



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**MEMORIA
2015**

SUMARIO

MEMORIA	3
JORNADAS	
159º JORNADA CIENTÍFICA 16	
“BIOSIMILARES”	16
CONFERENCIAS	
CONFERENCIA DE INCORPORACION	17
“Bioprospección de compuestos tripanocidas en la flora medicinal argentina”	18
Dr. Virginia Martino	
PREMIOS	
PREMIO “PREMIO MARGNI” 2014	25
“Detección y caracterización de autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) en pacientes argentinos con reciente diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 1.”	
Natalia Inés Faccinetti, Luciano Lucas Guerra, Ruben Francisco lacono, Aldana Trabucchi Silvina Noemí Valdez	
PREMIO “PREMIO GERSHMAN” 2014 -	35
“El sistema dopaminérgico renal y el péptido natriurético atrial como reguladores de la excreción de sodio y la presión arterial: implicancias fisiopatológicas en la hipertensión arterial “	
Rukavina Mikusic NL &, Kouyoumdzian NM&, Kravetz MC#, Del Mauro J#, Gorzalczany S#, Puyó AM [§] Toblli JE& Fernández BE&, Choi MR& ^{§*} .	
IN MEMORIAM	77

CONSEJO DIRECTIVO

ASUNCIÓN DE NUEVAS AUTORIDADES

El 23 de abril tuvo lugar la Asamblea Ordinaria convocada para proceder a la elección de los miembros que cesan su mandato, siendo elegidos por un período de dos años: Vicepresidente, Prosecretario, Protesorero, un Vocal titular, y un Vocal Suplente por dos años y por un año un Vocal suplente y tres Revisores de Cuentas.

El Consejo Directivo quedó constituido de la siguiente manera:

Presidente:	Acad. Manuel R. Limeres
Vicepresidente:	Acad. Carlos M. Baratti
Secretario General:	Acad. Horacio José Gabriel Mato
Prosecretario:	Acad. Nestor Caffini
Tesorero:	Acad. Alfredo Salibian
Protesorero:	Acad. Miguel D' Aquino
Vocales Titulares:	Acad. Carlos A. Gotelli Acad. Juan Pablo F.C. Rossi
Vocales Suplentes:	Acad. Marta M. Salseduc Acad. Miguel Ángel Caso
Revisores de Cuentas:	Acad. Alfredo A. Hager Acad. Osvaldo Cascone Acad. Francisco Stéfano

El Consejo Directivo realizó durante este período diez (10) reuniones y el Claustro Académico se reunió en nueve (9) oportunidades. La nómina de las Comisiones y la composición de las Secciones figuran como anexos I y II.

NUEVOS ACADEMICOS

ACTO DE INCORPORACION DE ACADEMICO

El 28 de mayo se llevó a cabo el acto de incorporación del Académica Titular Virginia Martino. La Académica ingresante dictó una Conferencia de incorporación, según lo especificado en el Estatuto, y se le hizo entrega de la medalla y diploma correspondientes, según el detalle que figura en el anexo V.

ACADEMICOS EMERITOS

El 28 de mayo se votó el pasaje a Académicos Eméritos de los Académicos Titulares Rodolfo Brenner y José Alberto Santomé (*post mortem*).

ACADEMICO CORRESPONDENTE

Se designa al Académico Titular Bregni como Acad. Correspondiente ya que el Acad Titular Bregni se traslada a más de 300km de Buenos Aires.

IN MEMORIAM

Durante este año hubo que lamentar el fallecimiento del Académico Emérito Jorge Coussio, cuya semblanza estuvo a cargo de la Académica Titular Virginia Martino, el Académico Emérito Hector Iovine, semblanza a cargo del Académico Titular Otmaro Roses, el Académico Emérito Horacio B. Rodriguez, semblanza a cargo del Académico Titular Miguel A. Caso, y el Académico Emérito José A Santomé, semblanza a cargo de Académica Titular Mirta Biscoglio.

MODIFICACION REGLAMENTO GENERAL

El 22 de octubre de 2015 la Asamblea Extraordinaria se modificó el TÍTULO IV - DE LAS SECCIONES del Reglamento General de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

En consecuencia, en lo sucesivo las tres Secciones que componen la Academia serán las siguientes:

Sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas, con 14 sitaliales titulares y 7 correspondientes

Sección Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales, con 14 sitaliales titulares y 7 correspondientes

Sección Ciencias Aplicadas a la Salud, 12 sitaliales titulares y 6 correspondientes

El claustro, el 22 de octubre, aprobó la integración de las mismas:

Sección Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales

Académicos Añon, Biscoglio, Boveris, Caffini, Cascone, Hajos, Portela, Poskus, Roses, Rossi, Salibián y Wikinski

Sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas,

Académicos Baratti, Carducci, Caso, Gaozza, Gurni, Gutkind, Los, Martino, Nacucchio, Rubio, Salseduc, y Volonté

Sección Ciencias Aplicadas a la Salud

Académicos Caro, Coco, D'Aquino, De Paoli, Giuliani, Gotelli, Hager, Limeres, Mato, Pizzolato, Stéfano,

MODIFICACION REGLAMENTO PREMIOS

El claustro aprobó el 22 de octubre la modificación del reglamento de premios. Como consecuencia de la puesta en vigencia de las modificaciones no habrá llamado de premios correspondiente al año en curso.

A partir de esta reforma anualmente se otorgaran los premios anuales a trabajos presentados en las siguientes áreas:

- a) Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas (Control de Calidad, Farmacobotánica, Farmacognosia, Farmacología, Química Farmacéutica, Radiofarmacia, Tecnología Industrial y Ciencias Afines).
- b) Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales (Anatomía Humana, Bioestadística, Biología Molecular, Bromatología, Genética, Histología, Inmunología, Microbiología y Ciencias Afines).
- c) Ciencias Aplicadas a La Salud (Bioquímica Clínica, Ecología, Ejercicio, Doctrina y Legislación Farmacéutica y Bioquímica, Ética Científica y Profesional, Farmacia Clínica, Farmacia Oficinal y Hospitalaria, Gestión y Aseguramiento de la Calidad, Higiene, Historia de las Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Industrias Bioquímico-Farmacéuticas, Organización Sanitaria, Sanitarismo, Toxicología y Ciencias Afines).

COLOQUIOS

15-6-2015 Coloquio desarrollado por el Académico Rubio sobre “Aplicaciones de la Farmacogenética en la prevención de efectos adversos y en la optimización y mejora de la eficacia terapéutica”

24-9-2015 el Académico Mato desarrolla el Coloquio “Medicamentos huérfanos: estado actual de la legislación”, tema que había sido presentado en la última reunión de la AIAF en Barcelona.

REUNIONES CIENTIFICAS

El 20 de agosto de 2015 se llevó a cabo las 159ª Jornada Científica titulada “Biosimilares”, coordinada por el Académico Alberto Díaz .(Anexo IV)

PREMIOS 2014

Se otorgó el Premio 2014:

PREMIO MARGNI

“Detección y caracterización de autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) en pacientes argentinos con reciente diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 1.”

Natalia Inés Faccinetti, Luciano Lucas Guerra, Ruben Francisco Iacono, Aldana Trabucchi Silvina Noemí Valdez

PREMIO GERSHMAN

“El sistema dopaminérgico renal y el péptido natriurético atrial como reguladores de la excreción de sodio y la presión arterial: implicancias fisiopatológicas en la hipertensión arterial “

Rukavina Mikusic NL[&], Kouyoumdzian NM[&], Kravetz MC[#], Del Mauro J[#], Gorzalczy S[#], Puyó AM[§]
Toblli JE[&] Fernández BE[&], Choi MR^{&§*}.

Se declararon **desiertos** los Premios Marenzi (Química Biológica) y De Prado (Legislación Farmacéutica y Bioquímica). No hubo presentaciones a los Premios Celsi (Química Analítica), Lugones (Industrias Farmacéuticas Y Bioquímica), García Fernández (Toxicología), Nethol (Cosmética), Novelli (Química Orgánica).

AIAF 2015

Los académicos Manuel R. Limeres, Gabriel Mato y Marcelo Nacucchio concurren a la reunión de AIAF realizada en España, del 25 al 27 de marzo, en representación de la ANFyB.

Los académicos Manuel R. Limeres y Gabriel Mato participaron en los simposios sobre Falsificación de Medicamentos y Medicamentos Huérfanos.

PROYECTO DE LEY 0324 D - 2014

El 15 de diciembre de 2014 por orden del día 1633 se da media sanción, en diputados, al proyecto de ley que pasa al senado de la Nación.

Con fecha 11 de noviembre se aprobó el dictamen de la Comisión de Presupuesto y Hacienda que modifica el art. 2° de la Ley 24.824, para el que propone el siguiente texto: *“La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica percibirá las contribuciones y subsidios previstos a favor de las Academias Nacionales por el artículo 4° del decreto ley 4.362/55, complementado por el decreto 1.556/2008”*.

El proyecto pasó al recinto pero no se trató quedando pendiente para el año legislativo 2016.

AUSPICIOS DE LA ACADEMIA A REUNIONES CIENTÍFICAS

Curso de Postgrado: Nutrición en Neonatología organizado por el Instituto Argentino de Educación e Investigación en Nutrición IAEDIN.

Asociación Argentina de Farmacología Experimental, para el evento conjunto que se realizará los días 4 al 6 de noviembre en la ciudad de Córdoba, en el que se desarrollarán simultáneamente el 6° Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas, la 47ª Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental y el 3er. Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética.

A la Jornada “Control de la Resistencia Antimicrobiana y la importancia del rol del farmacéutico en la misma”, realizada el 17 de septiembre de 2015 en el Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal.

RELACIONES CON OTRAS ACADEMIAS NACIONALES

Se mantiene una relación directa, asistiendo a la mayoría de las incorporaciones y actos programados, a los que fue invitada la Academia. En forma especial merece destacarse:

- Los Acad. Caso y Squassini concurren al acto de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires, en la que el Embajador Vicente Guillermo Arnaud brindó una conferencia sobre “Manuel Belgrano y la Educación” realizado el 30 de julio.
- El Acad. Manuel Limeres asistió al acto de incorporación de académicos de la Academia Nacional de Bellas Artes realizada el 15 de julio
- El Acad. Caso participó del acto celebrado el 13 de agosto en la Academia Nacional de Medicina, donde se produjo la presentación del libro “En busca de la causa del cáncer”, de Christiane Dosne Pasqualini y un concierto a cargo de la Orquesta ARS de Buenos Aires.
- Los Acad. Caso y Squassini asistieron el 11 de agosto a la incorporación de la Dra. Beatriz Moreyra como miembro de la Academia Nacional de la Historia. La Dra. Moreyra disertó sobre el tema “Cuestión social, modelo asistencial e historiografía en la modernidad liberal”
- Los Acad. Caso y Squassini estuvieron presentes el 24 de setiembre en el Regimiento de Patricios, donde el Instituto Belgraniano presidido por el tataranieta del general Manuel Belgrano, quien lleva su mismo nombre- conmemoró el aniversario de la Batalla de Tucumán.
- El Académico Caso informa que junto al Acad. Squassini estuvieron presentes el 10 de noviembre en la Academia Nacional de Historia, donde se entregaron premios a los egresados con mayor promedio en las carreras de Historia del año 2014 y también el Premio sobre Obras Publicadas, además de diplomas de reconocimiento a las personas e instituciones que efectúan donaciones a la Academia. También tuvieron lugar los discursos de recepción de los Académicos de número Dres. Ezequiel Gallo y Natalio Botana y la entrega del diploma de académico correspondiente por España al Dr. José Varela Ortega, nieto de José Ortega y Gasset, quien disertó sobre “La mirada del otro. La imagen en el extranjero o la historia del estereotipo: entre el español militante y apasionado y el español indolente y decadente (1469-2015)”
- Academia Nacional de Ciencias celebró el 80° aniversario de su creación donde se distinguió al Dr. Rodolfo Brenner como Académico Honorario. Concurrió el Dr. Manuel Limeres

RELACIONES CON OTRAS INSTITUCIONES Y PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

- El Acad. Limeres estuvo presente junto con el Acad. Squassini en la Jornada “Control de la Resistencia Antimicrobiana y la importancia del rol del farmacéutico en la misma”, realizada el 17 de septiembre de 2015 en el Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal, a la que la Academia otorgara el auspicio.
- SADAM, Asociación Argentina de Auditoría y Gestión Sanitaria realizó el 27 de agosto una reunión en la que se distinguió al Académico Manuel R. Limeres en reconocimiento a su destacada trayectoria y aportes a la calidad en la Auditoría y en la Gestión en Salud

PUBLICACIONES

Revista Farmacéutica 157nº 1 (2015 versión electrónica).

Anales de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (Año 2014) versión electrónica.

ENTIDADES COOPERADORAS DE LA ACADEMIA

En la Revista Farmacéutica se mencionan las Entidades Cooperadoras que apoyan económicamente a la Academia, permitiendo así su normal funcionamiento. (Se mencionan en el anexo VII).

ACTO DE FIN DE AÑO

El 10 de diciembre tuvo lugar en la sede de nuestra Academia el brindis de Fin de Año.

ANEXO I

COMISIONES 2015

(Por orden alfabético)

Publicaciones

Acad. Dr. Nestor Caffini (Coordinador), Acad. Alberto Gurni (Coordinador Alterno), Acad. Marcelo C. Nacucchio, Acad. María Luz Pita Martín, Acad. Marta Salseduc, Acad. Alfredo Salibian

Premios y Distinciones

Acad. Carlos M. Baratti (Coordinador), Acad. Clyde N. Carducci, Acad. Osvaldo Cascone, Acad. Miguel A. Caso, Acad. Alfredo A. Hager, Acad. Mario Los, Acad. Alfredo Salibián

Relaciones Públicas, Vinculaciones y Finanzas

Acad. Miguel A. Caso (Coordinador), Acad. Miguel D´Aquino, Acad. Alfredo Salibian y Acad. Marcelo Squassini.

Estatuto y Reglamento

Acad. Gabriel Mato (Coordinador), Acad. Juan Pablo Rossi, Acad. Modesto C. Rubio y Acad. Carlos Gotelli

ANEXO II

MIEMBROS

ACADÉMICOS TITULARES

Acad. María Cristina Añón
Acad. Carlos M. Baratti
Acad. Mirta J. Biscoglio
Acad. Alberto A. Boveris
Acad. Nestor O. Caffini
Acad. Clyde N. Carducci
Acad. Ricardo A. Caro
Acad. Osvaldo Cascone
Acad. Miguel A. Caso
Acad. Roberto Coco
Acad. Miguel D' Aquino
Acad. Tomás de Paoli
Acad. Carlos H. Gaozza
Acad. Hector I. Giuliani
Acad. Gabriel O. Gutkind
Acad. Alberto Gurni
Acad. Carlos A. Gotelli
Acad. Alfredo A. Hager
Acad. Silvia Hajos
Acad. Manuel Limeres
Acad. Mario A. Los
Acad. Virginia Martino
Acad. Horacio José Gabriel Mato
Acad. Marcelo C. Nacucchio
Acad. María Luz Pita Martín de Portela
Acad. Marco Pizzolato
Acad. Edgardo Poskus
Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Juan Pablo F.C. Rossi
Acad. Modesto C. Rubio
Acad. Alfredo Salibian
Acad. Marta M. Salseduc
Acad. Francisco J.E. Stefano
Acad. María Guillermina Volonté
Acad. Regina L. W. de Wikinski

ANEXO II

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

ARGENTINA

Acad. Carlos Bregni
Acad. Marcelo O. Cabada
Acad. Alberto Diaz
Acad, Jorge Errecalde
Acad. Oscar H. Fay
Acad. Raul C. Fazio
Acad. Pesce de Ruiz Holgado
Acad. Guillermo R. Lossa
Acad. Ruben H. Manzo
Acad. Modesto P. Montecchia
Acad. Aldo D. Mottino
Acad. Elsa M. Nadalin
Acad. Jorge O. Nicolini
Acad. Otto A. Orsingher
Acad. Ana Maria Pechen D'Angelo
Acad. Gabriela Del Valle Perdigón
Acad. Clelia M. Riera
Acad. Daniel O. Sordelli
Acad. Marcelo D. Squassini

ALEMANIA

Acad. Pablo Steinberg

BRASIL

Acad. Aluísio Pimenta
Acad. Caio Romero Cavalcanti

CHILE

Acad. Aquiles Arancibia Orrego
Acad. Marco A. Montes Guyot
Acad. Rosa I. Morán Gana
Acad. Wanda Quilhot Palma

COLOMBIA

Acad. Fleming Martíne Rodríguez

CUBA

Acad. Ricardo Galvis
Acad. Héctor Zayas Bazan Y Perdomo

ECUADOR

Acad. Julio F. Araoz
Acad. Eduardo Goetchel

ANEXO II

ACADEMICOSCORRESPONDIENTES

ESPAÑA

Acad. María del Carmen Francés Causapé
Acad. Tomás Adzet Porredón
Acad. Francisco Zaragoza García
Acad. Eduardo Mariño Hernández
Acad. Miguel Ylla Catalá Genis
Acad. Antonio Monge Vega

