el objetivo de identificar el posible receptor involucrado en el aumento de COX-2 tras la administración de lisinopril vía JNK/c-Jun, los animales IRC se trataron con Leu-8, un antagonista del receptor B1 de BK. Como se había observado previamente, en los animales tratados con lisinopril los niveles de COX-2 (2,85 veces de Sham) fueron más elevados que en los animales IRC (1,17 veces de Sham). Interesantemente, al evaluar la co-administración de lisinopril más Leu-8 (0,85 veces de Sham), se previno el aumento en los niveles de COX-2 obtenido con la administración de lisinopril, sugiriendo de esta manera que el receptor B1 de BK estaría involucrado en la cascada de señal que lleva al aumento proteico de COX-2 posterior a la administración de lisinopril (Figura 28). Por otra parte, la administración de Leu-8 (0,95 veces de Sham) a animales IRC no produjo cambios en los niveles de COX-2 comparado con los animales IRC sin tratamiento adicional (Figura 28).

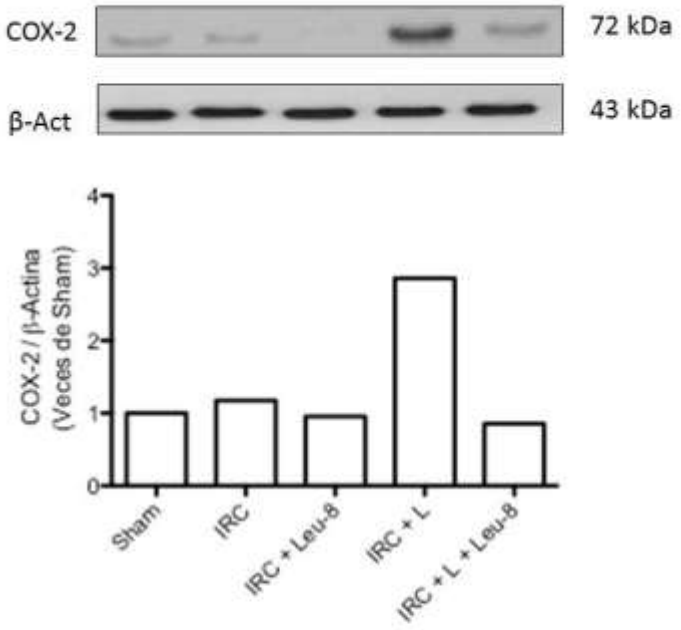


Figura 28: El aumento de COX-2 inducido por lisinopril es dependiente del receptor B1 de BK. Las proteínas de los homogenizados renales se separaron por electroforesis y la banda de COX-2 fue identificada mediante Western blot. Sobre el gráfico se muestran western blots para COX-2 y β-actina usada como control de carga. L: lisinopril, Leu-8: Des-Arg-Leu8. (n=1).

La distribución de COX-2 medida a través de inmunohistoquímica muestra que el número de células positivas para COX-2 por Asa en los animales IRC sin tratamiento fue similar a los animales Sham. Los animales IRC tratados con lisinopril presentaron un aumento en el número de células COX-2 positivas, en comparación con los animales Sham e IRC. Los animales con IRC tratados con Leu-8 no presentaron diferencias en el número de células COX-2 positivas en relación a los animales Sham e IRC, pero este número fue considerablemente menor en relación a los animales IRC tratados con lisinopril. Al comparar los animales IRC más Leu-8 versus los animales IRC tratados con lisinopril se puede observar que los primeros presentan un menor número de células COX-2 positivas. La distribución de COX-2 en el Asa Ascendente de Henle no fue modificada por las distintas condiciones (Figura 29A).

Al realizar la cuantificación Morfométrica los resultados muestran que los niveles de COX-2 fueron significativamente más altos en los animales IRC tratados con lisinopril (3.444 ± 594 μm^2) en relación a los animales Sham (1.407 ± 494 μm^2) e IRC (1.636 ± 387 μm^2). Los animales IRC tratados con Leu-8 (877 ± 134 μm^2) no presentaron diferencias significativas en relación a los animales Sham e IRC. Los animales a los que se les co-administró lisinopril más Leu-8 (1.201 ± 560 μm^2) presentaron niveles de COX-2 significativamente menores en comparación con los tratados solo con lisinopril (Figura 29B).

