

03086



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA 2
DE MEXICO**

24

UNIDAD DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL CCH
CENTRO NEUROBIOLOGIA

**PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN LA
NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA.
HEMODYNAMICA GLOMERULAR, BIOLOGIA
MOLECULAR E HISTOPATOLOGIA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA

NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

El papel del óxido nítrico durante la vasoconstricción renal (VR) inducida por ciclosporina (CsA) fue evaluado por medio de los cambios hemodinámicos e histológicos producidos por la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico y la expresión del RNAm de las isoformas de las sintetasas de óxido nítrico (NOS). Se estudiaron 4 grupos de ratas uninefrectomizadas que recibieron durante 7 días Vehículo; ciclosporina (CsA) 30 mg/Kg; CsA+ N-nitro-metil-éster de Arginina (NAME) en el agua de beber a una dosis de 10mg/dl (CsA+NAME) y Veh+NAME. Se estudió la expresión génica de las isoformas de NOS en los grupos de Veh y CsA por medio de una reacción en cadena de la polimerasa semiquantitativa (RT-PCR). En el grupo tratado con CsA+NAME presento un aumento en la presión arterial, resistencias aferente y eferente también como una disminución en el flujo plasmático glomerular y en la filtración glomerular por nefrona, siendo estos cambios significativamente mayores que en el grupo tratado con CsA. El aumento en la resistencia aferente en el grupo con CsA+NAME fue mayor que en el grupo de Veh+NAME. También la trombosis glomerular, la vacuolización tubular y el engrosamiento arterial fueron mayores que en el resto de los grupos.

La expresión de la NOS neuronal fue similar en Veh y CsA, pero la expresión de la NOS endotelial fue de 2.5 veces mayor en el grupo de CsA

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la síntesis de óxido nítrico (ON) se encuentra aumentada durante la nefrotoxicidad por CsA y contrarresta predominantemente la vasoconstricción preglomerular el aumento en la producción de puede ON puede ser el resultado de un aumento de la expresión de NOS endotelial y la expresión normal de la NOS neuronal.



RESUMEN

The role of nitric oxide (NO) during cyclosporine renal vasoconstriction (RV) was evaluated by renal hemodynamic and histological changes produced by chronic NO synthesis inhibition and renal nitric oxide synthase (NOS) isoforms mRNA expression. Uninephrectomized rats receiving during seven days vehicle (Veh); cyclosporine (CsA) 30 mg/kg; CsA plus N-nitro-L-arginine-methyl-ester (NAME) in drinking water at 10 mg/dl (CsA+NAME) and Veh+NAME were studied. In Veh and CsA groups NOS isoforms mRNA were evaluated by semi-quantitative RT-PCR. Increase in arterial pressure, afferent and efferent resistances, as well as decrease in glomerular plasma flow, ultrafiltration coefficient and single nephron glomerular filtration rate

were significantly greater with CsA+NAME than CsA alone. The increase in afferent resistance with CsA+NAME was greater than Veh+NAME. In addition, glomerular thrombosis, proximal tubular vacuolization and arteriolar thickening were more prominent.

Neuronal-NOS expression was similar in Veh and CsA, but endothelial-NOS expression was 2.5-fold higher in CsA.

Our results support that NO synthesis is enhanced during CsA nephrotoxicity and counterbalancing predominantly preglomerular vasoconstriction. Higher NO production could result from increased endothelial-NOS and normal neuronal-NOS renal expression.



Este proyecto fue llevado a cabo en el laboratorio de Micropunción Renal del Departamento de Nefrología y Patología del Instituto Nacional de Cardiología y en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de la Nutrición y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Jaime Herrera Acosta y la co-dirección de el Dr. Gerardo Gamba Ayala.

A mis hijas Norma Yvett y Andrea
a quienes le robé parte de su tiempo
para la realización de esta tesis y que
con su constante alegría y cariño me
ayudan a continuar con entusiasmo.

A mi esposo Albert quien me ha brindado
amor, paciencia, comprensión y apoyo constante
en todas las empresas que realizo.

A mis padres y hermanos,
quienes siempre me han brindado
su ayuda incondicional.

A la memoria de mi padre:

Quien con su experiencia y palabras me enseñó a conseguir y defender mis principios y anhelos. Así como también comprender, respetar, apoyar y amar a mis seres queridos.

Quien constantemente me enseñó que la vida no es fácil, pero que hay que disfrutarla tomando en cuenta que la superación es una parte muy importante para el ser humano y en especial para la mujer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime Herrera-Acosta:

Mi mas profundo agradecimiento, por todo el apoyo y dedicación que me brindó durante mi desarrollo profesional.

Al Dr. Gerardo Gamba:

Le agradezco el heredarme muchos de sus conocimientos de una forma sencilla y clara, el enseñarme varias herramientas de investigación, además de ser un gran profesor y amigo.

Un profundo agradecimiento:

- ◆ Al jurado de mi tesis doctoral quienes me han dedicado parte de su valioso tiempo: Dr. Ricardo Correa, Dr. Bruno Escalante, Dr. Gerardo Gamba, Dr. Jaime Herrera-Acosta, Dr. Gustavo Pastelln, Dr. Jose Pedraza y Dra. Teresa Tussie.
- ◆ A todos los integrantes de el Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología, en especial a la Dra. Tapia con quien llevé a cabo la parte hemodinámica glomerular y al Dr. Romeo Garcia Torres quien llevó a cabo los estudios de Microscopía de Luz de esta tesis.
- ◆ A todos los integrantes de la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Invcstigaciones Biomédicas y del Instituto Nacional de la Nutrición.
- ◆ Al personal que labora en el Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de la Nutrición.
- ◆ Al mismo tiempo agradezco el apoyo otorgado por el CONACYT como becario del programa de posgrado No. de Registro 89239 y por el apoyo al proyecto 0356 PM.
- ◆ Agradezco también el apoyo constante de la Dra. Sofía Dlaz Coordinadora del Proyecto de Maestría y Doctorado en Ciencias Fisiológicas.

RESUMEN

The role of nitric oxide (NO) during cyclosporine renal vasoconstriction (RV) was evaluated by renal hemodynamic and histological changes produced by chronic NO synthesis inhibition and renal nitric oxide synthase (NOS) isoforms mRNA expression. Uninephrectomized rats receiving during seven days vehicle (Veh); cyclosporine (CsA) 30 mg/kg; CsA plus N-nitro-L-arginine-methyl-ester (NAME) in drinking water at 10 mg/dl (CsA+NAME) and Veh+NAME were studied. In Veh and CsA groups NOS isoforms mRNA were evaluated by semi-quantitative RT-PCR. Increase in arterial pressure, afferent and efferent resistances, as well as decrease in glomerular plasma flow, ultrafiltration coefficient and single nephron glomerular filtration rate

were significantly greater with CsA+NAME than CsA alone. The increase in afferent resistance with CsA+NAME was greater than Veh+NAME. In addition, glomerular thrombosis, proximal tubular vacuolization and arteriolar thickening were more prominent.

Neuronal-NOS expression was similar in Veh and CsA, but endothelial-NOS expression was 2.5-fold higher in CsA.

Our results support that NO synthesis is enhanced during CsA nephrotoxicity and counterbalancing predominantly preglomerular vasoconstriction. Higher NO production could result from increased endothelial-NOS and normal neuronal-NOS renal expression.

INDICE

| | Página |
|---|-----------|
| I. RESUMEN | VI |
| II. GLOSARIO | IX |
| III. INTRODUCCION | |
| a. <i>Farmacología y Mecanismos de Acción de la CsA</i> | 1 |
| b. <i>Nefrotoxicidad aguda</i> | 2 |
| c. <i>Nefrotoxicidad Crónica</i> | 3 |
| d. <i>Mecanismos de Vasoconstricción Renal Inducida por CsA</i> | 3 |
| e. <i>Oxido Nitrico</i> | 8 |
| f. <i>Distribución de las Isoformas de NOS</i> | 9 |
| g. <i>Oxido Nitrico en el Riñón</i> | 12 |
| IV. ANTECEDENTES | 14 |
| V. OBJETIVOS | 16 |
| VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 17 |
| <i>Determinación de la Hemodinámica Glomerular</i> | 18 |
| a. <i>Estudios de Micropunción Renal</i> | 18 |
| b. <i>Estudios Histopatológicos</i> | 21 |
| c. <i>Microanálisis y Métodos Analíticos</i> | 23 |
| <i>Determinación de la Expresión Génica de las NOS</i> | |
| d. <i>Aislamiento de RNA</i> | 25 |
| e. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> | 26 |
| ♦ <i>Transcripción Reversa</i> | 27 |
| ♦ <i>Amplificación de DNAC</i> | 28 |
| ♦ <i>Clonación de NOS I</i> | 28 |
| f. <i>Análisis de Northern y Dot Blot</i> | 30 |
| <i>PCR semiquantitativa</i> | 31 |
| ♦ <i>Transcripción Reversa</i> | 32 |
| ♦ <i>Amplificación de DNAC</i> | 32 |

| | |
|---|----|
| ♦ <i>Determinación de la Fase Exponencial</i> | 34 |
| ♦ <i>Determinación de la Sensibilidad</i> | 35 |
| VII. ANALISIS ESTADISTICO | 38 |
| VIII. RESULTADOS | 38 |
| <i>Estudios de Micropunción Renal</i> | 38 |
| <i>Estudios Histopatológicos</i> | 41 |
| <i>Expresión de las isoformas de NOS</i> | 44 |
| a. <i>Clonación de NOS I</i> | 44 |
| b. <i>Northern y Dot Blot</i> | 47 |
| c. <i>PCR semiquantitativa</i> | 50 |
| d. <i>Determinación de la Fase exponencial</i> | 50 |
| e. <i>Sensibilidad de la PCR semiquantitativa</i> | 51 |
| f. <i>Expresión génica de NOS I</i> | 52 |
| g. <i>Expresión génica de NOS II</i> | 53 |
| h. <i>Expresión génica de NOS III</i> | 54 |
| VII. DISCUSION | 55 |
| VIII. CONCLUSIONES | 62 |
| IX. BIBLIOGRAFIA | 63 |
| X. APENDICE | 71 |

I. GLOSARIO:

| | |
|---------|---|
| Agua BM | Agua para cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) |
| CA | Concentración de Proteínas en la Arteria Femoral |
| CE | Concentración de Proteínas en la Arteriola Eferente |
| CsA | Ciclosporina A |
| FG | Filtración Glomerular Total |
| FG/n | Filtración Glomerular por Nefrona. |
| FP/n | Flujo Plasmático Glomerular. |
| FF/n | Fracción de Filtración por nefrona |
| Htc | Hematocrito. |
| Kf | Coefficiente de Ultrafiltración. |
| NAME | Nitro metil ester de Arginina |
| IIA | Presión Oncótica Aferente. |
| IIIE | Presión Oncótica Eferente. |
| ON | Oxido Nítrico. |
| PC | Peso Corporal. |
| PCG | Presión Capilar Glomerular. |
| RA | Resistencia Aferente. |
| RE | Resistencia Eferente. |
| RT | Transcriptasa Reversa. |
| NOS I | Sintetasa de Oxido Nítrico Neuronal. |
| NOS II | Sintetasa de Oxido Nítrico Inducible. |
| NOS III | Sintetasa de Oxido Nítrico Endotelial. |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa. |
| TAM | Tensión Arterial Media. |

INTRODUCCION

La eficacia y especificidad inmunosupresora de la ciclosporina (CsA) ha permitido mejorar significativamente la sobrevida a corto plazo de los pacientes trasplantados y de los pacientes con enfermedades autoinmunes, lo que ha reducido el uso de esteroides (1). Sin embargo la utilización de este medicamento se encuentra limitada debido a que produce efectos deletéreos en el riñón y la función renal. La nefropatía por CsA se manifiesta inicialmente por alteraciones agudas que pueden ser reversibles al disminuir las dosis, sin embargo, en etapas posteriores produce daño renal crónico progresivo que usualmente es irreversible (2).

a. Farmacología y mecanismo de acción de la ciclosporina

La CsA es un péptido de 11 aminoácidos cíclico e hidrófobo producido por la levadura *Tolipocladium polysporum*. Su efecto inmunosupresor depende de la formación de un complejo constituido por el medicamento y la ciclofilina, la cual es una proteína receptora citoplasmática (3). Este complejo se enlaza a la calcineurina bloqueando su actividad de fosfatasa; esto a su vez inhibe la expresión de proteínas nucleares reguladoras y la activación de los genes que codifican para las interleucinas y sus receptores en las células T (4).

La absorción de la CsA por el tracto gastrointestinal es variable e incompleta promediando entre un 25 a 30%. Numerosos factores como alimentación y otros medicamentos pueden afectar la absorción y las acciones terapéuticas de la CsA (5).

La CsA es metabolizada en el hígado por el citocromo P-450 a metabolitos que son menos tóxicos y con actividad inmunosupresora menor que la CsA. Los

medicamentos que inhiben al citocromo P-450 tales como verapamil, ketoconazol, diltiazem y eritromicina incrementan la concentración de CsA y pueden precipitar la nefrotoxicidad. Por el contrario, medicamentos que activan esta enzima tales como anticonvulsivantes y antituberculosos reducen la concentración plasmática de CsA (6).

b. Nefrotoxicidad Aguda

En pacientes que reciben CsA la alteración mas importante es la vasoconstricción renal que puede ser reversible si se disminuye la dosis o si se suspende el medicamento. Clínicamente se observa aumento de la presión arterial, un incremento en los niveles de creatinina sérica, hiperkalemia y acidosis tubular distal moderada (7), aunque también es posible demostrar la presencia de vasoconstricción renal en pacientes en los que la creatinina sérica no se modifica. En modelos experimentales, donde se ha estudiado la hemodinámica glomerular por medio de micropunción renal se ha encontrado que la CsA administrada tanto en forma aguda como crónica produce vasoconstricción tanto de la arteriola aferente como de la eferente, lo que provoca disminución del flujo plasmático renal, QA. También se ha observado disminución en el coeficiente de ultrafiltración, Kf; la reducción de estos dos parámetros hemodinámicos dan por resultado una disminución importante de la filtración glomerular por nefrona que se refleja en la filtración glomerular total (8-11).

Un problema clínico frecuente en pacientes con trasplante renal es distinguir entre la disfunción aguda inducida por CsA y el rechazo agudo, siendo la biopsia, la única prueba definitiva que permite diferenciar entre estas dos condiciones. Aunque no hay cambios patológicos específicos inducidos por la

administración aguda de ciclosporina, la ausencia de rechazo celular y vascular sugiere la presencia de nefrotoxicidad por ciclosporina. Por lo contrario, la presencia de rechazo agudo no excluye la toxicidad por ciclosporina (12).

c. Nefrotoxicidad Crónica.

La nefrotoxicidad crónica se caracteriza por azotemia progresiva, proteinuria e hipertensión. Histológicamente se observa fibrosis túbulo intersticial, atrofia tubular y arteriopatía aferente. El proceso comienza en la médula externa extendiéndose a la médula interna renal, lo que ocasiona que el diagnóstico sea difícil si la biopsia es superficial. La lesión vascular se caracteriza por arteriopatía obliterativa con cambios degenerativos en las paredes de la arteriola aferente (12-13). Estas lesiones tienden a ocurrir en forma más temprana en pacientes que reciben dosis más altas, sin embargo estos cambios no son dosis dependientes, puesto que también se observan en pacientes que reciben dosis muy bajas. La mayoría de los estudios que evalúan la nefropatía por ciclosporina están basados en datos funcionales tales como creatinina sérica o determinación de la filtración glomerular, sin embargo estas determinaciones son insuficientes porque la filtración glomerular puede permanecer estable por periodos prolongados a pesar de la progresión en las alteraciones túbulo-intersticiales. En pacientes con enfermedades autoinmunes el diagnóstico de nefrotoxicidad por CsA suele ser mucho más sencillo.

d. Mecanismos de la vasoconstricción renal inducida por CsA

La vasoconstricción renal inducida por CsA se ha atribuido a un desequilibrio en la liberación de sustancias vasoactivas, sin embargo, los mecanismos responsables de la vasoconstricción inducida por CsA no han sido

completamente dilucidados. Por una parte, estudios en cultivos de células del músculo liso vascular y cultivos de células mesangiales han demostrado que la CsA incrementa la entrada de Ca^{**} a la célula y estimula la liberación de Ca^{**} de los depósitos intracelulares (14-15). Es probable que este efecto pueda ser explicado por la acumulación de CsA en la bicapa lipídica, perturbando la interacción entre proteínas y lípidos que modulan el transporte de Ca^{**} a la membrana.

Por otra parte, el tono de los vasos pre y posglomerulares está determinado por el equilibrio entre la liberación local de factores contráctiles y vasorelajantes. Angiotensina, tromboxano A₂ y endotelina producen vasoconstricción al aumentar el Ca^{**} citosólico, en cambio prostaglandinas y óxido nítrico ejercen un efecto vasodilatador.

La vasoconstricción por ciclosporina se asocia con aumento en la liberación de tromboxano A₂ (16), endotelina (17) y angiotensina II (18). En condiciones normales estos factores activan a la fosfolipasa C que libera Ca^{**} de los depósitos intracelulares. El aumento del Ca^{**} citosólico induce contracción y estimula a la fosfolipasa A₂, lo que aumenta la síntesis de prostaglandinas vasorelajantes. Sin embargo, la CsA a través de un mecanismo no conocido inhibe la producción basal de prostaglandinas y la estimulada por hormonas vasoconstrictoras (19-20), potenciando así el efecto vasoconstrictor. La CsA tiene efectos deletéreos combinados; por una parte aumenta el Ca^{**} citosólico y por otra inhibe la liberación compensadora de eicosanoides vasodilatadores (14-15).

Diversos estudios han mostrado la elevación de factores vasoconstrictores durante la nefrotoxicidad por ciclosporina. Perico y col. (18) estudiaron la

contribución del sistema renina angiotensina durante la administración crónica de ciclosporina y observaron un aumento en la actividad de renina plasmática. Tuffro y col. (21) encontraron que la ciclosporina incrementa los niveles de renina intrarrenales, altera la distribución de renina intrarrenal y sugieren que puede estimular la síntesis de renina. Sin embargo, en modelos con nefrotoxicidad aguda por ciclosporina, donde se evaluó el papel de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los resultados son contradictorios: en uno de ellos (8), se encontró una recuperación parcial de la filtración glomerular por nefrona y en el otro (22) no se observó ningún efecto sobre la hemodinámica glomerular.

En estudios en los que se administró ciclosporina a ratas por periodos prolongados (5 meses), se produjo un aumento en la síntesis de tromboxanos y la administración de un inhibidor de la sintetasa de tromboxanos, UK-38485, restableció parcialmente la filtración glomerular por nefrona, pero no modificó el flujo plasmático glomerular, indicando la participación de otros factores además del tromboxano A₂ (16).

Por otra parte, se ha demostrado que el endotelio vascular juega un papel importante en la regulación de la presión arterial y del flujo sanguíneo, ya que libera sustancias vasoactivas como el óxido nítrico y la endotelina que modulan la tonicidad de los vasos (23). La endotelina es un potente péptido vasoconstrictor de 23 aminoácidos, formado por la acción de una endopetidasa denominada enzima convertidora de endotelina; la vasoconstricción que induce es 10 veces más acentuada en el riñón que en cualquier otro lecho vascular y es 10 veces más potente que la angiotensina II (24). La infusión exógena de endotelina en ratas, produce hipertensión sistémica, vasoconstricción renal, disminución del

coeficiente de ultrafiltración y de la filtración glomerular por nefrona (25), es decir, efectos similares a los producidos por la administración aguda de ciclosporina.

En estudios con cultivos de células endoteliales se ha observado que la ciclosporina inhibe el crecimiento y proliferación celular (26-27). Kon y col (17) han observado que la infusión aguda de ciclosporina aumenta la producción de endotelina, aunque 60 min. después los niveles circulantes de endotelina regresan a valores normales, lo cual aumenta el número de receptores renales de endotelina (28). Por otra parte, se ha demostrado que la velocidad de disociación entre la endotelina y su receptor es muy baja e incluso puede ser irreversible, lo que explica el efecto vasoconstrictor tan prolongado a pesar de que los niveles circulantes sean normales (29). En animales con tratamiento agudo de ciclosporina, la infusión intrarrenal de anticuerpos anti-endotelina o del antagonista de los receptores restableció la filtración glomerular por nefrona y el flujo plasmático glomerular, sugiriendo que la endotelina es en parte responsable de la vasoconstricción observada (17,29-30).

Con todo lo anterior podemos decir que la vasoconstricción renal inducida por CsA es el resultado de un desequilibrio en la liberación de sustancias vasoactivas, por una parte induce aumento de factores vasoconstrictores como tromboxano, angiotensina y endotelina y por otra inhibe la liberación de prostaglandinas, sin embargo, no se ha determinado la participación del óxido nítrico (ON), un importante vasodilatador en la microcirculación glomerular.

El ON también es liberado por el endotelio, el cual es un compuesto vasodilatador que contrarresta el efecto de los factores vasoconstrictores y regula el flujo plasmático en condiciones normales, participando en mantener la función

renal. Existen varios estudios en los que se evalúa la participación del ON en la nefrotoxicidad por CsA sin embargo, los resultados son contradictorios. Por una parte, estudios llevados a cabo con anillos de aorta y de arteria renal precontractados con norepinefrina han mostrado que el tratamiento con CsA reduce la relajación producida por acetil colina, por lo que se ha sugerido que la CsA reduce la producción de ON (31-33), aunque en estudios mas recientes realizados con anillos de arteria mesentérica se observó que la respuesta a acetil colina se normaliza cuando las arterias son pretratadas con superóxido dismutasa lo que sugiere la producción de ON es normal, pero la CsA acentúa la producción de radicales libres, los cuales inactivan al ON producido por el endotelio (34). Por otra parte estudios de otros y de nuestro laboratorio, sugieren que la síntesis de ON se encuentra normal y contribuye a mantener la función renal contrarrestando la vasoconstricción por CsA (35-37).

Nosotros observamos que en ratas tratadas crónicamente con ciclosporina la excreción urinaria de NO₂/NO₃ fue similar al grupo control; la inhibición aguda de la síntesis de ON con NAME produjo marcada vasoconstricción glomerular; por el contrario la estimulación de la síntesis de ON con L-arginina produjo vasodilatación renal. Ambas respuestas fueron similares al grupo control lo que indica que en la nefrotoxicidad por ciclosporina la producción de ON esta conservada y participa en el mantenimiento de la función renal (37). En otro estudio llevado a cabo con homogenados de riñón se encontró que la conversión de L-arginina tritiada a L-citrulina fue mayor en las ratas tratadas crónicamente con CsA indicando una mayor actividad de la sintetisas de ON en estas condiciones (35). Más aún, López-Ongil et al. (36) observaron en células

endoteliales de bovino en cultivo que la ciclosporina estimula la producción de ON lo cual se asoció con un aumento en los niveles del RNAm de la sintetasa de óxido nítrico endotelial, de la proteína y en la actividad de la proteína.

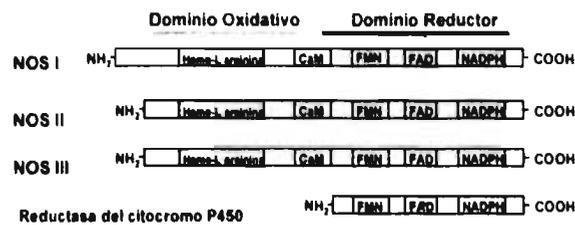
e. Oxido Nitrico

El oxido nítrico (ON) puede ser sintetizado y liberado por una gran variedad de células. Esta pequeña molécula regula funciones vitales tales como la neurotransmisión o el tono vascular y es capaz de destruir parásitos y células tumorales a través de las enzimas que contienen hierro o directamente interactuando con el DNA de estas células (38). En vista de la gran cantidad de funciones del ON, es importante comprender como es que cada célula individualmente logra regular su producción de ON

El ON es producido a partir del aminoácido L-arginina por la acción de una enzima denominada sintetasa de óxido nítrico (NOS). Actualmente se han identificado tres

Figura 1. Estructura de las Sintetasas de ON

isoformas de esta sintetasa, (fig. 1), las cuales son productos de tres genes diferentes.



Cada una de las sintetatas han sido clonadas y diferenciadas: la sintetasa de óxido nítrico neuronal (NOS I) fue la primera isoforma identificada la cual se expresa en forma abundante en el cerebro (39); la segunda isoforma que se aisló y clonó fue la sintetasa de óxido nítrico inducible (NOS II) que se expresa principalmente en macrófagos después de algún estímulo inmunológico o

inflamatorio (40) y por último la sintetasa de óxido nítrico endotelial que se expresa en forma constitutiva en las células endoteliales (41-42). Como muestra la figura 1, las tres isoformas de NOS poseen un dominio oxidante y uno reductor y este último presenta una gran homología con el citocromo P450 (38).

Tabla 1. Caracterización Molecular de las NOS.

| ISOFORMA DE NOS | NOS I | NOS II | NOS III |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Dependencia de Calcio | + | - | + |
| Dependencia de Calmodulina | + | + | + |
| Tamaño del Gen Humano (kb) | > 200 | ≈ 37 | ≈ 21 |
| Número de exones | 29 | 26 | 26 |
| Tamaño del RNAm (kb) | 8.5-9.5 | 4.2-4.5 | 4.3-4.8 |
| Tamaño de la Proteína (kDa) | 160 | 130 | 135 |
| Número de aminoácidos | 1434 | 1153 | 1203 |
| Localización en el C. H. | 12q24.2 | 17q11.2-q12 | 7q35-q36 |
| Prototipo Celular | Neuronas | Hepatocitos y Macrófagos | Células Endoteliales. |
| Localización sub-celular | Citosólica / M. C. | Citosólica | M. C. |
| Expresión | Constitutiva * | Inducible | Constitutiva * |

C. H. Cromosoma Humano, M. C. Membrana Celular, * Expresión constitutiva pero regulada.

La tabla 1 muestra la características generales de cada una de las sintetasas de ON. Las NOS I y III son expresadas en forma constitutiva y su expresión es regulada por diversos estímulos como: acetilcolina, bradikinina, calcio intracelular, concentración de sodio, fuerzas de rozamiento sobre el

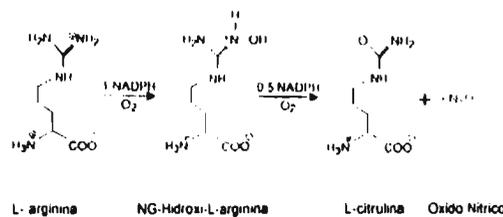
endotelio (Shear stress, en el caso de la endotelial), etc. Pero, para la expresión constitutiva de estas dos isoformas se requiere de la presencia del complejo calcio-calmodulina. La síntesis de ON es rápida y no requiere de síntesis nueva de la enzima a diferencia de la NOS II. Niveles altos de calcio libre intracelular activan la actividad de estas enzimas. La homología entre la secuencia de la NOS I y NOS III es de un 60%. El extremo amino terminal de la NOS III difiere al de las otras dos isoformas en cuanto a su abundancia en prolinas y un sitio de miristilación que le confiere a esta enzima su localización en la membrana celular a diferencia de las otras dos enzimas que no poseen este sitio y su localización subcelular se confina al citosol (38)

A diferencia de las NOS constitutivas, la expresión NOS II es independiente de calcio-calmodulina y es dependiente de la formación de RNAm y de síntesis proteica nueva (38). Aunque recientemente se ha observado que su actividad es dos veces mayor en presencia de calcio-calmodulina

Las tres sintetetas de ON oxidan el nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina. El oxígeno molecular y el NADPH reducido participan como co-substrato en la catálisis del ON, el primer paso de la reacción parece ser la formación de N^G-hydroxy-L-arginina

(Fig 2). Las tres isoformas de NOS contienen: un dinucleotido de flavina-adenina, un mononucleotido de flavina

Figura 2. Síntesis de Oxido Nítrico



y un grupo hemo, así como grupos prostéticos, y requieren de cofactor 6R-5,6,7,8-

tetrahidrobiopetrina (BH₄). En humanos y presumiblemente en casi todas las otras especies las tres isoformas se forman de tres genes diferentes, localizados en tres cromosomas distintos (38).

f. Distribución celular de las isoformas de las Sintetasa de Oxido Nítrico.

Sintetasa de ON Neuronal

La NOS I fue la primera sintetasa identificada molecularmente. Utilizando inmunohistoquímica, hibridación in situ o RT-PCR, se ha encontrado que esta isoforma se encuentra en: neuronas específicas del sistema nervioso central, en ciertas áreas de la medula espinal, ganglios simpáticos, glándulas adrenales, nervios periféricos, células epiteliales pulmonares, útero, estómago, células β de los islotes pancreáticos, mientras que en el riñón se encuentra localizada específicamente en la mácula densa y en el tubulo colector de la médula interna. La NOS I también se localiza en el músculo esquelético de los humanos, ratas y cobayos, así como en las líneas celulares del rhabdomyosarcoma humano (38).

Sintetasa de ON inducible

La producción de la NOS II se puede inducir en varios tipos de células por citocinas y lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Fue aislada de macrófagos de murino. La localización inmunohistoquímica de esta isoforma en ratas tratadas con LPS demostró la localización de esta enzima en: macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer y hepatocitos, células endoteliales de hígado, de glándulas adrenales y de colon; en el riñón se observa principalmente en el mesangio y en el epitelio tubular proximal (38).

Sintetasa de ON Endotelial.

La NOS III fue encontrada inicialmente en las células endoteliales, sin embargo, utilizando anticuerpos específicos contra esta isoforma se observó que también se expresa en las células de la placenta, el epitelio tubular del riñón, neuronas y células intersticiales del colon (38).

g. Oxido Nitrico en el Riñón.

El equilibrio en la liberación de factores vasoconstrictores y vasorelajantes en el riñón es importante para mantener una función normal renal. El ON participa de una manera muy importante en este órgano manteniéndolo en un estado de vasorelajación al permitir que las resistencias renales se encuentren disminuidas. Las tres sintetetasas de óxido nítrico (NOS I, II, III) se expresan en el riñón y cada una de ellas presenta una localización muy característica como veremos adelante, sin embargo, aún no se conoce claramente la función del ON producido por cada isoforma en las diferentes estructuras renales. La localización de cada una de las sintetetasas de ON se ha llevado a cabo utilizando técnicas de hibridación "*in situ*", inmunohistoquímica y RT-PCR. La tabla 2 muestra la localización de cada una ellas y la técnica que fue utilizada para su localización. Brevemente podemos decir que NOS I se expresa principalmente en la mácula densa (43-46), NOS II en las células mesangiales y en el epitelio tubular proximal y del asa de Henle (49-51) y NOS III en el endotelio de la arteriola aferente y eferente (43,48).