ESTADOS UNIDOS

Acad. Jorge R. Barrio
Acad. Jorge D. Brioini
Acad. Marcel E. Nimni

FRANCIA

Acad. Jean Marc Aïache
Acad. Paul Fleury
Acad. Carlos Soto

ITALIA

Acad. Stefano Govoni

MEXICO

Acad. Pedro Joseph Nathan

PANAMA

Acad. Ceferino Sánchez

PARAGUAY

Acad. Luis H. Berganza

PERU

Acad. Fernando Quevedo Ganoza
Acad. José Amiel Pérez

VENEZUELA

Acad. José Luis Andrade

URUGUAY

Acad. Jorge Ares Pons
Acad. Cayetano Cano Marotta
Acad. Cosme de los Santos Carvallido
Acad. Uberfil Delbene Garate
Acad. Pietro Fagiolino
Acad. Raquel Lombardo de Bertolaza
Acad. Justo Emilio Menes
Acad. Patrick Moyna
Acad. Anibal Alberto Olmos Ferreira
Acad. Oscar Polla Bermudez
Acad. Joaquin E. Royer Meicoso

ANEXO II

ACADEMICOS EMERITOS

Acad. Sem M. Albonico
Acad. Arnaldo L. Bandoni
Acad. Rodolfo Brenner
Acad. Mateo Chekherdemian
Acad. Ronaldo Meda

ACADEMICOS HONORARIOS

ARGENTINA

Acad. Juan Carlos Bagó

BRASIL

Acad. Evaldo De Oliveira

ESPAÑA

Acad. Benito del Castillo García
Acad. María Teresa Miras Portugal
Acad. Federico Mayor Zaragoza

ITALIA

Acad. Rodolfo Paoletti

ANEXO II

SECCIONES

A) SECCION CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y NATURALES (21 miembros)

B) SECCION CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y FARMACOLÓGICAS, (21 miembros)

C) SECCION CIENCIAS APLICADAS A LA SALUD (18 miembros)

SECCION A: CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y NATURALES

Acad. María Cristina Añón

Acad. Mirtha Biscoglio

Acad. Alberto A. Boveris

Acad. Néstor O. Caffini

Acad. Osvaldo Cascone

Acad. Héctor I. Giuliani

Acad. Silvia Hajos (**Coordinador Alterno**)

Acad. María L. Pita Martín de Portela

Acad. Edgardo Poskus

Acad. Otmaro E. Roses

Acad. Juan Pablo F.C. Rossi (**Coordinador**)

Acad. Alfredo Salibian

Acad. Regina L.W. de Wikinski

SECCION B: CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y FARMACOLÓGICAS

Acad. Carlos M. Baratti

Acad. Clyde N. Carducci

Acad. Miguel A. Caso

Acad. Carlos H. Gaozza

Acad. Alberto Gurni

Acad. Gabriel O. Gutkind

Acad. Mario A. Los

Acad. Virginia Martino

Acad. Marcelo C. Nacucchio

Acad. Modesto C. Rubio (**Coordinador**)

Acad. Marta M. Salseduc (**Coordinador alternativo**)

Acad. María Guillermina Volonté

SECCION C: CIENCIAS APLICADAS A LA SALUD

Acad. Ricardo A. Caro
Acad. Roberto Coco
Acad. Miguel D' Aquino
Acad. Tomas De Paoli
Acad. Héctor I. Giuliani
Acad. Carlos A. Gotelli (**Coordinador**)
Acad. Alfredo A. Hager
Acad. Manuel R. Limeres
Acad. Horacio J. G. Mato
Acad. Marco Pizzolato
Acad. Francisco J. E. Stefano (**Coordinador alternativo**)

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
159ª JORNADA CIENTIFICA
“BIOSIMILARES”

Lugar: Sala de conferencias: “Pbro. Antonio Sáenz”

Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA

Junín 956 C.A.B.A.

20 de agosto de 2015

[Ver Publicaciones/Articulos/ 159° Jornada](#)

PROGRAMA	
Coordinador Acad. Alberto Diaz	
Producción industrial	
Coordinador: Acad. Alberto Diaz	
Dr. Esteban Corley – PharmADN	“Desarrollo de un Anticuerpo Biosimilar Seguro y Efectivo de acuerdo a las normativas internacionales El Novex (Rituximab) como ejemplo”
Dr. Eduardo Ortí – AmegaBiotech	“Desarrollo y Producción de Biosimilares”
Dr. Marcelo Criscuolo – Biosidus	“Biosimilares”
Ensayos Clínicos	
Coordinador: Acad. Gabriel Mato	
Dr. Pablo Viard - (BMS)	“Estudios Clínicos en Biosimilares”
Dra. Patricia Saidón . Investigadora (H. Ramos Mejía).	“Medicamentos Biosimilares. Ensayos Clínicos “
Dr. Roberto Gómez – Director Asuntos Médicos Laboratorio ELEA S.A.C.I.F. y CONICET	“ JORNADA CIENTIFICA BIOSIMILARES ”
Regulaciones	
Coordinador: Acad. Carlos Baratti	
Dra. María Cecilia Rodríguez - ANMAT- Directora de evaluación y control de biológicos y radiofármacos	
Dr. Eduardo Spitzer CILFA	
Dra. Maria Alejandra Blanc - CAEME Director - Regulatory Affairs & Quality Assurance Region South AbbVie S.A.	“Medicamentos biológicos y biotecnológicos”
Sistemas de Salud y Economía de Medicamentos	
Coordinador: Acad. Manuel Limeres	
Dr. Osvaldo Podhajcer - Ph.D. Director, Laboratorio de Terapia Molecular y Celular Fundación Instituto Leloir-CONICET	“Biosimilares dentro del “Plan Argentina Innovadora 2020” del Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva”
Dr. Ruben Torres - Rector de ISALUD	“Los sistemas de salud y el desafío de los medicamentos biológicos”

ANEXO V

Buenos Aires, Mayo de 2015

La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica tiene el agrado de invitar a usted a la sesión pública de incorporación como Académico Titular de la **Dra. Virginia Martino** que celebrará el jueves 28 de mayo a las 18:00 hs., en la Sala de conferencias “Pbro. Antonio Sáenz” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA, Junín 956 PP C.A.B.A.

En la oportunidad, luego de la apertura del acto por parte del Presidente, el Acad. Miguel D’Aquino presentará a la Dra. Virginia Martino quien disertará sobre el tema: ***“Bioprospección de Compuestos Tripanocidas en la Flora Medicinal Argentina”***.

Saludamos a Usted con alta consideración.

Acad. Manuel R. Limeres Presidente
Acad. Gabriel Mato Secretario General

BIOPROSPECCIÓN DE COMPUESTOS TRIPANOCIDAS EN LA FLORA MEDICINAL ARGENTINA

Dra. Virginia S. Martino

(IQUIMEFA) (UBA-CONICET)

Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires - Buenos Aires, Argentina.

Uno de los roles inherentes al profesional farmacéutico, quizás el menos conocido de la actividad profesional, es el de la investigación y desarrollo de nuevos fármacos para lograr nuevos medicamentos eficaces, seguros y de calidad. Es justamente a este aspecto profesional al que me he dedicado siempre y hoy les expondré un resumen de mis actividades de investigación.

Los productos naturales han hecho una importante contribución a la terapéutica, destacándose los de origen vegetal. Como ejemplos, podemos citar a la morfina, potente hipnoanalgésico obtenido del opio; la digitoxina, de la Digital, usada en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y más recientemente la vincristina para el tratamiento de la leucemia, el paclitaxel usado para cáncer ovárico y la taspigargina que se encuentra en ensayo clínico para el tratamiento del cáncer de próstata. Otros ejemplos que se pueden mencionar son la quinina y los derivados de artemisinina para el tratamiento de la malaria.

Nuestro país posee una rica y abundante flora. Muchas de las especies que crecen en nuestro país han sido reconocidas por sus cualidades medicinales pero están poco estudiadas en cuanto a su composición química y sus actividades biológicas. Entre estas especies, las pertenecientes a la familia Asteraceae son las más numerosas entre las plantas vasculares y la segunda en orden de importancia por su diversidad. Esta familia es rica en metabolitos secundarios entre los que se destacan las lactonas sesquiterpénicas y los flavonoides, compuestos con diversas actividades biológicas.

La investigación de estas especies es de importancia porque pueden proveer compuestos bioactivos útiles a la terapéutica. Este hecho adquiere aún más importancia cuando se considera la investigación y el desarrollo de fármacos para las enfermedades denominadas “abandonadas”. Se llaman así a aquellas enfermedades que afectan principalmente a las poblaciones mundiales de menores recursos y que reciben poca atención por parte de las autoridades gubernamentales. La mayoría de estas enfermedades son producidas por parásitos, entre ellas se encuentran la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

Enfermedad de Chagas:

- Hay 7-8 millones de personas infectadas en el mundo
- Se producen 12000 muertes por año
- Es endémica en 21 países de Latinoamérica
- En Argentina es un problema sanitario relevante (2 millones de personas infectadas)

WHO, 2014

Leishmaniasis:

- Hay 300.000 casos por año de leishmaniasis visceral
- Hay 1 millón de casos de leishmaniasis cutánea por año
- Se producen 40,000 muertes anuales por leishmaniasis visceral
- En Argentina, predomina la leishmaniasis cutánea, pero desde 2006

ya hay casos de leishmaniasis canina y humana

DNDi, 2014

Nuestro grupo de investigación comenzó hace unos años a incursionar en la investigación de principios con actividad tripanocida y leishmanicida de plantas medicinales argentinas.

La metodología de trabajo comprende los siguientes pasos:

- Selección de las plantas
- Preparación de los extractos
- Ensayo *in vitro* sobre *Trypanosoma cruzi*
- Fraccionamiento bioguiado
- Identificación de los compuestos activos
- Ensayos *in vitro* sobre *T. cruzi*
- Ensayos *in vivo*
- Estudio de mecanismos de acción
- Estudios de relación estructura-actividad
- Obtención de derivados

Las especies investigadas fueron:

NC: *Ambrosia tenuifolia* (Asteraceae)

NV: “Ajenjo”, “ajenjo del campo”, “artemisia”, “saltamisa”

Distribución: sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y en Argentina.

Uso tradicional: contra fiebres intermitentes, antiparasitaria, antineurálgica, antirreumática.

NC: *Ambrosia elatior* L. (Asteraceae)

NV: “ajenjo del campo”, “altamisa”

Distribución: América tropical

Uso tradicional: anticefalálgica, antifebril, antitusígena, insecticida.

NC: *Ambrosia scabra* (Asteraceae)

NV: “Ajenjo”, “ajenjo del campo”, “artemisa”, “altamisa”

Distribución: sur de Brasil, Uruguay y Argentina.

Uso tradicional: para tratar fiebres intermitentes y parásitos, estimulante.

Los extractos diclorometánico-metanólicos de las partes aéreas de estas especies fueron ensayados sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Los resultados se observan en la Tabla 1.

Los extractos diclorometánico-metanólicos de las partes aéreas de estas especies fueron ensayados sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Los resultados se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad sobre epimastigotes de *T. cruzi* de los extractos orgánicos de *A. scabra*, *A. tenuifolia* y *A. elatior*

Actividad sobre epimastigotes de *T. cruzi* de los extractos orgánicos de *A. scabra*, *A. tenuifolia* y *A. elatior*

Especie	Parte usada	% inhibición del crecimiento	
		100 µg/ml	10 µg/ml
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Partes aéreas	81.1±0.8	43.3±3.1
<i>Ambrosia scabra</i>	Partes aéreas	73.9±0.8	69.0±1.0
<i>Ambrosia elatior</i>	Partes aéreas	93.7±2.0	35.1±0.5

Sülßen V. et al. *Parasitology Research*, 2006; 98 (4): 370-374; *Plos Neglected Diseases* 7 (10) e2494., 2013.

Los tres extractos inhibieron el crecimiento de los epimastogotes de *T. cruzi* (Sulsen y col. 2006). De los extractos activos de estas tres especies se aislaron psilostachina, psilostachina C, peruvina, cordilina y cumanina. Estos compuestos pertenecen al grupo de las lactonas sesquiterpénicas, que tienen en común un grupo lactónico α,β no saturado. La estructura de los compuestos aislados puede observarse en la Figura 1.

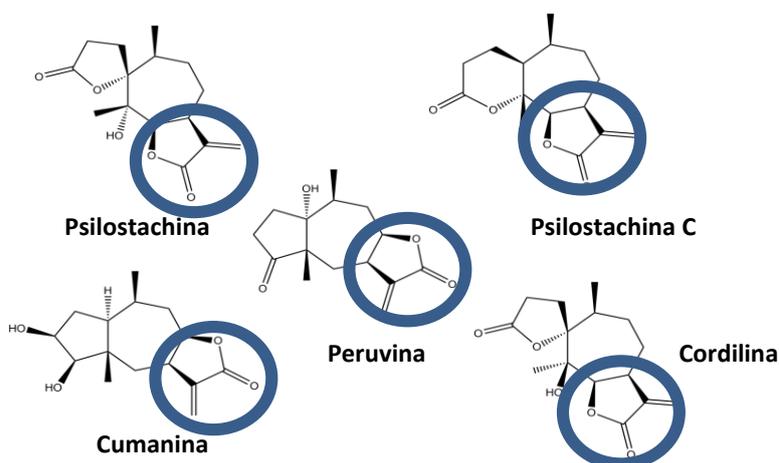


Figura 1. Estructura de los compuestos aislados de *Ambrosia* spp.

Los compuestos aislados fueron ensayados *in vitro* sobre las distintas formas no infectivas e infectivas de *T. cruzi*. El compuesto más activo *in vitro*, psilostachina, fue ensayado *in vivo*. Los resultados pueden observarse en la Tabla 2 y en la Figura 2 (Sulsen y col, 2008, 2011,2013).

Tabla 2. Actividad tripanocida de los compuestos aislados de *Ambrosia* spp.

Actividad tripanocida				
	Epimastigotes IC ₅₀ µg/ml (µM)	Tripomastigotes IC ₅₀ µg/ml (µM)	Amastigotes IC ₅₀ µg/ml (µM)	<i>In vivo</i> % Supervivencia
Psilostachina	1.3 (4.6)	0.8 (2.9)	5.9 (21.1)	100
Psilostachina C	0.6 (2.3)	3.5 (13.3)	0.9 (3.4)	20
Peruvina	1.6 (6.1)	53 (200.8)	-	-
Cumanina	3.2 (12.0)	47.9 (180.1)	2.1 (7.9)	66
Cordilina	7.3 (26.1)	25.2 (90.0)	-	-

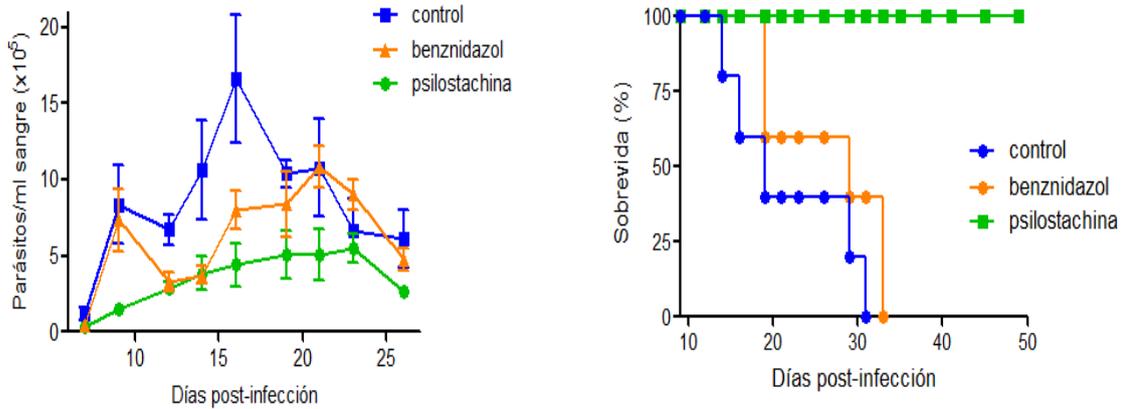


Figura 2. Niveles de parasitemia y curva de sobrevivida durante el período agudo en ratones C3H infectados con tripomastigotes sanguíneos y tratados con psilostachina o benznidazol.

Todos los compuestos fueron ensayados también *in vitro* sobre promastigotes de *Leishmania* sp. (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad leishmanicida de los compuestos aislados de *Ambrosia* spp.

Actividad leishmanicida	
<i>Leishmania amazonensis</i> IC ₅₀ ug/ml	
Psilostachina	2.9
Psilostachina C	1.5
Peruvina	0.4
Cumanina	0.8
Cordilina	15.4

Se realizó un estudio de relación estructura- actividad tripanocida de una serie de 15 lactonas sesquiterpénicas. Como resultado de este estudio se pudo atribuir la actividad de los compuestos al grupo α -metileno γ -lactona. Se determinó asimismo que la geometría de la molécula es importante para la actividad tripanocida con dependencia de factores estéricos y con relación a la estructura 3D de las moléculas (Fabián y col., 2013).

Se ensayaron los efectos de psilostachina sobre epimastogotes de *T. cruzi*, utilizando microscopía electrónica de transmisión. Como se observa en la Figura 3, la psilostachina produjo cambios en la ultraestructura del parásito con vacuolización del citoplasma, aumento de los cuerpos multivesiculares, hinchamiento mitocondrial y deformidad del kinetoplasto, eventos producidos en algunos casos por la alteración del metabolismo del colesterol (Sulsen y col., 2010).