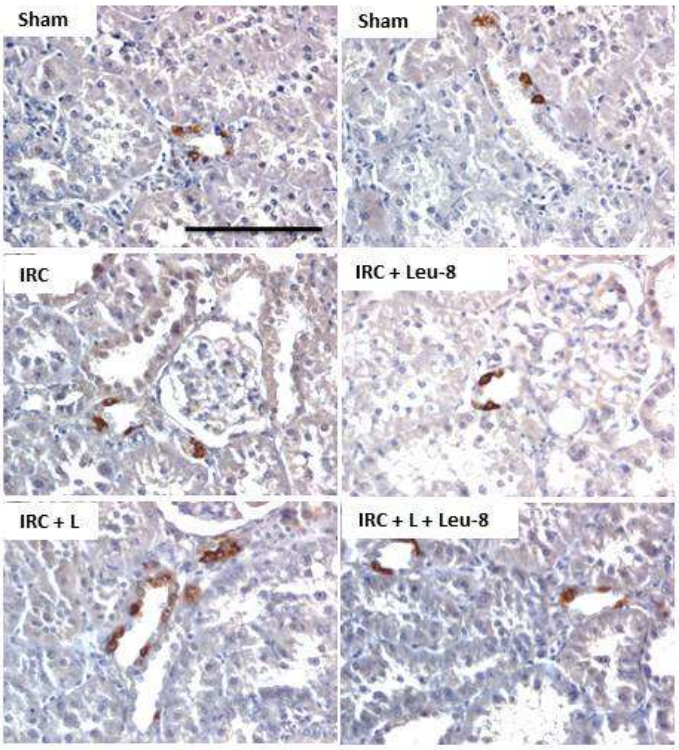


Figura 29 A: El aumento en la distribución de COX-2 inducido por lisinopril es dependiente del receptor B1 de BK. Se realizó IHQ para COX-2 en cortes de riñón fijado en Bouin, utilizando el método de PAP y contrastada con Hematoxilina. L: lisinopril, Leu-8: Des-Arg-Leu8. Barra de escala 100 μm. (n=4).

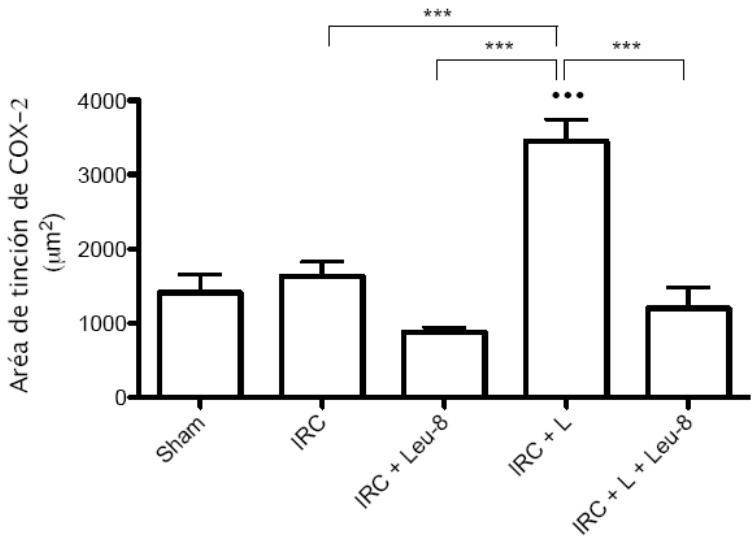


Figura 29 B: Cuantificación Morfométrica de la expresión de COX-2. La administración de lisinopril aumenta los niveles de COX-2 renal, este efecto es prevenido con la co-administración de lisinopril más Leu-8. El área de la tinción para COX-2 se cuantificó con el *software* "C-Imaging". L: lisinopril, Leu-8: Des-Arg-Leu8. Las barras representan el promedio ± EE para las diferentes muestras. ***P< 0,001. •••P< 0,001 vs Sham. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=4).

8.4 Lisinopril regula la vía de señalización JNK/c-Jun a través del receptor B1 de Bradicinina.

Para corroborar la participación de la vía JNK/c-Jun en el aumento de COX-2 dependiente del receptor B1, se cuantificaron los niveles de JNK y p-JNK, mostrando que los animales IRC tratados con lisinopril más HOE-140 (1,69 veces de Sham) y lisinopril más losartan (1,60 veces de Sham), presentaron niveles de JNK más elevados que los animales Sham (1,00) o IRC (0.79 veces de Sham) y similares a los observados en IRC tratados solo con lisinopril (1,63 veces de Sham). La co-administración de lisinopril más Leu-8 (0,80 veces de Sham) previno el aumento en los niveles de JNK observados con la administración de lisinopril (Figura 30A). Por otra parte, se observó que los niveles de p-JNK de los animales IRC tratados con lisinopril (2,51 veces de Sham), lisinopril más HOE-140 (2,37 veces del Sham) y lisinopril más losartan (2,34 veces del Sham) presentaron niveles mayores en comparación a los animales Sham (1,00) e IRC (1,25 veces del Sham). De forma análoga, los animales IRC tratados con lisinopril más Leu-8 (1,16 veces del Sham) presentaron niveles más bajos de p-JNK que aquellos animales IRC tratados solo con lisinopril (Figura 30B). Estos resultados muestran que la administración de lisinopril en animales con IRC y en células mTAL genera el aumento de los niveles proteicos de COX-2 siendo mediado por la vía JNK/c-Jun. De manera preliminar este efecto estaría siendo mediado a través del receptor B1 de BK.