El ON producido por la NOS I regula el tono vascular renal mediante la relajación de la arteriola aferente durante la activación del sistema retroalimentario túbulo-glomerular (46, 53), así mismo se ha observado que el ON producido por la

mácula densa estimula la secreción de renina por las células yuxtaglomerulares de la arteriola aferente (54-56). de la arteriola aferente (54-56).

Tabla 2. Distribución de las Sintetasas de ON en el riñón.

| | Distribución Intrarrenal | Metodología | Referencia |
|----------------|---|------------------|----------------|
| NOS I | Mácula Densa | IH, IIS | 43-46 |
| | Epitelio Glomerular | IH | 43 |
| | Endotelio de la Arteriola Eferente | IH | 43 |
| | Nervios Pélvicos y perivasculares | IH | 43 |
| | Tubo colector | RT-PCR | 47 |
| | Asa de Henle Médula Interna | RT-PCR | 47 |
| NOS III | Endotelio del capilar glomerular | IH | 43 |
| | Arteriolas aferente y eferente y arterias intrarrenales | IH, RT-PCR | 43, 48 |
| | Túbulo Proximal, Asa Ascendente de Henle y tubo colector. | RT-PCR | 48 |
| NOS II | Asa Ascendente de Henle | IIS, RT-PCR | 49, 50, 51 |
| | Túbulo Proximal | IIS, RT-PCR | 49, 50 |
| | Tubo Colector | IIS, RT-PCR, IIS | 49, 50, 51, 52 |
| | Arterias Arcuatas | IIS, RT-PCR | 50, 51 |
| | Arteriola Aferente | IH | 45 |

IH = Inmunohistoquímica, IIS = Hibridación "in situ", RT-PCR = Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa.

El ON producido por la acción de la NOS III contribuye a mantener el tono vascular y regular el flujo plasmático glomerular a través de producir vasodilatación renal (57-58).

Por otra parte, en el riñón la NOS II se expresa en forma constitutiva, pero su expresión es mayor bajo condiciones inmunológicas o inflamatorias y el ON producido por esta isoforma regula la relajación de las células mesangiales (59-60). De este modo, la fuente de ON determina su efecto sobre la función renal en condiciones normales y fisiopatológicas.

ANTECEDENTES

El endotelio produce sustancias vasoactivas que regulan el tono del músculo liso vascular renal, por tanto alteraciones en la liberación de estos factores contráctiles y relajantes dan lugar a cambios importantes en la función renal. Se ha encontrado que la ciclosporina produce un desequilibrio en la liberación de estos factores; por una parte induce aumento de sustancias vasoconstrictoras como endotelina, angiotensina II y tromboxanos, que actúan elevando los niveles de calcio intracelular, y por otra parte, inhibe la producción de prostaglandinas vasorelajantes, lo que da lugar a la marcada vasoconstricción renal que caracteriza a la nefrotoxicidad por ciclosporina. Por otra parte, es razonable suponer que en ausencia de prostaglandinas, el efecto vasorelajante del óxido nítrico contribuya a mantener la función renal en mayor proporción que en condiciones normales, inclusive, es posible, que el aumento en el calcio citosólico que induce la ciclosporina estimule la síntesis de óxido nítrico a través de un efecto directo sobre la sintetasa constitutiva del endotelio que es dependiente de calcio; así mismo, la administración de ciclosporina produce importantes alteraciones en la hemodinámica glomerular y en el mesangio las cuales por sí mismas podrían estimular a la sintetasa inducible.

Existe controversia acerca de cual es el papel del óxido nítrico en la vasoconstricción renal asociada a la nefrotoxicidad por ciclosporina. En estudios realizados en arterias renales de ratas tratadas con ciclosporina, se ha observado que la relajación por acetil colina se encuentra bloqueada, por lo que se ha

postulado que la síntesis de óxido nítrico se encuentra disminuida. Recientemente sin embargo, se ha atribuido esta relajación deficiente a un aumento local de radicales libres de oxígeno que inactivan al óxido nítrico. Por el contrario, estudios de otros y de nuestro laboratorio sugieren que la síntesis de óxido nítrico es normal y contribuye a mantener la función renal contrarrestando la vasoconstricción por ciclosporina.

El presente trabajo evaluó la síntesis de óxido nítrico y su participación en el mantenimiento de la microcirculación glomerular en la nefrotoxicidad por ciclosporina. Para ello se determinó la respuesta hemodinámica glomerular y los cambios histopatológicos inducidos por la inhibición crónica de óxido nítrico y la expresión génica de las sintetasas de óxido nítrico neuronal, inducible y endotelial en los riñones de ratas controles y con nefrotoxicidad por ciclosporina.

OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar uno de los mecanismos por los cuales la ciclosporina produce vasoconstricción renal. Específicamente establecer si la síntesis de óxido nítrico está aumentada o disminuida y su relación con la vasoconstricción inducida por ciclosporina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer los efectos de la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico sobre las alteraciones de la microcirculación glomerular durante la nefrotoxicidad por ciclosporina.
2. Evaluar las alteraciones histopatológicas inducidas por la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas controles y tratadas con ciclosporina.
3. Determinar la expresión génica de la sintetasas de óxido nítrico endotelial, neuronal e inducible en el riñón de ratas tratadas con vehículo y ciclosporina.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

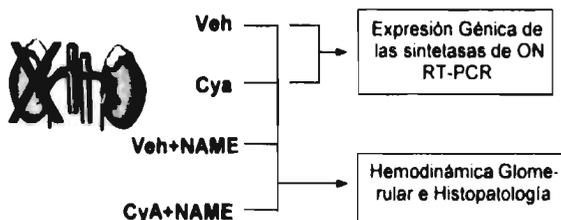
Se utilizaron 34 ratas Wistar macho con un peso entre 300-350 g. Bajo anestesia general con éter, se realizó uninefrectomía mediante una incisión de lumbotomía derecha y los animales se dejaron evolucionar durante 15 días, permitiéndoseles libre acceso a comida y agua.

La figura 3 muestra el protocolo experimental que se utilizó. Las ratas se dividieron en 4 grupos, uno que recibió vehículo (Veh) 0.1 ml de aceite de oliva s.c.(n=11), el segundo recibió ciclosporina (CsA) a una dosis de 30 mg/kg s.c. por día durante 7 días

(n=11), el tercer y cuarto grupo simultáneamente a la administración de ciclosporina (CsA+NAME, n=6) o

vehículo (Veh+NAME, n=6) recibieron diariamente en el agua de beber nitro metil éster de arginina (NAME), inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, a una concentración de 100 mg/l por 7 días (61). Los grupos que recibieron vehículo fueron alimentados en forma pareada, es decir, la cantidad promedio de alimento que consumieron las ratas tratadas con ciclosporina se proporcionó al grupo control. En seis ratas de cada grupo se realizaron estudios de micropunción e histopatológicos y en 5 ratas de los dos primeros grupos se aisló el RNA total de

Figura 3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL



cada riñón con el que se determinó la expresión génica de cada una de las sintetasas de óxido nítrico.

DETERMINACION DE LA HEMODINAMICA GLOMERULAR E HISTOPATOLOGIA.

a. Estudios de Micropunción Renal

Preparación Quirúrgica:

Se estudió la hemodinámica glomerular en el riñón remanente de los cuatro siguientes grupos: Veh, CsA, Veh+NAME, CsA+NAME. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal i.p.) y se instilaron dosis suplementarias en el peritoneo, conforme a requerimientos. La preparación quirúrgica se realizó de la siguiente manera: se colocó a la rata en una mesa termostregulada en 37 °C, se cateterizó la tráquea con un tubo de polietileno PE-240, las venas yugulares y ambas arterias femorales con tubo de polietileno PE-50 y el uretero izquierdo con tubo de polietileno PE-10. Se expuso el riñón a través de una incisión en la línea media, después de disecar el tejido adiposo perirrenal se colocó en una cápsula de lucita, conservando su posición fisiológica, sin comprimir el uretero ni el pedículo renal. El espacio entre la cápsula y el riñón se llenó con un elastómero (Xantopren, Bayer) y la superficie del riñón se cubrió con solución de Ringer tibia. El riñón se iluminó con una luz fría transmitida por una fibra óptica; esta luz permite visualizar claramente los túbulos y capilares de la corteza renal con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-10, Japón). Uno de los catéteres femorales se utilizó para obtener muestras de sangre

periódicamente y el otro para monitorear en forma continua la tensión arterial media, TAM, mediante un transductor de presión (modelo P23db, Statham Instruments, Gould Division Inc. Hato Rey, Puerto Rico), conectado a un polígrafo (Grass Model RPS 7C8, Instruments, Quincy, Mass. EUA). Las muestras de sangre se repusieron en forma simultánea con el mismo volumen de sangre obtenida de una rata donadora.

Las ratas se mantuvieron en condiciones de euvolemia mediante la administración intravenosa de plasma isoncótico de rata a dosis de 10 ml/Kg de peso corporal en una hora, seguida de una infusión de polifructosan (Inutest Laevosan-Gesellschaft, Viena) al 25% en solución Ringer por vía intravenosa a razón de 2.2 ml/h, durante todo el experimento. Después de un periodo de equilibrio de 60 min., se inició una recolección de orina de 30 a 40 min. en tubos de plástico eppendorf que contenían aceite mineral y que previamente fueron pesados. El volumen urinario se calculó por la diferencia de pesos entre el tubo con la muestra recolectada y el tubo previamente pesado. Al principio y al final de cada recolección de orina se obtuvieron muestras de sangre. Simultáneamente a la recolección de orina, se obtuvieron muestras por micropunción de el líquido tubular y de sangre de la arteriola eferente y también se midió la presión intratubular y del capilar peritubular.

Medición de la presión intratubular y del capilar peritubular.

Para la medición de la presión tubular se utilizó un equipo Servo Null (Servonulling Pressure System model 4A, Instrumentation for Physiology and Medicine Inc. San Diego CA. EUA) conectado a un transductor de presión (modelo P23db, Statham Instruments, Gould Division Inc. Hato Rey, Puerto Rico), a una

bomba de presión y a un poligrafo (Grass Model RPS 7C8, Instruments, Quincy, Mass. EUA) calibrado previamente a presiones entre 0 y 50 mm Hg. El equipo detecta cambios en la conductividad eléctrica dentro de la pipeta de punción, la cual esta llena con una solución salina 1 M. Al introducir la pipeta en el capilar o en el túbulo ingresa a dicha pipeta solución relativamente hipotónica, disminuyendo la conductividad dentro de la pipeta, lo cual es detectado por el "Servo Null", que activa una bomba y aumenta la presión hasta igualar la presión con la de la cavidad en cuestión, recuperándose la conductividad inicial dentro de la pipeta; el transductor mide la presión que la bomba aplicó al sistema para igualarla a la de la cavidad en estudio, la cual es registrada en el poligrafo.

Para medir la presión intratubular y la presión intracapilar se utilizaron pipetas de vidrio con diámetro de la punta de 5 a 7 μm . Para medir la presión intratubular con bloqueo de flujo, se interrumpió el flujo del liquido tubular mediante una columna de aceite mineral, coloreado con Sudán negro, se inyectó en la luz tubular a través de una pipeta de vidrio con un diámetro de la punta de 9 a 11 μm y se conservó en posición estable por un mínimo de 30 segundos, la pipeta del servo null se colocó en el segmento más proximal del túbulo bloqueado y se registró la presión intratubular necesaria para detener el flujo tubular y la filtración glomerular, esto permite calcular indirectamente la presión dentro del capilar glomerular. Posteriormente se midieron la presión hidrostática tubular a flujo libre y la presión hidrostática en los capilares peritubulares en forma directa.

Toma de muestras de micropunción.

Para la obtención de las muestras tubulares se utilizaron pipetas de diámetro en la punta de 9 a 11 μm , llenas con aceite mineral coloreado con Sudán negro, fijadas a un adaptador conectado a una jeringa de 20 ml de tal manera que la jeringa permite aspirar o inyectar a través de la micropipeta. El adaptador con la micropipeta se montó en un manipulador Leitz, que permite realizar movimientos finos a la micropipeta. Con estas pipetas se puncionaron los túbulos proximales en un punto cercano a la emergencia de la arteriola eferente que corresponde a las porciones terminales del túbulo proximal. Para recolectar el líquido tubular se inyectó una pequeña columna de aceite con el objeto de bloquear la luz tubular y permitir el paso libre del líquido tubular al interior de la pipeta. En todos los experimentos se obtuvieron 5 a 6 muestras de líquido tubular de 3 a 4 min. c/u. A continuación, se puncionó con pipetas de 13 a 15 μm la arteriola eferente en su emergencia a la superficie, este sitio puede reconocerse fácilmente por su aspecto en forma de estrella y se obtuvieron muestras de 100 a 200 nl para la determinación de proteínas en el plasma. La concentración de proteínas en la arteriola aferente se midió en las muestras de sangre arterial, obtenidas de el catéter de la arteria femoral.

En aquellos experimentos en los que se realizaron dos periodos, las mediciones anteriores se determinaron nuevamente después de un periodo de equilibrio de 30 min. de haber iniciado la infusión de nitro arginina metil ester ó L-arginina según el experimento.

b. Estudios de Microscopía de Luz.

Después de terminar los estudios de micropunción se ligó la aorta por arriba de las arterias renales y se ligó el tronco celiaco. El riñón se lavó con amortiguador de fosfatos 0.13 M (pH 7.4) durante uno o dos min. para eliminar la sangre de los vasos renales, inyectándolo por la arteria femoral a una presión constante y similar a la tensión arterial que tenía previamente la rata, uno de los catéteres de las arterias femorales se utilizó para inyectar el buffer y el otro para monitorear en forma continua la presión de la inyección. Posteriormente se extrajo el riñón, se rebanó y se suspendió en Bouin alcohólico para la microscopía de luz. Para el análisis histopatológico las muestras se deshidrataron y se colocaron en parafina y se cortaron con un microtomo a un espesor de 4 μ , estos cortes se tiñeron con los métodos rutinarios de hematoxilina/eosina, ácido peryódico y tricromo de Masson. En las laminillas teñidas se examinaron 100 glomérulos de cada rata. El análisis morfológico se llevo a cabo utilizando una escala semiquantitativa usando valores de 0 a 3. Cada una de las graduaciones de cada lesión observada se clasificaron de la siguiente manera. Vacuolización tubular: 1= escasa, 2= abundante y focal y 3= abundante y difusa. Lesiones arteriolas como engrosamiento de la pared y estrechamiento del lumen arteriolar: 0= ninguno 1= escaso, 2= moderado y 3= severo. Se determino el porcentaje de glomérulos que presentaban trombosis glomerular y necrosis fibrinoide. El análisis histológico lo realizó el patólogo desconociendo el grupo al que pertenecía cada tejido.

c. Microanálisis y métodos analíticos

El volumen de las muestras tubulares se midió con un capilar de cuarzo de diámetro constante, previamente calibrado, que permite medir volúmenes en nanolitros con un error del 2%. La concentración de polifructosan tubular se midió por triplicado por el método microfluorométrico de Vureck y Pegram (62). Las concentraciones de polifructosan en muestras de sangre y orina se midieron con la técnica de antrona de Davidson y Suckner (63). La concentración de proteínas se midió por duplicado mediante el micrométodo fluorométrico de Viets y col. (64) en el plasma de la sangre tomada de las arteriolas eferentes y de la arteria femoral.

Cálculo de los determinantes de la filtración glomerular

Con las mediciones y determinaciones anteriores se calcularon los siguientes parámetros como previamente se reportó (65): la filtración glomerular por nefrona (FG/n), la presión del capilar glomerular (PCG), la fracción de filtración (FF/n), el flujo plasmático glomerular (FP/n), el flujo sanguíneo glomerular (FSG), las resistencias aferente y eferente (RA y RE), la presión efectiva de filtración (PEF) y el coeficiente de ultrafiltración (Kf) con las siguientes fórmulas:

$$FG/n = (LT/P)_{poli} \cdot VF$$

en donde $(LT/P)_{poli}$ es el cociente de la concentración de polifructosan en el líquido tubular entre la concentración de polifructosan en el plasma y VF es la velocidad del líquido tubular que se obtiene al dividir el volumen del líquido tubular entre el tiempo de recolección de la muestra.

La presión oncótica, Π , se calculó a partir de la concentración de proteínas, C, con la ecuación de Landis y Pappenheimer:

$$\Pi = 1.63C + 0.294C^2$$

$$PCG = SFP + \Pi A$$

donde SFP es la presión tubular a flujo detenido y ΠA es la presión oncótica aferente.

$$FF/n = 1 - \frac{CA}{CE}$$

donde CA y CE son las concentraciones de proteína aferente y eferente respectivamente.

$$FP/n = \frac{FG/n}{FF/n}$$

donde FF/n es la fracción de filtración por nefrona.

$$FSG = \frac{FP/n}{1 - Htc}$$

donde Htc es el hematocrito.

$$RA = \frac{TAM - PCG}{FSG} \times 7.962$$

$$RE = \frac{PCG - Pc}{FSG} \times 7.962$$

donde TAM es la tensión arterial media, y Pc la presión capilar peritubular.

$$PEF = \frac{(PCG - \Pi A - FF) + (PCG - \Pi E - FF)}{2}$$

donde ΠE es la presión oncótica eferente y FF es la presión tubular a flujo libre.

$$Kf = \frac{(FGN / PEF)}{60}$$

DETERMINACION DE LA EXPRESION GENICA DE LAS SINETASAS DE OXIDO NITRICO

d. Aislamiento del RNA.

En los grupos que recibieron vehiculo (n=5) y ciclosporina (n=5) se aisló en forma separada el RNA total de riñón, cerebelo, corazón, intestino, hígado y aortas de la siguiente manera.

Cada una de las ratas se anestesió con pentobarbital sódico y se extrajeron los órganos de interés, se rebanaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA y se mantuvieron congelados a -80°C. El RNA se extrajo por el método de tiocianato de guanidina y cloruro de cesio (66) para lo cual se tomaron aproximadamente 500 mg de cada tejido de cada rata y se suspendieron en 8 ml de una solución de tiocianato de guanidina 3M. Con un cavitron se homogenizó perfectamente el tejido 3 veces durante 15 seg., se agregó 400 µl de sarcosil al 10%, después de 30 min., el homogenado se colocó en un tubo de plástico que contenía 4 ml de cloruro de cesio. Los tubos se colocaron en una ultracentrifuga a 29000 rpm durante 18 horas. Al día siguiente, se descartó el sobrenadante y en el fondo del tubo se pudo apreciar el botón de RNA total, se cortaron los tubos a una distancia de dos cm. del botón, y se lavaron con 300 µl de agua, cada botón se resuspendió en 600 µl de agua grado biología molecular, se agitó en vortex cada 10 min., se mantuvo en hielo y se esperó a que el RNA se solubilizara. Se determinó la concentración por espectrofotometría de

luz UV a 260 y 280 nm. El RNA obtenido se corrió en un gel de agarosa para corroborar que se encontrara en buenas condiciones y visualizar las bandas 28 y 18s.

Las muestras de RNA se precipitaron de la siguiente manera:

- ♦ Se agregaron 3 volúmenes de alcohol etílico absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH= 5.2 y se mantuvieron a -20°C durante 24 h.
- ♦ Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 12 000 r.p.m., 30 min. a 4 °C.
- ♦ Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 12 000 r.p.m. 10 min. a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- ♦ Por un sistema especial de vacío (speed vac) el RNA se secó y después se resuspendió con la cantidad de agua necesaria para obtener una concentración final de 5 µg/µl la cual fue determinada por espectrofotometría de luz UV.

Este procedimiento se realizó con cada uno de los tejidos obtenidos de cada rata. El RNA total obtenido se almacenó a -80°C.

e. Reacción de polimerasa en cadena, PCR.

Estas reacciones se llevan a cabo en lugares donde no se haya manejado previamente DNA, con puntas para pipetas automáticas con filtro y con material exclusivo para PCR.

Los iniciadores o *primers* fueron diseñados para la sintetasa neuronal, mientras que tanto para la sintetasa inducible y endotelial se utilizaron los iniciadores reportados previamente (67-68).

Cada par de iniciadores se adquirieron de Gibco. La tabla 3 muestra las secuencias de cada uno de los iniciadores que se utilizaron para amplificar cada una de las isoformas de las NOS y el tamaño del producto una vez amplificado.

Cada uno de los iniciadores se resuspendió con agua BM para tener una concentración final de 100 μ M, y se tomo la cantidad necesaria de c/u

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar cada una de las isoformas de las SON

| Isoforma | Secuencia de los Iniciadores | Tamaño del producto |
|------------|--|---------------------|
| Neuronal | 5' GAACCCCAAGACCATCC 3' 3' GGCTTTGCTCCCACAGTT 5' | 308 pb |
| Inducible | 5' GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG 3' 3' CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC 5' | 570 pb |
| Endotelial | 5' TAC GGA GCA GCA AAT CCA C 3' 3' CAG GCT GCA GTC CTT TGA TC 5' | 819 pb |

para obtener una solución 10 μ M que contenía ambos iniciadores sentido y antisentido.

f. Transcripción Reversa

La transcripción reversa (RT) fue llevada a cabo con 10 μ g de RNA total de cerebro. Previamente el RNA se llevó a 65 °C por 10 min. La reacción se incubó a 37 °C por 60 min, en un volumen final de 20 μ l, utilizando 200 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia en el mono (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV, Stratagene), 100 pmol of hexámeros al azar (random primers, Life Technologies), 0.5 mM de cada dNTP (una mezcla de dCTP, dATP, dGTP, dTTP, Sigma), y 1X de buffer de TR (75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, pH 8.3). Al finalizar el tiempo de la reacción, las muestras se

llevaron a 95 °C por 5 min. para inactivar la transcriptasa reversa y se diluyeron a 40 µl con agua grado PCR.

Amplificación del DNAC

Para la reacción de la polimerasa en cadena se utilizó un décimo de la reacción de TR para amplificar el fragmento de SON I, por PCR, en un volumen final de 20 µl, estas reacciones se llevaron a cabo en presencia de buffer 1X PCR (10 mM tris-HCl; 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl, pH 8.3); 0.2 mM de cada dNTP, 10 µM de cada par de oligonucleótidos (SON I) y una unidad de Taq DNA polimerasa (Stratagene). Las muestras se cubrieron con 2 o 3 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación de los componentes y las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (M.J. Research) durante 30 ciclos (Ver apéndice).

Al final de cada reacción se corrió un gel de acrilamida para corroborar si se obtuvo el fragmento del peso esperado.

Con las condiciones óptimas para la obtención del fragmento de la isoforma NOS I, se llevaron a cabo simultáneamente varias reacciones para obtener en mayor cantidad el fragmento y posteriormente ligarlo a un vector y transformar células.

A partir de RNA de cerebro por medio de RT-PCR se obtuvo el fragmento de 310 pares de bases correspondiente a la sintetasa neuronal (SON I) de óxido nítrico.

Clonación de NOS I

El fragmento de la isoforma SON I obtenido por PCR se ligó a un vector (superscrit stratagene), el cual contiene el gen de la resistencia a ampicilina y el

cual previamente se llevó a terminaciones rasuradas con la enzima Sma. Con el DNA recombinante obtenido (pBluescript + fragmento de SON I), se transformaron bacterias de *E. coli* DH5 α (tratadas con el método de cloruro de calcio para hacerlas competentes, esto es cambiar la conformación de la membrana para permitir la inserción del plásmido) y se sembraron en un medio sólido con ampicilina para que sólo las bacterias que habían sido transefectadas con el vector crecieran en este medio.

Se obtuvo el cDNA circular de cada una de las colonias (Gene Clean) y con los iniciadores de la NOS I, se realizó nuevamente PCR utilizando como molde (*template*) el cDNA circular de cada colonia. Los productos de la PCR se corrieron en un gel de acrilamida, en donde se observó que con el cDNA de una de las colonias se amplificó un fragmento de 310 pb, que era el esperado para la SON I. Una vez identificada esta clona, las bacterias se crecieron en un medio líquido 2 YB-Broth con ampicilina, y se extrajo el DNA circular (Medi Prep, ver apéndice). Utilizando los promotores que contiene el vector el fragmento se secuenció por el método de Sanger. La secuencia del fragmento obtenido se comparó con la secuencia reportada para la sintetasa de óxido nítrico neuronal.

Para el análisis de Northern blot se utilizó una sonda de RNA no radioactiva construida por transcripción *in vitro* antisentido en presencia de digoxigenina, a partir del cDNA previamente linearizado en el extremo 5' con *Xba* I.

Con el RNA total obtenido de cerebro, corazón y riñón de cada rata y con el RNA mensajero extraído del RNA de los riñones de cada grupo se realizó el

análisis de Northern blot, utilizando la sonda de RNA construida para NOS I y una sonda de β actina como gen control.

f. Análisis de Northern Blot

El análisis de Northern blot se realizó utilizando el siguiente procedimiento (para mas detalles consultar el apéndice):

- En un gel de agarosa para RNA se corrieron 10 μ g de RNA total de cada muestra.
- El RNA se transfirió a una membrana de nylon y los ácidos nucleicos se fijaron con luz UV utilizando un UV crosslinker (stratagene).
- Las prehibridación se llevó a cabo al colocar las membranas en una bolsa con 15 ml de solución de hibridación durante 2 h a 55°C, en un horno de hibridación, esto sirve para limpiar la membrana de colorante y bromuro de etidio.
- Se cambió la solución pero ahora se agregaron 2 μ g/ μ l de cada sonda en este caso de la β actina y de NOS I, se dejó a 55°C durante 18 h.
- Al día siguiente se llevaron a cabo los lavados a baja astringencia, esto es a una alta temperatura y baja concentración de sal, para que la unión de la sonda al RNA sea en forma muy específica al mensaje que se está buscando. (Ver apéndice).
- Las membranas se lavaron en solución A y B, durante el lavado con la solución B se agregó el anticuerpo y para finalizar se agregó la solución que desarrolló la quimioluminiscencia (CDP Star, lakeside).

- ◆ Las membranas se colocaron en bolsas nuevas, se sellaron y se colocaron en un cassette con una placa para su exposición, el tiempo de exposición varió según la abundancia del gen y se determinó en forma experimental.

Análisis de Dot Blot:

Este análisis se llevó a cabo de la misma manera que el de Northern Blot, sólo que para la transferencia a la membrana, el RNA se depositó en el aparato de Dot Blot y por medio de vacío el RNA se transfirió a la membrana de nylon (Ver apéndice), sin la necesidad de correr un gel de agarosa, inmediatamente después el RNA se fijó a la membrana con luz UV y se realizó el mismo procedimiento que para el Northern Blot.

Como puede apreciarse en la parte de resultados, el análisis de Northern blot, no fue lo suficientemente sensible como para detectar la expresión de esta proteína que se expresa en forma abundante en la mácula densa, pero que con respecto al RNA total del riñón su detección puede ser difícil, por lo que decidimos determinar la expresión génica de las sintetasas de óxido nítrico por medio de PCR semi-cuantitativa.

PCR semi-cuantitativa

Los iniciadores o *primers* fueron diseñados para la sintetasa neuronal, mientras que tanto para la sintetasa inducible y endotelial se utilizaron los iniciadores reportados previamente (67-68). Cada par de iniciadores se adquirieron de Gibco. Cada uno de ellos se resuspendió con agua para tener una concentración de 100 μ M, y se tomó la cantidad necesaria de c/u para obtener una solución 10 μ M de ambos primers sentido y antisentido. La tabla 2 muestra

las secuencias de los iniciadores y el tamaño del fragmento que se obtendrá por PCR.

Para llevar a cabo este análisis, previamente validamos la técnica (69), determinado la fase exponencial y la sensibilidad del método tanto para cada par de oligonucleótidos de cada isoforma de NOS como para el gen control, el cual fue la deshidrogenasa 3 fosfato gliceraldehido (GAPDH) que ha sido previamente reportado (70).

Transcripción reversa

La transcripción reversa (RT) fue llevada a cabo utilizando 10 µg de RNA total. Previamente el RNA se calentó a 65 °C by 10 min. La TR se incubó a 37 °C por 60 min., en un volumen final de 20 µl, utilizando 200 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia en el mono (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV, Life Technologies), 100 pmol de hexámeros al azar (random primers, Life Technologies), 0.5 mM de cada dNTP (una mezcla de dCTP, dATP, dGTP, dTTP, Sigma), y 1X de buffer de TR (75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, pH 8.3). Al finalizar el tiempo de la reacción, las muestras se calentaron a 95 °C por 5 min. para inactivar la TR y se diluyeron a 40 µl con agua grado PCR.

Amplificación del DNA

Para la reacción de la polimerasa en cadena se utilizó un décimo de la reacción de TR para amplificar cada uno de los fragmentos de las isoformas de NOS y GAPDH por PCR, en un volumen final de 20 µl, estas reacciones se llevaron a cabo en presencia de buffer 1X PCR (10 mM tris-HCl; 1.5 mM MgCl₂; 50

mM KCl, pH 8.3); 0.1 mM de cada dNTP, 0.2 μ Ci de [α^{32} P]-dCTP (~ 3000 Ci/mmol, 9.25 MBq, 250 μ Ci); 10 μ M de cada iniciador (o GAPDH) y una unidad de Taq DNA polimerasa (Biotecnológicas Universitarias). Las muestras se cubrieron con 2 o 3 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación de los componentes y las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (M.J. Research). Las temperaturas y los tiempos a los que se sometió cada reacción dependiendo de los iniciadores utilizados se presentan en tabla 4.

Tabla 4: Temperaturas y tiempos para la amplificación de cada NOS

| Fragmento | Desnaturalización | Acoplamiento | Extensión |
|------------------|--------------------------|---------------------|------------------|
| NOS I | 94 °C, 1 min. | 55 °C, 1 min. | 72 °C, 1.30 min. |
| NOS II | 94 °C, 45 seg. | 60 °C, 45 seg. | 72 °C, 1.25 min. |
| NOS III | 94 °C, 45 seg. | 55 °C, 45 seg. | 72 °C, 1.25 min. |

El último ciclo de cada reacción fue precedido por un etapa final de extensión a 72°C durante 5 min. Todas las reacciones para la validación de la técnica se llevaron a cabo por duplicado y para la determinación de la expresión de cada isoforma se llevaron a cabo por cuadruplicado.