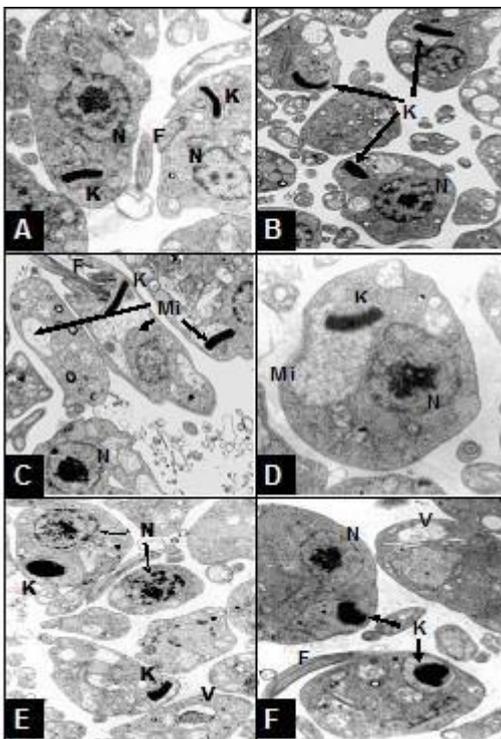


Figura 3. Efecto de psilostachina sobre la Ultraestructura de epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron con medio Diamond solo (A), o con psilostachina 0.5 (B, C), 1.0 (D, E) o 2.5 (F) $\mu\text{g/ml}$. (N) núcleo, (K) kinetoplasto, (F) flagelo, (V) vacuolas, (Mi) mitocondria

Estos hallazgos señalan a estas lactonas sesquiterpénicas como moléculas líderes para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

Participaron en esta investigación:

Dra. Liliana Muschiatti
Dra. Flavia Redko
Dra. María Clavin
Farm. Greta Maravilla
Tca. M. T. Argerich
Dr. Gustavo Giberti
Dra. Claudia Anesini
Dra. Albertina Moglioni
Dra. Liliana Finkelstein
Dr. Lucas Fabian
IQUIMEFA (UBA-CONICET)
Dr. Emilio Malchiodi
Dra. Fernanda Frank
Dra. Silvia Cazorla
IDEHU (UBA-CONICET)
IMPAM (UBA-CONICET)

Dra. Valeria Sülsen
Farm. Cecilia Laurella
Farm. Mariana Selener
Dra. M. R. Alonso
Farm. Jerónimo Ulloa
Farm. Florencia Beer
Est. Orlando Elso

Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires

Dr. Miguel A. Sosa Escudero
IHEM (CONICET)
Instituto de Histología y Embriología Dr. M. Burgos
Universidad Nacional de Cuyo-CONICET
Mendoza, República Argentina

Dra. Elisa Lombardo
CIPYP (UBA-CONICET)
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias
Buenos Aires, República Argentina

Dr. César Catalán
INQUINOA (CONICET)
Instituto de Química del Noroeste - Universidad Nacional de Tucumán
San Miguel de Tucumán, República Argentina

Dr. Osvaldo Donadel
INTEQUI (CONICET)
Instituto de Tecnología Química- Universidad Nacional de San Luis
San Luis, República Argentina

Referencias

Dndi 2014 DNDi Drugs for neglected disease Initiative. <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html>, September 2014.

Fabián L. y col. *Minireviews in Medicinal Chemistry* 13: 1407-1414 (2013).

Sülsen V. y col. *Parasitology Research* 98 (4): 370-374 (2006).

Sülsen V. y col. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2415-2419 (2008).

Sülsen V. y col. *Molecules*, 15, 545-553 (2010).

Sülsen V. y col. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37:536-543 (2011).

Sülsen V. y col. *Plos Neglected Tropical Diseases* 7 (10) e2494 (2013).

World Health Organization (WHO). In: Chagas disease (American trypanosomiasis). 2014; Fact sheet N° 340. Geneva, Switzerland.

PREMIOS

PREMIO MARGNI

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-ZNT8 (ZNT8A) EN PACIENTES ARGENTINOS CON RECIENTE DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS TIPO 1.

Natalia Inés Faccinetti(1), Luciano Lucas Guerra(1), Ruben Francisco Iacono(1), Aldana Trabucchi(1), Silvina Noemí Valdez(1)*

(1) Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA) e Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Prof. Ricardo A. Margni (IDEHU, CONICET-UBA). Junín 956, 4° piso, CABA, Argentina. CP (1113). (*)E-mail: silval@ffyb.uba.ar

CONTENIDO

CONTENIDO	25
RESUMEN.....	25
SUMMARY	26
INTRODUCCIÓN	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Serotecas empleadas.....	28
1.1 Sueros provistos por la American Diabetes Association (ADA).....	28
1.2 Sueros humanos normales	28
1.3 Pacientes argentinos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1.....	28
2. Síntesis de las variantes antigénicas de ZnT8.....	29
3. Ensayo de unión de radioligando (RBA) para la detección y caracterización inmunoquímica de ZnT8A.....	29
4. Determinación de IAA/PAA, GADA e IA-2A	29
5. Análisis estadístico de los datos	29
RESULTADOS.....	30
1. Determinación de la sensibilidad y especificidad de ZnT8A empleando las distintas variantes antigénicas de ZnT8.....	30
2. Detección de ZnT8A en pacientes argentinos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1.....	30
3. Prevalencia y caracterización inmunoquímica de ZnT8A empleando las diferentes variantes antigénicas en los pacientes argentinos.....	31
CONCLUSIONES.....	32
AGRADECIMIENTOS.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo involucró la detección y caracterización inmunoquímica de autoanticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) provenientes de pacientes argentinos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de Diabetes Mellitus (DM) tipo 1.

Se evaluaron 100 sueros de pacientes con DM tipo 1. La determinación de ZnT8A se realizó mediante ensayo de unión de radioligando, utilizando distintas variantes antigénicas: ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8-Arg-Trp325, ZnT8-Arg-Arg325 y ZnT8-Trp-Trp325.

Paralelamente se determinó la presencia de los otros marcadores serológicos de autoinmunidad para DM.

De los 100 pacientes estudiados, 65 fueron ZnT8A+ para al menos alguna de las variantes antigénicas empleadas. Ocho reconocieron todas las formas recombinantes de ZnT8. La mayoría (56) resultaron positivos para el heterodímero, 25 de los cuales reconocieron además el homodímero ZnT8-Arg-Arg325 y el monómero ZnT8-Arg325. Nueve pacientes presentaron únicamente ZnT8A como marcador de autoinmunidad. Por otro lado, los niveles de señales obtenidos con el heterodímero fueron significativamente más altos que con las demás construcciones.

Se logró abordar la caracterización inmunoquímica de los ZnT8A presentes en pacientes argentinos con DM tipo 1 empleando diferentes variantes antigénicas de ZnT8. Se observó que la incorporación de ZnT8A, en combinación con los marcadores clásicos, incrementa la sensibilidad diagnóstica de autoinmunidad. La reactividad exclusiva de ZnT8A por las variantes antigénicas que contienen Arginina en el residuo 325 evidencia la existencia de epitopes dependientes del aminoácido presente en dicho residuo. Además, la aplicación de variantes dimericas reveló la existencia de epitopes definidos por la estructura cuaternaria de ZnT8. La construcción heterodimérica fue la que mostró la mejor combinación de sensibilidad y especificidad a los fines del *screening* rutinario de ZnT8A.

PALABRAS CLAVE: Diabetes Mellitus tipo 1, Autoanticuerpos, ZnT8, *SCL30A8*

SUMMARY

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF AUTOANTIBODIES TO ZNT8 (ZNT8A) IN ARGENTINIAN PATIENTS WITH RECENT DIAGNOSIS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

The aim of this study involved the detection and immunochemical characterization of ZnT8 autoantibodies (ZnT8A) in new-onset type 1 Argentinian diabetic patients.

One hundred sera from type 1 diabetic patients were tested for ZnT8A. The antigens employed were obtained using cDNA plasmids encoding the C-terminal domains of ZnT8 carrying 325Arg, 325Trp and 3 dimeric constructs (ZnT8-Arg-Trp325, ZnT8-Arg-Arg325 and ZnT8-Trp-Trp325). Other islet-autoantibodies were also tested.

Among the 100 type 1 diabetic patients, the prevalence of ZnT8A was 65.0%, 8 recognized all recombinant forms of ZnT8. Most patients (56) were positive for the heterodimer, being 25 of them also positive for the homodimer ZnT8-Arg-Arg325 and monomer ZnT8-Arg325. Single reactivity against ZnT8A was found in 9.0% of the group. Besides, the highest signal values in radioligand binding assay (RBA) were obtained with the heterodimeric variant.

An increased detection of autoimmunity was found when ZnT8A was employed in combination with the other islet-autoantibodies. The presence of autoantibodies that recognized only constructions containing Arg reveals the existence of epitopes dependent of the amino acid present at residue 325. Furthermore, application of dimeric constructions revealed the existence of quaternary structure-defined epitopes which were recognized by type 1 diabetic patients. Finally, the highest combined sensitivity and specificity for routine screening of ZnT8A was accomplished with the heterodimeric construction.

KEY WORDS: Type 1 Diabetes Mellitus, autoantibodies, ZnT8, *SCL30A8*

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones constituyen la tercera causa de muerte en los países industrializados, después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Alrededor del 5-6 % de la población mundial padece alguna de las formas de esta enfermedad, la cual muestra una tendencia de crecimiento continuo. La DM constituye un grupo heterogéneo de patologías, las cuales conducen a una elevación de la glucosa en sangre. Se distinguen dos tipos principales de la enfermedad: la diabetes mellitus tipo 1 (DM tipo 1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2). Sin embargo, en algunos casos es difícil diferenciar entre las dos variantes principales (1). Así, se han propuesto nuevas categorías, entre ellas, la diabetes autoinmune latente del adulto (conocida como LADA por su sigla en inglés) para identificar un subgrupo de pacientes adultos que sufren un proceso autoinmune e inicialmente no requieren insulina pero pueden requerirla poco tiempo después del diagnóstico (2). Aunque los síntomas agudos y a veces letales de la diabetes pueden ser controlados, las complicaciones tardías de la enfermedad exhiben alta morbilidad y reducen significativamente las expectativas de vida.

La principal causa de la DM tipo 2 es una resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, asociada a un grado variable de disfunción secretoria. Ambas causas, a su vez, se correlacionan con la presencia de determinantes genéticos y factores ambientales, de ahí que la DM tipo 2 haya sido definida como una enfermedad poligénica y multifactorial.

La DM tipo 1 se clasifica como autoinmune (tipo 1A) o idiopática (tipo 1B). La DM tipo 1A es un trastorno de origen autoinmune que presenta un importante componente de autoagresión celular, acompañado de una serie de marcadores humorales que sirven principalmente para la detección prodrómica de la patología y para el apoyo diagnóstico (3). La tolerancia hacia componentes propios de las células beta pancreáticas productoras de insulina puede quebrarse, luego del ataque de los linfocitos T citotóxicos, tal vez como un evento secundario a la agresión de ciertos virus beta-citotrópicos. Además de los agentes ambientales existe contribución de la constitución genética, principalmente a través del sistema HLA que interviene en la presentación antigénica ((4);(5)). La mayoría de los pacientes con reciente diagnóstico de DM tipo 1A tiene en circulación autoanticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos de las células beta pancreáticas, exhibiendo especificidades hacia la insulina y proinsulina (IAA/PAA), hacia la glutamato decarboxilasa (GADA) y la tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A). Estos tres marcadores presentes en el pródromo de la enfermedad son altamente predictivos, ya que denuncian la instalación de una agresión autoinmune que conducirá luego de un tiempo variable a su expresión clínica (6). Por otra parte una fracción minoritaria de los pacientes con DM tipo 1 no muestran evidencia de autoinmunidad por lo cual se los clasifica como DM tipo 1B.

En el año 2007, fue descrito un nuevo autoantígeno: la isoforma 8 del transportador de Zn (ZnT8) específico de célula beta (7). El ZnT8 participa en el transporte de Zn^{2+} desde el citoplasma hacia el interior del gránulo de secreción de insulina. La presencia del catión es esencial para el almacenamiento de la insulina, como hexámero con dos cationes Zn^{2+} , y para la secreción de la hormona frente al estímulo de glucosa. El gen codificante para ZnT8 se ubica en el cromosoma 8q24.11, contiene 8 exones y codifica una proteína de 369 aminoácidos.

Los ensayos para los marcadores IAA, GADA, e IA-2A pueden ser ubicados en el percentilo 99 de los controles, y aproximadamente el 90% de niños debutantes con DM expresan positividad para algunos de ellos (8). Con la determinación de ZnT8A el porcentaje se incrementa aproximadamente al 96%, disminuyendo el número de casos de la denominada DM tipo 1B. El principal epítipo de ZnT8 involucrado en el reconocimiento de los autoanticuerpos se localiza en el dominio C-terminal de la molécula (aa 268-369) (7). En esta región existen dos variantes polimórficas en el residuo 325 (Arg/Trp) (9), razón que llevó a algunos autores a analizar la asociación entre la reactividad de los ZnT8A y el polimorfismo SLC30A8 (10). Sin embargo, aún no se encuentra suficientemente definido el papel de este residuo en la inmunorreactividad de este marcador.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo involucró la detección y caracterización inmunoquímica de los ZnT8A provenientes de pacientes argentinos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1. Para ello se emplearon diferentes variantes antigénicas recombinantes de ZnT8, ya sea con Arg o Trp en la

posición 325, o bien construcciones quiméricas que contienen ambos aminoácidos en dicha posición. El objetivo final fue establecer si el residuo 325 del ZnT8 es un determinante clave para definir la inmunorreactividad de los ZnT8A y obtener información acerca del papel de los dímeros en la génesis de estos autoanticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Serotecas empleadas

1.1 Sueros provistos por la American Diabetes Association (ADA)

Ciento cincuenta sueros, provistos por la ADA para participar del *Diabetes Antibody Standardization Program* (DASP 2009), fueron evaluados para calcular la sensibilidad y especificidad de los ensayos de ZnT8A. Dichas muestras incluyen 50 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1 (17 mujeres y 33 hombres, edad media 24.5 años- rango de 10 a 32 años-) (11). Asimismo, 100 sueros humanos normales fueron utilizados para calcular la especificidad de dichos ensayos.

1.2 Sueros humanos normales

Se emplearon sueros controles normales obtenidos a partir de individuos sanos, sin historia familiar de DM, libres de enfermedades autoinmunes, ninguno de los cuales había recibido insulina, o experimentado episodios de hiperglucemia. Dichas muestras fueron obtenidas del Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA (programa con aval técnico y aprobación del Comité de Ética). Los individuos fueron informados del propósito del estudio obteniéndose su consentimiento para la participación en el mismo. Dichos sueros fueron utilizados para determinar el *cut off* en cada uno de los ensayos.

1.3 Pacientes argentinos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1

Este grupo incluyó a 100 niños y adolescentes ingresados en el Servicio de Nutrición del Hospital Nacional de Pediatría Gutiérrez (Buenos Aires, Argentina) desde mayo de 2013 hasta marzo de 2015. Los datos clínicos y de laboratorio de estos pacientes se muestran en la **Tabla 1**. Dado que dicho Hospital es centro de referencia, los pacientes provienen de toda la República Argentina y son principalmente caucásicos. Las muestras de suero fueron colectadas antes o dentro de las 72 h de comenzar el tratamiento con insulina. La DM tipo 1 se diagnosticó de acuerdo a criterios de la OMS (3). Dicho programa contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Nacional de Pediatría R. Gutiérrez. Los individuos fueron informados del propósito del estudio y fue obtenido su consentimiento, o el de sus padres en los menores de edad, para la participación en el mismo.

Tabla 1. Datos clínicos y de laboratorios de pacientes argentinos con DM tipo 1

Pacientes (n)	100
Sexo (F:M)	44: 56
Edad media al diagnóstico (años)	10.0 ± 4.0*
Rango etario (años)	1-17
Cetoacidosis, n (%)	49 (49 %)
Estado nutricional, n (%)	
Desnutrición	23 (23.0)
Eutrófico	54 (54.0)
Sobrepeso	10 (10.0)
Obesidad	13 (13.0)

*Valores correspondientes a la media ± SD

2. Síntesis de las variantes antigénicas de ZnT8

El ADN codificante para el dominio C-terminal de ZnT8 (aa 268-369) conteniendo en la posición 325 Arg o Trp fue gentilmente cedido por el Dr J. Hutton del *Barbara Davis Center of Childhood Diabetes, University of Colorado*, EEUU. Asimismo, tres construcciones diméricas de ADN codificantes para Arg-Arg325, Trp-Trp325 y Arg-Trp325 fueron sintetizadas por GenScript (Piscataway, EEUU) y ligadas en el vector p-ALTER-Ex1 (Promega, Madison, EEUU) en los sitios PstI/XbaI. La identidad de las moléculas de ADN fue confirmada por secuenciación.