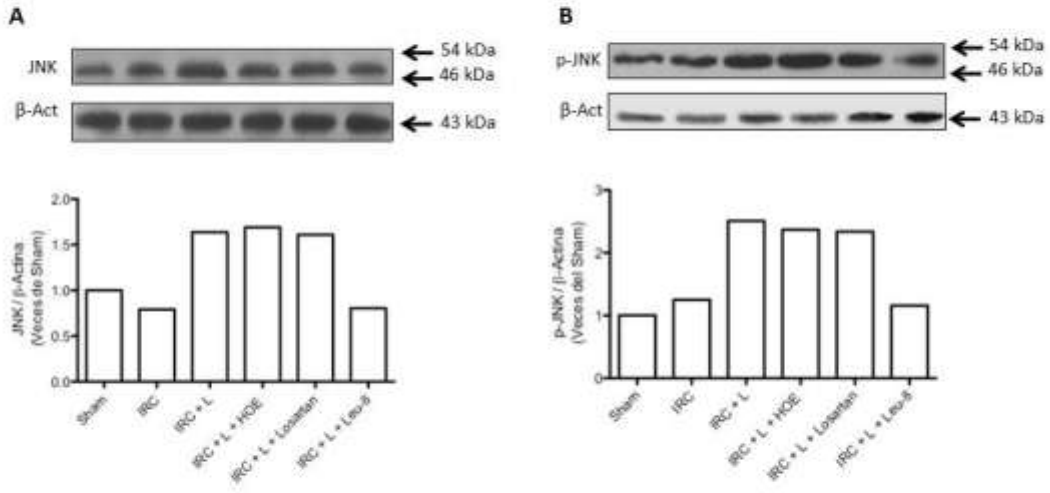


Figura 30: El aumento en los niveles proteicos de JNK y p-JNK es dependiente del receptor B1 de BK. Sobre el gráfico se muestran western blots para JNK (A), p-JNK (B) y β-actina usada como control de carga. L: lisinopril, HOE: HOE-140, Leu-8: Des-Arg-Leu8. (n=1).

8.5 Diuresis, FE K^+ y FE Na^+ en animales IRC y Sham.

Al analizar la diuresis en los animales IRC tratados con lisinopril, celecoxib, meclofenamato y los tratamientos combinados observamos que las diferentes condiciones experimentales no presentan diferencias significativas en comparación con los animales Sham, IRC ni entre ellos. (P>0.05) (Tabla 1).

Por otra parte se evaluó la fracción excretada de Na^+ (FE Na^+) y K^+ (FE K^+), evidenciando que los animales IRC (69,86 ± 4,52 %) presentaron un aumento significativo en la FE K^+ en comparación con los animales Sham (26,66 ± 3,36 %) (P<0.05). Al evaluar las diferentes condiciones experimentales, se observó que los animales IRC tratados con lisinopril (32,92 ± 4,24 %), celecoxib (30,58 ± 6,99 %), lisinopril más celecoxib (31,41 ± 5,34 %), lisinopril más meclofenamato (37,20 ± 9,12 %) y celecoxib más meclofenamato (36,87 ± 6,19 %) presentaron una disminución significativa en la FE K^+ en comparación con los animales IRC sin tratamiento (69,86 ± 4,52 %), asemejándose a la condición Sham (26,66 ± 3,36 %). (P<0.05) (Tabla 1).

Al evaluar la FE Na^+ no se observan diferencias significativas con la condición Sham, IRC y entre los distintos tratamientos. De igual forma se observa una tendencia de aumento en los animales IRC e IRC tratados en comparación con los animales Sham (Tabla 1).

Al analizar la diuresis en los animales tratados con lisinopril, anisomicina, SP600125 y los tratamientos combinados, se observó que los animales tratados con SP600125 (17,50 ± 3,15 ml/16hrs) y anisomicina más SP600125 (16,30 ± 5,24 ml/16hrs) presentaron un aumento significativo en comparación con los animales Sham (7,17 ± 2,89 ml/16hrs) (P<0.05). Los animales tratados con lisinopril, anisomicina o los tratamientos combinados no presentan diferencias significativas en comparación con los animales Sham e IRC. (P>0.05) (Tabla 2).