El número de ciclos que se utilizó para cada reacción se determinó mediante una cinética de amplificación y se eligió durante la fase exponencial como se detalla a continuación.

Para analizar los productos obtenidos la mitad de cada reacción se corrió en un gel de agarosa al 1.2% y la otra mitad en un gel de acrilamida al 5%.

Determinación de la Fase Exponencial

Como la mayoría de las reacciones enzimáticas, la amplificación de cualquier gen por PCR exhibe dos fases: una fase exponencial, en donde la cantidad de los productos se incrementa en forma geométrica en relación al número de ciclos y una fase de meseta en donde la cantidad del producto ya no se incrementa en forma geométrica y la reacción se satura. Entre mas baja es la abundancia del RNAm, mas grande es la fase exponencial y la fase de meseta se alcanza a un mayor número de ciclos.

Una característica esencial para llevar a cabo una PCR semi-cuantitativa es conocer la fase exponencial para cada par de iniciadores, con el fin de evitar resultados falsos, ya que si las reacciones se realizan durante la fase de meseta, los resultados pueden ser erróneos y las diferencias pueden no ser detectadas. Para determinar la fase exponencial las reacciones se llevan a cabo en un volumen final 200 μ l y se dividen en 10 reacciones de 20 μ l, en la presencia de [α - 32 P]-dCTP. Los ciclos analizados para cada isoforma y el gen control fueron:

- ◆ NOS I 15, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35 y 38
- ◆ NOS II 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30
- ◆ NOS III 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30
- ◆ GAPDH 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26.

Al finalizar las reacciones, 10 μ l de cada reacción fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa para DNA al 1.5 %, las bandas se visualizaron con bromuro de etidio utilizando luz UV. Cada banda se corto y se suspendió en 500 μ l de agua bidestilada, los tubos se calentaron a 95°C para fundir la agarosa y

permitir que el DNA se suspendiera en 5 ml de líquido de centelleo para soluciones acuosas. La cantidad de DNAC amplificado fue determinado por el número de cuentas registradas por el contador de centelleo (Beckman LS6500). Las cuentas obtenidas se graficaron en escala logarítmica contra el número de ciclos. De forma similar la otra mitad de la reacción de PCR se corrió en un gel de acrilamida, nuevamente las bandas se visualizaron con bromuro de etidio y luz UV y el gel se deshidrató en un secador de geles para mas tarde exponerlo en una placa radiográfica. De las imágenes obtenidas se realizó la densitometría y se graficó las unidades arbitrarias de densidad óptica en escala logarítmica contra el número de ciclos. De esta manera se obtiene una gráfica sigmoidea en donde se observa una fase geométrica (fase exponencial) y una fase de saturación (fase de meseta). En base a estas gráficas se determinó el número de ciclos al que se sometería cada reacción tanto para la amplificación de cada una de las sintetasas de óxido nítrico como para el gen control (GAPDH).

Determinación de la sensibilidad de la PCR semi-cuantitativa

La sensibilidad del método para detectar cambios en los niveles de expresión se determinó de la siguiente manera:

a) Se amplificaron cada una de las tres sintetasas de óxido nítrico utilizando diferentes concentraciones de DNAC, con el fin de determinar la linealidad y sensibilidad de la técnica. Se utilizaron cantidades de RNA total que fueron de 0.125 a 1.25 μg y cada una de las reacciones se realizaron durante la fase exponencial previamente determinadas. El número de cuentas por minuto ó las

unidades de densidad óptica se graficaron en escala logarítmica contra la cantidad de DNAc (ó de RNA inicial) y se determinó la correlación de la recta.

b) También se amplificó el fragmento de NOS I y III a partir de diferentes tejidos con diferentes niveles de expresión, en el caso de NOS I, se utilizó DNAc obtenido de la transcripción reversa de RNA total de cerebelo, donde se conoce que esta isoforma se expresa en forma abundante, al mismo tiempo se utilizó DNAc de corazón, corteza renal y medula interna, donde el nivel de expresión es menor.

Una vez determinada la fase exponencial y la sensibilidad se procedió al análisis de cada una de las muestras. Para determinar la expresión génica de cada una de las sintetasas de óxido nítrico neuronal, inducible y endotelial en el riñón de las ratas tratadas con vehículo y ciclosporina, las reacciones de PCR se realizaron durante la fase exponencial 26, 28 y 24 ciclos respectivamente, mientras que para el GAPDH durante 13 ciclos. En todos los casos las reacciones se realizaron por cuadruplicado a partir de dos diferentes reacciones de transcripción reversa, utilizando un décimo de la TR, obtenida a partir de 10 µg de RNA total, o sea, se utilizaron 0.5 µg de RNA total transcrito a DNAc. Los productos obtenidos de cada muestra se corrieron en geles de agarosa y acrilamida. El promedio de las densidades ópticas de cada reacción se graficó para cada grupo con la co-amplificación del gen control.

ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados obtenidos son expresados como un promedio \pm el error estándar para cada grupo de ratas estudiado. Las diferencias encontradas en cada grupo se determinaron por medio de la t de Student pareada y las comparaciones entre grupos se analizaron por ANOVA con un diseño para mediciones repetidas y cuando fue apropiado se aplicó la prueba de t de Student no pareada. Cuando el valor de F alcanzó una $p < 0.05$, las diferencias encontradas se consideraron como estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Estudios Hemodinámicos Glomerulares

En la tabla 5 se resumen los resultados hemodinámicos glomerulares correspondientes a los cuatro grupos de ratas estudiados.

La figura 4 muestra los cambios porcentuales obtenidos en cada grupo, los cuales fueron

comparados contra el

grupo control el cual esta representado por el

100%. La administración

de ciclosporina no

modificó la TAM de los

animales de este grupo,

pero se observaron

cambios importantes en

la hemodinámica

glomerular: el flujo

plasmático por nefrona

(QA) disminuyó cerca de

la mitad (49%) de los

valores normales debido

a vasoconstricción pre y

posglomerular, las resistencias arteriales aferente (RA) y eferente (RE)

aumentaron en un 73 y 85 % respectivamente; la presión intraglomerular (PGC) no

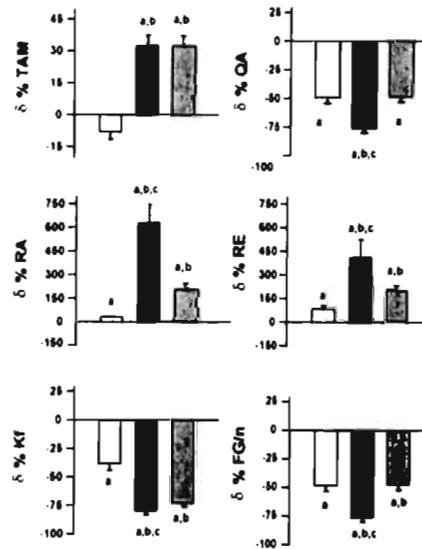


Figura 4. Cambios Porcentuales observados en la Hemodinámica Glomerular (□ CsA, ■ CsA+NAME y ■ Veh+NAME), a= p <0.05 vs. Veh, b= p<0.05 vs. CsA y c= p0.05 vs. Veh+NAME.

se modificó dado que la TAM no cambió y las resistencias arteriolares disminuyeron en la misma proporción, pero el coeficiente de ultrafiltración disminuyó en 37%. La disminución del QA y el Kf produjo que la filtración glomerular por nefrona disminuyera en un 50% con respecto al grupo control. Estos resultados muestran que la administración de ciclosporina a este grupo produjo la vasoconstricción renal característica de la nefrotoxicidad por ciclosporina.

La administración simultánea de ciclosporina y la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico con NAME acentuó los efectos que se observaron en el grupo que solo recibió ciclosporina. El NAME produjo un aumento significativo del 43.9% en la tensión arterial media (TAM), el flujo plasmático disminuyó a la mitad del valor promedio observado en el grupo que solo recibió ciclosporina, lo que se asoció con una mayor vasoconstricción renal, las resistencias pre y pos glomerulares aumentaron en un 621 y 414% con respecto al grupo control, sin embargo, la vasoconstricción fue significativamente mayor en la arteriola aferente con respecto a la eferente, esta mayor vasoconstricción preglomerular previno la transmisión de la TAM a los capilares glomerulares, lo que ocasionó que la presión intraglomerular no cambiara, mientras que, el Kf disminuyó en un 80% de los valores normales. La disminución del flujo plasmático y del Kf, produjo un descenso de la FG/n por más del 75% con respecto al grupo control y un 50% menor del observado en el grupo que sólo recibió CsA.

El grupo que recibió Veh+NAME se diseñó con el fin de demostrar que la dosis de NAME fue suficiente para inhibir la síntesis sistémica y renal del óxido nítrico como previamente se reportó (61). Esta dosis produjo elevación de la TAM

en un 32.2% con importante vasoconstricción renal, como lo demuestra la disminución del flujo plasmático glomerular en un 48%. Sin embargo, el patrón de vasoconstricción glomerular inducido por NAME fue distinto al observado en el grupo que recibió CsA+NAME. En el grupo de Veh+NAME las resistencias arteriolares aferente y eferente se elevaron en la misma proporción 200 y 200%, mientras que en las ratas con CsA se observó vasoconstricción predominantemente preglomerular. La presión intraglomerular se elevó como resultado de la elevación de la TAM y de la elevación proporcional de las resistencias aferente y eferente. El NAME también produjo un descenso del 72% del coeficiente de ultrafiltración. El descenso de la FG/n en el grupo Veh+NAME se debió a la disminución del flujo plasmático y del coeficiente de ultrafiltración a pesar de que la presión intraglomerular aumentó.

Con el fin de evaluar si la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico produjo una respuesta

diferente entre las ratas controles y las ratas tratadas con ciclosporina se calculó el índice de cambio para cada uno de los parámetros hemodinámicos evaluados. El valor promedio del por ciento de cambio en cada parámetro

del grupo Veh+NAME se ajustó a cero (tomándose como una respuesta normal

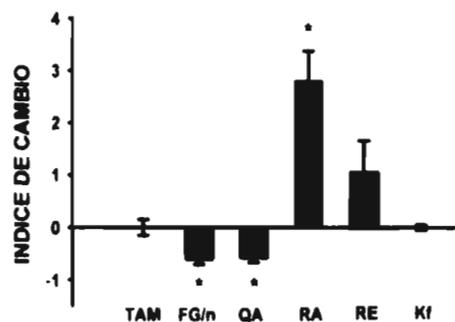


Figura 5. Índice de cambio observado en el grupo CsA+NAME comparado con el grupo Veh+NAME *p<0.01 vs. Veh+NAME.

producida por NAME) y se comparó con el índice calculado para el grupo de CsA+NAME. En la figura 5 se puede apreciar que la administración de NAME produjo una respuesta similar al grupo control en cuanto a TAM y Kf, pero las ratas tratadas con CsA presentaron índices significativamente diferentes para la filtración glomerular, el flujo plasmático por nefrona y la resistencia aferente. También la resistencia eferente mostró un índice diferente, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. Esta respuesta diferente entre los animales tratados con vehículo o ciclosporina indican que la administración de NAME produjo una respuesta mayor en el grupo tratado con ciclosporina, lo que indica una mayor participación del ON a nivel de la microcirculación glomerular.

Estudios Histopatológicos

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en la microscopia de luz, la cual fue llevada a cabo en forma ciega; esto es que el patólogo desconocía a

que grupo pertenecía cada tejido. Los principales hallazgos histopatológicos encontrados en los

Tabla 6. Alteraciones Histopatológicas

| ALTERACION | V | CsA | Veh+NAME | CsA+NAME |
|--------------------------|--------|----------|----------|----------|
| Trombosis Glomerular | 0 | 1% | 1.6% | 10.0% |
| Vacuolización Tubular | Escasa | Difusa | Moderada | Moderada |
| Engrosamiento arteriolar | 0 | Moderado | Moderado | Severo |

cuatro grupos estudiados fueron trombosis glomerular, vacuolización tubular y engrosamiento arteriolar.

Como se puede apreciar las alteraciones se presentaron en mayor proporción en los animales tratados con ciclosporina e inhibición crónica de la síntesis de óxido

nitrico (CsA+NAME) comparando con el resto de los grupos, encontrándose trombosis glomerular en el 10% de los glomérulos observados; la vacuolización tubular fue difusa y se observó engrosamiento arteriolar severo.

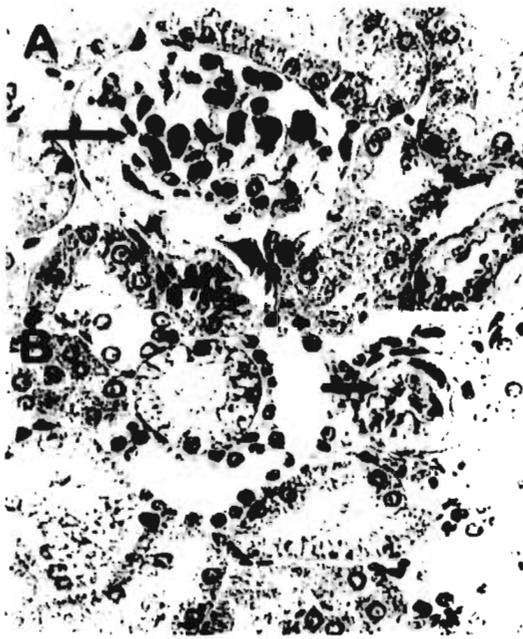


Figura 6. Microscopía de Luz representativa de una rata tratada con CsA+NAME

En la figura 6 se muestra una microfotografía de un corte histológico renal representativo de una rata tratada con CsA y con inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico (CsA+NAME), en la que en la parte superior (A) puede apreciarse claramente la trombosis glomerular y en la parte inferior (B) se puede observar el engrosamiento arteriolar y la vacuolización

del epitelio tubular, indicados por medio de una flecha larga y corta respectivamente.

TABLA 5 : HEMODINAMICA GLOMERULAR SIN Y CON INHIBICION CRONICA DE LA SINTESIS DE ON.

| | TAM | Q _A | RA | RE | PGC | Kf | FG/n | FF/n |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-----------|
| | mmHg | nl/min | dyn/s/cm ⁻⁵ | | mmHg | nl/s/mmHg | nl/min | % |
| V | 122.5±4.6 | 133.7±11.3 | 2.3±0.3 | 1.4±0.1 | 50.3±1.0 | 0.049±.007 | 35.3±3.3 | 0.26±.003 |
| V+NAME | 162.0±5.5 ^{ac} | 69.3±6.2 ^a | 6.9±0.9 ^a | 4.2±0.5 ^a | 60.4±1.9 ^{acd} | 0.014±.002 ^a | 18.9±1.6 ^a | 0.27±.002 |
| CsA | 112.8±4.3 | 68.3±7.2 ^a | 4.0±0.5 ^a | 2.6±0.3 ^a | 47.2±1.8 | 0.031±.003 ^a | 18.4±1.8 ^a | 0.27±.004 |
| CsA+NAME | 162.4±6.0 ^{ac} | 32.2±5.6 ^{abc} | 16.6±2.7 ^{abc} | 7.2±1.6 ^{abc} | 47.8±1.9 | 0.010±.002 ^{ac} | 8.5±1.4 ^{abc} | 0.27±.004 |

TAM presión arterial media, Q_A, flujo plasmático por nefrona, RA y RE, resistencias arteriolares aferente y eferente PGC, presión capilar glomerular, Kf, coeficiente de ultrafiltración FG/n, filtración glomerular por nefrona, FF/n, fracción de filtración por nefrona.

^a=p<0.05 vs V ^b=p<0.05 vs V+NAME, ^c=p<0.05 vs CsA, ^d=p<0.05 vs CsA+NAME.

Expresión Génica de las sintetasas de óxido nítrico.

a. Clonación de NOS I

Se determinó la pureza del RNA extraído de hígado, corazón, intestino, cerebelo y riñón. por medio de espectrofotometría de luz U.V. y de geles agarosa desnaturalizantes. La figura 7 muestra una imagen digitalizada de una fotografía representativa de un gel de agarosa

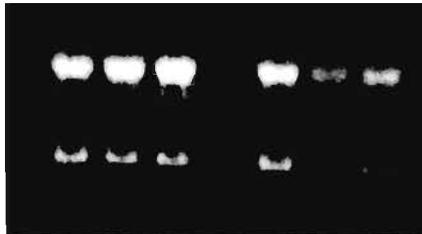


Figura 7. Gel de Agarosa mostrando el RNA extraído con CsCl.

de el RNA extraído de los riñones de las ratas tratadas con vehiculo o ciclosporina teñido con bromuro de etidio. Como puede observarse el RNA se encontraba en buen estado, diferenciándose claramente las bandas 28 y 18s.

Por medio de transcripción reversa y de una reacción en cadena de la polimerasa y con los iniciadores específicos de cada isoforma se obtuvieron los fragmentos de las tres sintetasas de óxido nítrico. Los fragmentos de las sintetasas de óxido nítrico neuronal, inducible y endotelial (NOS I, II y III) se amplificaron a partir del cDNA, obtenido por la acción de la

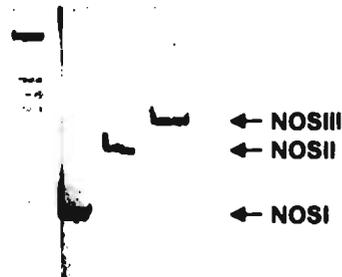


Figura 8. Fragmentos de las NOS obtenidos mediante PCR

trancryptasa reversa (RT) a partir de RNA total de riñón del grupo control. La homología entre los tres fragmentos obtenidos por PCR es alrededor de un 50%, lo

que nos permite amplificar fragmentos específicos de cada una de las sintetasas de ON. La figura 8 muestra la imagen digitalizada de un gel de acrilamida donde se pueden observar los productos amplificados por PCR correspondientes a las tres isoformas: NOS I de 310 pb, NOS II de 560 pb y NOS III de 810 pb junto con un marcador de peso molecular para DNA.

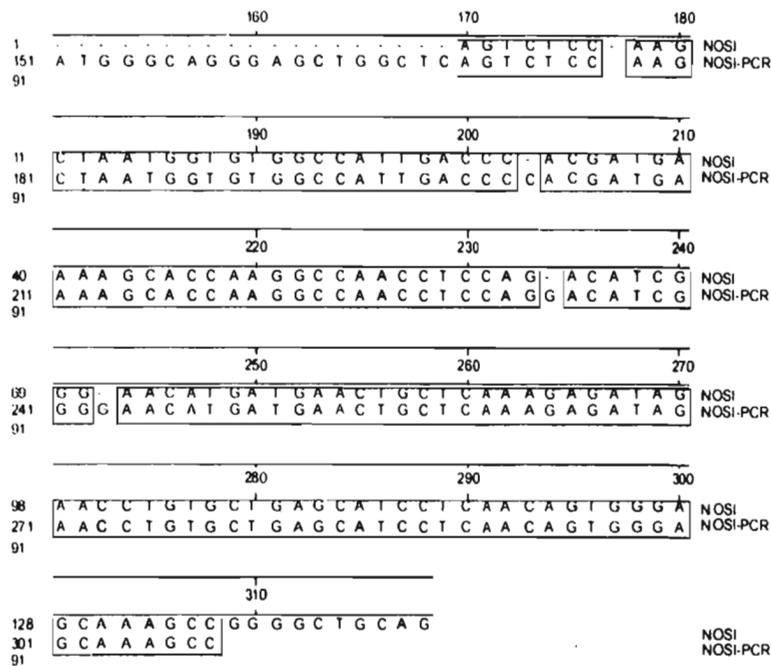


Figura 9. Comparación de la secuencia obtenida por PCR con la secuencia original de NOS I.

El fragmento obtenido de la isoforma NOS I se ligó a un vector (superscrit stratagene), el cual contiene el gen de la resistencia a ampicilina. Con el DNA

recombinante se transformaron células *E. coli* DH5 α (Life Technologies) tratadas con el método de cloruro de calcio para hacerlas competentes y se sembraron en un medio sólido con ampicilina para que sólo las bacterias que contuvieran el vector crecieran en este medio. Por medio de PCR y con los iniciadores de la isoforma cerebral se identificó la colonia que contenía el fragmento de la NOS I.

Esta colonia se creció en gran escala y se obtuvo el cDNA circular (Medi Prep) del cultivo. El fragmento se secuenció utilizando el método de Sanger y la secuencia resultó un 98% idéntica a la sintetasa cerebral (figura 9). Una vez identificada la colonia, las células se congelaron, con los cuidados necesarios y actualmente se cuenta con la clona que codifica para la isoforma cerebral.

El cDNA circular obtenido por Medi prep, se linearizó en el extremo 5' con la enzima *Xba* I y para la obtención de la sonda, se sintetizó RNA antisentido in vitro con la enzima T $_7$ DNA polimerasa y se marcó con digoxigenina para producir una sonda no radioactiva.

Una vez construida la sonda se llevó a cabo el análisis de Northern blot con el RNA total de cerebro y riñón.

La figura 10 muestra una imagen digitalizada del análisis de Northern y Dot blot con RNA total de cerebro en ratas control y tratadas con ciclosporina. En la parte inferior de cada análisis se observa la expresión de la β -actina que se utilizó como gen control. El tiempo de exposición fue de 30 seg. y para el Dot blot de 5 min.; se puede apreciar que la intensidad de las bandas es homogénea en todas las muestras, esto indica que la cantidad de RNA total utilizado fue similar.

b. Análisis de Northern y Dot Blot

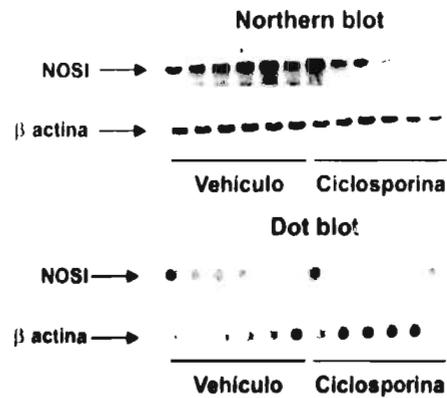


Figura 10. Expresión génica de la NOS I en el sistema nervioso central

El análisis Northern blot para el RNA total obtenido de cerebro mostró una banda única de 10.5 Kb para la sintetasa cerebral (NOS I) la cual se observó después de 13 h de exposición. Tanto en el Northern como el Dot blot se encontró una tendencia a la disminución de la expresión génica de la isoforma NOS I en el cerebro de las ratas tratadas con ciclosporina, sin

embargo, el análisis densitométrico de la relación NOS I/ β-actina, no mostró diferencias estadísticamente significativas (control 0.78 vs ciclosporina 0.39 unidades arbitrarias).

La figura 11 muestra una imagen digitalizada de la autoradiografía obtenida del análisis de Northern blot llevado a cabo con el RNA mensajero y total de riñón de ratas tratadas con vehiculo o ciclosporina. El primer y segundo carril corresponden al RNAm de los grupos tratados con vehiculo o ciclosporina, el tercero al RNA total de cerebro, mientras que los siguientes doce carriles corresponden al RNA total extraído del riñón de ratas tratadas con vehiculo o ciclosporina.

La imagen inferior corresponde a la hibridación de la β -actina que se utilizó como gen control, siendo de tan solo 30 seg de exposición y en donde se observó una expresión similar entre el RNAm y entre el RNA total.

Las imágenes superior y media corresponden a la hibridación de NOS I durante una exposición de 3 y 13 h respectivamente.

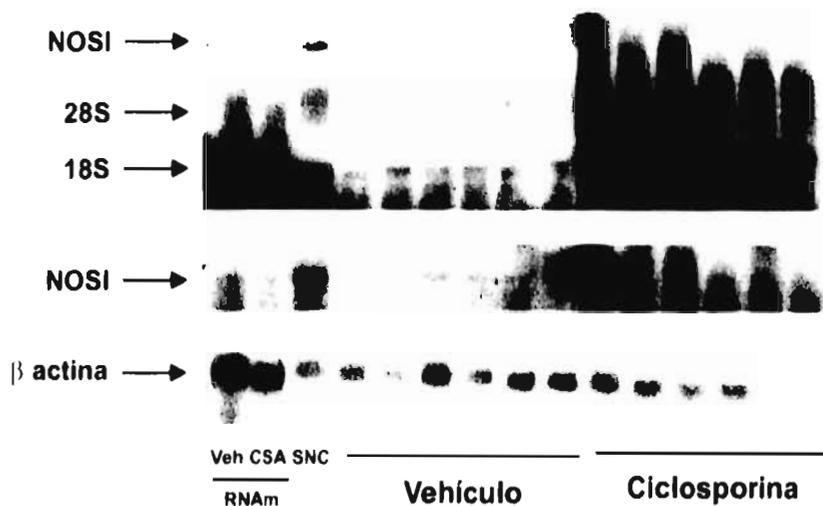


Figura 11. Expresión génica de la NOS I en el RNA de riñón

En el tercer carril de la imagen superior, se observó una banda de 10.5 Kb correspondiente a la NOS I en RNA de cerebro, pero este tiempo de exposición no fue suficiente para observar la expresión en el RNA total de riñón. Cuando el tiempo de exposición fue mayor (13 h), la banda de NOS I se pudo apreciar tanto en el RNAm como en el RNA total del riñón de las ratas tratadas con vehiculo, sin embargo no pudimos detectar la expresión en el riñón de las ratas tratadas con CsA debido a que se observó una hibridación inespecífica a nivel del RNA ribosomal.

En el RNAm de cada grupo se observó una tendencia a la disminución de la expresión de esta isoforma, sin embargo, no es posible realizar el análisis estadístico de la densitometría de esta isoforma, debido a que cada grupo está compuesto por un solo resultado.

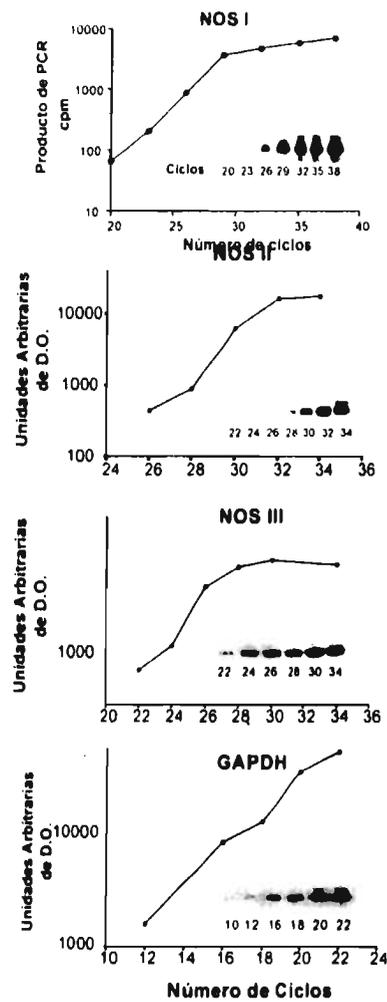
Con los resultados obtenidos con el análisis de Northern blot decidimos que esta metodología no era suficientemente sensible como para determinar la expresión de las sintetasas de óxido nítrico en el riñón por lo que decidimos utilizar la metodología de la reacción de la polimerasa en cadena semiquantitativa (RT-PCR).

PCR semiquantitativa.

d. Determinación de la fase exponencial

Para llevar a cabo la PCR semiquantitativa se determinó la fase exponencial para cada par de iniciadores de las sintetasas de óxido nítrico y del gen control. En la figura 12 se muestran las cinéticas de cada reacción en las cuales se graficó en escala logarítmica las cuentas por minuto o las unidades arbitrarias de la densidad óptica del producto obtenido por PCR contra el número de ciclos, además cada gráfica muestra el inserto la imagen autoradiográfica. Como se puede observar cada cinética tiene una fase exponencial y una fase de meseta. Para amplificar cada fragmento de cada una de las sintetasas neuronal, inducible y endotelial y del gen control en forma

Figura 12. Cinéticas de amplificación por PCR a partir de RNA total de riñón



rutinaria se eligieron los siguientes ciclos 24, 26, 28 y 13 ciclos respectivamente.

e. Sensibilidad de la PCR semiquantitativa.

Una vez que se estableció la fase exponencial, se comprobó la sensibilidad del método: 1) utilizando diferentes tejidos con diferentes niveles de expresión, 2) utilizando diferentes cantidades de DNAc obtenido por la TR del RNA total de riñón.

1) Para la NOS I se utilizaron los siguientes tejidos: cerebro, corazón, corteza y médula interna, la figura 13 muestra la imagen digitalizada de la placa autorradiográfica mostrando los diferentes niveles de expresión de la NOS I en los tejidos antes mencionados, y donde podemos apreciar claramente como esta

metodología detecta los diferentes niveles de expresión en los tejidos estudiados, siendo el cerebro, como era de esperarse, el tejido que muestra mayor expresión de esta isoforma y la médula interna la de menor expresión de esta isoforma. En el caso de la NOS III se utilizaron también diferentes tejidos como: cerebello, corazón, riñón completo y médula.

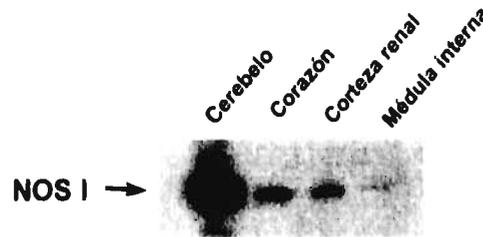


Figura 13. Expresión de NOS I en diferentes tejidos

2) Para validar esta técnica, se utilizaron diferentes cantidades de DNAc obtenido a partir de la TR de RNA y con

cada par de iniciadores se determinó la correlación entre la concentración de DNAc y el producto obtenido por PCR durante la fase exponencial utilizando el número de ciclos previamente determinado

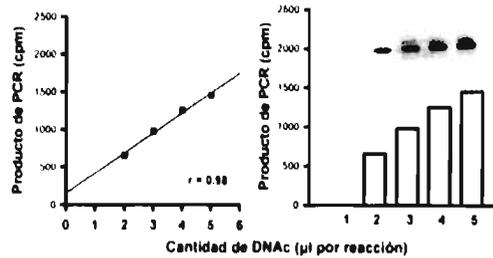


Figura 14. Amplificación de NOS I a partir de diferentes cantidades de DNAc

para cada par de iniciadores. La figura 14 muestra la relación obtenida para el par de oligonucleótidos que amplifica un fragmento de la NOS I, como puede observarse existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de producto obtenido con respecto a la concentración inicial de DNAc.