Los antígenos radiactivos [³⁵S]-ZnT8-Arg325, [³⁵S]-ZnT8-Trp325, [³⁵S]-ZnT8-Arg-Arg325, [³⁵S]-ZnT8-Trp-Trp325 y [³⁵S]-ZnT8-Arg-Trp325 fueron obtenidos mediante un sistema eucarionte de expresión de proteínas. Para ello, el ADN codificante para cada una de las construcciones se transcribió y tradujo *in vitro* empleando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo en presencia de [³⁵S]-metionina (actividad específica 1.175 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, EEUU) durante 2 h a 30 °C. Los productos de traducción se sembraron en una columna PD10 (Sephadex G25, AmershamBiosciences, Nueva Jersey, EEUU) para remover la [³⁵S]-metionina libre. Las proteínas marcadas radiactivamente fueron analizadas por SDS-PAGE y fluorografía, revelando una única banda en cada caso.

3. Ensayo de unión de radioligando (RBA) para la detección y caracterización inmunológica de ZnT8A

Para determinar la presencia del ZnT8A en los sueros de pacientes bajo estudio se optimizó e implementó un RBA. Aproximadamente 10.000 cpm del trazador ([³⁵S]ZnT8-Arg325, [³⁵S]ZnT8-Trp325, [³⁵S]ZnT8-Arg-Arg325, [³⁵S]ZnT8-Trp-Trp325 o [³⁵S]ZnT8-Trp-Arg325) se incubaron con alícuotas de 5 µl de sueros humanos (en un volumen final de 60µl en buffer RBA: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.15 %, aprotinina 0.1 %, BSA 0.1 %, pH7.4) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, a cada muestra se le agregó 50 µl de proteína *A-Sepharose* 4B FF (AmershamBiosciences, Piscataway, NJ, EEUU) 50% en buffer RBA y las suspensiones se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, en agitación continua. Las muestras fueron centrifugadas y los precipitados conteniendo los inmunocomplejos se lavaron cuatro veces con buffer RBA, se resuspendieron en 100 µl de SDS 1% y los sobrenadantes fueron transferidos a viales para ser contados en un contador automático de centelleo líquido.

Los resultados se expresaron como porcentajes de unión (B%) con respecto a las cuentas totales agregadas en el ensayo, o como unidades de precisión: *SD scores* (SDs = (B%suero analizado – B%media de los controles normales)/Desvío Estándar controles normales)

Se procesaron simultáneamente 30 sueros humanos normales para calcular el *cut off* como la media más 3 desvíos estándar.

4. Determinación de IAA/PAA, GADA e IA-2A

Se determinaron los marcadores IAA/PAA (12), GADA (13) e IA-2A (14) por los métodos radiométricos de referencia.

5. Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa de computación *Graph Pad Prism*, versión 5.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU, www.graphpad.com).

Para obtener los niveles de corte de los RBAs, primero se evaluó la distribución de los datos correspondientes a los sujetos controles normales. Para ello se realizó el Test de Normalidad de *D'Agostino & Pearson*. Dado que los resultados de los sueros controles siguieron una distribución normal, se consideró como valor de corte para todos los ensayos a la media más 3 desvíos estándar de los resultados obtenidos con los controles normales.

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los niveles de señales obtenidos con las diferentes construcciones antigénicas de ZnT8 se aplicó el Test de *Mann-Whitney*.

RESULTADOS

1. Determinación de la sensibilidad y especificidad de ZnT8A empleando las distintas variantes antigénicas de ZnT8

Empleando las diferentes construcciones recombinantes de ZnT8 se procesaron 50 sueros de pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1 y 100 sueros humanos normales, provistos por la ADA. Se establecieron así los parámetros de sensibilidad, definido como el porcentaje de pacientes diabéticos detectados como positivos, y especificidad, calculada como 100 menos el porcentaje de falsos positivos (**Tabla 2**).

Tabla 2: Sensibilidad y especificidad obtenidas en la determinación de ZnT8A empleando ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8 Arg-Trp325, ZnT8 Arg-Arg325 y ZnT8 Trp-Trp325.

	Arg325	Trp325	Arg-Trp325	Arg-Arg325	Trp-Trp325
Sensibilidad	22.0%	26.0%	60.0%	46.0%	32.0%
Especificidad	100.0%	98.8%	96.5%	98.0%	98.0%

2. Detección de ZnT8A en pacientes argentinos infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1.

Contando con el método de referencia (RBA) optimizado, se determinó la prevalencia de ZnT8A (porcentaje de pacientes diabéticos detectados como positivos) en 100 pacientes infanto-juveniles con reciente diagnóstico de DM tipo 1. El estudio se complementó con la búsqueda de los otros marcadores asociados a DM autoinmune: GADA, IA2-A e IAA/PAA, empleando los respectivos métodos de referencia.

En el histograma de la **Fig. 1** se muestra la prevalencia de ZnT8A en forma conjunta con la de los otros marcadores de autoinmunidad. La prevalencia de ZnT8A fue del 65%, compuesta por la reactividad frente a ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8 Arg-Trp325, ZnT8 Arg-Arg325 y ZnT8 Trp-Trp325. La prevalencia de los otros autoanticuerpos fue de 22% para IAA/PAA, 58% para GADA y 53% para IA-2A.

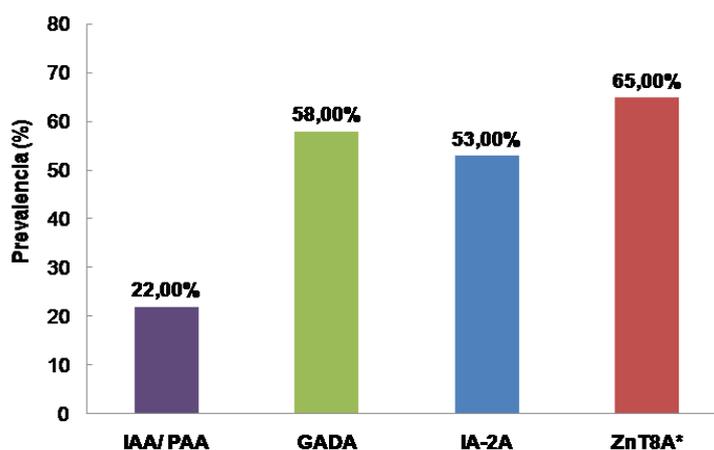


Figura 1. Histograma de prevalencias relativas para los marcadores IAA/PAA, GADA, IA-2A y ZnT8A en 100 muestras de pacientes argentinos con DM tipo 1. ZnT8A*: representa la reactividad frente a $[^{35}\text{S}]\text{ZnT8-Arg325}$, $[^{35}\text{S}]\text{ZnT8-Trp325}$, $[^{35}\text{S}]\text{ZnT8-Arg-Arg325}$, $[^{35}\text{S}]\text{ZnT8-Trp-Trp325}$ y $[^{35}\text{S}]\text{ZnT8-Trp-Arg325}$

Por otra parte, se analizó la sensibilidad combinada de los cuatro marcadores de autoinmunidad (**Fig. 2**). En este caso, es de destacar que 9 pacientes con DM tipo 1 (9%) fueron positivos sólo para ZnT8A y que la inclusión de dicho marcador disminuyó el porcentaje de pacientes que dieron negativo para los cuatro autoanticuerpos a sólo un 7%, reduciendo el número de casos de DM tipo 1B o idiopática.

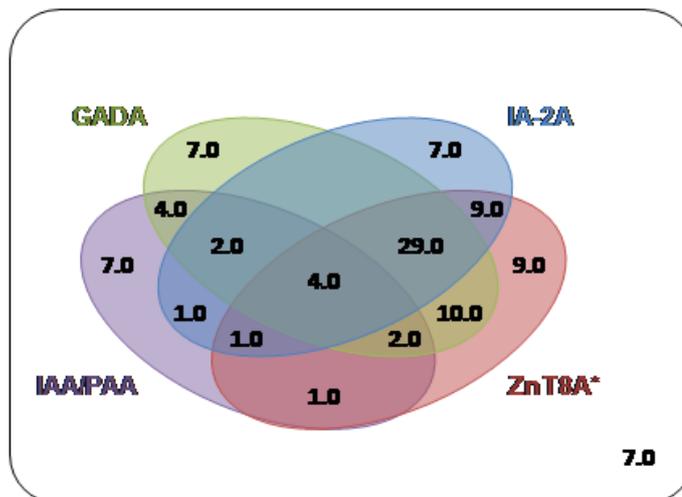


Figura 2: Sensibilidad conjunta de los marcadores IAA/PAA, GADA, IA-2A y ZnT8A aplicando los respectivos RBAs en pacientes argentinos con DM tipo 1. Las regiones de intersección indican el porcentaje de pacientes positivos para las diferentes combinaciones de autoanticuerpos. ZnT8A*: representa la reactividad frente a [³⁵S]ZnT8-Arg325, [³⁵S]ZnT8-Trp325, [³⁵S]ZnT8-Arg-Arg325, [³⁵S]ZnT8-Trp-Trp325 y [³⁵S]ZnT8-Trp-Arg325.

3. Prevalencia y caracterización inmunquímica de ZnT8A empleando las diferentes variantes antigénicas en los pacientes argentinos

En la **Tabla 3** se representa la prevalencia obtenida con cada una de las variantes antigénicas empleadas, siendo la construcción heterodimérica (ZnT8-Arg-Trp325) la de mayor prevalencia.

Tabla 3: Prevalencias obtenidas en la determinación de ZnT8A empleando ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8 Arg-Trp325, ZnT8 Arg-Arg325 y ZnT8 Trp-Trp325.

	Arg325	Trp325	Arg-Trp325	Arg-Arg325	Trp-Trp325
DM tipo 1	42.0%	10.0%	56.0%	38.0%	15.0%

Asimismo se analizaron y compararon los niveles de señales de los sueros ZnT8A positivos para cada una de las variantes antigénicas empleadas (**Fig. 3**). Las señales obtenidas para el heterodímero fueron significativamente mayores a los niveles alcanzados empleando cualquiera de las otras variantes antigénicas (mediana 17.99 vs. 10.71, 6.32, 5.66 y 4.44 *SD score* para ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8-Arg-Arg325 y ZnT8-Trp-Trp325, respectivamente; $p < 0.05$, test *t* de *Mann-Whitney*).

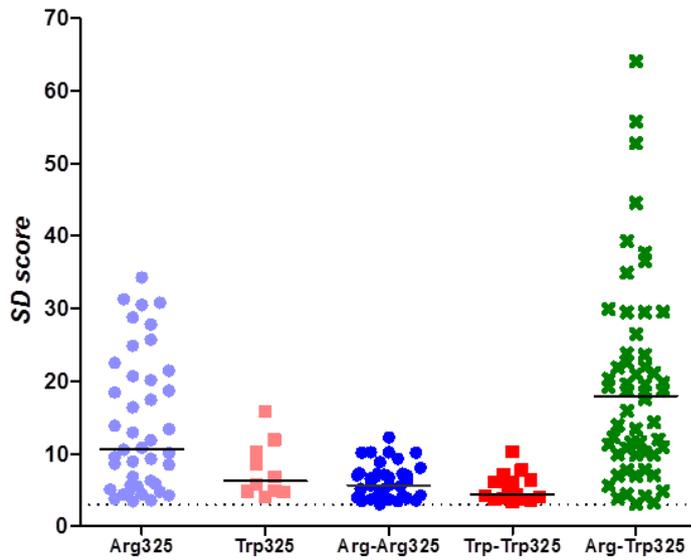


Figura 3: Distribución de las señales obtenidas por los RBAs empleando ZnT8-Arg325, ZnT8-Trp325, ZnT8-Arg-Arg325, ZnT8-Trp-Trp325 y ZnT8-Arg-Trp325. La línea punteada representa el *cut off* de los ensayos y la línea continua la mediana de cada población de ZnT8A.

Por otra parte, en la **Fig. 4** se representa la reactividad de ZnT8A hacia las diferentes variantes antigénicas de ZnT8. Así, de los 65 pacientes con DM tipo 1 ZnT8A positivos, 8 reconocieron a todas las formas recombinantes de ZnT8. La mayoría (56) resultó positiva para el heterodímero, de los cuales 25 reconocieron, también, el dímero ZnT8-Arg-Arg325 y el monómero ZnT8- Arg325 y sólo 1 reconoció además el dímero ZnT8-Trp-Trp325 y el monómero ZnT8-Trp325.

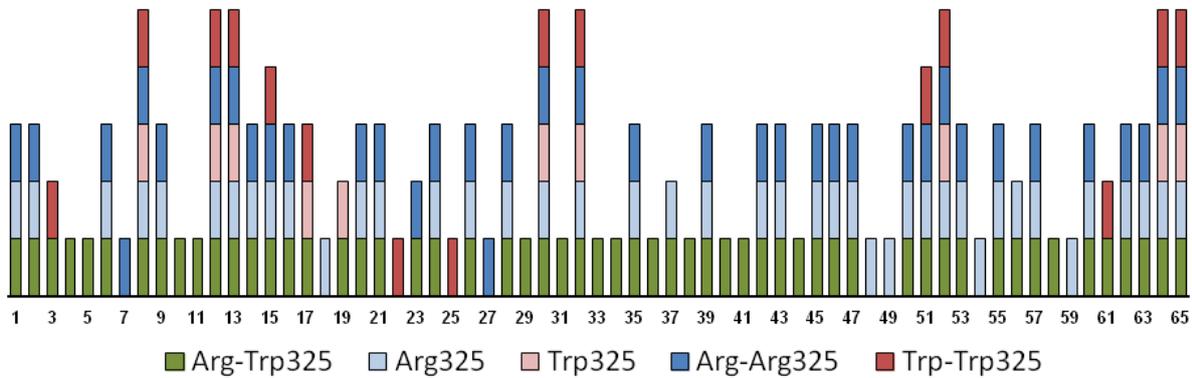


Figura 4: Inmunorreactividad de ZnT8A frente a las diferentes variantes antigénicas de ZnT8.

CONCLUSIONES

En el año 2007, Hutton y colaboradores describieron al ZnT8 como el cuarto autoantígeno inmunodominante en DM tipo 1. A diferencia de lo que ocurre con GAD e IA-2, ZnT8 es un antígeno específico de célula beta por lo que la detección de ZnT8A pone en evidencia un daño específico de dichas células. En relación a este nuevo marcador se ha descrito que el 60-80% de la población caucásica con DM tipo 1 y el 50-60% de la población Japonesa con debut agudo de DM presentan

ZnT8A ((7); (15)). En el presente trabajo hemos estudiado 100 pacientes argentinos con reciente diagnóstico de DM tipo 1, de los cuales 65% fueron ZnT8A positivos. Estos resultados están en concordancia con el perfil descrito anteriormente. Además se observó que la incorporación de dicho marcador incrementó la sensibilidad diagnóstica de autoinmunidad de un 84.0% a un 93.0%, ratificando que ZnT8A constituye un marcador humoral adicional a la tríada ya existente (IAA, GADA e IA-2A).

En relación a los epitopes reconocidos por los ZnT8A, se ha descrito que el 80% de los sueros de pacientes con DM tipo 1 ZnT8A positivos reconocen el dominio C-terminal de ZnT8 (residuos 268-369) resultando muy poco frecuente la presencia de anticuerpos que reconozcan al fragmento N-terminal (residuos 1-74) (16). Acorde con estos estudios, en este trabajo evaluamos el reconocimiento específico de ZnT8A presentes en sueros de pacientes con DM tipo 1 utilizando construcciones monoméricas del dominio C-terminal que contienen Arg o Trp en el residuo 325 y construcciones diméricas con Arg-Arg, Trp-Trp o Arg-Trp en los residuos 325. Se logró así diferenciar subpoblaciones de autoanticuerpos según sus inmunorreactividades frente a las variantes antigénicas de ZnT8 empleadas. De los 65 pacientes ZnT8A positivos, 25 (38,50%) presentaron autoanticuerpos que sólo reconocieron las construcciones que contienen el aminoácido Arginina en el residuo 325. Esto pone en evidencia la existencia de epitopes dependientes del aminoácido presente en dicho residuo. Dichos resultados son concordantes con reportes previos publicados por Kawasaki y col. (10). Estos autores concluyen que el residuo 325 es clave en la autorreactividad para ZnT8 y que el genotipo *SLC30A8* es un determinante importante en la especificidad del autoanticuerpo. Asimismo, el descubrimiento de sueros ZnT8A positivos que reconocen la construcción monomérica con Arg y las tres construcciones diméricas (siendo negativos para el monómero con Trp) confirma no sólo la existencia de epitopes dependientes del residuo 325 sino también de otros epitopes aportados por la estructura dimérica. Esta observación pone en evidencia la existencia de epitopes conformacionales discontinuos presentes en las construcciones diméricas de ZnT8, los cuales son reconocidos por los ZnT8A, emulando el posible mecanismo de la respuesta inmune desencadenada *in vivo* por la estructura cuaternaria de este autoantígeno.