En la FE K^+ se observó que los animales IRC tratados con lisinopril (27,89 ± 3,85 %), anisomicina (30,19 ± 9,76 %), lisinopril más anisomicina (27,96 ± 2,11 %) y lisinopril más SP600125 (27,61 ± 4,82 %) presentaron una disminución significativa en la FE K^+ en comparación con los animales IRC sin tratamiento (59,83 ± 4,62 %) (P<0.05). No se observaron diferencias significativas en comparación con los animales Sham (44,75 ± 5,10 %) (P>0.05) (Tabla 2).

Al analizar la FE Na^+ se observó que los animales IRC tratados con SP600125 (1,26 ± 0,18 %) y anisomicina más SP600125 (1,43 ± 0,36 %) presentaron un aumento significativo en comparación con los animales Sham (0,28 ± 0,04) (P<0.05) (Tabla 2).

Los animales Sham tratados con lisinopril, anisomicina, SP600125, celecoxib y meclofenamato no presentaron diferencias significativas entre sí en la diuresis, FE K^+ y FE Na^+ evidenciando que los tratamientos utilizados en animales Sham no generó cambios en los parámetros estudiados a nivel renal (P>0.05) (Tabla 3).

Tabla 1

Tratamiento	Diuresis (ml/16 hrs)	FE K^+ (%)	FE Na^+ (%)
Sham	13,36 ± 2,26	26,66 ± 3,36	0,16 ± 0,15
IRC	13,55 ± 2,77	69,86 ± 4,52*	0,57 ± 0,16
IRC + L	8,70 ± 1,01	32,92 ± 4,24••	0,36 ± 0,15
IRC + C	11,93 ± 7,05	30,58 ± 6,99•	0,62 ± 0,05
IRC + M	6,43 ± 0,80	40,37 ± 10,94	0,77 ± 0,21
IRC + L + C	9,87 ± 2,52	31,41 ± 5,34•	0,54± 0,12
IRC + L + M	9,42 ± 2,77	37,20 ± 9,12•	0,43 ± 0,13
IRC + C + M	9,87 ± 3,84	36,87 ± 6,19•	0,68 ± 0,03

Tabla 1: Diuresis y Fracción excretada de Na^+ y K^+ en animales IRC tratados con lisinopril, celecoxib y meclofenamato: Las muestras fueron colectadas mediante jaula metabólica de 16 hrs. *P< 0,05 vs Sham. •P< 0,05, ••P< 0,005 vs IRC. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=4).

Tabla 2

Tratamiento	Diuresis (ml/16 hrs)	FE K^+ (%)	FE Na^+ (%)
Sham	7,17 ± 2,89	44,75 ± 5,10	0,28 ± 0.04
IRC	13,67 ± 2,04	59,83 ± 4,62	0,90 ± 0,16
IRC + L	10,52 ± 2,59	27,89 ± 3,85•	0,29 ± 0,07
IRC + A	12,20 ± 3,77	30,19 ± 9,76•	0,40 ± 0,18
IRC + SP	17,50 ± 3,15 **	29,63 ± 5,11	1,26 ± 0,18*
IRC + L + A	13,40 ± 1,79	27,96 ± 2,11••	0,24 ± 0,02
IRC + L + SP	13,18 ± 4,15	27,61 ± 4,82••	0,71 ± 0,10
IRC + A + SP	16,30 ± 5,24 *	44,71 ± 7,28	1,43 ± 0,36**

Tabla 2: Diuresis y Fracción excretada de Na^+ y K^+ en animales IRC tratados con lisinopril, anisomicina y SP600125: Las muestras fueron colectadas mediante jaula metabólica de 16 hrs. *P< 0,05, **P< 0,005 vs Sham. •P< 0,05, ••P< 0,005 vs IRC. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=4).

Tabla 3

Tratamiento	Diuresis (ml/16 hrs)	FE K^+ (%)	FE Na^+ (%)
Sham	11,87 ± 1,17	35,84 ± 1,01	0,19 ± 0,02
Sham + L	9,53 ± 0,57	32,40 ± 7,36	0,19 ± 0,03
Sham + A	8,93 ± 0,80	30,61 ± 1,18	0,24 ± 0,02
Sham + SP	11,60 ± 0,70	28,35 ± 4,08	0,20 ± 0,02
Sham + C	11,40 ± 1,53	26,41 ± 4,58	0,18 ± 0,04
Sham + M	12,23 ± 1,41	29,85 ± 1,69	0,15 ± 0,01

Tabla 3: Diuresis y Fracción excretada de Na^+ y K^+ en animales Sham tratados con lisinopril, anisomicina, SP600125, celecoxib y meclofenamato: Las muestras fueron colectadas mediante jaula metabólica de 16 hrs. Análisis estadístico; ANOVA, *post-hoc test* Tukey (n=3).