Una vez que se validó la PCR semiquantitativa para cada una de las sintetasas de óxido nítrico neuronal, inducible y endotelial, procedimos a determinar la expresión génica de cada una de ellas en el tejido renal para los grupos que recibieron vehículo o ciclosporina.

f. Expresión génica de NOS I

La expresión génica de la sintetasa de ON neuronal en el riñón de animales tratados con vehículo o ciclosporina se muestra en la figura 15. En esta figura y en las dos posteriores las barras blancas representan al grupo control, mientras que las barras negras al grupo que recibió ciclosporina.

En cada figura, la gráfica en la parte izquierda muestra la expresión de cada una de las sintetasas de ON y en la derecha la expresión del gen control, así mismo,

en cada grafica se insertó la imagen digitalizada de la placa autoradiográfica del gel de acrilamida.

Como podemos observar los niveles de RNAm de la sintetasa de ON neuronal tendieron a aumentar en las ratas tratadas con ciclosporina, sin embargo la diferencia

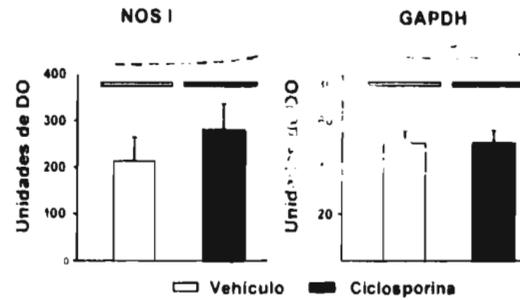


Figura 15. Expresión Genica de la NOS I en ratas tratadas con vehiculo y ciclosporina.

no fue estadísticamente diferente, mientras que los niveles de RNAm del gen control no se modificaron.

g. Expresión génica de NOS II

La figura 16 muestra la imagen digitalizada de la placa autoradiográfica de la PCR para la sintetasa inducible de óxido nítrico (NOS II) de las ratas tratadas con vehiculo o ciclosporina.

Como puede apreciarse solo en tres tejidos renales de cada grupo se detectó la presencia de esta isoforma, a pesar de que el fragmento del gen control se amplificó

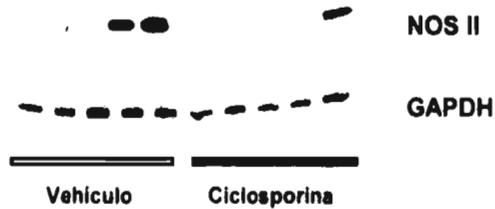


Figura 16. Expresión Genica de la NOS II en ratas tratadas con vehiculo y ciclosporina.

en todas las muestras sin diferencias en ambos grupos, por lo tanto estos resultados no nos permitieron determinar la expresión de esta isoforma en el RNA total de riñón de estos animales.

h. Expresión génica de NOS III

La figura 17 muestra la expresión de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (NOSIII) y del gen control el GAPDH, evaluados por PCR semiquantitativa en el riñón de las ratas tratadas con vehículo

o ciclosporina, nuevamente esta

figura muestra en

forma gráfica las unidades arbitrarias de densidad óptica \pm el error standard obtenidas para cada grupo y el inserto de la imagen digitalizada de la placa autoradiográfica de cada una de las reacciones de cada grupo. Como podemos observar en el grupo tratado con ciclosporina se observó un aumento significativo de 2.5 veces en la expresión de la sintetasa de óxido nítrico endotelial comparado con el grupo control. Mientras que la expresión del gen control no se modificó.

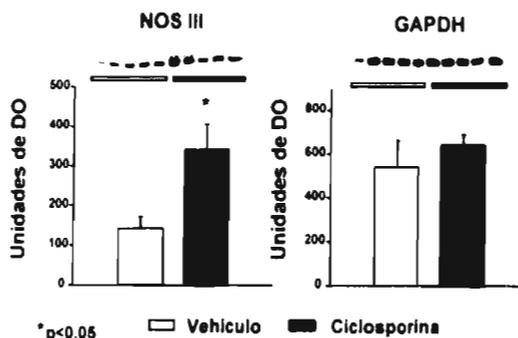


Figura 17. Expresión Génica de la NOS III en ratas tratadas con vehículo y ciclosporina

DISCUSION

No se han establecido claramente los mecanismos responsables de la vasoconstricción inducida por ciclosporina. Diversos estudios han demostrado que la administración de ciclosporina estimula la producción de factores vasoconstrictores como lo son la endotelina, el tromboxano A₂ y la angiotensina II (16-18), e inhibe la liberación de la prostaciclina (14-15). Sin embargo, no se ha definido la participación del óxido nítrico, un importante vasodilatador que mantiene la función renal.

En estudios llevados a cabo con cultivos de células endoteliales mostraron que la exposición a ciclosporina produce daño a nivel celular (26-27). Varios estudios *in vitro* han reportado que la CsA reduce la vasodilatación inducida por acetilcolina en los anillos de aorta y arteria renal precontraídos con norepinefrina, sugiriéndose así una deficiencia en la síntesis de ON (31-33). Sin embargo en estudios más recientes realizados con anillos de arteria mesentérica se observó que la respuesta a acetil colina se normaliza cuando las arterias son pretratadas con superóxido dismutasa lo que sugiere la producción de ON es normal, pero la CsA acentúa la producción de radicales libres, los cuales inactivan al ON producido por el endotelio (34).

Por otra parte, estudios previos de nuestro laboratorio donde se evaluó la respuesta aguda hemodinámica renal a la inhibición de la síntesis de ON con NAME o a la estimulación con la infusión de arginina en ratas tratadas con ciclosporina mostraron que ambas respuestas fueron similares a las observadas en el grupo control, lo que sugiere que la capacidad del endotelio renal para producir ON es preservada (37). Así mismo, recientemente Amore et al (35) y López Ongil et al (36)

mostraron que la presencia de ciclosporina en homogenados de riñón y en células endoteliales de aorta respectivamente, aumenta la actividad de las sintetasas de óxido nítrico. Estos estudios sugieren que durante la nefrotoxicidad por Ciclosporina la liberación de ON es normal o inclusive puede estar aumentada.

El presente estudio fue llevado a cabo para caracterizar la contribución de ON durante la vasoconstricción inducida por la administración de ciclosporina en la rata. Para lo cual se evaluó el efecto de la inhibición crónica de la síntesis de ON sobre la hemodinámica y la histología renal en ratas uninefrectomizadas tratadas con ciclosporina, este modelo de uninefrectomía se utilizó porque en él se reproducen los cambios funcionales e hipertróficos similares a los que se observan en los pacientes que reciben trasplante (71-72). Además, se determinó el nivel de expresión renal de cada una de las sintetasas de óxido nítrico: neuronal, inducible y endotelial (NOS I ; II y III respectivamente) en los grupos que recibieron vehículo o ciclosporina.

Con el fin de determinar si la vasoconstricción renal inducida por ciclosporina es mediada por una deficiencia en la síntesis de ON o por otros mecanismos se evaluó el efecto de la inhibición de la producción de ON con NAME en ratas tratadas con ciclosporina. Considerando las siguientes hipótesis: si la síntesis de ON está suprimida por ciclosporina, la administración de NAME no acentuará la vasoconstricción renal existente; si la síntesis de ON está parcialmente suprimida, el efecto vasoconstrictor de NAME será moderado; pero si la síntesis de ON se encuentra preservada o aumentada la administración crónica de NAME acentuará la vasoconstricción renal inducida por ciclosporina.

En este estudio encontramos que en las ratas tratadas con CsA, la inhibición crónica de la síntesis de ON produjo elevación de la presión arterial y mayor

vasoconstricción renal que en el grupo control, la cual fue desproporcionalmente mayor en la vasculatura preglomerular. La elevación de la resistencia aferente fue significativamente mayor que la elevación en la resistencia eferente lo que previno la transmisión del aumento en la presión arterial al capilar glomerular. Este efecto característico fue diferente al observado en el grupo control, en el cual se observó una elevación proporcional en las resistencias pre y pos glomerulares y en la presión capilar glomerular. Este efecto particular del NAME sobre el grupo tratado con ciclosporina sugiere que el ON tiene una participación proporcionalmente mayor en mantener el tono vascular preglomerular que en condiciones normales. En apoyo a esta elucidación, los estudios de microscopía de luz demostraron que los cambios estructurales vasculares y la trombosis glomerular fueron mayores en el grupo con inhibición crónica de ON y tratamiento con ciclosporina (CsA+NAME) con respecto al resto de los grupos.

Por otra parte, el tono de las células mesangiales puede ser indirectamente evaluado *in vivo* por los cambios en el coeficiente de ultrafiltración (Kf), el cual es el producto de la permeabilidad por el área de filtración que es determinado por el tono de las células mesangiales (66). La nefrotoxicidad por ciclosporina se asoció con una reducción moderada del Kf, el cual presentó valores mucho menores cuando se inhibió la síntesis de ON. Un efecto similar sobre el Kf fue observado en el grupo control tratado crónicamente con NAME, lo que sugiere que el ON participa en mantener el tono mesangial en ambos grupos.

Estos hallazgos apoyan la idea de que la síntesis de ON esta preservada y juega un papel importante en mantener el tono vascular y la función renal durante la nefrotoxicidad por ciclosporina.

Con el fin de diferenciar la vía de la producción de ON durante la vasoconstricción inducida por ciclosporina, se determinó el nivel de expresión de las sintetasas de ON mediante RT-PCR semiquantitativa. Nosotros elegimos esta metodología, dado que ofrece la posibilidad de detectar cambios en los niveles de expresión de RNAm poco abundantes como es el caso de las sintetasas de ON en el riñón.

El ON producido por la sintetasa de ON neuronal en la mácula densa está directamente involucrado en el control local del tono vascular y de la secreción de renina (53-56). Cambios en la concentración de NaCl sentidos por las células de la mácula densa determinan la expresión de la NOS neuronal: una concentración baja de NaCl en el fluido que llega a la mácula densa estimula la expresión de esta isoforma mientras que una concentración alta de NaCl la suprime (55-56). Previamente observamos que aunque la filtración glomerular por nefrona estaba muy disminuida en las ratas tratadas con CsA, también la reabsorción fraccional de sodio en el túbulo proximal estaba reducida (37), lo cual tiende a mantener constante la llegada de sodio a la macula densa sin que cambie la expresión de NOS I. En este estudio los niveles de RNAm de esta isoforma no fueron diferentes en las ratas controles y en las ratas tratadas con ciclosporina, lo que sugiere que el ON producido por la mácula densa no es suprimido por la administración de ciclosporina.

La expresión de la sintetasa de ON inducible (NOS II) es regulada por estímulos inflamatorios e inmunológicos (67,73), por lo que los niveles de RNAm de esta isoforma pueden variar considerablemente de un animal experimental a otro. En el presente estudio observamos la variabilidad esperada tanto en el grupo control como en el que recibió ciclosporina. Por lo que, con los resultados obtenidos no

podemos establecer la participación de esta isoforma en la nefrotoxicidad por ciclosporina.

El ON liberado por las células endoteliales es el responsable de la reducida resistencia vascular que caracteriza la circulación renal y por lo tanto contribuye a regular el flujo plasmático glomerular. La fricción (shear stress) ejercida del flujo sanguíneo sobre la superficie luminal del endotelio es considerada el estímulo más importante para la liberación de ON por las células endoteliales (38, 73). En el presente estudio encontramos un aumento significativo de 2.5 veces en los niveles de RNAm de la NOS III en las ratas tratadas con ciclosporina con respecto al grupo control, este aumento en la expresión génica de la isoforma endotelial sugiere que a nivel renal hay un incremento en la síntesis de ON por las células endoteliales, lo cual está de acuerdo con los resultados que obtuvimos en la hemodinámica glomerular y en la histopatología.

El incremento en el RNAm de la NOS III puede ser el resultado de un efecto directo y/o indirecto. El primer mecanismo puede ser derivado de un efecto directo de la CsA a nivel transcripcional y/o estabilización del RNAm endotelial. Recientemente López Ongil et al. (36) mostraron en células de aorta de bovino que la ciclosporina aumentó la producción de ON; lo cual correlacionó con un incremento del RNAm, la proteína y la actividad de la NOS endotelial, lo que sugiere que la ciclosporina por sí misma puede estimular la expresión de el gen de la NOS III. El segundo mecanismo puede resultar de la vasoconstricción inducida por ciclosporina, lo cual produce una disminución del diámetro del vaso a flujo constante incrementándose así la fricción a las células endoteliales y como resultado de este estímulo se produce un aumento en la expresión de esta isoforma. En apoyo a esto

se ha encontrado una sobre-regulación de la NOS endotelial en vasos sanguíneos cerebrales durante la isquemia cerebral (74), sugiriendo que la expresión de esta isoforma puede ser indirectamente regulada por la fricción sobre la capa de células endoteliales resultante de la vasoconstricción.

RESUMEN

- La administración de ciclosporina produjo las alteraciones características de la nefrotoxicidad por ciclosporina.
- La inhibición de la síntesis de ON en los animales tratados con vehículo o CsA produjo elevación de la presión arterial, vasoconstricción renal y disminución del coeficiente de ultrafiltración. Sin embargo, el patrón de vasoconstricción renal fue diferente, en las ratas tratadas con ciclosporina en la que se observó predominantemente vasoconstricción preglomerular, mientras que en el grupo control se observó una elevación proporcional de las resistencias arteriales aferente y eferente.
- Se observaron mayores alteraciones histopatológicas en las ratas tratadas con ciclosporina e inhibición crónica de la síntesis de ON con respecto a los demás grupos.
- Los niveles renales de RNAm de la NOS I no fueron diferentes en las ratas tratadas con vehículo o ciclosporina.
- La expresión renal de la NOS III fue 2.5 veces mayor que en el grupo control.

CONCLUSION

- ◆ Los resultados obtenidos en los estudios hemodinámicos e histopatológicos como también el cambio en el nivel de expresión en la NOS III soportan que durante la nefrotoxicidad por ciclosporina la síntesis de ON esta aumentada contrarrestando predominantemente la vasoconstricción pregomerular y manteniendo la función renal. Así mismo, la ciclosporina no suprimió los niveles de RNAm de la NOS I que representa otra fuente de ON el glomérulo.

BIBLIOGRAFIA

1. Cecka J.M., Terasaki P.I.: The UNS scientific renal transplant registry. Clinical Transplants 1994. Los Angeles CA, UCLA Tissue Typing Laboratory 1994, 1-18.
2. Kopp J.B., Klotman P.E.: Cellular and molecular mechanisms of cyclosporine nephrotoxicity. J. Am. Soc. Nephrol. 1:162-179, 1990.
3. Liu J., Farmer J.D., Lane W.S.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes. Cell 66:807-815, 1991.
4. Schreiber S.L.: Immnophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signalling pathways. Cell 70:365-368, 1992.
5. Morris P.J.: Cyclosporine, Kidney transplantation: principles and practice. 4th edition Philadelphia PA, Saunders, 1994, pp 179-201.
6. Bennet W.M.: The nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. Clin. Nephrol. 43:S3-S7, 1995.
7. Novick A.C., Ho-Hsieh H., Steinmuller D.S. Detrimental effect of cyclosporine on initial function of cadaver renal allografts following extended preservation. Results of randomized prospective trial. Transplantation 42:154-158, 1986.
8. Barros E., Boim M., Ajzen H., Ramos O., Schor N.: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int. 32: 19-25, 1987.
9. Sabatini M., Esposito F., Uccello L., De Nicola L. Alba M., Conte G., Dal Canton A., Andreucci V.E.: Acute effects of cyclosporine on glomerular dynamics. Micropuncture study in the rat. Transp. Proc. 20: 544-548, 1988.
10. Sabbatini M., De Nicola L., Uccello F., Romano G., Papaccio G., Esposito V., Sepe V., Conte G., Fuiano G.: Medium-term cyclosporine renal dysfunction and its reversibility in rats. Am. J. Physiol. 260: F898-F905, 1991.

- 11 Thomson S.C., Tucker B.J., Gabbaï F., Blantz R.C.: Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J. Clin. Invest.* 83: 960-969, 1989.
- 12 Mihatsch M.J., Ryffel B., Gudat F.: The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 48: S63-S69, 1995.
- 13 Myers B.D., Ross J.C., Newton L.D.: Cyclosporine associated chronic nephropathy. *N. Eng. J. Med.* 311:699-705, 1984.
- 14 Meyer-Lehnert H., Schrier R. W.: Cyclosporine A enhances vasopressin induced Ca^{2+} mobilization and contraction in mesangial cells. *Kidney Int.* 32:19, 1987.
- 15 Meyer-Lehnert H., Schrier R. W.: Potential mechanisms of cyclosporine A induced vascular smooth muscle contraction. *Hypertension* 13:352-360, 1989.
- 16 Perico, N., Benigni, A., Zoja, C., Delaini, F., Remuzzi, G.: Functional significance of exaggerated renal thromboxane A_2 synthesis induced by cyclosporine. *A. Am. J. Physiol.* 251: F581-F587, 1986.
- 17 Kon, V., Sugiura, M., Inagami, T., Harvie, B. R., Ichikawa, I., Hoover, R. L.: Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int.* 37: 1487-1491, 1990.
- 18 Perico, N., Benigni, A., Bosco, E., Rossini, M., Orisio, S., Ghilardi, F., Piccinelli, A., Remuzzi, G.: Acute cyclosporin A nephrotoxicity in rats: Which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins? *Clin. Nephrol.* 25: S83-S88, 1986.
- 19 Stahl R. A. K., Adler S., Baker P. J., Johnson R.G., Chen Y.P., Pritzl P., Couser W.G.: Cyclosporine A inhibits prostaglandin E_2 formation by rat mesangial cells in culture. *Kidney Int.* 35:1161-1167, 1989.
- 20 Rutledge W., Levi G., Wong P. Y., Skorecki K.: Structural specificity and biochemical locus for Cyclosporine A induced inhibition of prostaglandin production in glomerular mesangial cells in culture. *Clin. Res.* 38:275, 1990.

21. Tufro-McReddie A., Gómez A., Norling L.L., Omar A.A., Moore L.C., Kaskel F.J.: Effect of CsA on the expression of renin and angiotensin type 1 receptor genes in the rat kidney. *Kidney Int* 43: 615-622, 1993.
22. Murray B.M., Paller M.S., Ferris T.F.: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int.* 28: 767-764, 1985.
23. Marsden P.A., Brenner B.M.: Nitric oxide and endothelins: Novel autocrine/paracrine regulators of the circulation. *Sem Nephrol* 11: 169-185, 1991.
24. Yanakisawa M., Kurihar H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui M., Goto K., Masaki T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
25. Kon V., Yoshioka T., Fogo A., Ichikawa I.: Glomerular actions of endothelin in vivo. *J. Clin. Invest.* 83: 1762-1767, 1989.
26. Law D.C.W., Wong K.L., Hwang W.S.: Cyclosporine toxicity on cultured rat microvascular endothelial cells. *Kidney Int.* 35: 604-613, 1989.
27. Zoja C., Ghilardi F., Zilio P., Benigni A., Remuzzi G.: Cyclosporine-induced endothelial cell injury. *Lab. Invest.* 55: 455-462, 1986.
28. Awazu M., Sugiura M., Inagami T., Ichikawa I., Kon V.: Cyclosporine promotes glomerular endothelin binding sites in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 1253-1258, 1991.
29. Perico N., Remuzzi G.: Role of endothelin in glomerular injury. *Kidney Int.* 43: S76-S80, 1993.
30. Fogo A., Hellings S. E., Inagami T., Kon V.: Endothelin receptor antagonism is protective in acute cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 42: 770-774, 1992.
31. Diederich, D., Yang, Z., Lüscher, T. F.: Chronic cyclosporine therapy impairs endothelium-dependent relaxation in the renal artery of the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2:1291-1297, 1992.
32. Takenaka, T., Hashimoto, Y., Epstein, M.: Diminished acetylcholine-induced vasodilation in renal microvessels of cyclosporine-treated rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3:42-50, 1992.

33. Gallego, M. J., López Farré, A., Riesco, A., Montón, M., Grandes, S.M., Barat, A., Hernando, L., Casado, S., Caramelo, C.A.: Blockade of endothelium-dependent responses in conscious rats by cyclosporine A: effect of L-arginine. *Am. J. Physiol.* 264:H708-H714, 1993.
34. Diederich, D., Skopec, J., Diederich, A., Dai, F. X.: Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hipertension.* 23:957-961, 1994.
35. Amore, A., B. Gianoglio, D. Ghigo, L. Peruzzi, M. G. Porcellini, F. Bussolino, C. Costamagna, G. Cacace, G. Picciotto, G. Mazzucco, L.M. Sena, R. A. Coppo.: Possible role for nitric oxide in modulating the functional cyclosporine toxicity by arginine. *Kidney. Int.* 47:1507-1514, 1995.
36. López-Ongil, S., Saura, M., Rodríguez-Puyol, D., Rodríguez-Puyol, M., Lamas, S.: Regulation of endothelial NO synthase expression by cyclosporin A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 271: H1072-H1078, 1996.
37. Bobadilla, N. A., Tapia, E., Franco, M., López, P., Mendoza, S., García-Torres, R., Alvarado, J. A., Herrera-Acosta, J.: Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 46:773-779, 1994.
38. Ignarro L., F. Murad.: Nitric Oxide, Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications. San Diego, California. Academic Press Inc. 1995:71-85.
39. Brecht, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H.: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 351:714-718, 1991.
40. Lyons, C.R., Orloff, G.J., Cunningham, J.M.: Molecular cloning and functional expression of and inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267:6370-6374, 1992.
41. Sessa, W.C., Harrison, J.K., Barber, C.M., Zeng, D., Durieux, M.E., D'Angelo, D.D., Lynch, K.R., Peach, M.J.: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267:15274-15276, 1992.

42. Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., Michel, T.: Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6348-6352, 1992.
43. Bachmann S., Bosse H.M., Mundel P.: Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am. J. Physiol.* 268:F885-898, 1995.
44. Mundel, P., Bachmann, S., Bader, M., Fischer, A., Kummer, W., Mayer, B., Kriz, W. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int.* 42:1017-1019, 1992.
45. Tojo A., Gross S.S., Zhang L., Tisher C.C., Schmidt H.H., Wilcox C.S., Madsen K.M.: Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney reactive
46. Wilcox, C. S., Welch, W. J., Murad, F., Gross, S. S., Taylor, G., Levi, R., Schmidt, H. H. H. W.: Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11993-11997, 1992.
47. Terada Y., Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F.: Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. *J. Clin. Invest.* 90: 659-655, 1992.
48. Ujie, K., Yuen, J., Hogarth, L., Danzinger, R., Star, R. A.: Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 267:F296-F302, 1994.
49. Ahn K. Y., Mohaupt M. G., Madsen K.M., Kone B.C.: In situ hybridization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 267:F748-757, 1994.
50. Mohaupt M. G., Elzie J. L., Ahn K. Y., Clapp W. L., Wilcox C. S., Kone B. C.: Differential Expression and induction of mRNA encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int.* 46:653-665, 1994.

51. Morrisey, J. J., McCracken, R., Kaneto, H., Vehaskary, M., Montani, D., Klahr, S.: Location of and inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney International*. 45:998-1005, 1994.
52. Tojo A., Garg L. C., Guzman N. C., Tisher C.C., Madsen K.M.: Nitric oxide inhibits bafylomicin-sensitive H⁺-ATPase activity in cortical collecting duct. *Am J. Physiol.* 267:F509-515, 1994.
53. Thorup, C., Persson, A. E. G.: Macula densa derived nitric oxide in regulation of glomerular capillary pressure. *Kidney Int.* 49:430-436, 1996.
54. Singh, I., Grams, M., Wang, W. H., Yang, T., Killen, P., Smart, A., Schnermann, J., Briggs, J. P.: Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am. J. Physiol.* 270:F1027-F1037, 1996.
55. Beierwaltes, W. H.: Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. *Am. J. Physiol.* 269:F134-F139, 1995.
56. Schriker, K., Hamann, M., Kurtz, A. Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am. J. Physiol.* 269:F825-F830, 1995.
57. Baylis, C., Harton, P., Engels, K.: Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1:875-881, 1990.
58. Zatz, R., De Nucci, G.: Effect of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am. J. Physiol.* 261: F360-F363, 1991.
59. Saura, M., López, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., Lamas, S. Regulation of inducible nitric oxide synthase in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int.* 47:500-509, 1995.
60. Morrisey, J. J., McCracken, R., Kaneto, H., Vehaskary, M., Montani, D., Klahr, S.: Location of and inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney International*. 45:998-1005, 1994.

61. Fujihara, C.K., De Nucci, G., Zatz, R.: Chronic nitric oxide synthase inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1498-1507, 1995.
62. Vurek, G.G., Pegram, S.E.: Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin. *Anal. Biochem.* 16:409-419, 1966.
63. Davidson, W.D., Sackner, M.A.: Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J. Lab. Clin. Med.* 62:351-356, 1963.
64. Viets, J.W., Deen, W.M., Troy, J.L., Brenner, B.M.: Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 88:513-521, 1978.
65. Baylis, C., Deen, W.M., Myers, B.D., Brenner, B.M.: Effect of some vasodilator drugs on transcapillary fluid exchange in renal cortex. *Am. J. Physiol.* 230:1148-1158, 1976.
66. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. Eds. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:7-7.15.
67. Morrissey, J. J., McCracken, R., Kanelo, H., Vehaskary, M., Montani, D., Klahr, S.: Location of and inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney International* . 45:998-1005, 1994.
68. Ujje, K., Yuen, J., Hogarth, L., Danzinger, R., Star, R. A.: Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 267:F296-F302, 1994.
69. Bobadilla, N. A., J. P. Herrera, A. Merino, G. Gamba.: Semi-quantitative PCR: A tool to study low abundance messages in the kidney. *Arch. Med. Res.* 1: 55-60, 1997.
70. Rocco M.V., Neilson, E.G., Hoyer, J.R., Ziyadeh, F.N.: Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol.* 262:F679-F686, 1992.

71. Gillum, D. M., L. Truong, J. Tasby, W.N. Suki.: Effects of uninephrectomy and high protein feeding in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 36:194-200, 1989.
72. Winston, J.A., R. Feingold, R. Safirstein. Glomerular hemodynamics in cyclosporine nephrotoxicity following uninephrectomy. *Kidney Int.* 35:1175-1182, 1989.
73. Brenner B.M., F.C. Rector.: The Kidney. Philadelphia. W.B. Saunders Company. 1996:713-753.
74. Zhang, Z.G., M. Chopp, C. Zaloga, J.S. Pollock, U. Försterman.: Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 24:2016-2021, 1993.

AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

Cada una de las ratas se anestesió con pentobarbital sódico y se extrajeron los órganos de interés, se rebanaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA y se mantuvieron congelados a -70°C . Se tomó aproximadamente 0.5 g de cada tejido de cada rata y se suspendió en 8 ml de una solución de tiocianato de guanidina fría. Con un cavitron se homogenizó perfectamente el tejido 3 veces durante 15 seg; se agregó 400 μl de sarcosil al 10%, después de 30 min. el homogenado se colocó en un tubo de plástico que contenía 4 ml de cloruro de cesio. Los tubos se colocaron en una ultracentrifuga a 29000 r.p.m. durante 18 horas. Al día siguiente, se descartó el sobrenadante y en el fondo del tubo se pudo apreciar el botón de RNA total, se cortaron los tubos a una distancia de dos cm del botón, y se lavó con 300 μl de agua, el botón se resuspendió en 600 μl de agua, se agitó en vortex, se mantuvo en hielo y se esperó a que el RNA se solubilizara. Se determinó la concentración por espectrofotometría de UV. El RNA obtenido se corrió en un gel de agarosa para corroborar que se encontrara en buenas condiciones y visualizar las bandas 28 y 18s.

- El RNA se precipitó con 3 V de etanol al 100% y 0.1 V de acetato de sodio 3M pH= 5.2 y se mantuvo a -20°C .
- Al día siguiente se centrifugó a 12 000 r.p.m., 30 min., a 4°C .
- Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 μl de etanol al 70%, se centrifugó a 12 000 r.p.m. 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- Por un sistema especial de vacío (speed back) el RNA se secó y después se resuspendió con la cantidad de agua necesaria para obtener una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ la cual fue determinada por espectrofotometría de UV.
- Este procedimiento se realizó con cada uno de los tejidos obtenidos de cada rata. El RNA total obtenido se almacenó a -70°C .

Isotiocianato de guanidina. Para preparar 8 ml:

- Isotiocianato de guanidina 4M: 3.78 gr
- Citrato de Sodio 25mM : 200 μl de Citrato de Sodio 1 M, pH=7.0
- Llevar a 8 ml con agua grado HPLC
- Calentar para disolver (40°C). Enfriar en hielo.
- β -mercaptoetanol al 0.7% : 56 μl (agregar este reactivo hasta que la guanidina este fría y lista para usarse).
- Esterilizar por filtración.

Cloruro de Cesio. Para preparar 4 ml:

- CsCl 5.7 M: 3.83 gr
- Acato de sodio 25 mM: 33.3 μl de acetato de sodio 3M pH=5.2
- Llevar a 4 ml con agua grado HPLC
- Esterilizar por filtración.

Obtención del RNA mensajero con oligo dT a partir del RNA total de riñón.