En conclusión, se logró abordar la caracterización inmunoquímica de los ZnT8A presentes en pacientes argentinos con DM tipo 1, empleando diferentes variantes antigénicas de ZnT8. Se observó que la construcción heterodimérica fue la que mostró la mejor combinación de sensibilidad y especificidad a los fines del *screening* rutinario de ZnT8A, así como la que denotó el más amplio rango dinámico. Cabe destacar que es de sumo interés la inclusión de la determinación de ZnT8A en pacientes con debut dudoso de DM tipo 1 ya que permite disminuir el porcentaje de DM tipo 1B o idiopática. Asimismo, la inclusión de este marcador en individuos de riesgo (familiares en primer grado de pacientes con DM tipo 1) es esencial, en los ensayos terapéuticos (*trials*) de predicción y prevención de la DM Tipo 1.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las doctoras Liliana Trifone y Adriana Roussos (Servicio de Nutrición del Hospital Nacional de Pediatría Gutiérrez) por la provisión de sueros de pacientes diabéticos. Este trabajo fue financiado en parte por los subsidios otorgados por UBA (UBACyT 20020110100146), CONICET (PIP 0256) y ANPCyT (PICT-2008-0998).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Palmer JP, Hirsch IB. What's in a name: latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes. *Diabetes Care*. Feb 2003;26(2):536-538.
- 2) Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Medicine : a Journal of the British Diabetic Association*. Apr 1994;11(3):299-303.
- 3) Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. *World Health Organization Technical Report Service*. 1985;727:1-113.

- 4) Campbell RD, Milner CM. MHC genes in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. Dec 1993;5(6):887-893.
- 5) Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *American Journal of Human Genetics*. Nov 1996;59(5):1134-1148.
- 6) Mrena S, Savola K, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M. Staging of preclinical type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Pediatrics*. Oct 1999;104(4 Pt 1):925-930.
- 7) Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Science of U S A*. Oct 23 2007;104(43):17040-17045.
- 8) Eisenbarth GS, Jeffrey J. The natural history of type 1A diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Mar 2008;52(2):146-155.
- 9) Lu M, Fu D. Structure of the zinc transporter YiiP. *Science*. Sep 21 2007;317(5845):1746-1748.
- 10) Kawasaki E, Uga M, Nakamura K, et al. Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. Dec 2008;51(12):2299-2302.
- 11) Lampasona V, Schlosser M, Mueller PW, et al. Diabetes antibody standardization program: first proficiency evaluation of assays for autoantibodies to zinc transporter 8. *Clinical Chemistry*. Dec 2011;57(12):1693-1702.
- 12) Valdez SN, Iacono RF, Villalba A, Cardoso_Landaburu A, Ermacora MR, Poskus E. A radioligand-binding assay for detecting antibodies specific for proinsulin and insulin using 35S-proinsulin. *Journal of Immunological Methods*. Aug 2003;279(1-2):173-181.
- 13) Grubin CE, Daniels T, Toivola B, et al. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia*. Apr 1994;37(4):344-350.
- 14) Gianani R, Rabin DU, Verge CF, et al. ICA512 autoantibody radioassay. *Diabetes*. Nov 1995;44(11):1340-1344.
- 15) Kawasaki E. ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocrine journal*. 2012;59(7):531-537.
- 16) Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, et al. A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes*. Oct 2008;57(10):2693-2697.

PREMIO REBECA GERSHMAN**EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL Y EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO ATRIAL
COMO REGULADORES DE LA EXCRECIÓN DE SODIO Y LA PRESIÓN ARTERIAL:
IMPLICANCIAS FISIOPATOLÓGICAS EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

Rukavina Mikusic NL[&], Kouyoumdzian NM[&], Kravetz MC[#], Del Mauro J[#], Gorzalczany S[#], Puyó AM[§], Toblli JE[&], BE Fernández[&], Choi MR^{&§*}.

Cátedras de [§]Anatomía e Histología, ^{*}Fisiopatología y [#]Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, INFIBIOC, CONICET. [&]Instituto de Investigaciones Cardiológicas ININCA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	35
REGULACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL Y SU IMPACTO EN LA FUNCIÓN TUBULAR RENAL Y EL METABOLISMO DEL SODIO	3
8	
OBJETIVOS GENERALES.....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	41
Hipótesis de trabajo:	41
Objetivos específicos:	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Determinaciones en Sangre y Orina	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	47
RESULTADOS.....	47
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	60
Listado de abreviaturas:	68
Rol desempeñado por cada uno de los autores:.....	69
Financiamiento del presente trabajo:	69
Parte de los resultados que se incluyen en este trabajo fueron parcialmente presentados en los siguientes congresos científicos:	69
BIBLIOGRAFÍA	71

INTRODUCCIÓN

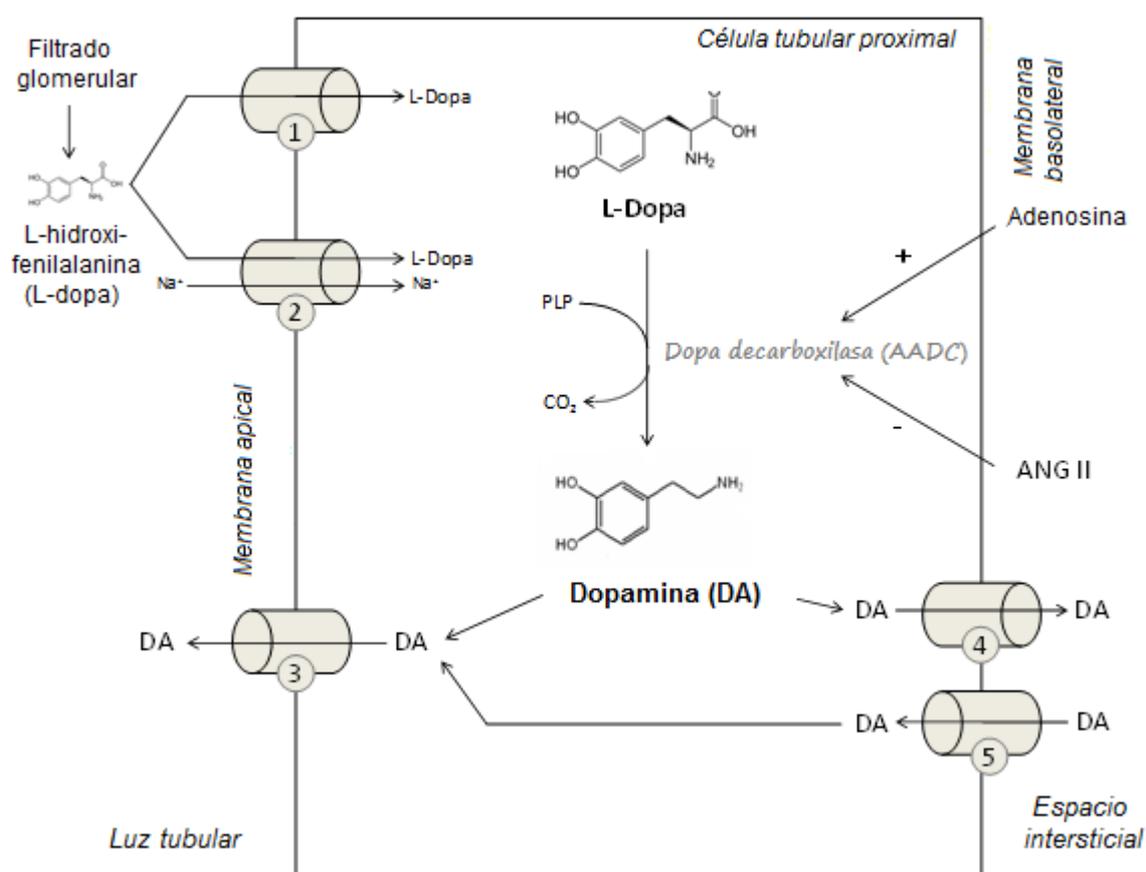
El manejo renal del sodio es un paso determinante para regular los niveles de presión arterial y es controlado por diversos factores endocrinos, autocrinos y neurogénicos que modifican la tasa de reabsorción del mismo [1]. Las alteraciones en la excreción renal de sodio poseen vital importancia en la patogénesis de la hipertensión arterial. La hipertensión arterial es la patología crónica de mayor prevalencia e incidencia mundial, endemia cosmopolita del 20 al 25 % de incidencia y causa principal de las patologías cardiovasculares, que junto con sus complicaciones son la primera causa de muerte con incidencia actual del 50% en la morbimortalidad [1, 2]. En este sentido, radica el interés de aportar conocimientos relacionados sobre las formas en que los factores natriuréticos y los antinatriuréticos pueden utilizar vías comunes que involucren de modo reversible la inhibición o activación de la Na⁺, K⁺-ATPasa tubular renal, enzima cuya alteración está íntimamente relacionada con la retención salina. Asimismo, la dopamina (DA) renal y el péptido natriurético atrial (ANP) son capaces de modificar el manejo renal del sodio (filtración, reabsorción y

excreción) regulando diversos transportadores de sodio [1, 3]. Por lo tanto, DA y ANP controlan procesos renales determinantes de los niveles de la presión arterial, cuya alteración conduce al desarrollo de la hipertensión arterial [4, 5].

La DA se sintetiza en los túbulos proximales renales y juega un importante rol en la regulación autocrina y/o paracrina de la función renal a través de la inhibición de la actividad enzimática de la Na^+ , K^+ -ATPasa tubular renal, como así también sobre otros transportadores sodio dependientes [5, 6]. El metabolismo de la DA involucra varios procesos celulares, como la síntesis, captación, catabolismo y liberación de la amina. La síntesis de DA renal proviene de dos fuentes: neuronal y extraneuronal. La DA neuronal proviene de neuronas dopaminérgicas que inervan arteriolas y vasa recta. La fuente extraneuronal proviene principalmente de las células tubulares proximales, que poseen toda la maquinaria bioenzimática necesaria para regular las diferentes etapas de estos procesos [7-9]. A diferencia de otras catecolaminas, la síntesis renal de DA proviene de la descarboxilación del precursor L-Dopa por acción de la enzima dopa descarboxilasa [10]. No obstante, el paso limitante para la formación endógena de DA intratubular es la captación de su precursor, la L-dopa [11]. En este sentido, se han descrito dos transportadores de L-amino ácidos (LAT-1 y LAT-2), ubicados principalmente a nivel apical del túbulo proximal, que son los responsables de la captación de L-dopa hacia el interior celular [12]. Pocos datos se han aportado sobre los mecanismos hormonales que regulan la función y/o expresión de dichos transportadores y hasta el presente se desconoce qué efectos pueden tener sobre ellos, hormonas como el ANP o la insulina. Tampoco se conoce si este sistema transportador se encuentra alterado en modelos de hipertensión arterial, como el inducido por sobrecarga de fructosa. Se han descrito hasta el momento, dos tipos de regulación del funcionamiento de los LATS: la regulación a corto plazo y la regulación a largo plazo [13]. Básicamente, la regulación a corto plazo implica la fosforilación por diversas proteínquinas, de sitios específicos ubicados en los dominios intracelulares de los LATs, mientras que la regulación a largo plazo implica cambios en el nivel de expresión de los LATS y/o de su localización celular. La inhibición del proceso de síntesis enzimática de DA con inhibidores como la carbidopa, impide la síntesis y posterior respuesta de la DA frente a una sobrecarga de sodio, como así también la consecuente inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa [14-17]. Poco se conoce acerca de los mecanismos mediante los cuales la DA circulante es captada, almacenada y liberada por las células del túbulo proximal. Teniendo en cuenta la existencia de transportadores de L-Dopa en las células tubulares proximales, se postuló también la existencia de otros transportadores no neuronales para transportar DA a nivel tubular [18]. Una vez sintetizada, la DA intracelular abandona la célula a través del borde apical por un proceso difusional, mientras que su pasaje a través de las células basales parece ser un proceso de transporte y captación saturable. Ambos procesos son, sin embargo, insensibles a los inhibidores clásicos de transportadores de DA como la cocaína y el GBR-12909 [18]. En este sentido, en las últimas décadas se han identificado diferentes transportadores que regulan el pasaje y eliminación de numerosos cationes orgánicos endógenos y exógenos, con diferente afinidad y cinética [9]. Estos transportadores de cationes orgánicos (OCTs) incluyen a los OCT 1, 2 y 3, que son transportadores tubulares pertenecientes a la superfamilia de transportadores de solutos SLC22A y que se ubican principalmente en la membrana basolateral de las células de los túbulos proximales [13,19,20]. Algunas propiedades funcionales comunes a los OCTs son: 1) su capacidad de transportar cationes orgánicos de diferentes estructuras moleculares y ser inhibidas por compuestos que no son transportados por ellos como las isocianinas; 2) traslocar cationes orgánicos de manera electrogénica; 3) operar de forma independiente del sodio y del gradiente de protones y 4) su propiedad bidireccional, es decir, de trasladar cationes orgánicos a través de la membrana plasmática en cualquier dirección (salida o entrada) [13]. Entre las catecolaminas, la DA es uno de los cationes orgánicos endógenos que se capta y secreta a través de este tipo de transportadores [21]. Tal es así que una posible ruta para el manejo de la DA en el túbulo proximal incluye un proceso de dos etapas: primero, la captación basolateral de DA circulante a través de los OCTs y segundo, la liberación de la misma en la membrana luminal, proceso que está mediado por un antiporter electroneutro [13, 22]. La DA es particularmente un buen sustrato, tanto para el OCT-1 como para el OCT-2, lo que sugiere que estos transportadores pueden estar implicados en el manejo renal de DA [23, 24]. El hecho de que la administración intravenosa de la isocianina disprocymium 22 (D-22), un potente inhibidor de los OCTs, reduce francamente la secreción tubular de DA, sugiere la participación de estos transportadores en el transporte renal de la DA [25]. La relevancia fisiológica de los transportadores OCTs en el manejo renal de DA y por ende en sus

acciones, reside en su capacidad de ser regulados por fosforilación mediada por diversas proteinquinas, las que a su vez pueden ser controladas por factores natriuréticos y antinatriuréticos [26]. La figura 1 ilustra de manera sintética el manejo tubular de la DA.

Figura 1. Representación esquemática de la síntesis y tráfico celular de dopamina (DA) en el túbulo proximal. La L-Dopa filtrada puede ser captada por dos mecanismos diferentes: (1) por transportadores independientes de sodio (LAT); (2) por transportadores sodio dependientes del sistema B0. La L-Dopa es descarboxilada rápidamente a DA por la enzima dopa descarboxilasa (o AADC del inglés *aminoacid aromatic decarboxilase*). La actividad de esta enzima puede ser regulada por diversas hormonas, como la angiotensina II y adenosina, entre otros. La DA recién formada puede salir de las células a través del borde apical (3) y actuar sobre sus receptores apicales o a través del lado basolateral (4) por los OCTs. La DA circulante puede



ingresar a las células tubulares proximales a través de los OCTs situados a nivel de la membrana basal (5).

La DA ejerce sus acciones a través de receptores de superficie celular pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G [27]. Los receptores de DA se clasifican en receptores D₁-símiles (subtipos D₁ y D₅) y D₂-símiles (subtipos D₂, D₃ y D₄) en base a su estructura y farmacología. Los receptores D₁ (D₁ y D₅), acoplados a las proteínas G estimuladoras G_s y G_{off}, se caracterizan por su capacidad para activar la adenilato ciclasa, mientras que los receptores D₂ (D₂, D₃, y D₄), acoplados a las proteínas G inhibitorias G_i y G_o, se caracterizan por su capacidad para inhibir la adenilato ciclasa y modular canales iónicos [27, 28]. Los receptores de DA están localizados en la vasculatura renal y en los túbulos renales (siendo su máxima concentración a nivel del túbulo proximal) [29]. En condiciones basales, más de 50% de la excreción renal de sodio está regulado por los receptores D₁ [27, 28]. La estimulación de dichos receptores por ligandos

exógenos da como resultado un aumento en la excreción de sodio que se atribuye en parte a un aumento en el flujo sanguíneo renal y a una inhibición directa del transporte de sodio tubular, con afectación variable de la tasa de filtración glomerular [27, 28, 30-34]. Sin embargo puede ser posible la necesidad de un sinergismo entre los receptores D_1 y D_2 para lograr un efecto natriurético completo [35, 36]. La importancia de la DA como una hormona natriurética se refleja en su capacidad para inhibir transportadores de sodio en casi la totalidad de la nefrona [37]. En efecto, la activación de los receptores de DA inhiben la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa en los túbulos proximales, en el asa ascendente gruesa de Henle y en el conducto colector [38-42]. La regulación de la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa por parte de la DA involucra diferentes pasos de fosforilación en distintos sitios de la subunidad catalítica de la enzima [43-45]. Existen evidencias de que la fosforilación inducida por DA también puede estimular la internalización y la subsiguiente inhibición de la enzima [46].

REGULACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL Y SU IMPACTO EN LA FUNCIÓN TUBULAR RENAL Y EL METABOLISMO DEL SODIO

La regulación fina de la excreción renal de sodio requiere una amplia interacción entre factores autocrinos, paracrinos y endocrinos [47]. En este sentido, la DA cumple un papel clave en el control y la regulación de este proceso interactivo. La DA intrarrenal puede actuar por sí sola o favoreciendo la acción de otras hormonas natriuréticas u oponiéndose a los efectos de hormonas antinatriuréticas [47]. La manera mediante la cual la DA interactúa con otras hormonas se puede dividir en dos categorías: (a) mediante efectos sinérgicos o antagónicos a corto plazo: por ejemplo, la DA interactúa sinérgicamente con el ANP y antagónicamente con los receptores β -adrenérgicos y la vasopresina; (b) mediante efectos a largo plazo: por ejemplo, la DA regula en menos la expresión renal de los receptores de angiotensina II (ANG II) y la síntesis de prostaglandinas [47].

El ANP es un péptido de 28 aminoácidos sintetizado y almacenado en los miocitos auriculares, el cual se libera en respuesta al estiramiento de la pared cardiaca o por estimulación endotelinérgica a través del receptor de endotelina tipo A o β -adrenérgica [48-50]. Los efectos natriuréticos y diuréticos del ANP se producen a través del aumento de la tasa de filtrado glomerular y de la disminución de la reabsorción tubular de sodio y agua [51]. Se demostró asimismo que el ANP es capaz de inhibir la reabsorción de sodio y agua dependiente de ANG II a nivel de los túbulos proximales, como así también disminuir la reabsorción de agua en los túbulos distales y colectores [52]. La observación de que la DA y el ANP comparten algunos efectos fisiológicos similares sugiere que cada uno puede contribuir a mejorar sinérgicamente las acciones de la otra [53]. Durante la última década, numerosos estudios experimentales han sugerido la posible existencia de una interacción entre los péptidos natriuréticos y el sistema dopaminérgico renal [53, 54]. Sin embargo, los mecanismos implicados en esta interacción no han sido completamente elucidados y continúan siendo motivo de investigación. Se ha reportado que parte de los efectos inhibidores del ANP sobre la reabsorción de sodio y agua dependen de mecanismos dopaminérgicos, particularmente ejercidos a través de los receptores de la DA [55-58]. De esta manera se ha demostrado que la DA refuerza los efectos natriuréticos y diuréticos del ANP, pues se observó que el uso de antagonistas D_1 (haloperidol y SCH 23390) disminuyen la natriuresis y la diuresis dependiente de ANP. La inhibición de la natriuresis y diuresis dependiente de ANP por bloqueo de los receptores D_1 no es cuantitativamente superior cuando se la compara con la natriuresis total aumentada por el péptido, por lo que la DA solo media una parte de sus efectos [5, 6]. El ANP también puede potenciar el efecto inhibidor de DA sobre el intercambiador Na^+/H^+ en los túbulos proximales y puede reclutar receptores D_1 localizados intracelularmente hacia la membrana plasmática de la célula tubular [1, 59]. Complementando y reforzando estos antecedentes, hemos demostrado que el ANP estimula la captación de DA por las células tubulares del riñón a través de la estimulación de los receptores de ANP tipo A (NPR-A, por su sigla en inglés), acoplados a la guanilato ciclasa, seguido por la formación de GMPc (como segundo mensajero) y la activación de la proteinkinasa G (PKG) [60, 61]. El proceso de captación se caracterizó como una captación extraneuronal típica, mecanismo dependiente de la temperatura y de la presencia de sodio [60]. El ANP también inhibe la actividad de la enzima catecol-O- metil transferasa (COMT), pero carece de efecto sobre la liberación renal de DA [62]. Estos resultados en conjunto muestran que el ANP aumenta el

contenido de DA endógena en la corteza renal. De esta manera, el ANP favorece la acumulación intracelular de DA, la que a su vez permite el reclutamiento y la estimulación de los receptores D_1 , con la consiguiente sobre-inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa, la disminución de la reabsorción de sodio y el aumento de la natriuresis. Por lo tanto, la DA y el ANP pueden lograr sus efectos a través de una vía común que implica la desactivación reversible de la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa tubular renal [60-62]. La interacción descrita entre el ANP y la DA renal puede contribuir a una mejor regulación del metabolismo del sodio y de la presión arterial. Por el contrario, el deterioro de esta interrelación puede jugar un papel relevante en la fisiopatología de la hipertensión arterial. De esta manera, se podría plantear que la captación alterada de DA por los túbulos renales podría contribuir al desarrollo de la hipertensión esencial.

De manera opuesta, nuestro grupo de trabajo también ha demostrado que la ANG II inhibe la captación de DA en corteza renal a través de la estimulación de los receptores AT_1 y activación de la vía de señalización de la fosfolipasa C con generación de segundos mensajeros como el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), el diacilglicerol (DAG), liberación de calcio intracelular y activación de la proteinkinasa C (PKC) y la calcio-calmodulina quinasa II (CaMK II) [63, 64]. La captación de DA tubular se caracterizó como una captación extraneuronal típica, dependiente de la temperatura e sensible a la hidrocortisona (bloqueante de la captación extraneuronal de aminas) [63]. A través de este efecto, la ANG II disminuye la inhibición de la DA sobre la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, y además, reduce la actividad de la dopa decarboxilasa y estimula la actividad de la monoaminoxidasa (MAO), aunque carece de efectos sobre la secreción tubular de DA [64, 65]. En su conjunto, todos estos efectos previenen la acumulación de DA en las células tubulares renales, resultando en una disminución de la biodisponibilidad de DA en el interior de la célula y en luz tubular de la nefrona. Finalmente este mecanismo previene el reclutamiento de receptores D_1 a la membrana celular y su ulterior estimulación por la DA, produciendo la desinhibición de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa y, en consecuencia, ocasionando un aumento de la reabsorción de sodio y agua [63-65].

La comprensión de los mecanismos celulares mediante los cuales el ANP regula el metabolismo renal de DA aportará nuevas evidencias sobre los mecanismos de excreción y/o retención de sal y agua que impactan sobre el manejo renal del sodio. La hipertensión arterial puede ser resultado de una incapacidad del riñón en eliminar sodio y por ende retener un exceso de agua que conduce al incremento del volumen sanguíneo [66]. Otras situaciones patológicas que implican una alteración en la excreción tubular de sodio sin implicar necesariamente un estado de hipertensión arterial son el síndrome nefrótico y la resistencia a la insulina, escenarios patológicos en donde se ha demostrado la participación del sistema dopaminérgico renal y de los péptidos vasoactivos en el desarrollo de la patología [67-72].

Se estima que cerca del 30-50% de los pacientes hipertensos poseen insulino-resistencia, y a su vez ésta se asocia a hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y a las enfermedades cardiovasculares que la acompañan [73-74]. A su vez, existen numerosas evidencias que revelan que la resistencia a la insulina es un factor importante en la etiología y la fisiopatología de la hipertensión arterial esencial [75-76]. Los mecanismos que relacionan la hiperinsulinemia con la hipertensión arterial son varios, entre ellos, un aumento en la reabsorción de sodio, la estimulación del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina, y la proliferación de células musculares lisas vasculares [73, 77-79]. Se ha descrito que la insulino-resistencia está presente en varios modelos de animales hipertensos, incluyendo las ratas espontáneamente hipertensas y las alimentadas con fructosa [80]. En este último modelo, la insulino-resistencia conduce a una forma adquirida de hipertensión en la cual el aumento de la presión arterial no está determinado genéticamente sino que es inducida por la dieta [80]. Diversos estudios establecieron una relación entre la insulino-resistencia y el sistema dopaminérgico renal en la génesis de la hipertensión arterial. Desde el punto de vista experimental se ha demostrado en ratas con insulino-resistencia por sobrecarga de fructosa, una menor excreción urinaria de DA y un menor contenido endógeno renal de la amina que se correlacionan en forma inversamente proporcional a los niveles de presión arterial [81]. Otra condición que promueve un estado de resistencia a la insulina es la obesidad. Un estudio realizado en ratas Zucker obesas demostró que el reclutamiento y función de los receptores D_1 a la membrana plasmática se encuentra alterado en este escenario patológico. Bajo estas condiciones, la administración de rosiglitazona a los

animales de experimentación provocó la restauración de los receptores D_1 como así también de su función [82]. De la misma manera, se ha comprobado que la inhibición de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa causada por DA se encuentra significativamente atenuada en ratas Zucker obesas con hipertensión. Dicha alteración se debió a una reducción en la expresión de receptores tubulares D_1 junto con alteraciones en la vía de señalización causadas por la hiperinsulinemia [83, 84]. Como se ha mencionado anteriormente, el paso que limita la síntesis y disponibilidad de DA renal es la captación de su precursor, la L-Dopa. Se ha demostrado que la insulina estimula el proceso de captación tubular de L-dopa y que dicho efecto estimulante se encuentra abolido en modelos de ratas con resistencia a la insulina por sobrecarga de fructosa [85]. En otro modelo de hiperinsulinemia inducida por obesidad, la presencia de resistencia a la insulina junto con un aumento del tono simpático se asoció a una menor actividad dopaminérgica renal [86]. Por otro lado, se ha observado la existencia de una relación entre los niveles plasmáticos de glucosa e insulina y el ANP. Se cree que el ANP podría aminorar la insulino-resistencia a través de mejoras en la oxidación lipídica a nivel hepático y muscular [87, 88]. En este sentido, se demostró que el ANP preserva la función mitocondrial y sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con dieta grasa [89]. Asimismo, diversos estudios han confirmado una correlación entre bajos niveles de ANP y altos niveles de glucosa e insulina, así como altos niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos [90].

OBJETIVOS GENERALES

Nos propusimos dos principales objetivos generales:

- 1- Comprobar *in vivo* si la alteración del transporte de DA afecta la función renal excretora de agua y sodio ejercida por el ANP.
- 2- Determinar si existen alteraciones en el sistema dopaminérgico renal en el modelo de sobrecarga de fructosa en la dieta, que puedan correlacionarse con variaciones en la función tubular (diuresis, clearance de creatinina, excreción urinaria de sodio y fracción excretada de sodio) y con modificaciones en los parámetros hemodinámicos como la presión arterial sistólica (PAS).

Con respecto al primer objetivo, se evaluó si los efectos del ANP sobre el sistema dopaminérgico renal inciden indirectamente sobre los mecanismos de formación de la orina, para lo cual se determinaron sus efectos sobre diversos parámetros de funcionalidad renal. Asimismo, se evaluó la implicancia de los transportadores de cationes orgánicos (OCT-1, OCT-2, OCT-3) como posibles blancos de la interacción ANP y sistema dopaminérgico renal. Se completaron los estudios analizando los efectos que resultan de esta interacción sobre la función de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal. De esta manera, se procedió a investigar la participación de los transportadores OCTs en la captación de DA por los túbulos renales, proceso que estaría estimulado por el ANP. Con el objetivo de identificar el tipo de transportador involucrado y su repercusión sobre la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, se estudiaron los efectos de dichos péptidos en presencia de un inhibidor específico de los OCTs (D-22) y sobre la actividad específica de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Los resultados obtenidos que más abajo se detallan y discuten, aportan nuevas evidencias de una interacción entre el ANP y la DA renal en un modelo *in vivo*, demuestran su incidencia en los mecanismos fisiológicos de regulación de la diuresis y la natriuresis y sugieren su posible repercusión en la fisiopatología de la hipertensión arterial.

En cuanto al segundo objetivo, se investigó en ratas hipertensas insulino-resistentes por sobrecarga de fructosa, la posible existencia de alteraciones en el sistema dopaminérgico renal que conducirían a una reducción del contenido endógeno de DA renal y por lo tanto a una menor excreción urinaria de la amina. Los resultados sugieren una menor activación de receptores D_1 y consecuentemente una desinhibición de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal. Estas alteraciones se vieron acompañadas de un incremento en los niveles plasmáticos de ANP y una disminución en los receptores NPR-A tubulares, lo que conduce a una menor inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, tanto en forma directa como indirecta, produciéndose ésta última a través de sus efectos del ANP sobre la síntesis de DA. Finalmente, la alteración simultánea de ambos sistemas hipotensores renales (el ANP y la DA), contribuiría al incremento sinérgico de la reabsorción de sodio y agua. Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre el mecanismo patogénico de la hipertensión arterial en

modelos de insulino-resistencia por sobrecarga de fructosa. Asimismo, confirman la existencia de un estrecho vínculo entre ambos sistemas natriuréticos y la forma en que ambos impactan sobre los mecanismos que regulan la formación de orina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis de trabajo:

PARTE 1) Parte de los efectos natriuréticos y diuréticos del ANP se producirían de manera indirecta estimulando la captación renal de DA al regular positivamente la funcionalidad de los OCTs. Esto conduciría a incrementar la disponibilidad tubular de DA, produciendo una mayor activación de receptores D_1 y una mayor inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, disminuyendo de esta manera, la reabsorción de Na^+ y agua. Por lo tanto, las hipótesis de trabajo que surgen son:

- 1- Los efectos del ANP, mediados por el receptor NPR-A, sobre la captación tubular de DA deben ser efectuados a través de la regulación de la función de un transportador de membrana del tipo extraneuronal de aminos, siendo posible postular como candidatos a los OCTs, afectando de esta manera el manejo renal de DA.
- 2- A través de sus efectos sobre el sistema dopaminérgico renal, el ANP modificaría indirectamente la función de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal.

Por lo tanto el empleo de sustancias específicas que bloquean el sistema de transporte dopaminérgico renal podrían disminuir los efectos diuréticos/natriuréticos del ANP. Esto demostraría la vía efectora final por la cual el ANP regula la captación tubular de DA, justificando así los efectos fisiológicos renales indirectos sobre la regulación de la reabsorción de sodio y agua y su repercusión en el balance hidrosalino.

PARTE 2) Los cambios hemodinámicos observados en un modelo de insulino-resistencia por sobrecarga de fructosa en la dieta se asociarían a modificaciones del sistema dopaminérgico renal que llevarían a una reducción en el contenido endógeno de la amina. Estas alteraciones conducirían al aumento de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, la cual está íntimamente relacionada a la retención hidrosalina y al desarrollo de hipertensión arterial. Por otra parte, el incremento en los niveles plasmáticos de ANP junto a una disminución de sus receptores NPR-A tubulares en este modelo, conduciría también a una menor inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, tanto en forma directa como indirecta, ésta última a través de los efectos del ANP sobre la síntesis de DA. Finalmente, la alteración de ambos sistemas hipotensores renales (el ANP y la DA) en forma simultánea, contribuiría al incremento sinérgico de la reabsorción de sodio y agua.

Por lo tanto, las hipótesis de trabajo surgidas son:

- 1- Si la hipertensión inducida por sobrecarga de fructosa se asocia a menor excreción urinaria de DA, se puede postular que esta alteración puede deberse a la existencia de alteraciones en la captación de su precursor L-Dopa, lo que conduce a disminuir la síntesis de DA y consecuentemente a reducir la inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal.
- 2- Los efectos inhibitorios sobre la síntesis de DA renal en estos modelos de hipertensión deben producirse a través de modificaciones en la regulación de la expresión de un transportador de membrana del tipo extraneuronal de aminos. En este sentido, es posible postular como candidatos involucrados a los LATs, afectando de esta manera el manejo renal de la L-Dopa.
- 3- Considerando que en modelos de hipertensión asociada a insulino-resistencia existen cambios en la expresión de receptores dopaminérgicos, es posible postular también que pueden existir alteraciones en otro sistema natriurético renal como el de los péptidos natriuréticos, modificando la expresión de sus receptores NPR-A renales como los niveles plasmáticos del péptido.
- 4- Todas estas posibles alteraciones en los sistemas natriuréticos renales en modelos de hipertensión como el inducido por sobrecarga de fructosa, conducirían a una vía final común: la disminución de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa, enzima cuya alteración está íntimamente relacionada con la retención salina y la hipertensión arterial.

La demostración de estas hipótesis tiende a poner en evidencia que la alteración de mecanismos renales complejos encargados del transporte tubular de sodio puede ser causa originaria de la retención de sodio y agua presente en el modelo de hipertensión insulino-resistente por sobrecarga de fructosa.

Objetivos específicos:

PARTE 1) Comprobar si el ANP estimula la función de los transportadores catiónicos orgánicos (OCT-1, OCT-2 y OCT-3), lo que conduciría a incrementar el contenido endógeno de DA renal y por consiguiente a una mayor biodisponibilidad de la amina para acceder al lumen tubular, ocasionando una mayor activación de receptores D₁ y/o D₂ y consecuentemente una mayor inhibición de la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal. De esta manera, además de sus efectos directos natriuréticos y diuréticos propios, los péptidos natriuréticos y la DA se potenciarían para disminuir la reabsorción de agua y Na⁺, contribuyendo de esta manera a incrementar la excreción de sodio y agua. Los resultados de este estudio pueden aportar un novedoso mecanismo fisiológico de acción renal del ANP a través de la interacción con un sistema regulador local de la reabsorción y excreción renal de sodio como el sistema dopaminérgico renal y cómo impacta sobre los mecanismos que regulan la formación de orina.

Por lo tanto los objetivos específicos serán:

- 1- Determinar los efectos del ANP sobre la función tubular renal (carga filtrada de sodio, excreción fraccional de sodio, tasa de reabsorción tubular de sodio, natriuresis y diuresis) y sobre el transporte tubular de DA exógena (a través de los niveles de excreción urinaria de DA en presencia y ausencia de un bloqueante específico de los OCTs).
- 2- Determinar, como resultado de la interacción ANP-sistema dopaminérgico renal, qué alteraciones se producen en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal.
- 3- Determinar los efectos del ANP sobre la expresión y actividad de los OCTs.