1. Suspender 50 mg de oligo dT en 5 ml de buffer de elución.
2. Vaciar la suspensión en una columna plástica para cromatografía.
3. Agregar 7 ml de buffer de unión.
4. Disolver 500 μ g de RNA total en 300 μ l de H₂O B.M.
5. Calentar a 65°C durante 4 min, enfriar a 4°C y llevarlo a T.A.
6. Agregar 1.2 ml de buffer de unión y vaciarlo en la columna.
7. Lavar con 200 μ l de buffer de unión.
8. Recolectar el eluante y calentarlo a 65°C durante 4 min., enfriar a 4°C y llevarlo a T.A, volviendo a colocarlo en la columna.
9. El eluante se recolecta nuevamente y se guarda a -70°C.
10. Lavar la columna con 5ml de buffer de unión y luego 5ml de buffer de lavado
11. Etiquetar 5 tubos del 1 al 5
12. Agregar a la columna 400 μ l de buffer de elución y recolectarlo en el tubo 1, repetir esta maniobra 5 veces.
13. Precipitar el RNA de cada tubo con 40 μ l de Acetato de Sodio 3M, pH=5.2 y 1ml de etanol al 100% frío.
14. Agitar bien y guardar toda la noche a -20°C.
15. Centrifugar a 12000 r.p.m. a 4°C durante 20 min.
16. Tirar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 70%.
17. Centrifugar a 12000 r.p.m. a 4°C durante 10 min.
18. Tirar todo el sobrenadante.
19. Secar al vacío (speed vac).
20. Resuspender en 32 μ l, esperar 30 min.
21. Tomar 2 μ l y leerlos en el espectrofotómetro y correr un gel de agarosa.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR

Estas reacciones se llevan a cabo en lugares donde no se haya manejado previamente DNA, con material exclusivo para PCR y con puntas con filtro para pipetas automáticas especiales para PCR.

Los iniciadores o primers que se diseñaron para cada una de las isoformas de la sintetasa de óxido nítrico se hicieron y adquirieron de Genosys y del Instituto de Fisiología Celular.

Cada uno de ellos se resuspendió con agua grado PCR para obtener una concentración de 100 μ M, y se tomo la cantidad necesaria de c/u (sentido y antisentido) para obtener una solución 10 μ M que contenía ambos primers.

Para la sintetasa cerebral (I) se utilizó como templado la transcripción reversa del RNA total extraído de cerebro.

Para las isoformas inducible y endotelial se utilizó la transcripción reversa de RNA total de riñón, y a través de una reacción de polimerasa en cadena con la *Taq* DNA polimerasa obtuvimos los fragmentos esperados de 560 y 810 pb respectivamente.

Transcripción reversa de RNA total.

- Se utilizan 10 μ g de RNA total y se llevan a un volumen final de 12 μ l.
- 65 °C, 10 min.
- 2 μ l buffer 10 x para transcripción reversa (strata script buffer, stratagene).
- 1 μ l deoxinucleotidos (dNTPS).
- 2 μ l DTT.
- 1 μ l oligo dT.
- 2 μ l transcriptasa reversa (RT, stratagene).
- 37 °C, 60 min.
- 95°C, 5 min.
- Llevar a un volumen final de 40 μ l.

Reacción en cadena de la polimerasa para el fragmento de la sintetasa cerebral (NOS I).

Para la obtención del fragmento de la sintetasa de óxido nítrico I, se utilizó como templado la transcripción reversa del RNA total de cerebro de rata normal, y las condiciones para la reacción de amplificación fueron las siguientes:

- 2 μ l buffer 10x para *Taq* polimerasa.
- 2 μ l iniciadores o primers.
- 0.4 μ l deoxinucleótidos (dNTPS).
- 11.4 μ l agua.
- 0.2 μ l *Taq* polimerasa.
- 4 μ l DNAC de cerebro.
- 25 μ l de aceite mineral.

Los tubos se colocaron en el ciclador térmico y el cual se programó de la siguiente manera:

- . 1 ciclo, 94°C, 4 min
- . 40 ciclos, 94°C, 1 min, 55°C, 1 min, 72°C, 1 min, 30 seg
- . 1 ciclo, 72°C, 10 min
- . 4°C, α .

Reacción en cadena de la polimerasa para los fragmentos de la sintetasa inducible y endotelial (NOS II y III).

Para la obtención del fragmento de la sintetasas de óxido nítrico II y III, se utilizó como templado la transcripción reversa del RNA total de riñón de rata normal, y las condiciones para la reacción de amplificación fueron las siguientes:

- . 2 μ l buffer 10x para *Taq* polimerasa
- . 2 μ l iniciadores o primers específicos de cada isoforma
- . 0.4 μ l deoxinucleótidos (dNTPS)
- . 13.4 μ l agua
- . 0.2 μ l *Taq* polimerasa
- . 2 μ l DNAC de riñón
- . 25 μ l de aceite mineral

Los tubos se colocaron en el ciclador térmico y se programó de la siguiente manera:

- . 1 ciclo, 94°C, 4 min.
- . 35 ciclos, 94°C 1 min.; 60°C 1 min.; 72°C 2 min.
- . 1 ciclo, 72°C 5 min.
- . 4°C, α .

Al final de cada reacción se corrió un gel de acrilamida para corroborar si se obtuvo el fragmento del peso esperado.

Con las condiciones óptimas para la obtención de los fragmentos de la isoformas I, II y III, se llevaron a cabo simultáneamente varias reacciones para obtener en mayor cantidad cada uno de los fragmentos.

EXTRACCION FENOL CLOROFORMO

1. Se obtuvo un volumen de 150 μ l de la PCR de cada fragmento.
2. 50 μ l de H₂O BM.
3. 100 μ l de fenol y 100 μ l de cloroformo/isoamil
4. Centrifugar 12000 r.p.m., 4 min.
5. Separar fase acuosa (fase superior), aproximadamente 190 μ l.
6. 90 μ l de Acetato de Amonio 7.5 M.
7. 800 μ l de etanol al 100%
8. 20°C durante 20 min.
9. Centrifugar a 12000 rpm, a 4°C durante 30 min.
10. Tirar sobrenadante (SN).
11. Lavar con 800 μ l de etanol al 70%, tirar SN.
12. Centrifugar a 12000 r.p.m., a 4°C durante 10 min.
13. Secar al vacio (Seed Vac) durante 2 min.
14. Resuspender en 20 μ l de H₂O BM.
15. Correr un gel de acrialmida con 1ml.

Una vez que se obtuvieron los fragmentos concentrados de cada isoforma se corrió un gel de agarosa con los 19 μ l restantes para posteriormente extraer el DNAc de agarosa.

EXTRACCION DE DNA A PARTIR DE AGAROSA (Método de Gene Clean)

1. Correr un gel de agarosa para DNA al 2%.
2. Visualizar la banda con luz ultravioleta.
3. Cortarla con una hoja de bisturi y colocarla en un tubo de 1.5 ml, que previamente se peso.
4. Pesar nuevamente el tubo y calcular el peso del fragmento de agarosa.
5. Agregar 2.5 V de NaI y calentarlo a 55°C, hasta que se disuelva.
6. Agregar 5 μ l de silica gel (que previamente se agitó vigorosamente para resuspenderla) y se agita la muestra vigorosamente cada 2 minutos hasta un total de 10 minutos.
7. Centrifugar 10 seg. y tirar el SN.
8. Agregar 500 μ l de solución de lavado (Wash solution) y agitar vigorosamente.
9. Centrifugar 10 seg., tirar el SN, repetir este paso 3 veces.
10. Agregar 20 μ l de H₂O BM.
11. Calentar a 55°C para liberar el DNAc de la silica.
12. Centrifugar 1 min. y pasar el SN a un tubo nuevo.
13. Guardar a -20°C.

INSERCIÓN DEL FRAGMENTO DE NOS I EN UN VECTOR (pBlueskript) EN TERMINACIONES RASURADAS

El plásmido se digirió con la enzima *Sma* y el fragmento de la isoforma I se trató con Klenow fragment de la siguiente manera:

BSK

| | |
|-------------------------------|------------|
| BSK | 2 μ l |
| Buffer Universal para Enzimas | 2 μ l |
| Agua BM | 14 μ l |
| <i>Sma</i> | 1 μ l |
| Volumen total | 20 μ l |

- Dejar a TA 90 min.
- Agregar 1 μ l de fosfatasa alcalina (CIAP, stratagene)
- 60 min a 37°C

NOS I

| | |
|-------------------------------|-------------|
| NOS I | 5.0 μ l |
| Buffer Universal para Enzimas | 1.5 μ l |
| dNTPS | 0.5 μ l |
| Agua BM | 7.0 μ l |
| <i>klenow fragment</i> | 1 μ l |
| Volumen total | 15 μ l |

1. 10 min. a TA
2. 10 min. a 65°C

- Al finalizar tanto el BSK como el fragmento de NOS I se extraen con fenol cloroformo, como previamente se describió.

- Resuspender cada uno en 10 μ l de agua BM y leer la concentración de BSK por medio de espectrofotometría.

Unión de un fragmento a un vector

| | |
|---------------------------|------------|
| NOS I / <i>klenow</i> | 15 μ l |
| BSK / <i>Sma</i> | 1 μ l |
| Buffer de Ligasa | 2 μ l |
| T ₄ DNA Ligasa | 2 μ l |
| Agua BM | 10 μ l |
| Volumen total | 30 μ l |

- 16 °C durante 18 h
- Se toman 5 μ l y se diluyen con 15 μ l de agua BM (dilución 1:4)

TRANSFORMACION DE CELULAS *E. coli* DH5 α

1. Preparar un baño de hielo seco-etanol.
2. Descongelar las células en hielo.
3. Colocar tubos cónicos de 1.5 ml. estériles en hielo.
4. Mezclar las células suavemente y alicuotizar 50 μ l para cada transformación dentro de tubos cónicos fríos.
5. Recongelar las células que no se utilizaron en el baño de hielo seco-etanol y pasar inmediatamente a -70°C (no utilizar nitrógeno líquido).
6. Adicionar de 1 a 3 μ l de la reacción de ligación al tubo que contiene las bacterias, moviendo con la punta de la pipeta para dispersar completamente, tapar y agitar suavemente, preparar un control positivo (BSK) y uno negativo (agua).
7. Incubar las células en hielo durante 30 minutos.
8. Incubar a 37°C durante 20 seg. (Shock térmico). Si se utilizan 100 μ l de bacterias incubar durante 45 seg.
9. Incubar en hielo durante 2 min.
10. Adicionar 950 μ l de medio LB con ampicilina que se encuentre a TA.
11. Agitar a 225 r.p.m. a 37°C durante 60 min.
12. Dispersar el contenido en una placa de medio LB agar con ampicilina.
13. Incubar a 37°C durante 18 a 24 h.
14. Al siguiente día el crecimiento del control negativo es nulo, del positivo es abundantes colonias y si la transformación tubo éxito también se observará crecimiento de algunas colonias.

REACCION DE POLIMERASA EN CADENA DE CELULAS TRANSFORMADAS

Crecieron 3 colonias de las células transformadas con BSK/NOS I con las cuales se llevo a cabo la PCR con los iniciadores de la NOS I de la siguiente manera:

1. En un tubo cónico de 15 ml, poner 2ml de medio LB con 4 μ l de ampicilina (50 mg/ml)
2. Tomar cada una de las colonias con una punta estéril y soltar la punta dentro del tubo, agitando suavemente hasta dispersar la colonia.
3. Incubar a 37°C durante toda la noche.
4. Tomar 5 μ l y agregar 45 μ l de medio LB.
5. Hervir 5 min.
6. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 2 min.
7. Tomar 2 μ l del SN y utilizarlo como templado.
8. Realizar una reacción en cadena de la polimerasa con los iniciadores específicos para el fragmento (como previamente se describió).
9. Correr un gel de acrilamida con los productos de la PCR y determinar cual colonia contiene el fragmento.

**OBTENCION DEL DNAc CIRCULAR A PARTIR DE UN CULTIVO
(Método de Medi-prep)**

1. Tomar 20 μ l de las bacterias y suspenderlas en 2ml de medio LB con ampicilina, incubar de 2 a 4 h a 37°C con agitación (225 r.p.m.).
2. Suspender los 2 ml en 200 ml de medio 2YB-Broth e incubar a 37°C durante 12 h.
3. Transferir el medio cultivado a un frasco de nalgeno con rosca y tapa y centrifugar a 6 K por 10 min. a 4°C.
4. Desechar el SN y resuspender la pastilla en 4ml de Solución I, dejar a TA durante 10 min. y transferir la suspensión a un tubo cónico de nalgeno para centrifuga.
5. Agregar 8 ml de la Solución II (la cual se prepara en el momento) y mezclar por inversión, incubar 10 min. a 4°C.
6. Agregar 6 ml de la Solución III, mezclar por inversión y dejar en hielo 10 min.
7. Centrifugar a 16 k durante 20 min.
8. Remover el SN, lavar la pastilla con etanol al 70%, tratando de no resuspender. Resuspender la pastilla con 4 ml de TE; agregar 4.4 g de CsCl y mezclar. Transferir la mezcla a viales (Sorvall 03945) a los cuales previamente se les agregó 400 μ l de bromuro de etidio. Asegurarse de que se llenen completamente y de que no se formen burbujas. Si es necesario preparar una solución de CsCl
9. Sellar los viales con calor y centrifugar durante 18 h en una ultracentrifuga a 57 K.
10. Colocar el vial en una gradilla e iluminar con luz UV, introducir en la parte superior del vial una aguja, pueden distinguirse dos anillos, el superior que corresponde al DNA lineal y el inferior al DNA circular también se puede observar el RNA que se encuentra en el fondo y en la pared del tubo; remover cuidadosamente el DNAc circular utilizando una jeringa y transferirlo a un tubo cónico de 1.5 ml.
11. Para quitar el bromuro de etidio, se extrae el DNAc circular con n-butanol+SDS 10% (9:1). Extraer 3 veces en una proporción 1:1 (2ml de la muestra con 2 ml de la solución de extracción). Agitar y esperar a que se separen las fases.
12. Descargar la fase púrpura superior en el lugar de desechos peligrosos.
13. Diluir la muestra con 3 volúmenes de agua y precipitar con 2.5 volúmenes de etanol al 100% a TA (si el etanol se agrega frío el CsCl puede precipitarse), el volumen total será de aproximadamente 30 ml.
14. Poner en el hielo.
15. Centrifugar a 12000 r.p.m. a 4°C durante 15 min.
16. Tirar el SN.
17. Secar al vacío.
18. Resuspender con 400 μ l de agua BM.
19. Después de 30 min. unir todas las fracciones en un tubo.

20. Tomar 2 μ l y agregar 498 μ l de agua destilada y leer la concentración en el espectrofotómetro para asegurarse de la cantidad y la calidad. La muestra puede diluirse a una concentración de 1 μ g/ml y almacenar a -20°C para corto tiempo y a -70°C para largo tiempo.

Solución I

Solución II

Solución III

TE pH=7.4

10 mM tris (pH=7.4) - 0.5 ml de Tris IM

1mM EDTA (pH=8) - 0.1 ml de EDTA 0.5M

PREPARACION DE SONDAS NO RADIOACTIVAS

1. Digerir 2 μ l de DNAC de NOS I (medi prep)
 - . 3 μ l de enzima *Xba*
 - . 3 μ l de buffer universal para enzimas
 - . 22 μ l de agua BM
 - . 90 min. a 37°C
 - . Correr un gel de agarosa para DNA
2. Extraer con fenol-cloroformo
 - . Llevar a 100 μ l con agua BM
 - . Agregar 50 μ l de fenol y 50 μ l de cloroformo
 - . Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 4 min.
 - . Separar la fase acuosa, aproximadamente 95 μ l
 - . Agregar 45 μ l de acetato de amonio y 450 μ l de etanol al 100%
 - . Mantener 20 min. a -20°C
 - . Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 30 min.
 - . Tirar el SN, agregar 450 μ l de etanol al 70%
 - . Centrifugar a 12000 r.p.m., 10 min.
 - . Tirar SN y secar al vacio
 - . Resuspender en 11 μ l de agua BM
 - . Tomar 1 μ l y correr un gel agarosa
3. Para construir la sonda
 - . 10 μ l de DNAC digerido y extraido
 - . 5 μ l de rATP
 - . 5 μ l de rCTP
 - . 5 μ l de rGTP
 - . 3.25 μ l de rUTP
 - . 3 μ l de DTT IM
 - . 5 μ l de Buffer de transcripción
 - . 1.75 μ l de digoxigenina
 - . 2 μ l de inhibidor de RNAasa
 - . 1 μ l de T7 DNA polimerasa
 - . Incubar 60 min a 37°C sin agitación
4. Agregar 4 μ l de DNAasa libre de RNAasa
 - . Incubar a 37°C durante 20 min
 - . Agregar 0.5 μ l de EDTA 0.5 M pH=8 (Para detener la reaccion)
 - . 50 μ l de agua BM
 - . Precipitar con 10 μ l de Acetato de Sodio y 330 μ l de etanol al 100%
 - . Guardar a -20°C toda la noche
 - . Centrifugar a 12000 r.p.m., a 4°C durante 30 min

- Tírar el SN agregar 500 μ l de etanol al 70%
- Centrifugar a 12000 r.p.m, a 4°C durante 10 min.
- Tírar el SN y secar al vacío por dos min.
- Resuspender en 20 μ l de agua BM esperar, mantener en hielo y esperar 30 min. antes de utilizar la sonda
- Correr un gel de agarosa para RNA

ANALISIS DE NORTHEN BLOT

Transferencia a la membrana de nylon.

1. Correr un gel de agarosa al 1% para RNA con 15 a 20 μg de RNA total de cada muestra.
2. Preparar el material necesario para la transferencia.
3. Sobre el soporte forrado con papel filtro humedecido con SSC 20x, colocar el gel con los pozos hacia abajo, sacar todas las burbujas que queden atrapadas.
4. Alrededor colocar tiras muy delgadas de parafilm, teniendo mucho cuidado de que no toquen el RNA del gel.
5. Sobre el gel colocar la membrana de nylon y cuatro capas de papel filtro los cuales son del mismo tamaño del gel.
6. Colocar varias capas de papel cortado al tamaño del gel hasta alcanzar una altura de 10 a 15 cm y fijar con masking tape y un plomo.
7. En el fondo del recipiente poner suficiente solución SSC 20x y se deja toda la noche.
8. Retirar el papel y el gel junto con la membrana, colocarla en un papel filtro.
9. Colocar el gel en la lámpara de luz UV poniéndolo hacia abajo (en la posición que se encontraba durante la transferencia).
10. Levantar la membrana y voltearla, marcar las bandas de la guía de RNA y cada canal con el número correspondiente de cada muestra.
11. En esta misma posición introducirla en el UV-linker, para fijar el RNA a la membrana.

Prehibridación

Colocar la membrana en una bolsa, con sus 4 lados sellados, y por un extremo colocar 15 ml de solución de hibridación, sacar todas las burbujas y sellar, colocar la bolsa en un tubo de hibridación e introducir en el horno de hibridación a 60 °C durante dos horas.

Hibridación

Tirar la solución con la que se prehibridó. En 15 ml de solución de hibridación poner 30 ml de la sonda de β -actina y 30 μl de la sonda que se va analizar (ambas sondas previamente se calientan a 83°C durante 3 min.). Colocar esta solución en la bolsa, sacar todas las burbujas, sellar y dejar hibridando toda la noche a 60 °C.

Lavados de la membrana

1. Tirar la solución de hibridación y sacar la membrana de la bolsa (se manipula la membrana con pinzas).
2. Lavar dos veces con 1l de 2x SSCP, 0.1 SDS al 10% a TA durante 5 min con agitación.
3. Lavar dos veces con 1 l de 0.1x SSCP, 0.1 SDS al 10% a TA durante 5 min con agitación a 65°C durante 15 min. con agitación (esta solución previamente se calienta a 65°C).
4. Equilibrar en 300 ml de buffer A durante 15 min a TA.
5. Poner la membrana en una bolsa y agregar 20 ml de buffer B a TA durante 1 h con agitación.

6. Agregar 4 μ l de anticuerpo antidigoxigenina por cada 20 ml de buffer B y agitar 45 min a TA. Centrifugar el anticuerpo durante dos min antes de utilizarlo
7. Lavar dos veces con 1 l de buffer A a TA durante 15 min.
8. Equilibrar en 300 ml de buffer C sin magnesio durante 3 min.
9. Pasar la membrana a una bolsa y sellar; en un tubo cónico 990 μ l de buffer C sin magnesio y 10 μ l de CDP star a TA (para una membrana de 10 x 10 cm se ponen alrededor de 4 ml de esta solución).
10. Sacar todas las burbujas y sellar; incubar a 37°C durante 5 min. (en el horno de hibridación)
11. Sacar la membrana y colocarla en una bolsa nueva, sellar y limpiar la superficie de la bolsa con una gasa con alcohol, ponerla en un cassette de exposición y colocar una placa radiográfica.
12. Dejar exponiendo (para la expresión de la β -actina el tiempo de exposición es de 30 seg. a 1 min.) para la sonda que se analizó se tomaron distintos tiempos de exposición.

SSC 20x (1lt)

175.3 g de NaCl
 88.2 g de citrato de sodio
 disolver
 ajustar el pH=7.0 con aprox
 1.2 ml de HCl 10N
 aforar a 1lt

Solución de hibridación

25 ml de formamida disuelta a 65°C
 2.5 gr de agente bloqueador
 12.5 ml de SSCP 20x pH=7.2
 10 ml de SDS 10%
 500 μ l de sarcosil al 10%
 llevar a 50 ml con agua
 Preparar incubando a 65°C
 enfriar antes de guardar a -20°C

Tris 1M pH=7.2 (1lt)

121 g de tris
 68 ml de HCl
 ajustar el pH

Buffer A (1lt)

100ml de tris 1M pH=7.5
 150 ml de NaCl 1M

Buffer C sin Mg (1lt)

25 ml de tris 1M pH= 9.2

SSCP 20x (1 lt)

140.3 g de NaCl
 88.2 g de Citrato de sodio
 35.4 g de KH_2PO_4
 10.7 g de NaOH
 7.4 g de EDTA

Preparar en frío, dejar agitando toda la noche, llevar a pH=7.2 con HCl
 Agregar 50 ml de SDS 10% y 5g de lauril sulfato y aforar a 1lt

SSCP 2x, 0.1% SDS 10% (1lt)

100 ml de SSCP 20x
 10 ml de SDS 10%

SSCP 0.1x, 0.1% SDS 10% (1lt)

5 ml de SSCP 20x
 10 ml de SDS 10%

Tris 1M pH=9.2

121 gr de tris
 25 ml HCl
 17.5 ml de NaOH 10 N
 ajustar el pH

Buffer B (1lt)

Por cada 50 ml de buffer A agregar
 1 gr de agente bloqueador

25 ml de NaCl 1M

ANALISIS DE DOT BLOT

Preparación de las muestras (2 membranas).

- . Suspender 30 μ g de RNA total en 20 μ l
- . 40 μ l de formamida
- . 14 μ l formaldehido
- . 4 μ l de SSC 20x
- . Incubar a 68°C durante 15 min.
- . 156 μ l de SSC 20x
- . Preparar el dot blot, poniendo de dos a tres capas de papel filtro y la membrana arriba
- . Pasar al vacío dos veces 500 μ l de SSC 10x en cada pozo
- . Hacer el mapa de las muestras
- . Poner 110 μ l de cada muestra en cada pozo y hacer vacío
- . Pasar nuevamente 500 μ l de SSC 10x en cada pozo
- . Marcar la membrana y fijarla con luz UV
- . La **prehibridación** se lleva de la misma manera que en el Northern blot, solo que durante 30 min.
- . La **hibridación** se lleva a cabo por separado con 40 μ l de β -actina y 40 μ l de la sonda a analiza, respectivamente y se sigue el mismo protocolo que para el Northern blot

ANALISIS DE PROTECCION DE RNAasas

Digestión del plásmido (obtenido por medi prep)

Sonda

4 μ l de DNAC

6 μ l de buffer universal para enzimas

44 μ l de agua BM

6 μ l de *Xba*

β -actina

6 μ l de DNAC

4 μ l de buffer

26 μ l de agua BM

4 μ l de *Eco RI*

- . Incubar a 37°C durante 90 min
- . Llevar a 100 μ l con agua BM
- . Extraer con fenol-cloroformo
- . Resuspender en 11 μ l de agua BM
- . Correr un gel de agarosa para DNA con 1 μ l de cada muestra
- . Descongelar el fósforo (32P)
- . A los 10 μ l de β -actina y los 10 μ l de la sonda
- . 9 μ l de agua BM
- . 5 μ l de rATP
- . 5 μ l de rCTP
- . 5 μ l de rUTP
- . 3 μ l de DTT 1M
- . 5 μ l de buffer 10x
- . 5 μ l de GTP 32P
- . 2 μ l de inhibidor de RNAasa
- . 1 μ l de enzima T₃ DNA polimerasa para la sonda de β -actina y T₇ DNA polimerasa para NOS I
- . Incubar a 37°C durante 60 min
- . 3 μ l de DNA libre de RNAasa
- . Incubar a 37°C durante 20 min.
- . 50 μ l de agua BM
- . Extraer con fenol-cloroformo
- . Precipitar dos veces con etanol
- . Resuspender en 50 μ l de BM
- . Esperar 30 min. a 4°C
- . Tomar 1 μ l y en un contador de centelleo contar las c.p.m
- . Preparar los tubos de la curva con a una concentración de 5, 10, 15, 20 y 25 μ g de RNA y llevar a un volumen de 30 μ l con el buffer de hibridación (por lo general la cantidad de RNA debe estar en un volumen de 3 μ l como máximo)
- . Preparar las muestras con una concentración de 15 μ g de RNA total
- . Agregar tanto a la curva como a las muestras 1 μ l de cada sonda (es decir a razón de 500 000 c.p.m.)

ALMACENAMIENTO DE CELULAS TRANSFORMADAS

1. Tomar 0.85 ml de las bacterias cultivadas
2. Agregar 0.15 ml de glicerol
3. Agitar vigorosamente
4. Transferir alícuotas de 100 μ l a tubos cónicos de 1.5 ml etiquetados
5. Congelar en hielo seco/etanol o en nitrógeno líquido
6. Transferir a -70 °C

Medio LB agar/ampicilina

- . Vaciar en un frasco de 1lt, 20 cápsulas de medio LB
- . Llevar a 500 ml con agua destilada
- . Esterilizar durante 20 min.
- . Enfriar a 50 °C
- . Agregar 1 ml de ampicilina (50mg/ml)
- . Vaciar en cajas de petri que se encuentren en un espacio balanceado
- . 5 mg de Azul de Bromofenol (0.25%)
- . 5 mg de Xileno lianol FF (0.25%)
- . Esterilizar por filtración

Gel de agarosa al 1% para DNA (mini)

1. Pesar 0.4 gr de agarosa (grado electroforésis)
2. Resuspenderla en 40 ml de TAE 1X
3. Enfriar a 50 °C
4. Vaciarlo en la cámara, para lo cual previamente se colocó el peine y se balanceo.
5. Esperar 30 min. antes de utilizarlo.
6. Llenar la cámara con TAE 1x.
7. Correr las muestras, las cuales se llevan a un volumen de 10 μ l con H₂O B.M. y se les agrega 2.5 μ l de colorante para DNA.
8. Correr las muestras a 75 V.
9. Suspender el gel en agua que contenga 7 μ l de bromuro de etidio durante 10 min.
10. Lavar 2 veces con agua durante 10 min.

Gel de agarosa para RNA (minigel).

- . En un matraz erlenmeyer para cada 10 ml de gel mezclar:
- . Agarosa 0.1 g
- . Agua destilada 8.5 ml
- . Disolver por calentamiento (horno de microwas 45")
- . Dejar enfriar a 50°C y agregar para cada 10 ml de gel:
- . 1 ml MOPS 10x
- . 0.5 ml Formaldehido

- . Vaciar sobre la caja del gel y dejarlo solidificar cuando menos por 30 min. antes de usarlo
- . Para correr el RNA preparar la siguiente mezcla para cada muestra:
 - . 5 µl Formamida
 - . 1 µl de MOPS 10 x
 - . 2 µl de Formaldehido
 - . 1 µl de Gel Loading
 - . 0.16 µl de Bromuro de Etidio. Br. Et. (10 mg/ml)
- . Mezclar 8.1 µl con 1 o 1.5 µl de RNA
- . Calentar 10 min. a 65 °C
- . Enfriar rápido en hielo y dejarlo a TA.
- . Vaciar las muestras en el gel sumergido en MOPS 1x
- . Corre el gel a 75 V durante 1.5 h.
- . Para desteñir el gel sumergirlo en agua durante 10 min 3 veces.

MOPS 10x 1L

- . 41.86 g MOPS
- . 6.80 g de Acetato de Sodio
- . 20 ml de EDTA 0.5 M
- . pH=7.0 con NaOH 10N
- . Esterilizar por filtración.

Gel loading. Para 2 ml

- . 1 ml de glicerol (50%)
- . 40 µl EDTA 0.5 M pH=8 (10 mM)

GEL DE POLIACRILAMIDA PARA DNA. (mini)

Para preparar 10 ml de gel al 5% agregar:

- . 7.4 ml de agua bidestilada
- . 1 ml de TBE 10x
- . 1.5 ml de Acrilamida (1:29 bis)
- . 100 µl de Persulfato de Amonio (APS) al 10%
- . 10 µl de TEMED

El gel polimeriza en unos minutos después de agregar el catalizador TEMED.

Se debe vaciar rápido el gel, insertar el peine y esperar cuando menos 15 min.

Agregar las muestras y correrlo a 100 V por aproximadamente 40 min.

Para teñirlo poner el gel en un recipiente con 100 ml de agua y 5 µl de Br. Et.

Para desteñir cambiar el agua y esperar 10 min.

Nota: El APS es neurotóxico y es necesario portar guantes durante su manejo. La solución al 10% es estable a 4°C durante una semana.