PARTE 2) Los objetivos específicos a desarrollar en el modelo de hipertensión insulino-resistente por sobrecarga de fructosa serán:

- 1- Determinar la existencia de alteraciones en el sistema dopaminérgico renal a través de modificaciones en los niveles de excreción urinaria de L-dopa y DA, y en los niveles de expresión del transportador de L-aminoácidos LAT-2.
- 2- Determinar la existencia de alteraciones en el sistema natriurético del ANP renal a través de la existencia de modificaciones en los niveles plasmáticos de ANP y la expresión de los receptores tubulares NPR-A.
- 3- Determinar si las alteraciones del sistema dopaminérgico renal y del ANP se correlacionan con cambios en la presión arterial, la función tubular renal (carga filtrada de sodio, excreción fraccional de sodio, tasa de reabsorción tubular de sodio, natriuresis y diuresis) y con la excreción urinaria de L-dopa y DA.
- 4- Determinar si la existencia de las alteraciones anteriormente mencionadas conducen finalmente a aumentar la actividad y/o expresión de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal.

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE 1) Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 250 a 350 gramos de peso corporal, mantenidas con ciclos de 12 horas luz/oscuridad, a 22°C y alimentadas con dieta balanceada para roedores y agua *ad libitum*.

En base a los objetivos específicos señalados se procedió a:

Punto 1- Determinar *in vivo* los efectos del ANP sobre la función tubular renal (carga filtrada de Na⁺, excreción fraccional de Na⁺, tasa de reabsorción tubular de Na⁺, natriuresis y diuresis), sobre la excreción urinaria de DA y determinar el sistema de transporte utilizado por la DA exógena mediante el uso del inhibidor específico de OCTs.

Se determinaron *in vivo* los efectos sobre la función tubular renal y la excreción de agua y sodio del ANP en presencia y ausencia del inhibidor específico de los OCTs (isocianina D-22). Bajo anestesia con uretano 10% (1,3 mg/kg, i.p.), se canuló la vena femoral izquierda con tubuladura Silastic (0,12 mm diámetro interno) para efectuar infusiones intravenosas continuas. Se colocó una cánula T4 en carótida derecha para la obtención de muestras de sangre y registro de la presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC) mediante un transductor Statham GOULD P23ID acoplado al Polígrafo Grass 79D. Se canuló la vejiga con cánula PE-75 para recolectar la orina. A continuación, se infundió durante 45 minutos solución salina isotónica (NaCl 0.9 g%, SSI) para estabilizar la diuresis (velocidad de infusión: $0.04 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) utilizando una bomba de infusión (Syringe Infusion Pump, SageTM, Orion). Posteriormente se infundió durante 120 minutos SSI al grupo control, y las drogas a testear (con SSI como vehículo) a los grupos experimentales. En las muestras de orina y sangre recolectadas, se determinó el volumen urinario y los niveles plasmáticos de sodio y creatinina basales y post-infusión (a los 90 y 120 minutos), calculando la carga filtrada de sodio, la tasa de reabsorción tubular de sodio, la excreción fraccional de sodio, la natriuresis y la diuresis.

Determinaciones en Sangre y Orina

El volumen urinario se determinó por gravimetría y las concentraciones plasmáticas y urinarias de sodio, potasio y creatinina se determinaron utilizando un autoanalizador. La velocidad de filtrado glomerular (VFG) se determinó mediante el clearance de creatinina (ClCr). A fin de estudiar la función tubular se estimaron la excreción fraccional de sodio (EFNa), carga filtrada de sodio (CFNa) y reabsorción tubular de sodio (RTNa) a partir de las siguientes fórmulas estándar:

$$\text{VFG} = \text{ClCr} = (\text{U}_{\text{Cr}} \cdot \text{VU}) / \text{PL}_{\text{Cr}}$$

$$\text{CFNa} = \text{ClCr} \cdot \text{PI}_{\text{Na}}$$

$$\text{RTNa} = (\text{ClCr} \cdot \text{PI}_{\text{Na}}) - (\text{VU} \cdot \text{U}_{\text{Na}})$$

$$\text{EFNa} = (\text{VU} \cdot \text{U}_{\text{Na}}) \cdot 100 / (\text{ClCr} \cdot \text{PI}_{\text{Na}}) = (\text{UNa} / \text{PINa}) \cdot 100 / (\text{UCr} / \text{PICr})$$

Con la finalidad de evaluar en un primer momento la participación selectiva de los OCTs como transportadores específicos y necesarios para las acciones tubulares de la DA, se llevó a cabo el siguiente set de experimentos. Todos los grupos estudiados fueron tratados con benserazida, un inhibidor de la síntesis endógena de DA, con la finalidad de independizarnos del tono basal dopaminérgico renal proveniente de la síntesis de DA tubular endógena. La misma se administró vía intraperitoneal (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 24 y 2 horas antes del comienzo del experimento.

Los grupos estudiados fueron:

a) control (SSI): se infundió SSI a los animales durante 120 minutos con la finalidad de evaluar la diuresis y natriuresis en una rata normal. De esta manera se determinó que el vehículo utilizado a la velocidad de infusión realizada, en este caso solución fisiológica a $0,04 \text{ mL}/\text{min}$, no incidiera sobre los resultados obtenidos en los grupos experimentales.

Para evaluar el efecto puro de la dopamina exógena, todos los grupos experimentales recibieron un bolo endovenoso de pargilina (20 mg/kg) y tolcapone (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), inhibidores de las enzimas catabolizadoras de DA, MAO y COMT, respectivamente. Los grupos experimentales fueron:

b) Pargilina + Tolcapone: a los animales se les infundió SSI durante 120 minutos. De esta manera se evaluó que la inhibición del sistema dopaminérgico renal endógeno no influyera en los resultados obtenidos para los demás grupos experimentales.

c) DA: a los animales se les infundió SSI + DA ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) durante 120 minutos. Se evaluó de esta manera el efecto puro de la DA exógena.

d) DA + D-22: se infundió SSI + D-22 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) durante los 60 minutos previos al inicio del período experimental. Luego, se infundió SSI + D-22 + DA por 120 minutos. Se evaluó así el efecto que posee el inhibidor específico D-22 sobre los OCTs como mediadores del transporte de DA.

Una vez que fue evaluada la participación de los OCTs como mediadores específicos de la captación de DA, se procedió a estudiar los efectos del ANP. Los siguientes grupos experimentales se realizaron con pretratamiento con el inhibidor endógeno de DA (benserazida) y recibieron pargilina y tolcapone en bolo endovenoso. De esta manera se inhibió tanto la síntesis de DA endógena y se protegió a la DA exógena administrada de ser catabolizada, pues el propósito principal de los experimentos fue evaluar exclusivamente los efectos del ANP sobre la DA administrada exógenamente:

e) ANP: los animales recibieron ANP en bolo endovenoso (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, disuelto en 0,1 mL de SSI) al inicio del período experimental. Luego, se infundió SSI + ANP (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) por 120 minutos. Se evaluó de esta manera el efecto puro del ANP exógeno.

f) ANP + DA: los animales recibieron ANP en bolo endovenoso (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, disuelto en 0,1 mL de SSI) al inicio del período experimental. Luego, se infundió SSI + ANP + DA por 120 minutos. Este grupo permitió evaluar el efecto de la administración conjunta de ANP y DA.

g) ANP + DA + D-22: se infundió SSI + D-22 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) durante los 60 minutos previos al inicio del período experimental. Al inicio del período experimental, los animales recibieron ANP en bolo endovenoso. Luego, se infundió SSI + ANP + DA + D-22 por 120 minutos. Se evaluó así el efecto que posee el inhibidor específico D-22 sobre los OCTs, como mediadores del transporte de DA cuando se lo administra conjuntamente con ANP.

Por otra parte, para comprobar si el bloqueo de los OCTs afecta la acción estimulante del ANP sobre el transporte tubular de DA, se procedió a determinar los niveles de excreción urinaria de DA en muestras de orina correspondientes a los grupos control y experimentales a), c), d) f) y g) referidas más arriba en el Punto 1.

Se purificaron parcialmente alícuotas de 50 μl de orina mediante una extracción en alúmina. Las catecolaminas se separaron por cromatografía de alta resolución (HPLC) en fase reversa utilizando una columna de C18 de 4.6x250 mm y se cuantificaron por amperometría mediante la corriente producida por exposición del efluente de la columna a potenciales oxidantes y reductores en serie, usando un sistema de triple electrodo. La recuperación de la extracción con alúmina fue de 80–90%. La concentración de DA en cada muestra fue corregida por el porcentaje de recuperación de un estándar interno. Los niveles de DA se corrigieron finalmente por diferencias en la recuperación del estándar interno en una mezcla de estándares externos. El límite de detección fue de 20 pg/volumen ensayado.

Punto 2- Determinar la existencia de cambios en la actividad específica de la Na^+ , K^+ , ATPasa tubular renal que surgen de la interacción ANP-DA renal.

Para comprobar si existen cambios en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa como producto de la interacción ANP-DA a nivel renal, se determinó la actividad específica de la bomba enzimática bajo los efectos de la administración exógena de ANP y DA.

Finalizados los experimentos del punto 1, y extirpados los riñones, se obtuvieron cortes de corteza renal, que rápidamente se colocaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el día de su procesamiento. Los tejidos se homogenizaron (1:10 peso/volumen) en una solución compuesta por 25 mM de imidazol, 1 mM EDTA y 0.25 M sucrosa y se centrifugaron a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos. Se utilizó en cada caso el sobrenadante para determinar la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa renal según el método de Fiske-Subbarow, expresándose los resultados como porcentaje (%) de actividad específica de la enzima, tomando como 100%, el valor del grupo control.

Punto 3- Determinar *in vivo* la existencia de cambios en los niveles de expresión de los OCTs y del receptor D_1 como consecuencia de la administración exógena de ANP. Determinar *in vitro* la existencia de cambios funcionales en los OCTs en presencia y ausencia de ANP y el bloqueante específico de los OCTs, D-22.

Para comprobar la existencia de cambios en la expresión de los transportadores OCTs así como del receptor D_1 de DA como producto de la administración exógena de ANP, se procedió a determinar los niveles de expresión proteica mediante western blot.

Finalizados los experimentos del punto 1, y extirpados los riñones derechos, se obtuvieron cortes de corteza renal, que rápidamente se colocaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el día de su procesamiento. Los tejidos se homogeneizaron (1:3 peso/volumen) en una solución compuesta por 50 mmol/L Tris; 0,1 mmol/L EDTA; 0,1 mmol/L EGTA; 1% Triton-X-100; 1 mmol/L PMSF; 1 $\mu\text{mol/L}$ pepstatina; 2 $\mu\text{mol/L}$ leupeptina y 1x cocktail inhibidor de proteasa, y se centrifugaron (1100 rpm durante 10 min a 4°C). La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante la técnica de Lowry. Posteriormente, se conformaron muestras conjuntas (pooles) de corteza renal y se sembró una cantidad de proteínas de 100 μg por calle, las que fueron separadas de acuerdo a su peso molecular, mediante una SDS-electroforesis en gel de 10% de poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF. La membrana, luego de bloquear la unión inespecífica con seroalbúmina bovina (BSA) 3% P/V, se incubó con anticuerpo policlonal anti-OCT-1 (dilución 1:200), anticuerpo policlonal anti-OCT-2 (dilución 1:400), anticuerpo policlonal anti-OCT-3 (dilución 1:200) o anticuerpo policlonal anti-D₁ (dilución 1:400), todos ellos procedentes de cabra. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo IgG anti-cabra biotinilado procedente de burro (dilución 1:1500), seguido por un tercer paso de incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rabanito (dilución 1:2000). Las muestras fueron reveladas mediante quimioluminiscencia, usando un reactivo ECL durante un tiempo de 1 a 5 minutos. La densidad óptica de las respectivas bandas fue cuantificada mediante escaneo densitométrico utilizando el programa Image J. Para evitar errores por diferencias en la cantidad de proteína sembrada en cada calle, se midió la expresión de GAPDH como standard interno, utilizando un anticuerpo policlonal anti-GAPDH procedente de conejo (dilución 1:2000), anticuerpo secundario anti conejo biotinilado (dilución 1:2000), y un tercer paso con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rabanito (dilución 1:2000). Los niveles de proteína en cada muestra se calcularon y se expresan como la relación existente entre las densidades ópticas de las bandas correspondientes a OCT-1, OCT-2, OCT-3, receptor D₁ y la correspondiente a GAPDH.

Por otra parte, para comprobar cambios en la actividad de los OCTs y en su capacidad de transportar DA tubular como consecuencia de la administración exógena de ANP, se llevó a cabo un experimento in vitro de captación de ^3H -DA en presencia de ANP y de D-22, como inhibidor específico de los OCTs. Para este experimento se utilizó otro grupo de ratas macho (300-350 g de peso corporal) que fue anestesiado con uretano 10% (1,3 mg/kg, i.p.). Ambos riñones fueron extirpados y lavados con buffer Krebs para remover la sangre residual. Se obtuvieron cortes de corteza renal de aproximadamente 50 mg de peso. Se determinó la captación renal de ^3H -DA. Los tejidos se pre-incubaron en 2 mL de buffer Krebs en un baño Dubnoff a 37°C , pH 7.40, burbujeados continuamente con mezcla gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂ durante 15 minutos. Se adicionó nomifensina (50 μM) al medio para inhibir la captación neuronal de DA, evitando que la misma afectara los resultados de la captación renal. Luego de la pre-incubación, los tejidos fueron transferidos a un nuevo medio de buffer Krebs e incubados en condiciones similares, con 0.625 $\mu\text{Ci/mL}$ ^3H -DA (22.32 nM) como trazador, 17 μM nomifensina y las diferentes drogas a testear. Se estudiaron los siguientes grupos: (a) control y los restantes incubados con: (b) 100 nM ANP; (c) 1 μM D-22 y (d) 1 μM D-22 + 100 nM ANP.

PARTE 2) Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 150 a 200 gramos de peso corporal, mantenidas con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, a 22°C y alimentadas con dieta balanceada para roedores (Asociación Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina) con la siguiente composición (P/P): 20% proteínas, 3% grasas, 2% fibra, 6% minerales y 69% almidón más suplementos vitamínicos.

Las ratas se dividieron al azar en 2 grupos al comienzo del estudio (n = 8 ratas por grupo por cada período):

- Grupo control (C): con agua de bebida corriente ad libitum, durante 4, 8 y 12 semanas.
- Grupo experimental (SF): tratadas con fructosa en el agua de bebida (al 10% P/V), durante por 4, 8 y 12 semanas.

Las ratas fueron pesadas antes del comienzo y al final de cada período de estudio. Para el análisis de los parámetros de funcionalidad renal, dos días previos al final de cada período de estudio se colocó a las ratas en jaulas metabólicas durante 48 horas para que se habitúen al medio, y se recolectó la orina de las siguientes 24 horas, con el objeto de determinar la excreción urinaria de L-dopa y DA, la excreción urinaria y fraccional

de sodio, la diuresis y la concentración de creatinina. Previo al sacrificio y bajo anestesia intraperitoneal con etiluretano al 10% (1,3 mg/kg) se recolectaron muestras de sangre del plexo retroocular en condiciones de ayuno, y se centrifugaron a 2700 rpm durante 20 minutos a 4°C. Las concentraciones plasmáticas y urinarias de sodio y creatinina se determinaron en un autoanalizador automatizado y los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol total y triglicéridos por método espectrofotométrico (analizador automatizado Spectrum CCX, Abbott diagnostics, Abbott Park, IL, USA) y por kits comerciales (Wiener Glycemia y TG color GPO/PAP AA, método enzimático, Wiener Labs S.A.I.C., Rosario, Argentina). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a los principios internacionales sobre ética y cuidado de animales de experimentación.

Punto 1- Determinar cambios en los niveles de presión arterial sistólica (PAS) en las ratas con sobrecarga de fructosa.

Para la medición de la presión arterial, los animales fueron entrenados dos veces por semana, desde la semana previa al cambio dietético. La PAS se determinó antes de comenzar los tratamientos y la semana previa al sacrificio (semana 4, 8 y 12) a través del método pletismográfico en la cola de la rata, usando un manguito inflable y un micrófono conectado a un amplificador Grass D.C. (modelo 7DAC, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA) acoplado a un polígrafo (modelo 79D, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA).

Punto 2- Identificar cambios en la función renal excretora de sodio y agua y en la excreción urinaria de L-Dopa y DA y correlacionarlos con cambios en la presión arterial. Determinar los niveles plasmáticos de ANP.

El volumen urinario se determinó por gravimetría y las concentraciones plasmáticas y urinarias de sodio, potasio y creatinina se determinaron utilizando un autoanalizador. Se determinó la VFG, ClCr, CFNa, RTNa y FENa como así también la excreción urinaria de L-Dopa y DA por HPLC, como fue descripta anteriormente en el punto 1 de materiales y métodos de la PARTE 1.

Los niveles plasmáticos de ANP se determinaron por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), previa extracción por cromatografía en fase reversa con cartuchos de Sep-Pak C18, según la metodología de purificación de Sarda y col. [91]

Punto 3- Determinar los niveles de expresión del LAT-2 y del NPR-A por Western Blot en tejido renal.