Participation of adenosine in the renal hemodynamic abnormalities of hypothyroidism

MARTHA FRANCO, NORMA A. BOBADILLA, JORGE SUAREZ, EDILIA TAPIA, LOURDES SANCHEZ, AND JAIME HERRERA-ACOSTA

Departments of Nephrology and Pharmacology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez, Mexico City 14080, Mexico

Franco, Martha, Norma A. Bobadilla, Jorge Suárez, Edilia Tapia, Lourdes Sánchez, and Jaime Herrera-Acosta. Participation of adenosine in the renal hemodynamic abnormalities of hypothyroidism. *Am. J. Physiol.* 270 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 39): F254–F262, 1996.—To investigate the participation of adenosine (ADO) in the abnormalities of renal function associated with hypothyroidism, glomerular hemodynamics were evaluated in normal (NI) and 2-wk thyroidectomized (Htx) rats. Studies were performed before and during intravenous infusion of the ADO blocker 1,3-dipropyl-8-*p*-sulphophenyl xanthine (PSPX, 20 mM, 1.2 ml/h), intra-aortic ADO (100 nmol·kg⁻¹·min⁻¹), or vehicle. In addition, single-nephron glomerular filtration rate (SNGFR) was measured during the infusion of different intrarenal ADO doses (1, 10, and 35 nmol·kg⁻¹·min⁻¹); plasma and renal content of ADO were measured by high-performance liquid chromatography in additional groups. Decreased SNGFR, glomerular blood flow (Q_G), and ultrafiltration coefficient (K_f) were found in Htx rats. PSPX did not modify glomerular hemodynamics in NI rats, in contrast, in Htx rats, the antagonist increased SNGFR, Q_G, and K_f, with a fall in afferent (R_A) and efferent (R_E) resistances. ADO infusion in NI rats produced renal vasoconstriction characterized by a fall in SNGFR, Q_G, and K_f, with an increased R_A and R_E. Paradoxically, in Htx rats, ADO increased SNGFR, Q_G, and K_f, decreasing R_A and R_E. However, when ADO was infused through the renal artery, it induced a 20% reduction of SNGFR at 1 nmol·kg⁻¹·min⁻¹ that rose to control values at 10 nmol·kg⁻¹·min⁻¹ and increased to 38.3% at 35 nmol·kg⁻¹·min⁻¹. Renal ADO content was markedly low in Htx rats (4.37 ± 0.79 and 115.46 ± 14.9 nmol/g wet wt for Htx and NI rats, respectively). Renal vasodilation induced by PSPX in Htx rats suggests predominant activation of A₁ receptors in this condition. The vasodilatory response to exogenous ADO suggests additional activation of A₂ receptors.

tubuloglomerular feedback

HYPOTHYROIDISM, A PATHOPHYSIOLOGICAL condition associated with renal function abnormalities and characterized by renal vasoconstriction, results in decreased glomerular filtration rate (GFR) (4); these hemodynamic changes suggest the presence of a vasoconstrictor substance influencing renal function. Gillum et al. (12) found that administration of an angiotensin antagonist (saralasin) restored renal hemodynamics to normal in 3-wk thyroidectomized rats, suggesting the participation of angiotensin II; however, the role of other vasoactive substances in mediating these renal alterations has not been completely elucidated.

In hypothyroidism, adenosine metabolism is markedly altered; indeed, increase in 5'-nucleotidase activity and decrease in adenosine kinase have been observed in brain tissue (19); moreover, the activities of

5'-nucleotidase and adenosine deaminase in brown and white adipocytes are decreased (16). Because adenosine production and degradation are primarily dependent on the activity of the synthesizing enzyme 5'-nucleotidase and two degrading enzymes, adenosine deaminase and adenosine kinase (31), alterations in these enzymes would result in changes in the overall adenosine concentration. Decreased adenosine content in adipose tissue from hypothyroid rats has been reported, and in these cells sensitivity to adenosine is enhanced (30).

Adenosine has been implicated in the regulation of GFR because of its unique vasoactive properties (24, 31). This nucleoside participates in a variety of renal processes, such as sodium-coupled adenosine transport (17) and stimulation of sodium-glucose (6) and sodium-phosphate symports in the proximal tubule (6). In the thick ascending limb, it induces changes in intracellular calcium concentration (3) and might be involved in activation of the tubuloglomerular feedback (TGF) mechanism (10, 25). In addition, adenosine modulates vasopressin effects on the distal nephron (36). These adenosine effects are mediated mainly by extracellular receptors (20, 24): activation of high-affinity A₁ receptors induces vasoconstriction and decreases adenylate cyclase activity and renin secretion; in contrast, activation of low-affinity A₂ receptors induces vasodilation and increases adenylate cyclase activity and renin secretion (20). In the presence of an abnormal nucleoside metabolism, as in hypothyroidism (16, 19), adenosine production may change or the sensitivity of specific receptors may be altered, as has been described in fat cells from hypothyroid rats (5, 23). Thus the pressor effects of adenosine on the kidney vasculature might contribute to the renal vasoconstriction observed in this condition. Furthermore, because it has been suggested that adenosine participates in the mediation of TGF vasoconstriction signals (10, 25), it is possible that enhanced activity of this mechanism might contribute to renal vasoconstriction (1).

To evaluate the participation of adenosine in the abnormalities of renal function during hypothyroidism, we studied the effect of an A₁ and A₂ adenosine receptor blocker on renal hemodynamics and TGF of hypothyroid rats. In addition, the sensitivity to exogenous adenosine of glomerular hemodynamics was also tested, and plasma and renal adenosine concentrations were determined.

METHODS

Induction of hypothyroidism. Male Wistar rats weighing 250–300 g underwent surgical thyroidectomy with parathyroid reimplant, as previously described (27). Briefly, under

ether anesthesia, the trachea was exposed, and, under stereoscopic microscope (model M5, Wild, Heerbrugg, Switzerland), the parathyroid glands were visualized, dissected from the thyroid gland, and reimplanted into the surrounding neck muscles. The thyroid gland was then carefully dissected, to avoid injury to the laryngeal nerves, and completely excised. The effectiveness of this procedure has been demonstrated previously (27).

Microperfusion studies. Microperfusion studies were performed 12–15 days after thyroidectomy in four groups of rats. *Group I* included seven normal rats used as controls and seven hypothyroid rats. Renal hemodynamics were evaluated in a basal period and during the infusion of the adenosine A_1 and A_2 water-soluble receptor blocker 1,3-dipropyl-8-*p*-sulphophenyl xanthine (PSPX, Research Biochemical International, Natick, MA). A 20 mM solution of this blocker was infused through the jugular vein at the rate of 1.1 ml/h; we previously found that this dose is sufficient to block a $3 \mu\text{M}$ A_2 -cyclopentyladenosine dose (10). *Group II* included seven normal rats and seven hypothyroid rats, in which the activity of the TGF mechanism was evaluated through proximal-distal differences in a basal period and during the infusion of the adenosine blocker. *Group III* included seven normal rats and seven hypothyroid rats, in which microperfusion measurements were carried out in a basal period and during an intra-aortic infusion of adenosine at $100 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Research Biochemical International). *Group IV* included six hypothyroid rats, in which renal hemodynamics were evaluated in a basal period and during intra-aortic infusion of vehicle (0.9% NaCl solution). *Group V* included five normal and five hypothyroid rats, in which total GFR and proximal single-nephron GFR from proximal tubule (SNGFR) were evaluated in a control period and during intrarenal infusion of adenosine at 1, 10, and $35 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

For microperfusion studies, the rats were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg ip), and supplementary doses were instilled as required. The rats were placed on a thermoregulated table, and the temperature was maintained at 37°C . Polyethylene tubing was used to catheterize the trachea (PE-240), both jugular veins and femoral arteries (PE-50), and the left ureter (PE-10). The left kidney was exposed and placed in a Lucite holder, which was sealed, covering the kidney surface with Ringer solution. In all experiments, the intra-aortic catheter was introduced so as to reach 3–4 mm beyond the left renal artery. For direct intrarenal infusion, the suprarenal artery was catheterized as previously described (22). In these experiments, the right kidney was studied, because only the right renal artery has a suprarenal branch. Mean arterial blood pressure was continuously monitored with a pressure transducer (model P23 db; Gould, Hato Rey, PR) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA). Blood samples were taken every 45–60 min and replaced with blood from a normal or hypothyroid donor rat.

Rats were maintained euolemic by infusion of isotonic rat plasma (10 ml/kg body wt) during surgery, followed by an infusion of 10% polyfructosan (Inutest, Laevosan-Gesellschaft, Austria) and 0.9% sodium saline solution, as vehicle, at 1.1 ml/h. After 60 min, 6 timed samples of proximal tubular fluid were obtained to determine flow rate and polyfructosan concentration, intratubular hydrostatic pressure under free-flow and stop-flow conditions and peritubular capillary pressures were measured in other proximal tubules with a servo-null device (Servo-Nulling Pressure System; Instrumentation for Physiology and Medicine, San Diego, CA), as previously described (33). Polyfructosan was measured in plasma samples. Glomerular colloid osmotic pressure was

estimated in protein from blood taken from the femoral artery and surface efferent arterioles.

To evaluate proximal and distal SNGFR, a micropipette containing 1% Lissamine green solution was inserted into a proximal convolution to allow visualization of the proximal and distal segments of the same nephron. Only tubules with three or more proximal convolutions and at least two distal tubular segments were used. After placement of an oil block, fluid was collected, first from the distal segment and later from the proximal tubule, to determine SNGFR in the same nephron. Small amounts of the dye were injected to ensure complete collections. In each animal, three to four nephrons were studied in a control period and three to four during administration of PSPX, in this order.

For the experiments with PSPX, adenosine, and vehicle, a 30-min equilibration period was allowed after the administration of the compounds, before microperfusion studies were repeated. Twenty-minute equilibration periods were allowed between the various concentrations of intrarenal adenosine. PSPX and adenosine were dissolved in isotonic sodium chloride solution immediately before use.

Polyfructosan concentrations were determined by the technique of Davidson and Sackner (7). The volume of fluid collected from an individual proximal tubule was estimated from the length of the column of fluid in a capillary tube of uniform bore and known internal diameter. The concentration of tubular polyfructosan was measured by the method of Vurek and Pegram (35). The protein concentration in the efferent samples was determined by the method of Viets et al. (34).

Serum calcium and phosphorus were determined by standard spectrophotometric automated techniques (Beckman), and thyroxine by radioimmunoassay (Cia, Sorm, France).

SNGFR, glomerular capillary hydrostatic pressure (P_{GC}), glomerular capillary hydrostatic pressure gradient (ΔP), single-nephron filtration fraction, single-nephron plasma flow (Q_{SA}), single-nephron blood flow, afferent (R_A) and efferent (R_E) resistances, ultrafiltration coefficient (K_f), and oncotic pressure (Π) were calculated according to equations given elsewhere (2).

Determination of plasma levels and kidney content of adenosine. In separate groups, adenosine plasma levels were measured in 10 normal and 10 hypothyroid rats. In additional groups of 10 normal and 10 hypothyroid rats, tissue adenosine content in the kidney was measured.

For determination of adenosine plasma levels, the animals were bled by decapitation, and 4-ml blood samples were immediately homogenized in two volumes of ice-cold 0.4 M HClO_4 .

For determination of tissue adenosine content, the animals were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg ip), and the left kidney was exposed; a tissue sample was removed and immediately frozen in a Wollenberger clamp precooled in liquid nitrogen (26). The time between removal of the tissue and the freezing procedure was <3 s; samples were stored in liquid nitrogen for subsequent adenosine determination. Tissue extraction of adenosine was performed by homogenizing 0.2 g of frozen renal cortex in five volumes of ice-cold 0.4 M HClO_4 .

The homogenates were centrifuged at 9,000 g for 10 min at 4°C . The pH of the supernatant was adjusted to 7.0 with 4 M KOH. After 15 min, the KClO_4 precipitate was eliminated by centrifugation, and the supernatant was kept for adenosine determination. Adenosine was measured by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), samples were purified in a Sep-Pak C_{18} column, as described by Garab et al. (11). The eluted samples were injected directly

Table 1. Glomerular hemodynamics in hypothyroid rats

| | NIx (n = 14) | Htx (n = 14) | P |
|--|-----------------|-----------------|--------|
| Body wt. g | 320.0 ± 8.0 | 334.0 ± 7.9 | NS |
| Hct, % | 47.1 ± 0.5 | 46.7 ± 0.3 | NS |
| MAP, mmHg | 120.4 ± 1.7 | 119.8 ± 1.3 | NS |
| Q _A , nL/min | 112.9 ± 6.1 | 88.9 ± 6.4 | <0.01 |
| R _A , dyn · s · cm ⁻⁵ × 10 ¹⁰ | 2.6 ± 0.2 | 3.6 ± 0.3 | <0.01 |
| R _E , dyn · s · cm ⁻⁵ × 10 ¹⁰ | 1.9 ± 0.1 | 2.4 ± 0.2 | <0.05 |
| SFP, mmHg | 35.4 ± 0.4 | 31.4 ± 0.5 | <0.01 |
| FF, mmHg | 11.7 ± 0.2 | 10.6 ± 0.3 | <0.05 |
| P _{GC} , mmHg | 12.8 ± 0.2 | 12.5 ± 0.3 | NS |
| II _A , mmHg | 17.9 ± 0.5 | 20.4 ± 0.5 | <0.005 |
| II _E , mmHg | 30.6 ± 1.0 | 32.4 ± 0.66 | NS |
| P _{GC} , mmHg | 53.4 ± 0.7 | 51.7 ± 0.7 | NS |
| K _f , nl · s ⁻¹ · mmHg ⁻¹ | 0.031 ± 0.001 | 0.026 ± 0.002 | <0.05 |
| SNNGFR, nL/min | 32.7 ± 1.2 | 21.7 ± 1.2 | <0.001 |
| GFR, mL/min | 1.1 ± 0.05 | 0.8 ± 0.05 | <0.005 |
| SNFF, % | 0.29 ± 0.01 | 0.25 ± 0.01 | <0.01 |

Values are means ± SE of 14 normal (NIx) and 14 hypothyroid (Htx) rats. Hct, hematocrit; MAP, mean arterial pressure; Q_A, single nephron plasma flow; R_A and R_E, afferent and efferent resistances; SFP, stop-flow pressure; FF, free-flow pressure; P_{GC}, peritubular capillary hydraulic pressure; II_A and II_E, afferent and efferent oncotic pressure; P_{GC}, glomerular capillary pressure; K_f, ultrafiltration coefficient; SNNGFR, single nephron glomerular filtration rate; GFR, glomerular filtration rate; SNFF, single-nephron filtration fraction.

into a Gold System HPLC (Beckman) running an isocratic method, the eluent consisting of 0.5 M (NH₄)₂H₂PO₄ in 10.90 methanol-water (pH 5), flow 1.9 mL/min, with use of a 330 cm × 3.9 mm ID C₁₈ Bondapak column; the effluent was monitored at a wavelength of 254 nm. Adenosine was quantified following the method described by Ramos and Schoffatal (29).

Statistical analysis. Results are expressed as means ± SE; statistical differences between basal and experimental conditions were assessed by Student's *t*-test for paired samples. Comparison between normal and hypothyroid groups was made by Student's *t*-test for unpaired samples. Statistical difference was defined when *P* < 0.05.

RESULTS

The success of the thyroidectomy was demonstrated by the fall of thyroxine plasma levels in hypothyroid rats, which were significantly lower than control values [2.3 ± 0.03 and 4.2 ± 0.5 µg/ml in hypothyroid (Htx) and normal (NI) rats, respectively]. In contrast, no differences were observed in calcium (9.7 ± 0.7 and

10.1 ± 0.7 mg/dl in Htx and NI rats, respectively) and phosphorus levels (6.5 ± 1.1 and 6.9 ± 0.4 mg/dl in Htx and NI rats, respectively), indicating integrity of the parathyroid glands.

Table 1 summarizes micropuncture studies in the basal period from normal and hypothyroid rats (groups I and III). Despite similar values of blood pressure, striking differences were observed in renal hemodynamics of hypothyroid rats. Renal vasoconstriction was evidenced by a 21% decrease in renal plasma flow due to a 38% rise in R_A and a 26% rise in R_E. In addition, K_f was 16% lower than controls. P_{GC} did not change; however, because afferent oncotic pressure (II_A) was higher, ΔP was not different. The combined reduction of Q_A and K_f resulted in SNGFR values that were 33% lower. Total kidney GFR decreased in similar proportion (27%).

Table 2 shows the effects of PSPX on renal hemodynamics in normal and hypothyroid rats (group I). In normal rats, blockade of adenosine A₁ receptors did not modify glomerular hemodynamics or total kidney GFR (1.10 ± 0.081 and 1.01 ± 0.035 mL/min in control and PSPX-treated rats, respectively); in contrast, in the hypothyroid group, PSPX induced a marked vasodilatory response characterized by a fall in R_A (41%) and R_E (36%) and a 50% increase in Q_A; in addition, K_f rose by 59%. These changes led to normalization of SNGFR (Fig. 1). Total kidney GFR also increased (0.78 ± 0.09 and 0.95 ± 0.11 mL/min in control and PSPX-treated rats, respectively; *P* < 0.05).

The results of studies on the activity of TGF response (group II) are shown in Fig. 2. The activity of TGF was evaluated through proximal-distal differences in SNGFR in seven normal and seven hypothyroid rats. In normal animals, the administration of PSPX had no effect on proximal (30.25 ± 1.16 and 31.48 ± 1.97 nL/min) or distal (16.21 ± 1.66 and 19.27 ± 1.36 nL/min) SNGFR; the proximal-distal difference in SNGFR was 14.66 ± 2.5 nL/min and remained unchanged during PSPX; when the proximal-distal difference was expressed as percent fraction of proximal SNGFR (proximal - distal/proximal), it was 47% in the control period and 40% during PSPX [*P* = not significant (NS)]. Total kidney GFR also remained unchanged (0.92 ± 0.07 to 1.07 ± 0.08 mL/min). In the hypothyroid rats, blockade

Table 2. Glomerular hemodynamics before and during PSPX infusion

| | MAP, mmHg | Q _A , nL/min | R _A , dyn · s · cm ⁻⁵ × 10 ¹⁰ | R _E , dyn · s · cm ⁻⁵ × 10 ¹⁰ | P _{GC} , mmHg | K _f , nl · s ⁻¹ · mmHg ⁻¹ | SNGFR, nL/min | II _A , mmHg | II _E , mmHg | SNFF, % |
|-------------|--------------|----------------------------|--|--|---------------------------|---|------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|
| NIx (n = 7) | | | | | | | | | | |
| Control | 122.1 ± 2.7 | 112.1 ± 10.8 | 2.8 ± 0.3 | 1.9 ± 0.2 | 52.0 ± 0.5 | 0.030 ± 0.002 | 31.5 ± 1.5 | 16.8 ± 0.2 | 28.5 ± 1.1 | 0.29 ± 0.01 |
| PSPX | 122.2 ± 1.7 | 108.7 ± 15.0 | 2.9 ± 0.3 | 2.0 ± 0.3 | 52.4 ± 0.8 | 0.031 ± 0.004 | 30.8 ± 3.1 | 16.6 ± 0.4 | 28.2 ± 1.4 | 0.28 ± 0.02 |
| <i>P</i> | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| Htx (n = 7) | | | | | | | | | | |
| Control | 123.2 ± 1.1 | 92.7 ± 10.1 | 3.6 ± 0.4 | 2.2 ± 0.2 | 51.2 ± 1.3 | 0.027 ± 0.002 | 22.3 ± 1.7 | 20.4 ± 0.9 | 31.8 ± 1.9 | 0.24 ± 0.01 |
| PSPX | 117.0 ± 3.4 | 139.0 ± 16.2 | 2.1 ± 0.2 | 1.4 ± 0.2 | 51.3 ± 0.6 | 0.043 ± 0.005 | 36.9 ± 3.4 | 18.3 ± 0.8 | 29.5 ± 1.3 | 0.26 ± 0.01 |
| <i>P</i> | <0.05 | <0.02 | <0.005 | <0.005 | NS | <0.01 | <0.005 | <0.005 | NS | NS |

Values are means ± SE. PSPX, 1,3-dipropyl-8-*p*-sulphophenyl xanthine; see Table 1 for definition of other abbreviations.

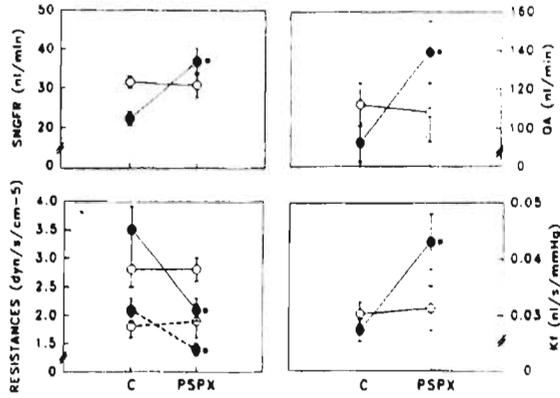


Fig 1. Renal hemodynamics from normal (○) and hypothyroid (●) rats in a control period (C) and during infusion of adenosine receptor blocker 1,3-dipropyl-8-*p*-sulphophenyl xanthine (PSPX). SNGFR, single-nephron glomerular filtration rate; QA, glomerular blood flow; R_a , ultrafiltration coefficient. Solid line, afferent resistance; dashed line, efferent resistance. * $P < 0.05$.

of adenosine receptors induced a rise in proximal SNGFR from 19.70 ± 2.8 to 33.0 ± 2.4 nl/min and in distal SNGFR from 9.4 ± 1.7 to 20.2 ± 2.3 nl/min (Fig 2). The proximal-distal difference in SNGFR rose less

than SNGFR (10.35 ± 1.86 to 12.75 ± 1.55 nl/min during PSPX, $P = NS$); therefore, the proximal - distal/proximal fraction fell significantly from 55 to 37% ($P < 0.005$), indicating a slight decrease in TGF activity.

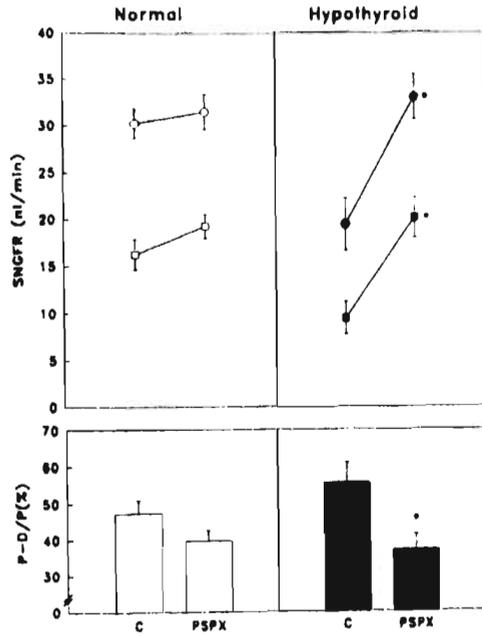


Fig 2. Top: proximal (circles) and distal (squares) SNGFR from normal and hypothyroid rats in a control period (C) and during infusion of PSPX. Bottom: proximal - distal/proximal relationship from normal and hypothyroid rats in C period and during PSPX infusion. * $P < 0.005$.

Table 3 Glomerular hemodynamics before and during adenosine infusion

| | MAP mmHg | R_A ml/min | R_V ($R_A \times 1.25$) ml/min | R_V ($R_A \times 1.25$) $\times 10^3$ | P_{GC} mmHg | K_f ml \times min ⁻¹ mmHg ⁻¹ | SNGFR, nl/min | I_{G_A} mmHg | I_{G_D} mmHg | SNFF % |
|-------------------------|-------------|-----------------|--|---|------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| <i>Normal rats</i> | | | | | | | | | | |
| Control | 118.6 ± 2.1 | 11.6 ± 1.5 | 2.4 ± 0.2 | 1.8 ± 0.1 | 51.8 ± 1.1 | 0.033 ± 0.001 | 33.8 ± 1.8 | 19.1 ± 0.7 | 32.0 ± 1.4 | 0.29 ± 0.001 |
| ADO | 117.1 ± 2.5 | 85.3 ± 6.0 | 3.3 ± 0.3 | 2.3 ± 0.1 | 50.7 ± 1.5 | 0.026 ± 0.002 | 25.2 ± 1.7 | 16.9 ± 0.5 | 28.8 ± 1.1 | 0.29 ± 0.003 |
| <i>P</i> | NS | <0.005 | <0.01 | <0.01 | <0.001 | 0.05 | <0.001 | <0.005 | <0.005 | NS |
| <i>Hypothyroid rats</i> | | | | | | | | | | |
| Control | 116.3 ± 1.3 | 85.2 ± 4.7 | 3.7 ± 0.6 | 2.7 ± 0.4 | 52.3 ± 0.6 | 0.025 ± 0.004 | 21.1 ± 1.8 | 20.4 ± 0.5 | 34.1 ± 0.7 | 0.26 ± 0.004 |
| ADO | 115.4 ± 2.4 | 114.1 ± 8.3 | 2.8 ± 0.4 | 1.8 ± 0.2 | 49.9 ± 1.3 | 0.031 ± 0.005 | 27.9 ± 2.7 | 18.2 ± 0.4 | 28.9 ± 0.4 | 0.26 ± 0.004 |
| <i>P</i> | NS | <0.005 | <0.02 | <0.02 | NS | <0.025 | <0.005 | <0.01 | <0.002 | NS |

Values are means ± SE. ADO, adenosine; see Table 1 for definition of other abbreviations.

Total GFR also increased from 0.80 ± 0.07 to 1.09 ± 0.11 ml/min ($P < 0.05$).¹

The effects of exogenous adenosine on renal hemodynamics of normal and hypothyroid rats (group III) are shown in Table 3. Normal rats responded to intra-aortic administration of adenosine with renal vasoconstriction. The renal blood flow fell because of a rise in R_A and R_V , and a slight but significant decrease in P_{GC} was observed. In addition, there was a fall in K_f ; these changes resulted in a 30% reduction of SNGFR. Total kidney GFR did not change significantly (1.10 ± 0.07 to 0.99 ± 0.09 ml/min). In contrast, in the hypothyroid group, a renal vasodilatory response to adenosine was observed. A fall in R_A and R_V allowed a rise in glomerular blood flow. In addition P_{GC} decreased slightly, and K_f increased; the net result of these changes was a significant increase in SNGFR (Fig. 3). The same pattern was observed in total kidney GFR, which increased from 0.86 ± 0.05 to 1.04 ± 0.09 ml/min ($P < 0.025$).

To exclude the possibility that volume expansion could be responsible for the changes observed in renal hemodynamics during adenosine and PSPX infusion, an additional group of hypothyroid rats was studied (group IV). In six hypothyroid rats, micropuncture studies were performed under basal conditions and during saline infusion at the same rate as PSPX and adenosine infusion. With the infusion of vehicle, no changes were observed in any parameter (Fig. 4).

¹ Large differences between proximal and distal SNGFR were found in normal and hypothyroid rats. This suggests that proximal values represent an overestimation of SNGFR, and, if this is so, calculated values of glomerular plasma flow are higher and R_A and R_V are lower than real values. In rats in which glomeruli cannot be punctured directly, proximal collections are currently used in micropuncture studies, because it is the only available method to measure glomerular dynamics. In our studies, overestimation of SNGFR by proximal collections would not invalidate the observed vasodilatory response induced by PSPX in hypothyroid rats, because proximal-distal differences remained practically unchanged from control to PSPX in both groups. In normal rats, proximal-distal difference was 14.7 and 12.8 nl/min in controls and during PSPX treatment, respectively, a change of only 1.9 nl/min, which was not statistically significant. The same pattern was observed in hypothyroid rats, in which proximal-distal difference was 10.5 and 12.7 nl/min in controls and during PSPX treatment, respectively, a change of 2.4 nl/min, which was not significant.

To further characterize the response observed with intra-aortic adenosine, five normal and five hypothyroid rats were treated with intrarenal infusions of adenosine (group V) at 1, 10, and 35 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹. In the hypothyroid rats, it was remarkable that adenosine at 1 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹ induced a 20.0% fall in SNGFR (from 26.7 ± 2.9 to 21.0 ± 3.1 nl/min, $P < 0.0005$); at 10 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹, SNGFR rose to the control level (25.9 ± 3.4 nl/min, $P = NS$), and at 35 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹, SNGFR increased 38.3% (to 41.2 ± 4.5 nl/min, $P < 0.0005$; Fig. 5). In contrast, in the normal animals, adenosine decreased SNGFR by 18.8% (from 31.5 ± 1.9 to 25.9 ± 3.9 nl/min, $P = NS$) with 1 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹; it further decreased by 26.4% (23.7 ± 4.4 nl/min, $P < 0.05$) with 10 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹ and by 35.9% (20.5 ± 3.9 nl/min, $P < 0.01$) with 35 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹. The changes in total GFR in the hypothyroid rats were significant at 1 and 35 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹; total GFR decreased from 0.93 ± 0.06 to 0.84 ± 0.02 ml/min ($P < 0.05$) and increased to 1.09 ± 0.07 ml/min ($P < 0.01$), respectively; in the normal animals, total GFR fell from 1.01 ± 0.1 to 0.58 ± 0.1 ml/min ($P < 0.025$) at 35 nmol \cdot kg⁻¹ \cdot min⁻¹.

Adenosine plasma levels were measured in separate groups: no significant differences were observed between normal and hypothyroid groups (0.63 ± 0.05 and 0.72 ± 0.06 nmol/ml, respectively). However, when the tissue adenosine content in kidney was evaluated in additional groups, a striking difference was found (115.46 ± 14.9 and 4.37 ± 0.79 nmol/g wet wt in NI and Htx kidneys, respectively, $P < 0.001$; Fig. 6).

DISCUSSION

Renal hemodynamics in hypothyroidism are characterized by hypoperfusion, decreased K_f , and reduced GFR (12). This study investigates the participation of adenosine in these alterations. Our glomerular hemodynamics data confirmed the changes in renal function previously described in this model (4, 12).

Our results with the adenosine receptor antagonist PSPX are in agreement with previous reports, indicating that blockade of adenosine receptors in normal conditions does not affect glomerular hemodynamics or TGF responses (10, 21). However, in hypothyroid ani-

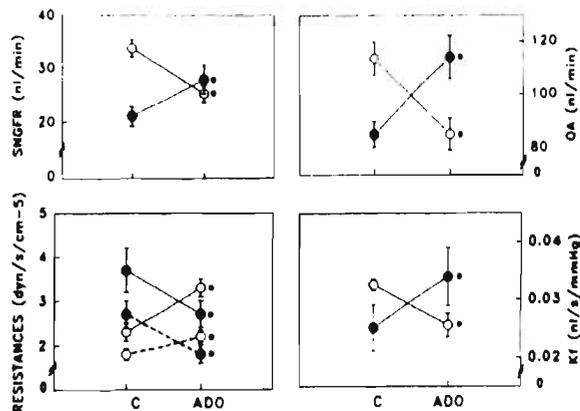


Fig. 3. Renal hemodynamics from normal (○) and hypothyroid (●) rats in a control period (C) and during infusion of adenosine. Solid line, afferent resistance; dashed line, efferent resistance. **P* < 0.05.

mals, PSPX restored blood flow, K_f , and SNGFR to normal, indicating the participation of A_1 receptors in the modulation of renal resistances and mesangial contraction in this pathophysiological condition.

It has been postulated that adenosine might be involved in the transmission of vasoconstrictor signals from the macula densa cells to the arterioles in the TGF mechanism (10, 25), which regulates GFR and glomerular pressure in normal conditions. When we evaluated the activity of the TGF mechanism, the absolute values of proximal-distal differences were similar in both groups; however, because SNGFR was lower in hypothyroid rats, we analyzed the proximal-distal difference as a percentage of single proximal GFR, and the values were also similar in both groups (47 and 55% in N1 and Htx rats, respectively, *P* = NS). These results did not support the possibility of an abnormal activation of TGF in thyroid-deficient rats. When A_1 receptors were blocked with PSPX, GFR rose only in hypothyroid rats;

this increment in GFR was not associated with a proportional increment in proximal-distal differences. Therefore, the value P-D/P, as a percentage, fell significantly from 55 to 37%. These data suggest that, under hypothyroid conditions, adenosine contributes to maintain the activity of the TGF mechanism within the normal range, because its blockade results in decreased activity. In addition, the marked increase in proximal and distal SNGFR, obtained when adenosine action was inhibited, suggests a predominant effect on afferent and efferent arterioles as well as mesangial cells. Indeed, these results suggest a role for adenosine in the renal vasoconstriction observed in hypothyroidism through multiple effects on the glomerular microcirculation.

Further evidence for the participation of adenosine in the renal abnormalities from hypothyroidism was obtained when we studied the sensitivity of hypothyroid kidneys to exogenous adenosine. The intra-aortic infusion to normal animals produced a renal vasoconstriction response, as expected (13, 14); in contrast, in the hypothyroid rats, adenosine administration induced paradoxical renal vasodilation. A fall in R_A and R_E with a consequent increase in Q_A and elevation in K_f resulted in an increase in SNGFR. These data support the possibility that activation of A_1 receptors (responsible for vasodilation) by exogenous adenosine could contribute to restoration of renal function in hypothyroidism. Indeed, when several doses of adenosine were infused through the renal artery, we observed a decrease in SNGFR with adenosine at $1 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, recovery to control values with $10 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, and an increase with $35 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, suggesting that preferential activation of A_1 receptors, at low doses, induces renal vasoconstriction, whereas preferential activation of A_2 receptors, at higher doses, induces vasodilation (Fig. 5) (20). A_2 receptors have been demonstrated in afferent arterioles from juxtamedullary glo-

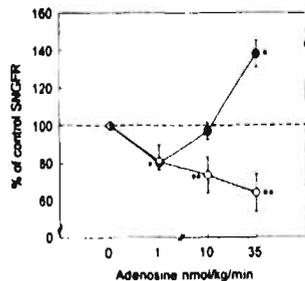


Fig. 4. Percent change in SNGFR in normal (○) and hypothyroid (●) rats in control period (time 0) and during infusion of adenosine into renal artery. ***P* < 0.05, normal vs. control normal rats. **P* < 0.005, hypothyroid vs. control hypothyroid rats.

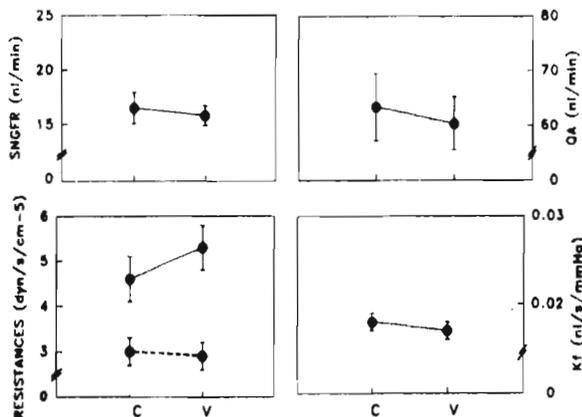


Fig 5 Renal hemodynamics from hypothyroid rats (●) in a control period (C) and during infusion of vehicle (V). Solid line, afferent resistance, dashed line, efferent resistance.

meruli of normal kidneys (15), as well as from cortical and juxtamedullary glomeruli of hydronephrotic kidneys (9). Thus it is possible that alterations in the activation of these receptors might participate in other pathophysiological processes, such as hypothyroidism.

Adenosine infusion induced a marked increase in SNGFR that did not occur when vehicle was infused in a parallel group of animals, ruling out the possibility that the rise in SNGFR was secondary to volume expansion. On the other hand, because SNGFR did not reach normal values during the intra-aortic infusion of nucleoside in the renal hemodynamics study, the presence of other vasoconstrictors cannot be excluded; however, because intrarenal adenosine did restore SNGFR to normal values, the possibility that adenosine would not have reached the kidney in sufficient amounts to fully activate A_2 receptors cannot be ruled out. Nevertheless, there are technical difficulties involved if this approach were to be used in the evaluation of complete renal hemodynamics. In support of the former possibility, Gillum et al. (12) demonstrated the participation of angiotensin II in the hypoperfusion of hypothyroidism. In these studies, thyroidectomized animals responded with renal vasodilation to saralasin, despite plasma renin activity and extracellular volume being similar to those of control animals, suggesting that the effects of angiotensin II were at a local level. Because a synergistic interaction between adenosine and angiotensin II has been demonstrated (13, 14), it is possible that both vasoconstrictor systems participate in this pathophysiological condition.

Plasma adenosine levels were similar in normal and hypothyroid animals. However, systemic levels might not reflect the concentrations of free adenosine in the extracellular fluid in specific organs. This notion was clearly demonstrated when the adenosine content in the kidney was measured: marked differences in tissue adenosine content were observed, with 28 times less

adenosine in kidneys from hypothyroid than in kidneys from normal rats. This finding can be explained by changes in the activity of the enzymes involved in adenosine metabolism, such as a decrease in 5'-nucleotidase or an increase in adenosine deaminase. In white and brown adipocytes from hypothyroid rats, 5'-nucleotidase activity is decreased (16), and the adenosine content of adipose tissue is low (23); furthermore, in brain of hypothyroid rats, the changes observed in the enzymes involved in adenosine metabolism evidence a region-specific profile (19). However, no data of this kidney enzyme system in hypothyroidism are available.

The renal response to PSPX and exogenous adenosine in the hypothyroid rats is fully explained by the presence of a low kidney adenosine content. Selective activation of high-affinity A_1 receptors due to the low nucleoside concentrations would result in renal vasoconstriction; in this condition, an adenosine blocker was able to normalize renal function. Furthermore, increas-

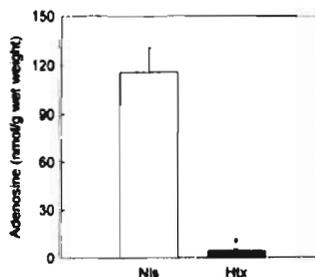


Fig 6 Renal adenosine content in normal (Nls) and hypothyroid (Htx) rats. * $P < 0.001$.

ing the renal adenosine content through exogenous administration activated A_2 receptors, inducing vasodilation. It is possible that the marked vasodilatory A_2 receptor-mediated response could be the result of A_2 receptor upregulation induced by the low renal adenosine content. Upregulation has been demonstrated for A_1 receptors and suggested for A_2 receptors; however, little is known about the regulation of A_2 receptors (32). In this regard, increased sensitivity to adenosine in hypothyroidism has been described in adipose tissue, this finding has been attributed to reverse of desensitization by endogenous adenosine, because adenosine content in this tissue is also low (23). In addition, Malbon et al. (18) found that hypothyroidism did not significantly alter the number or affinity of binding sites for cyclohexyladenosine, which would be expected, because low adenosine concentrations activate A_1 receptors. However, a substantial increase in the amount of G_i protein was observed, indicating the complexity of the mechanisms involved in adenosine receptor regulation. Nevertheless the affinity and number of A_2 receptors have not been studied in normal or pathophysiological conditions. It is reasonable to assume that the changes in kidney adenosine content induce alterations in the adenosine receptor regulation. A_1 and A_2 receptor desensitization has been described in various tissues and cultured renal cells (28, 32), which have resulted in altered A_1 and A_2 receptor function.

In summary, these results suggest a role for local adenosine in the alterations of renal hemodynamics in hypothyroidism. The low renal adenosine content activates selectively A_1 receptors, which contribute to the renal vasoconstriction characteristic of this model. Under this condition, adenosine concentrations will not be high enough to activate A_2 receptors. The elevation of renal adenosine concentrations by exogenous administration induced activation of A_2 receptors, which antagonize the A_1 vasoactive component. Further studies are needed to clearly define the participation of A_2 receptors in hypothyroidism, but this study provides evidence of a suitable pathophysiological model to study the effect of activation of A_2 receptors and its regulation.

We thank Juan A. Alvarado and Pedro Lopez for technical assistance.

Address for reprint requests: M. Franco, Nephrology Dept., Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1, Mexico City, Tlalpan 14080, Mexico.

Received 15 June 1994; accepted in final form 21 July 1995.

REFERENCES

1. Arendshorst, W. J. Altered reactivity of tubuloglomerular feedback. *Annu. Rev. Physiol.* 49: 295-317, 1987.
2. Baylis, C., W. M. Deen, B. D. Myers, and B. M. Brenner. Effects of some vasodilator drugs on transcapillary fluid exchange in renal cortex. *Am. J. Physiol.* 230: 1148-1159, 1976.
3. Burnatowska-Hledin, M. A., and W. B. Spolman. Effects of adenosine on cAMP production and cytosolic Ca^{2+} in cultured rabbit medullary thick limb cells. *Am. J. Physiol.* 260 (Cell Physiol. 29): C143-C150, 1991.
4. Capasso, G., and N. G. De Santo. Thyroid hormones and renal transport: cellular and biochemical aspects. *Kidney Int.* 32: 443-451, 1987.
5. Chohan, P., C. Carpenter, and E. D. Suggerson. Changes in the anti-lipolytic action and binding to plasma membranes of $N^6,2'$ -phenylisopropyladenosine in adipocytes from starved and hypothyroid rats. *Biochem. J.* 223: 53-59, 1984.
6. Coulson, H., R. A. Johnson, R. A. Olsson, D. R. Cooper, and S. J. Scheinman. Adenosine stimulates phosphate and glucose transport in opossum kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 260 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 29): F921-F928, 1991.
7. Davidson, W. D., and M. A. Sackner. Simplification of the anthrone method for the determination of uric acid in clearance studies. *J. Lab. Clin. Med.* 62: 351-356, 1963.
8. De Santo, N. G., G. Capasso, C. Paduano, C. Carella, and C. Giordano. Tubular transport processes in proximal tubules of hypothyroid rats. *Pflügers Arch.* 384: 117-122, 1980.
9. Dietrich, M. S., and M. Steinhausen. Differential reactivity of cortical and juxtaglomerular glomeruli to adenosine-1 and adenosine-2 receptor stimulation and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Microvasc. Res.* 45: 122-133, 1993.
10. Franco, M., P. D. Bell, and L. G. Navar. Effect of adenosine A_1 analogue on tubuloglomerular feedback mechanism. *Am. J. Physiol.* 257 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 26): F231-F236, 1989.
11. Gharib, A., N. Sarda, B. Chabannes, L. Cronenberger, and H. Pacheco. The regional concentrations of S-adenosyl-L-methionine, S-adenosyl-L-homocysteine, and adenosine in rat brain. *J. Neurochem.* 38: 810-815, 1982.
12. Gillum, D. M., S. A. Falk, W. S. Hammond, and J. D. Conger. Glomerular dynamics in the hypothyroid rat and the role of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* 253 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 22): F170-F179, 1987.
13. Hall, J. E., and J. P. Granger. Adenosine alters glomerular filtration control by angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 250 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 19): F917-F923, 1986.
14. Hall, J. E., J. P. Granger, and R. L. Hester. Interactions between adenosine and angiotensin II in controlling glomerular filtration. *Am. J. Physiol.* 248 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 17): F340-F346, 1985.
15. Inacho, E. W., P. K. Carmines, and L. G. Navar. Juxtaglomerular afferent arteriolar responses to P_1 and P_2 purinergic stimulation. *Hypertension Dallas* 7: 1033-1037, 1991.
16. Jamal, Z., and D. Suggerson. Enzymes involved in adenosine metabolism in rat white and brown adipocytes. Effects of streptozotocin-diabetes, hypothyroidism, age and sex differences. *Biochem. J.* 245: 881-886, 1987.
17. Le Hir, M., and U. C. Dubach. Sodium gradient energized concentrative transport of adenosine in renal brush border vesicles. *Pflügers Arch.* 401: 58-63, 1984.
18. Malbon, C. C., P. J. Rapiejko, and T. J. Mangano. Fat cell adenylate cyclase system: Enhanced inhibition by adenosine and GTP in the hypothyroid rat. *J. Biol. Chem.* 260: 2558-2564, 1985.
19. Masurkiewicz, D., and D. Suggerson. Changes in the activities of adenosine-metabolizing enzymes in six regions of the rat brain on chemical induction of hypothyroidism. *Biochem. J.* 261: 667-672, 1989.
20. McCoy, D. E., S. Bhattacharya, B. A. Olson, D. G. Levier, L. J. Arend, and W. S. Spielman. The renal adenosine system: structure, function and regulation. *Semin. Nephrol.* 13: 31-40, 1993.
21. Mitchell, K. D., and L. G. Navar. Modulation of tubuloglomerular feedback responsiveness by extracellular ATP. *Am. J. Physiol.* 264 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 33): F458-F466, 1993.
22. Miyamoto, M., Y. Yagil, T. Larson, C. Robertson, and R. L. Jamison. Effects of intrarenal adenosine on renal function and medullary blood flow in the rat. *Am. J. Physiol.* 255 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 24): F1230-F1234, 1988.
23. Ohisalo, J. J., B. Stoneham, and L. Kaso. Thyroid status and adenosine content of adipose tissue. *Biochem. J.* 246: 555-557, 1987.
24. Oswald, H. The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 94-97, 1984.
25. Oswald, H., H. H. Hermes, and G. Nabakowski. Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int.* 22, Suppl. 12: S136-S142, 1982.

- 26 Osawald, H., H. J. Schmitz, and H. Kemper. Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation *Pfluegers Arch* 371: 45-49, 1977
- 27 Paniagua, R., M. Franco, E. Rodriguez, L. G. Sánchez, and J. Herrera-Acosta. Impaired atrial natriuretic factor systemic clearance contributes to its higher levels in uremia *J Am Soc Nephrol* 2: 1707-1708, 1992
- 28 Ramkumar, V., M. E. Olah, K. A. Jacobson, and G. L. Stiles. Distinct pathways of desensitization of A_1 and A_2 -adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells *Mol Pharmacol* 40: 639-647, 1991
- 29 Ramos, D. L., and A. M. Schoffstall. Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of nucleosides and nucleotides *J Chromatogr* 261: 83-93, 1983
- 30 Saggeron, E. D. Sensitivity of adipocyte lipolysis to stimulatory and inhibitory agonists in hypothyroidism and starvation *Biochem J* 238: 387-394, 1986
- 31 Spielman, W. S., and C. I. Thompson. A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release *Am J Physiol* 242(Renal Fluid Electrolyte Physiol 11): F423-F435, 1982
- 32 Stiles, G. L. Adenosine receptors *J Biol Chem* 267: 6451-6454, 1992
- 33 Tapia, E., F. B. Gabbai, C. Calleja, M. Franco, J. L. Cermeño, N. A. Bobadilla, J. M. Pérez, J. A. Alvarado, and J. Herrera-Acosta. Determinants of renal damage in rats with systemic hypertension and partial renal ablation *Kidney Int* 38: 662-648, 1990
- 34 Viets, J. W., W. M. Deen, J. L. Troy, and B. M. Brenner. Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or o-phthalaldehyde *Anal Biochem* 88: 513-521, 1978
- 35 Vurek, G. G., and S. E. Pegram. Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin *Anal Biochem* 16: 409-419, 1966
- 36 Yagil, Y. Interaction of adenosine with vasopressin in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 259 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 28): F679-F687, 1990.



Biología molecular en medicina. V. Reacción en cadena de la polimerasa

*Norma A. Bobadilla

**Gerardo Gamba

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida mundialmente por las siglas PCR (de *polymerase chain reaction*), fue desarrollada a principios de la década de los 80's por Mullis y sus colaboradores en la empresa Cetus Corporation.¹ Como sucedió con la síntesis de genotecas de DNA o la secuenciación del DNA, la PCR revolucionó la biología molecular en poco tiempo. Por su gran versatilidad, actualmente se considera a la PCR como la "navaja suiza" de la biología molecular. Como una evidencia de esto podemos citar que en lo que va de la década de los 90's han aparecido más de 5 000 artículos de investigación en los que la PCR constituye el principal instrumento o metodología de trabajo.

En los mamíferos, cada gen se encuentra inmerso en una maraña de DNA que contiene más de 100 mil genes diferentes, aunado a los millones de bases en el genoma que no constituyen genes. Cuando se empezó a utilizar la biología molecular como una herramienta de investigación, era posible aislar un fragmento de un gen, pero representaba un trabajo complejo y laborioso que podía lograrse generalmente en el caso de genes que producen proteínas abundantes y de fácil acceso, como la hemoglobina y las inmunoglobulinas. Con la creación de la tecnología del DNA recombinante, se pudo avanzar hacia el estudio de genes que producen proteínas menos abundantes. Posteriormente, el advenimiento de la PCR revolucionó la biología molecular porque permitió el acceso fácil y rápido al estudio de los genes, especialmente de aquéllos que se expresan en mucha menor proporción.

La PCR es una metodología que se basa en el principio de amplificar un fragmento de DNA en

forma ilimitada en unas cuantas horas, lo que abre la posibilidad de estudiar cualquier gen. El poder de la PCR es tal que además ha permitido la identificación y estudio de genes de los que no se tenía evidencia de su existencia. La PCR es una técnica que permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de DNA de forma tal que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas. Si partimos de una molécula de DNA, al término de 20 ciclos tendremos cerca de un millón de copias de dicha molécula. Esta es la razón de por qué la PCR se ha convertido en una arma tan poderosa en la investigación. Si tomamos como sustrato para la reacción de PCR un homogeneizado (v.g. plasma) en el que existan una o unas cuantas copias de un RNA o DNA en particular (v.g. virus), en cuestión de horas podemos obtener suficientes copias de dicho gen como para poder detectarlo y estudiarlo. A este incremento geométrico en el número de copias de una secuencia en particular de DNA es a lo que denominamos amplificar el DNA. Para su realización se requiere de que los reactivos básicos sean expuestos a ciclos de cambios de temperatura que permitan la amplificación exponencial del DNA. Como muestra la Fig 1, estos ciclos se conocen como desnaturalización, hibridación y polimerización. Los reactivos básicos que se utilizan en una reacción de PCR son el molde de DNA del cual se quiere partir, los iniciadores que son necesarios para que la DNA polimerasa funcione, una mezcla de deoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), un amortiguador adecuado, y la enzima que polimeriza al DNA.

Como muestra la Fig 1, la **desnaturalización** es el inicio de cada ciclo. Para que la DNA polimerasa

¹ Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

² Unidad de Fisiología Molecular, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Vasco de Quiroga 15, Tlalpán 14000, México D.F.

funcione, se necesita que ambas cadenas de DNA se separen. a este proceso le llamamos desnaturalización y se consigue al exponer a la doble cadena de DNA a altas temperaturas (94°C). Cuando se empezó a utilizar la PCR, este paso hacía al proceso muy tedioso porque se llevaba a cabo con un fragmento de la DNA polimerasa denominado Klenow, con temperatura óptima de 37°C, es decir, una proteína termolábil que pierde su función al incrementar la temperatura a 94°C. En ese entonces, había que agregar DNA polimerasa en cada ciclo, después de la desnaturalización. La PCR se hizo mucho más accesible y se pudo automatizar en 1988 en que se comercializa la DNA polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales, tiene temperatura óptima de acción de 72°C y resiste temperaturas de 94°C sin perder bruscamente su actividad (después de 50 ciclos conserva ~ 70% de su actividad).² Esta enzima es conocida como *Taq* DNA polimerasa y es la de mayor utilización en la PCR. Sin embargo, tiene dos limitaciones principales: 1) no tiene actividad como exonucleasa 3' a 5' por lo que no corrige los nucleótidos mal colocados (por tanto es mayor la probabilidad de que ocurran mutaciones no deseadas, cosa que no ocurre con la DNA polimerasa); y 2) únicamente sirve para la síntesis de fragmentos de DNA relativamente pequeños (no mayores de 1,500 pares de bases [pb]). Estas limitaciones han desaparecido con el advenimiento de nuevas generaciones de enzimas, como es el caso de la enzima *Pfu* DNA polimerasa que, además de ser termolábil, tiene actividad como exonucleasa 3' a 5' o de la *Taq* extender con la que se pueden amplificar fragmentos de DNA tan grandes como 10 kb.

Después de la desnaturalización sigue la **hibridación**. Esta es la fase del ciclo que le confiere una alta especificidad a la PCR. Como hemos visto con anterioridad,³ para que la DNA polimerasa inicie la síntesis de una nueva cadena de DNA, se requiere que un pequeño fragmento de DNA con secuencia antisentido se hibride a la cadena molde y sirva como sitio iniciador o de anclaje para la DNA polimerasa. A partir de una alícuota en la que existan miles de fragmentos diferentes de DNA, esta enzima iniciará la síntesis de una nueva cadena de DNA, únicamente en el sitio en el que encuentre una de estas secuencias iniciadoras hibridadas a la cadena molde (de ahí el término iniciadores). Los

iniciadores a utilizar, y por lo tanto el DNA a ser amplificado, están bajo control del investigador. Para una reacción de PCR se utilizan dos iniciadores. Uno que se hibridará con la hebra del DNA molde que tiene sentido 5' a 3', y el otro con la hebra complementaria o antisentido 3' a 5'. El tamaño del fragmento obtenido en la PCR será del número de bases que queden entre ambos iniciadores. El iniciador puede variar en el número de bases: mientras mayor sea el tamaño la especificidad será mayor. Generalmente se utilizan iniciadores de 18 a 22 bases porque con este tamaño se considera poco probable que el iniciador encuentre dos sitios de unión en el genoma. Además, la especificidad se incrementa aún más al utilizar dos iniciadores de 18 a 22 bases cada uno.

Para incrementar la especificidad de la PCR, muchos investigadores utilizan lo que se conoce como PCR anidada (nested PCR) en el que se utilizan dos pares de iniciadores: un par denominado externo que sirve para una primera reacción en que se genera un fragmento de PCR, y un segundo par, denominado interno, que toma como molde al fragmento generado en la primera reacción y que tiene secuencias complementarias a una región interna de dicho fragmento. Por lo tanto, el producto final es un fragmento de PCR de menor tamaño que el inicial que, a fin de cuentas, requirió de cuatro iniciadores para su generación: dos externos y dos internos. La temperatura para la fase de hibridación varía según la longitud y secuencia de los iniciadores; en general esta temperatura se fija entre 42 y 60 °C. Es importante utilizar la temperatura óptima para cada par de iniciadores para evitar la posibilidad de que se hibriden en lugares no específicos.

La tercera fase del ciclo de PCR según muestra la figura 1 es la **polimerización**, es decir, la fase en la que la DNA polimerasa agrega al iniciador las bases correspondientes a la cadena complementaria. Esta fase se lleva a cabo a 72 °C por ser la temperatura óptima de función de las DNA polimerasas termoestables. Al término de esta fase, una cadena doble de DNA se ha convertido en dos cadenas dobles de DNA.

La Fig 2 muestra que la PCR consiste básicamente en repeticiones de estos ciclos en los que la amplificación de un fragmento específico de DNA se lleva a cabo en forma exponencial, con un crecimiento que será igual a 2ⁿ, en donde n es el número de ciclos. Una de las razones de por qué la

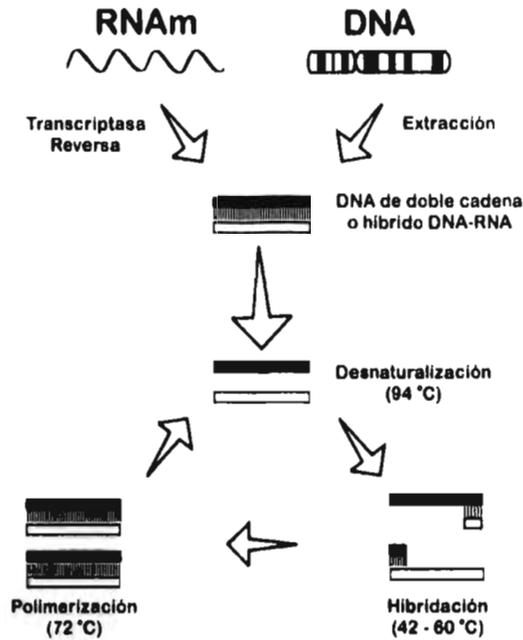


Fig 1. Obtención de DNA y esquematización de los diferentes ciclos durante la PCR.

PCR es tan útil es que este proceso de ciclaje térmico se lleva a cabo en forma automatizada gracias a máquinas conocidas como cicladores térmicos que combinan un refrigerador con un calefactor, controlados por un microprocesador, en forma tal que pueden programarse la temperatura y número de ciclos deseados. Los cicladores hacen su trabajo con alto grado de eficiencia de manera que pueden cambiar la temperatura de 42°C a 94°C en tan sólo 30 segundos y regresarla a 72°C en 10 segundos. Si tomamos en cuenta que un ciclo dura menos de cuatro minutos (1 min desnaturalización + 1 min hibridación + 1.5 min de polimerización) y generalmente se utilizan entre 30 y 40 ciclos, tenemos que una reacción de PCR se lleva a cabo en unas tres horas. Es decir, que a partir de una muestra que tenga tan sólo unas cuantas copias de DNA para un gen, aunque esté mezclado con el resto del genoma, en cuestión de tres horas podemos generar suficiente cantidad de un fragmento de dicho gen que nos permita estudiarlo en el laboratorio.

El producto obtenido por PCR puede ser evaluado de varias formas. Lo primero es determinar que se obtuvo el fragmento de DNA y que es del tamaño apropiado. Cuando un investigador diseña iniciadores para PCR generalmente lo hace sobre secuencias conocidas y por lo tanto, conoce la distancia que hay entre los dos iniciadores, y con esto, el tamaño del fragmento que deberá de obtener. Con este fin, los productos de PCR se analizan en geles de acrilamida o agarosa, junto con un marcador de peso molecular y las bandas se visualizan con bromuro de etidio sobre un transiluminador de luz UV. En la mayor parte de los casos, la existencia y tamaño apropiado del producto de PCR es el resultado del experimento, por ejemplo, cuando el investigador quiere saber si un tejido expresa el RNAm de alguna proteína en particular. Sin embargo, en ocasiones el investigador está interesado en conocer dicho producto con más detalle. En estos casos los fragmentos amplificados se pueden estudiar mediante mapeo de restricción⁴ o bien se pueden secuenciar.⁵ Además, los

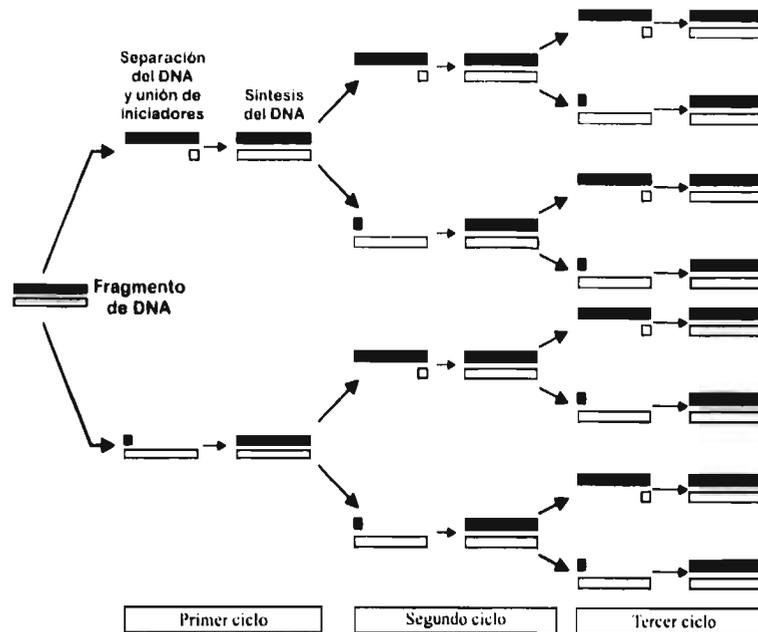


Fig 2. Amplificación de un fragmento de DNA en forma exponencial.

productos obtenidos también pueden ser cuantificados en caso de que la reacción se haya llevado a cabo en presencia de un nucleótido marcado radioactivamente.

Utilidad de la PCR en investigación básica

La PCR se ha convertido en una herramienta de incalculable valor para la investigación biomédica básica. De hecho, la PCR ha permitido expandir los horizontes de la biología molecular. Cada mes se publican artículos en los que se proponen nuevas estrategias para la utilización de la PCR en la investigación. Cosas que hace cinco años parecían ser imposibles para la biología molecular, hoy en día se han convertido en rutina gracias a la PCR. De la misma forma, es probable que muchas preguntas que hoy parecen imposibles de contestar, sólo están esperando a que algún investigador diseñe una estrategia con PCR que permita abordarla apropiadamente. La utilidad de la PCR en la

investigación biomédica básica es muy extensa y su revisión escapa al objetivo del presente trabajo, por lo que sólo presentaremos algunos ejemplos.

PCR a partir de RNA (RT-PCR)

Esta es una de las utilidades más importantes de la PCR en la investigación biomédica. Como muestra la fig 1, la versatilidad de la PCR empieza con el hecho de que como el molde a utilizarse es de DNA, entonces se puede partir directamente del DNA genómico (o viral), o bien, se puede partir de un molde que contenga DNA complementario (DNAc), es decir, RNA mensajero (RNAm) que ha sido previamente copiado a DNAc por la enzima transcriptasa reversa. Así, podemos decir que para hacer PCR se puede partir de DNA o de RNA, y la fuente dependerá del interés del investigador. Cuando la finalidad es amplificar el fragmento de un gen, particularmente intrones, o bien de secuencias de DNA que no son parte de

genes, se utiliza como sustrato el DNA extraído de los cromosomas (o mitocondrial). En cambio, cuando se pretende estudiar la expresión de un gen, a través de medir la presencia del RNAm, se parte de DNAC; en este último caso la denominamos RT-PCR.

Para que la transcriptasa reversa construya una cadena de DNAC a partir de RNA, se requiere de un sitio de iniciación. Existen tres tipos de iniciadores que pueden utilizarse para hibridar el RNA: hexámeros (random primers), oligo-dT, e iniciadores específicos. Los hexámeros son los menos específicos y consisten de una mezcla de hexanucleótidos con secuencias al azar, por lo que se obtiene transcripción inespecífica a partir de todo el RNA. El oligo-dT es un oligonucleótido compuesto de varias timinas (12 a 18) que se unen específicamente a la cola de poliadeninas que caracteriza al RNAm, por lo que la transcripción se obtiene exclusivamente del RNAm. Los iniciadores específicos los diseña el investigador y permiten la síntesis de DNAC exclusivamente del mensajero que contiene la secuencia que se pretende amplificar. La utilidad de la RT-PCR es básicamente la de determinar con precisión la expresión de genes en diversos tejidos, y a partir de ahí clonarlos, secuenciarlos o utilizarlos como sonda para un análisis de Northern blot.

Clonación y secuenciación

La PCR se ha convertido en una vía rápida para obtener, clonar y secuenciar fragmentos de DNA o de RNAm. El producto obtenido por PCR puede ser secuenciado y posteriormente insertado en un vector para transformar células, y obtener así una clona que codifique para una secuencia particular de DNA. La clonación permite obtener un fragmento de DNA en abundancia, con el que se pueden realizar estudios funcionales o bien construir sondas para la detección de RNAm.

Amplificación de secuencias desconocidas

La PCR ha permitido a los investigadores obtener secuencias desconocidas de genes conocidos e inclusive ha permitido la obtención de secuencias de genes desconocidos, y con esto, la identificación y clonación de genes que codifican para proteínas desconocidas.

La amplificación de extremos terminales de DNAC (o RACE por rapid amplification of complementary ends), también conocida como PCR anclada, es una ingeniosa técnica que permite conocer secuencias no transcritas del RNAm que se encuentran en los extremos 5' ó 3'. El caso más común es el de un DNAC que se obtuvo por la metodología de clonación descrita en un artículo previo de esta serie [6], a partir de la cual el investigador conoce un número x de bases en el extremo 5', antes de iniciar la transcripción del gen, pero desconoce el resto de la secuencia en ese extremo. Es común que los investigadores estén interesados en el extremo 5' no transcrito de los genes porque ahí es en donde se encuentra la región promotora. Con la PCR anclada se puede resolver este problema. Esta técnica consiste en sintetizar DNAC a partir del RNAm, utilizando un iniciador específico cercano a uno de los dos extremos (en este caso el 5'). Una vez obtenido el DNAC, se liga una secuencia sintética al extremo 5' (v.gr. una secuencia de poliadeninas) y posteriormente, la PCR se lleva a cabo con dos iniciadores, uno que es complementario a la secuencia sintética (anchor primer [v.gr. oligo-dT]) y el otro que hibrida con una porción conocida en el extremo 5'. El resultado es un fragmento de DNA que contiene dos regiones: la transcrita (ya conocida previamente) y la no transcrita. De esta manera el investigador puede obtener más información sobre la secuencia del extremo 5' del gen.

El desplegado diferencial del RNAm es otra ingeniosa estrategia diseñada para detectar secuencias importantes de genes que se activan o desactivan en procesos fisiológicos o fisiopatológicos. Consiste en amplificar al azar secuencias en el extremo 3' a partir del RNAm del tejido de interés, por ejemplo, de riñones de rata normales y de riñones de ratas expuestas a deshidratación. Después, se comparan las bandas obtenidas de ambas muestras en busca de bandas que aparecen o desaparecen. Una banda de amplificación que está presente en el riñón normal y desaparece en el de las ratas expuestas a deshidratación, podría indicar la presencia de un gen que se inactiva en estas circunstancias. En cambio, la ausencia de una banda en riñones normales, que sí se amplifica en el caso de la deshidratación, podría corresponder a un fragmento de un gen que se activa con este estímulo. De esta manera, eventualmente se pueden obtener secuencias de

genes importantes en dichos eventos y que codifican para proteínas desconocidas hasta el momento.

La utilidad de la PCR en la investigación clínica y en la práctica clínica también ha crecido en forma importante por lo que preferimos dedicarle el próximo artículo de esta serie.

Referencias

1. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-65.
2. Saito RK, Gelland DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 219:487-91.
3. Moreno C, Gamba G. Biología molecular en medicina. I. Estructura molecular del gen. *Rev Invest Clin* 1996; 48:81-4.
4. Merino A, Gamba G. Biología molecular en medicina. II. Enzimas de restricción. *Rev Invest Clin* 1996; 48:159-63.
5. Martínez F, Gamba G. Biología molecular en medicina. IV. Implicaciones médicas de la secuenciación del DNA. *Rev Invest Clin* 1996; 48:321-5.
6. Plata C, Gamba G. Biología molecular en medicina. III. Clonación de DNA. *Rev Invest Clin* 1996; 48:239-44.

Original Article

Semi-Quantitative PCR: A Tool to Study Low Abundance Messages in the Kidney¹NORMA A. BOBADILLA,* JUAN PABLO HERRERA,** ALEJANDRA MERINO,**
and GERARDO GAMBA**

* Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México, D.F.

** Unidad de Fisiología Molecular, Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.

Received for publication October 2, 1996; accepted October 30, 1996 (96/250)

Abstract

Some specific functions are often localized to unique cellular types or structures in organs such as kidney, brain, blood, and endocrine glands. As a result, it is not uncommon that gene products, although heavily expressed in some cell types within these organs, ultimately appear as low abundance products when total RNA is probed, resulting in decreased power of the conventional Northern blot analysis. To study gene expression in these circumstances, more sensitive techniques like RNase protection assay and quantitative or semi-quantitative PCR

strategies have been developed. In the present study, we provide a detailed description of the semi-quantitative PCR strategy in our laboratory. Using specific primers to amplify fragments from the neuronal isoform of the nitric oxide synthase and the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter (low abundance messages in the kidney), we show that the semi-quantitative PCR strategy is a valuable tool when low abundance messages are to be studied. (*Arch Med Res* 1997; 28:53)

KEY WORDS: Semi-quantitative PCR; Gene expression; Kidney; Nitric oxide synthase; Thiazido-sensitive cotransporter.

Introduction

The nephron is the functional unit that allows the kidney to accomplish a diversity of processes such as fluid and electrolyte metabolism, acid-base balance, arterial pressure control, and elimination of toxic waste products. In order to do so, the nephron is divided into specialized segments known as: glomerulus, proximal

tubule, loop of Henle, distal tubule, and collecting duct. Furthermore, these segments are subdivided into several sections exhibiting functional properties that are, therefore, unique to certain cellular types within the nephron. Thus, it is not uncommon that gene products heavily expressed in one of these nephron segments ultimately appear as low abundant products when whole kidney mRNA is analyzed, making difficult the quantitation of gene expression in disease animal models. A similar problem occurs in other organs such as brain, blood, and endocrine glands.

Two examples of these highly compartmentalized gene products within the kidney are the neuronal isoform of the nitric oxide synthase (known as NOS1) (1) and the thiazide-sensitive Na⁺:Cl⁻ cotransporter (known as TSC) (2). NOS1 is heavily expressed in the macula densa cells, a distinctive group of cells located on the very last part

Correspondence to:

Gerardo Gamba, MD, Ph.D., Unidad de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México D.F. Tel.: 573-1200, ext. 2506; Fax: 655-0382; e-mail: gamba@mail.mim.conacyt.mx

¹This work was supported by a research grant to GG (No. 93-2036) and a scholarship grant to NB from the Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

of the thick ascending limb of Henle's loop (3,4). Macula densa cells are in close contact with the glomerulus and afferent arteriole. These cells provide control of the glomerular filtration rate through the tubule-glomerular feedback mechanism, and modulate renin secretion by the afferent arteriole granular cells. The key molecule involved in these processes is the nitric oxide produced by NOS1 at the macula densa cells (3,5). NOS1 is also expressed in some cells of the inner medullary collecting duct (3,4,6). On the other hand, TSC is expressed only at the apical membrane of the distal tubule (7) where it serves as the main pathway for Na⁺:Cl⁻ reabsorption, is involved in the control of calcium reabsorption, and constitutes the target of the thiazide-type diuretics (8). Thus, NOS1 and TSC are responsible for important functions within the kidney. Although they are heavily expressed in specialized segments of the nephron, the mRNA of these genes appears as low abundance products when whole kidney RNA is probed, decreasing the power of the conventional Northern blot analysis to study their level of expression.

Since mRNA can be reverse transcribed into cDNA and subjected to conventional polymerase chain reaction (PCR), this technique has become particularly useful in the study of the gene expression level when either the analyzed gene products are of low abundance or when a limited amount of material is available. Two PCR-based strategies have been reported to evaluate the level of gene expression: quantitative and semi-quantitative (9).

The quantitative approach is used when the interest is to determine the absolute mRNA levels of a certain gene. This strategy requires the use of internal standards (10), which are composed of point-specific mutants of the gene that allows the investigator to differentiate between the amplified endogenous mRNA being studied, and the internal standard, using a unique restriction site.

The semi-quantitative PCR approach can be used when the interest of the scientist is to determine whether the amount of a specific low abundance mRNA product is modified during a given circumstance (6,11-13) and not to determine the exact number of molecules present in the sample. As with Northern blot analysis, the semi-quantitative PCR approach is performed using a constitutive gene as control (β -actin, cyclophilin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). This strategy allows the investigator to use one control gene in the analysis of several gene products.

Since one of the major goals of our laboratories is to study the expression of several genes in the kidney under different physiological and pathophysiological circumstances, we performed semi-quantitative PCR analysis for the NOS1 and TSC gene products using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a control gene. Here we show that semi-quantitative PCR is a useful tool to investigate the relative level of gene

expression of low abundance mRNAs in the kidney and the strategy employed is described in detail.

Materials and Methods

RNA Isolation. The tissues were obtained from six male Wistar rats weighing between 250-300 g. After anesthesia with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital, rats were sacrificed and the cerebellum, heart, liver, and both kidneys were excised, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. The left kidneys were macroscopically subdivided into cortex, outer medulla, and inner medulla. Total RNA was isolated by using the guanidine isothiocyanate-caesium chloride method (14). Integrity of isolated total RNA was examined by 1% agarose gel electrophoresis and RNA concentration was determined by the UV-light absorbance at 260 nm using a spectrophotometer (Beckman DU640, Fullerton, CA, USA).

PCR Primers. NOS1 and TSC custom primers were acquired from Genosys (Woodlands, TX, USA). The NOS1 primers were designed from a region of low identity between the three isoforms of the nitric oxide enzymes (1), corresponding to bases 692 - 999 of the cloned NOS1 isoform (15) (308 bp product):

sense: 5'GAACCCCAAGACCATCC3'
antisense: 5'GGCTTGTCTCCACAGTT3'

The TSC primers were also designed to amplify a region that exhibits a low degree of identity with other members of the electroneutral cotransporter family (16), corresponding to bases 589 - 792 of the cloned rat TSC (2) (204 bp product):

sense 5'AATGGCAAGGTCAAGTCGG3'
antisense 5'GATCGGGATGTCATTGATGG3'

PCR products from both NOS1 and TSC primers were sequenced in both directions by the dideoxy chain termination method (17) using the Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (USB, Cleveland, OH, USA). The GAPDH primers used as control gene have been previously described (18) and yield a PCR product of 515 bp.

Reverse Transcription. Reverse transcription (RT) was carried out using 5-10 μ g of total RNA from cerebellum, heart, liver, whole kidney, renal cortex, or inner medulla. Prior to the RT reaction, the RNA was heated at 65°C for 10 min. RT was performed at 37°C for 60 min in a total volume of 20 μ l using 200 U of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Bethesda MD, USA), 100 pmol of random hexamers (Life Technologies, Bethesda MD, USA), 0.5 mM of each dNTP (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 1X RT buffer (75 mM KCl; 50 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, pH 8.3). Samples were heated at 95°C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase and diluted to 40 μ l with PCR grade water.

cDNA Amplification One tenth and 1/20 of the RT samples were used for NOS1 and TSC PCR, respectively, in 20 μ l final volume reactions containing 1X PCR buffer (10 mM tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl, pH 8.3); 0.1 mM of each dNTP, 0.2 μ Ci of [α^{32} P]-dCTP (~3000 Ci/mmol, 9.25 MBq, 250 μ Ci, Amersham, Buckinghamshire, England); 10 μ M of each primer (NOS or TSC), and one unit of Taq DNA polymerase (Biotecnologias Universitarias, México, D.F., México). The samples were overlaid with 30 μ l of mineral oil, and PCR cycles were performed in a DNA thermal cycler (M.J. Research, Watertown, MA, USA), with the following profile: denaturation 1 min at 94°C, annealing 1 min at 55°C for the NOS1 primers and at 60°C for the TSC primers, and extension 1 min at 72°C. The number of cycles was determined as detailed below. The last cycle was followed by a final extension step of 5 min at 72°C. All reactions were performed by duplicate. To analyze the products, one-half of each reaction was electrophoresed on 1.2% agarose gel and the other half in a 5% acrylamide gel.

Determination of the Exponential Phase. As with many laboratory reactions, PCR amplification of any gene exhibits two phases: an exponential phase in which the amount of products increases linearly related to the number of cycles, and a plateau phase in which the amount of products obtained will not increase further with an increase in the number of cycles. The lower the abundance of the mRNA, the longer the duration of the exponential phase.

Knowing the exponential phase for each pair of primers is a critical feature of the semi-quantitative PCR reaction in order to avoid false results due to analysis during the plateau phase. The kinetics of the amplification of NOS1 and TSC was evaluated using whole kidney RNA. The exponential phase was determined in a double assay (200 μ l divided in individual reactions of 20 μ l) in the presence of [α^{32} P]-dCTP. The cycles analyzed were: for NOS1: 15, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, and 38, and for TSC: 15, 17, 19, 21, 23, 29, 35, and 40. An aliquot of 10 μ l was removed and loaded on an agarose gel. Bands were ethidium bromide stained and visualized under UV light, cut out, and melted at 95°C in 500 μ l of double distilled water. The relative amount of amplified cDNA was then determined by liquid scintillation counting (Beckman LS6500, Fullerton CA, USA). The amount of radioactivity recovered from the excised bands was plotted in a log scale against the number of cycles.

Kinetics of the GAPDH Amplification. Constitutive gene products used as controls (such as GAPDH) are usually of high abundance. For this reason, it is very important to be sure that an exponential phase for the control gene is also determined. This goal was accomplished for GAPDH by the combination of an optimal

concentration of the primers and the kinetics of amplification at different cycle numbers

Determination of Semi-Quantitative PCR Sensitivity. Once the exponential phase for amplification of NOS1, TSC, and GAPDH was determined from whole kidney total RNA, we examined the power of semi-quantitative PCR to detect small changes in the level of expression by performing the following experiments. 1) Different concentrations of cDNA. A set of reactions was performed using different amounts of cDNA (corresponding from 0.13 to 1.25 μ g of total RNA) during the exponential phase, previously determined for NOS1 and TSC. Ethidium bromide staining of PCR products separated in agarose gel were cut out and the radioactivity recovered from the bands was determined. Background values were subtracted. The radioactivity values in cpm were plotted against RNA concentration. 2) Dilution of renal total RNA with liver RNA. Since TSC is a kidney specific gene, we diluted total RNA from whole kidney with total RNA from liver and the diluted samples were transcribed to cDNA in order to determine the linearity of the amplification of TSC. 3) Amplification of NOS1 from tissues with different levels of expression. NOS1 was amplified from cDNA reverse transcribed from cerebellum, a tissue with the highest level of expression (15), as well as from heart, renal cortex, and inner medulla. 4) Amplification of TSC from renal cortex vs. whole kidney. Since TSC is expressed only in the distal tubule (7), located in the renal cortex, it is expected that the level of expression should be higher using total RNA from renal cortex than from the whole kidney.

Results and Discussion

The PCR products obtained with NOS1 and TSC primer pairs were of the expected size and when sequenced showed 100% identity with the cDNA previously reported (2,15). In the initial experiments we determined that the ratio between cold dNTP's and [α^{32} P]-dCTP should be in a final concentration of 100 nM:0.2 μ Ci per 20 μ l reaction, in order to allow the tracer dCTP to be incorporated (data not shown). We also observed that the new 32 P-nucleotides that contain dye and stabilizer (Redivue) exhibit some inhibitory action on the PCR. For this reason, all the experiments in the present paper were performed using the classical presentation that is stabilized in aqueous solution and requires storage at -20°C.

Exponential Phases

Figure 1 depicts the kinetics of the reaction for NOS1 (1A) and TSC (1B). Inside each graphic we display the scanned image of an autoradiograph showing the intensity of the incorporated products. It is clear from this figure that a similar graph may be constructed by using

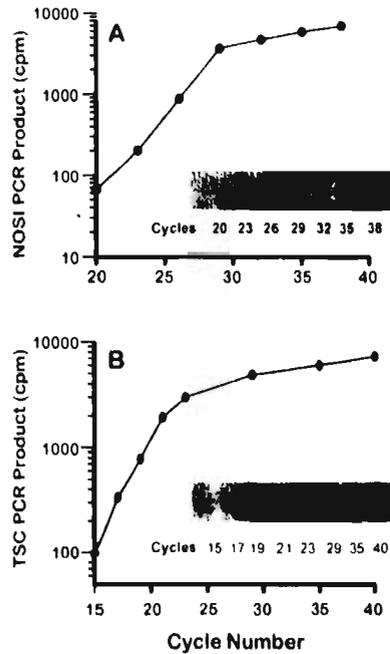


Figure 1. Kinetic analysis of NOSI (1A) and TSC (1B) amplification at increasing number of cycles. The product amount is expressed as the log of the incorporated [32 P]-dCTP in the bands excised from the gel. The insert shows a scanned image of the autoradiograph containing the same products.

either the log of the PCR product obtained by measuring the incorporated [32 P]-dCTP of the bands excised from the gel, or the densitometric analysis of the autoradiograph. Figure 1 shows that NOSI and TSC amplification reactions exhibit two clear phases: exponential and plateau. The exponential phase for NOSI was observed between 20 to 29 cycles, while for TSC it was observed from 15 to 24 cycles. The earlier exponential phase for TSC as compared to NOSI is in accordance with the fact that NOSI is expressed only at the macula densa, while TSC is expressed along the distal tubule. Based on these analyses, we decided to use 26 cycles for NOSI and 20 for TSC to routinely amplify the cDNA within the exponential phase.

For GAPDH we found that the optimal primer concentration was 100 nM (final concentration) instead of the 1 μ M used for NOSI and TSC (data not shown); this is a ten-times-lower concentration of primers. This finding is in accordance with the higher abundance of GAPDH

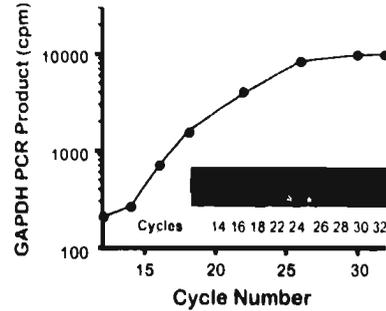


Figure 2. Kinetic analysis of GAPDH amplification at increasing number of cycles. The insert shows a scanned image of the autoradiograph containing the same products.

gene product. Figure 2 shows the kinetics and the autoradiograph of the curve obtained for GAPDH using this lower primers concentration. From Figure 2 it is clear that the exponential phase for GAPDH was between 15 to 25 cycles, so we decided to use 20 cycles for the analysis.

Sensitivity of the Semi-Quantitative PCR Strategy

The main purpose of the semi-quantitative PCR is to detect changes in the level of gene expression on low abundant transcripts. These changes can be in either direction, as the level of expression can increase or decrease. The latter is the major challenge and advantage of semi-quantitative PCR, since the detection of a decrease in the expression of a low abundant gene is difficult using Northern blot analysis. Therefore, we conducted experiments to determine the sensitivity of the strategy.

In one set of experiments we prepared samples with increasing amounts of total RNA ranging from a very low amount (0.13 μ g) to the regular amount (1.25 μ g) used in a PCR reaction. Figure 3 shows that for both NOSI (3A) and TSC primers (3B), there is a linear relationship between the amplified PCR products and the amount of cDNA in the PCR. In addition, we evaluated the effect of diluting whole kidney total RNA with a solution containing total RNA from another organ, such as liver, instead of water. In this experiment a constant amount of total RNA is maintained during the RT reaction. The ratios in μ g used from liver to kidney were: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5. Since TSC is a kidney specific gene (2), while NOSI is expressed in several organs (15), we performed the liver-kidney analysis only with the TSC primers. Figure 4 shows that as expected, no TSC product was obtained using RNA from the liver. Then, the higher the proportion of kidney RNA in the sample, the higher the amount of TSC product. No

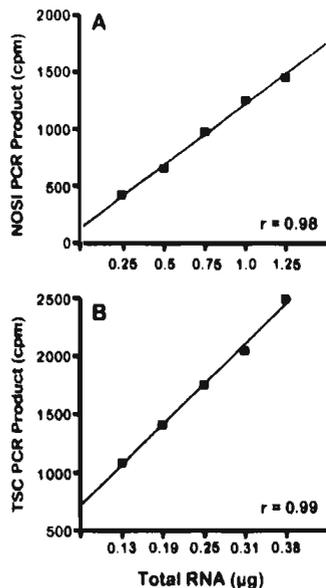


Figure 3. Linear regression of the PCR products (in cpm) of NOSI (3A) or TSC (3B) against the amount of total RNA used for the RT reaction.

differences were detected in GAPDH amplification (data not shown). Therefore, taken together, Figures 3 and 4 suggest that semi-quantitative PCR is able to detect even a small change either way in the number of the transcripts.

Detection of Different Levels of Expression

Once we demonstrated that the semi-quantitative PCR strategy exhibits high sensitivity to detect changes in the initial number of the transcripts by diluting the total RNA, we evaluated whether the strategy was good enough to detect changes in the level of expression of NOSI and TSC in a real situation. It is well known that the tissue with the highest level of expression of NOSI is the cerebellum (15). In the kidney, NOSI is expressed mainly in the macula densa (renal cortex), but a small expression has been demonstrated in cells of the inner medullary collecting duct (inner medulla) (6). Figure 5 shows a scanned image of the autoradiograph containing the NOSI PCR products from cerebellum, heart, renal cortex, and inner medulla during 26 cycles. The expression is clearly higher in cerebellum than in other organs. Furthermore, the smallest level of expression in the inner medulla, as compared to renal cortex is also detected.

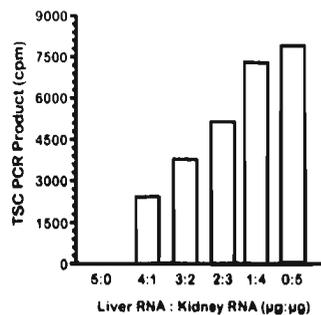


Figure 4. Amount of TSC PCR products (in cpm) obtained during 20 cycles from mixed liver and whole kidney total RNA, varying from no kidney RNA (5:0) to no liver RNA (0:5). No amplification was obtained from the sample with no kidney RNA (5:0).

Within the kidney, TSC is expressed only in the apical membrane of the distal tubule (7), a segment of the nephron that is located in the renal cortex. We compared the amount of PCR products at 20 cycles from RNA samples obtained from six whole kidneys to those RNA samples obtained from six renal cortices from the same rats (right kidney vs. left renal cortex). Figure 6 shows in panel A that renal cortex expresses a significantly higher amount of TSC than whole kidney. In contrast, note that in panel B in the same samples, expression of GAPDH was similar between renal cortex and whole kidney RNA.

Taken together, Figures 5 and 6 clearly support that semi-quantitative PCR is good not only for detecting differences between expression of high vs. low abundance messages (cerebellum vs. heart or renal cortex), but that is also able to differentiate between distinct levels of low abundance (cortex vs. inner medulla for NOSI, or whole kidney vs. renal cortex for TSC).

In summary, we showed that during the exponential phase there is a linear relationship between the PCR

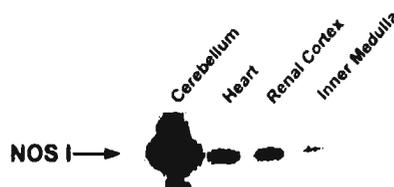


Figure 5. Autoradiograph showing the NOSI PCR products obtained at 26 cycles from cerebellum, heart, renal cortex, and renal inner medulla total RNA. For this analysis, 50% of the PCR samples were resolved in a 5% acrylamide gel, dried and exposed to autoradiograph for 12 h at -80°C .

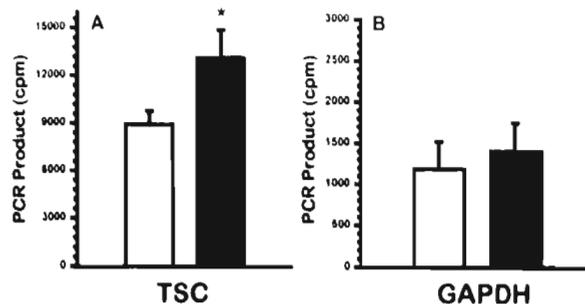


Figure 6. PCR products (in cpm) for TSC (6A) or GAPDH (6B) using total RNA from whole right kidney (open bars) or left renal cortex (solid bars) from six rats. Bars are expressed as mean \pm standard error.

products and the amount of cDNA added to the reaction or the initial number of mRNA copies of a gene transcript present in the sample. Then, we demonstrated that the semi-quantitative PCR strategy is sensitive enough to detect subtle differences in the levels of NOS1 or TSC expression. Thus, we conclude that if amplification is performed during the exponential phase, PCR is a sensitive and reproducible technique for studying the expression level of low abundance gene transcripts.

Acknowledgments

We thank Consuelo Plata and Javier Placencia, Ph.D. of the Faculty of Chemistry, UNAM, for their help in synthesizing the GAPDH primers under the program sponsored by PADEP (5014). We are also grateful to the members of the Molecular Physiology Unit for their suggestions and stimulating discussion.

References

1. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1995; 4:12.
2. Gamba G, Miyashita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC. Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-potassium-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 1994; 269:17713.
3. Wilcox CS, Welch WJ, Morad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HHHW. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:11993.
4. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthase in mammalian kidney. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 268:F885.
5. Schriker K, Haimann M, Kurtz A. Nitric oxide and prostaglandin are involved in the macula densa control of the renin system. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 269:F825.
6. Singh I, Granis M, Wang W-H, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP. Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1996; 270:F1027.
7. Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JM, Lee W-S, Brown D, Poch E, Gullans SR, Hebert SC. Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, tTSC1, in the rat kidney. *Kidney Int* 1996; 50:174.
8. Ellison DH, Velazquez H, Wright FS. Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1987; 253:F546.
9. Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods and Applications* 1992; 2:1.
10. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9717.
11. Ito H, Miller SC, Akimoto H, Torti SV, Taylor A, Billingham ME, Torti FM. Evaluation of mRNA levels by the polymerase chain reaction in small cardiac tissue samples. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23:1117.
12. Ahn KY, Turner PD, Madsen KM, Kone DC. Effects of chronic hypokalemia on renal expression of the "gastric" H⁺-K⁺-ATPase α -subunit gene. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1996; 270:F557.
13. Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 1993; 266:25993.
14. Sambrook J, Fritsch FF, Maniatis T, Eds. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:7.
15. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351:714.
16. Kaplan MR, Mount DB, Delpire E, Gamba G, Hebert SC. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu Rev Physiol* 1996; 58:649.
17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463.
18. Rocco-Neilson E, Hoyer J, Ziyadeh F. Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1992; 262:F679.

The American Physiological Society

June 21, 1997

Ms # 092-7R

Dr. Norma Bobadilla
Department of Nephrology
Instituto Nacional de Cardiologia I.Ch.
Juan Badiano No 1, Col Seccion XVI,
Mexico City CP 14080

PLEASE REPLY TO
Dr. Steven C. Herbert, Editor
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
RENAL PHYSIOLOGY
EDITORIAL OFFICE
VANDERBILT UNIVERSITY
DIVISION OF NEPHROLOGY
1161 TWENTY-FIRST AVENUE SOUTH AT GARLAND
S-3223 MEDICAL CENTER NORTH
NASHVILLE, TN 37232-2372
615-343-1920
FAX#615-343-1915
email: ajrenal@mc.manhattan.vanderbilt.edu

Associate Editors:
Christine Baylis, PhD
Peter A. Friedman, PhD
Steven R. Gullans, PhD
Sanjay K. Nigam, MD
Mark L. Zeidel, MD

Dear Dr. Bobadilla,

I have received comments from both reviewers on your revised version of your manuscript "Evaluation of NO synthesis in cyclosporine nephrotoxicity: Effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression". Both reviewers thought that the manuscript was considerably improved and I thank you for being so responsive to the comments. Reviewer 1 makes a few minor suggestions that will further improve the paper, and points that there are problems with the English, spelling etc that need to be addressed. The second reviewer feels strongly that you should show the distribution of the NOS mRNAs for cortex and medulla, if NOS activity assays are not available. I think that this is a reasonable request since the functional data relates to the cortical microcirculation. If you are willing to further revise the manuscript taking into account all of the comments of both reviewers I will do my best to expedite a decision on this manuscript.

If you resubmit, please include a response to the reviewers and an index of your changes with your revised manuscript. Please send your revised manuscript, 3 copies, a disk and glossy figures to the editorial office, attention: Jennifer Mahar, AJP Renal, Vanderbilt University, Division of Nephrology, 1161 21st Ave. South at Garland, S-3223 Medical Center North Nashville TN 37232-2372. Your revised manuscript must be submitted within 6 months or will be processed as a new submission. Thank you for submitting your interesting paper to the *American Journal of Physiology Renal Physiology*.

Sincerely,



Chris Baylis, PhD
Associate Editor

JOURNALS

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY • CELL PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND INTESTINAL PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: LUNG, CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY • ADVANCES IN PHYSIOLOGY • AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: INTEGRATIVE AND COMPARATIVE • JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY • JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY • PHYSIOLOGICAL REVIEWS • NEWS IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES • LITERATURE • THE PHYSIOLOGIST

BOOKS

HANDBOOK OF PHYSIOLOGY • PHYSIOLOGICAL PRINCIPLES • SERIES • SPEEDY PUBLICATION