Al finalizar el período de infusión, se extirparon los riñones bajo anestesia, y se obtuvieron cortes de corteza renal que rápidamente se colocaron bajo nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el día del experimento. Se homogenizaron los tejidos renales (corteza renal) con un homogenizador Polytrón en una solución de lisis y se determinó la cantidad de proteínas obtenidas por el método de Lowry. Luego se realizó una separación de las mismas por electroforesis en un gel de poliacrilamida y posterior transferencia a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences). Luego de bloquear la unión inespecífica se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal primario anti-LAT-2 procedente de cabra y anti-NPR-A procedente de conejo (Santa Cruz Biotechnology). Como anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpo IgG anti-cabra biotinilado procedente de burro (dilución 1:1500) y anticuerpo IgG anti-conejo biotinilado procedente de cabra (dilución 1:2000) seguidos por un tercer paso con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rabanito (dilución 1:2000). Las muestras fueron reveladas por quimioluminiscencia usando un reactivo ECL durante 1 a 5 minutos. La densidad óptica de las respectivas bandas fue cuantificada mediante escaneo densitométrico utilizando el programa Image J. Para evitar errores por diferencias en la cantidad de proteína sembrada en cada calle, se midió la expresión de GAPDH como standard interno, utilizando un anticuerpo policlonal anti-GAPDH procedente de conejo (dilución 1:2000), anticuerpo secundario anti conejo biotinilado (dilución 1:2000), y un tercer paso con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rabanito (dilución 1:2000). Los niveles de proteína en cada muestra se calcularon y expresan como la relación entre las densidades ópticas de las bandas correspondientes a LAT-2, NPR-A y la correspondiente a GAPDH.

Punto 4- Identificar cambios en la expresión y actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal.

Para la determinación de la expresión de Na⁺, K⁺-ATPasa mediante western blot, al finalizar el período de infusión, se extirparon los riñones bajo anestesia, y se obtuvieron cortes de corteza y médula renal que rápidamente se colocaron bajo nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el día del experimento. Las

muestras de corteza y médula renal se homogenizaron con un homogenizador Polytrón en una solución de lisis y se determinó la cantidad de proteínas obtenidas por el método de Lowry. Luego de separar las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences); se bloqueó la unión inespecífica con BSA 3% P/Vy se incubó toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal primario de conejo anti-Na⁺, K⁺-ATPasatotal y anti-Na⁺, K⁺-ATPasa fosforilada en Serina 23 (Amersham). Luego de los lavados con buffer fosfato salino (PBS) 1X se incubó con un anticuerpo secundario de burro dirigido contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Finalmente mediante la reacción de la peroxidasa se detectó en placas fotográficas la quimioluminiscencia generada. La densidad óptica de las respectivas bandas se cuantificó mediante escaneo densitométrico utilizando el programa Image J. Para evitar errores por diferencias en la cantidad de proteína sembrada en cada calle, se midió la expresión de GAPDH como standard interno, utilizando un anticuerpo policlonal anti-GAPDH hecho en conejo (dilución 1:2000), anticuerpo secundario anti conejo biotilado (dilución 1:2000), y un tercer paso con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rabanito (dilución 1:2000). Los niveles de proteína en cada muestra fueron calculados y expresados como la relación entre las densidades ópticas de las bandas correspondientes a Na⁺, K⁺-ATPasa total, Na⁺, K⁺-ATPasa fosforilada en serina 23 y la correspondiente a GAPDH.

Para efectuar las determinaciones mediante la técnica de inmunohistofluorescencia, se extirparon los riñones al finalizar el período de estudio y bajo anestesia. Posteriormente, se cortaron sagitalmente y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 10% (pH 7,20). Los tejidos se embebieron en parafina usando técnicas histológicas convencionales. Se efectuaron cortes de 3 micrones y se montaron en portaobjetos para efectuar el estudio histológico y la inmunohistofluorescencia. Luego de la desparafinización y lavados con buffer Ringer frío, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon incubando a 22°C con buffer Ringer conteniendo gelatina al 0,5%. Posteriormente, se incubaron a 4°C hasta el día siguiente, con anticuerpo específico anti-Na⁺, K⁺-ATPasa total purificado contra la correspondiente proteína (dilución 1:250 en PBS). Se lavó con PBS buffer y se incubó 45 minutos a oscuras con el contraanticuerpo correspondiente marcado (donkey anti-rabbit IgG FITC, dilución 1:500 en PBS, Santa Cruz Biotechnology, Inc). La medición de fluorescencia se realizó mediante microscopía de inmunofluorescencia.

Para determinar la actividad específica la Na⁺, K⁺-ATPasa, cortes de corteza renal se colocaron bajo nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el día del experimento. A continuación, se procedió de la misma manera como se explicó previamente en el punto 2 de la PARTE 1).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La distribución Gaussiana se evaluó por el método Kolmogorov y Smirnov y para comparar entre los grupos, se utilizó el ANOVA seguido del test Newman-Keuls o Tukey según corresponda. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó por medio del test Kruskal-Wallis (Nonparametric ANOVA) y el test de comparación múltiple de Dunn, para aquellos parámetros con distribución no Gaussiana como los datos histológicos. Los datos se procesaron con el programa GraphPad Prism, versión 2.0. Los resultados con $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

PARTE 1) En base a los objetivos y la metodología propuesta, se evaluó en un primer momento la participación de los OCTs como transportadores específicos y necesarios para las acciones tubulares de la DA, examinando para ello los efectos sobre la diuresis, la excreción fraccional de sodio (FENa), la natriuresis (uNa.V), el volumen de filtrado glomerular (estimado por el ClCr) y sobre parámetros hemodinámicos como la PAM y la FC. Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, los experimentos se llevaron a cabo en ratas pretratadas con benserazida, con el objeto de descartar que la participación de la DA endógena enmascare los efectos de la DA exógena. Determinamos los efectos de la pargilina y tropolona sobre la inhibición de las enzimas responsables del metabolismo de la DA (MAO y COMT), la administración de DA y ANP por separado y de su co-administración, sobre la funcionalidad renal (tabla 1) y sobre los parámetros hemodinámicos PAM y FC (tabla 2). Para investigar la participación de los OCTs, se empleó D-22 como

inhibidor específico de esos transportadores. La inhibición de la MAO y COMT (grupo P+T) no alteró ningún parámetro de funcionalidad renal ni la PAM y FC, con respecto a las ratas controles (tablas 1 y 2). La infusión tanto de ANP como de DA individualmente, aumentaron a los 90 y 120 minutos, la diuresis y las excreciones fraccional y urinaria de sodio, con respecto a sus niveles basales y en comparación contra el grupo P+T (tabla 1), sin alterar el filtrado glomerular. La administración de D-22 (grupo DA+D-22), inhibió los efectos natriuréticos y diuréticos de la DA, tanto a los 90 como a los 120 minutos. Por otro lado, la administración conjunta de ANP más DA (grupo ANP+DA) generó una mayor respuesta de efectos a los 90 y 120 minutos en la diuresis y excreción urinaria y fraccional de sodio, en comparación con el valor basal a tiempo 0, y también en comparación con los grupos infundidos con ANP o DA solamente. Asimismo, el D-22 disminuyó también significativamente los efectos natriuréticos y diuréticos de la co-infusión de ANP y DA (grupo ANP+DA+D-22), pero los valores obtenidos no alcanzaron los valores observados respecto al grupo control, ni respecto a sus respectivos parámetros basales.

El filtrado glomerular aumentó a los 90 y 120 minutos sólo en el grupo infundido con ANP más DA (grupo ANP+DA), con respecto a sus valores basales a tiempo 0 y con respecto a los grupos control y P+T, mientras que no se modificó en el resto de los grupos experimentales (tabla 1). La PAM y FC no se alteraron en ningún grupo experimental a lo largo de los 120 minutos de infusión, con excepción del grupo con ANP más DA (ANP+DA) en el cual los valores de la PAM disminuyeron con respecto a sus valores basales y a los valores obtenidos en los grupos control y P+T (tabla 2).

Tabla 1. Parámetros de función renal de grupos control y experimentales.

		FENa (%)	Diuresis (μL/min)	uNa.V (μEq/min)	VFG (mL/min)
Control	Basal	0,17±0,04	17,13±1,33	1,98±0,12	1,96±0,13
	90 min	0,18±0,06	18,00±1,10	1,80±0,08	2,04±0,18
	120 min	0,14±0,05	16,50±1,02	1,29±0,09	2,09±0,17
P+T	Basal	0,22±0,05	20,58±1,67	2,02±0,13	2,02±0,12
	90 min	0,16±0,02	20,98±1,80	1,83±0,12	1,97±0,18
	120 min	0,13±0,03	21,23±2,29	1,49±0,11	1,94±0,14
ANP	Basal	0,14±0,03	16,08±1,41	1,86±0,09	1,98±0,24
	90 min	1,46±0,09 ^{*/€}	48,30±3,38 ^{*/€}	9,03±0,92 ^{*/€}	2,65±0,17
	120 min	1,58±0,12 ^{*/€}	46,79±3,22 ^{*/€}	9,92±0,91 ^{*/€}	2,42±0,21
DA	Basal	0,15±0,04	19,14±1,65	1,73±0,09	2,07±0,28
	90 min	1,31±0,11 ^{*/€}	62,10±5,21 ^{*/€}	11,40±0,78 ^{*/€}	2,52±0,15
	120 min	1,42±0,18 ^{*/€}	64,47±4,78 ^{*/€}	12,30±0,85 ^{*/€}	2,36±0,18
DA + D-22	Basal	0,12±0,06	16,45±1,06	1,90±0,18	1,97±0,19
	90 min	0,20±0,05 ^{**}	28,04±1,31 ^{**}	3,90±0,34 ^{**}	2,62±0,11
	120 min	0,21±0,03 ^{**}	29,40±1,39 ^{**}	4,20±0,40 ^{**}	2,43±0,25
ANP + DA	Basal	0,16±0,04	17,34±1,50	1,84±0,07	1,92±0,22
	90 min	2,45±0,15 ^{**/**/€}	92,26±7,17 ^{\$/€}	25,32±2,85 ^{\$/€}	3,17±0,27 ^{*/€}
	120 min	2,22±0,16 ^{**/**/€}	95,24±8,56 ^{\$/€}	24,65±2,21 ^{\$/€}	3,02±0,16 ^{*/€}
ANP + DA + D-22	Basal	0,19±0,03	18,08±1,03	1,99±0,13	2,09±0,23
	90 min	1,56±0,10 ^{#/€}	58,41±4,98 ^{#/€}	15,30±1,70 ^{#/€}	2,96±0,24
	120 min	1,64±0,11 ^{#/€}	56,20±4,22 ^{#/€}	16,20±1,42 ^{#/€}	2,82±0,29

FENa: excreción fraccional de sodio; uNa.V: excreción urinaria de sodio; VFG: velocidad de filtrado glomerular estimado por CICr. [€]p<0.05 vs respectivo período basal; ^{*}p<0.05 vs control o grupo P+T; ^{**}p<0.05 vs DA; ^{***}p<0.05 vs ANP; [#]p<0.05 vs ANP+DA; ^{\$/€}p<0.05 vs DA o ANP.

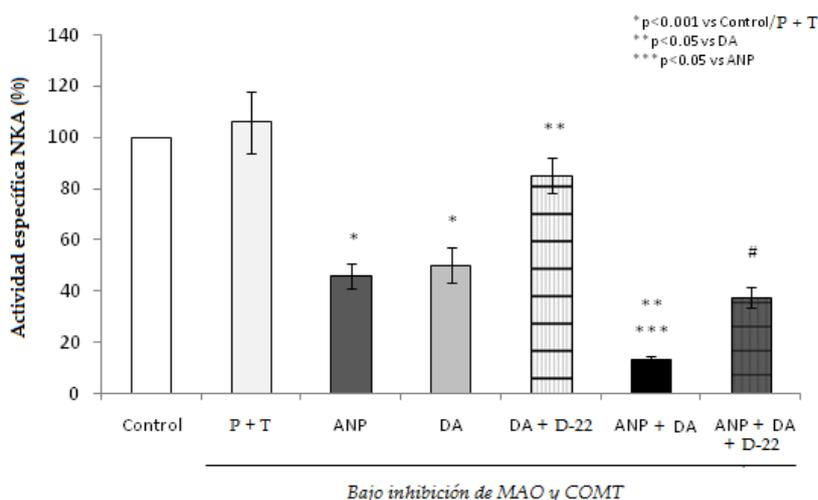
Tabla 2. Parámetros hemodinámicos de control y grupos experimentales.

	PAM (mmHg)			FC (latidos/min)		
	Basal	90 min	120 min	Basal	90 min	120 min
Control	82±4	84±5	82±4	390±10	384±11	374±9
P+T	83±5	85±3	83±4	400±8	386±12	374±13
ANP	78±5	73±3	69±4	388±12	368±8	366±11
DA	79±4	74±4	70±3	382±13	374±13	380±10
DA + D-22	78±5	72±4	68±4	378±13	370±10	368±9
ANP + DA	80±4	63±3*	61±3*	382±9	402±11**	420±12**/€
ANP + DA + D-22	79±4	70±4	66±6	370±8	366±12	380±10

PAM: presión arterial media; FC: frecuencia cardiaca. *p<0.05 vs control o grupo P+T; **p<0.05 vs ANP; €p<0.05 vs control, P+T, DA+D-22.

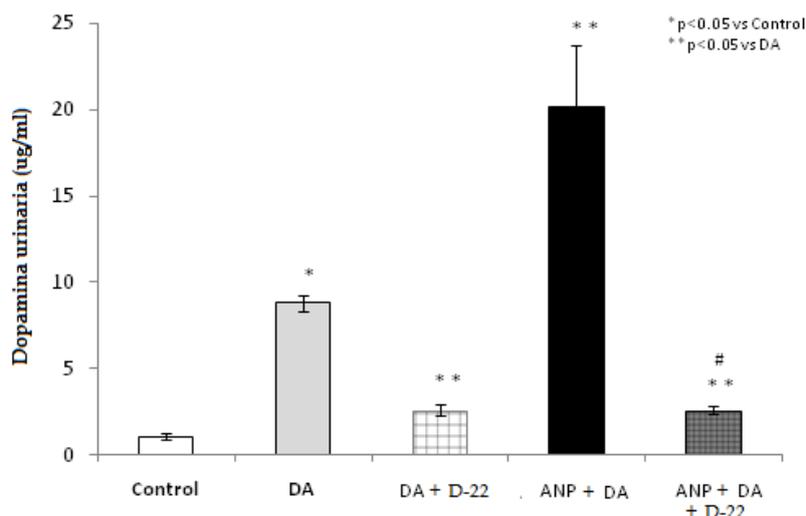
Luego de finalizar los experimentos que demostraron la participación de los OCTs como transportadores necesarios para que la DA ejerza sus efectos tubulares, se procedió a estudiar los efectos que ejerce el ANP sobre el transporte tubular de DA exógena y su impacto sobre la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa (figura 1). Tomando como referencia al grupo control con un valor de 100% de actividad específica de la bomba enzimática, la infusión de ANP o DA redujo significativamente la actividad específica de la Na⁺, K⁺-ATPasa en aproximadamente un 56% y 53% a los 90 y 120 minutos, respectivamente. El bloqueo específico de los OCTs, mediante el D-22, revirtió el efecto inhibitorio de la DA sobre la actividad de la bomba ATPásica. La co-infusión de ANP más DA (grupo ANP+DA) incrementó la inhibición de la bomba en mayor medida que cada tratamiento por separado, llegando a un valor aproximado de un 78% y superando significativamente la inhibición provocada por DA solamente. A su vez, la infusión conjunta de ANP más DA y D-22 (grupo ANP+DA+D-22) revirtió parcialmente la sobre-inhibición producida por la administración conjunta de DA y ANP, alcanzando valores similares a aquellos observados para cada tratamiento por separado.

Figura 1: Inhibición *In vivo* de los OCTs con D-22 y sus efectos en la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa en presencia de DA y ANP + DA.



Asimismo, se procedió a determinar la excreción de DA urinaria en muestras obtenidas entre los 90 y 120 minutos de infusión continua (figura 2). Teniendo en cuenta que la síntesis endógena de DA estaba inhibida por la administración de benserazida, debe considerarse que prácticamente la totalidad de la DA urinaria procedió de la administración exógena de DA. Como era de esperar, la infusión exógena de DA aumentó significativamente la excreción urinaria de la amina, en comparación con el grupo control. Este incremento fue inhibido por la administración del inhibidor específico de los OCTs, D-22. La co-infusión de ANP y DA incrementó aún más la excreción urinaria y en mayor medida con respecto al grupo con DA solamente. Este aumento también fue inhibido por D-22, alcanzándose niveles de DA urinaria similares a aquéllos del grupo control (figura 2).

Figura 2: Excreción urinaria de DA en presencia de DA y ANP+DA con y sin inhibición específica de los OCTs mediante la administración de D-22.



Teniendo en cuenta los resultados parciales obtenidos, estudiamos la posibilidad de que el ANP pudiera estimular la expresión proteica de los OCTs y/o del receptor D₁ de DA, y en consecuencia, que el péptido pudiera incrementar la excreción urinaria de DA y estimular sus efectos natriuréticos. Para evaluar esta posibilidad, se llevó a cabo mediante western blot, el análisis de la expresión proteica de los OCTs 1, 2 y 3 y el receptor de D₁ a partir de homogenatos de corteza renal. Las figuras 3A, 3B y 3C muestran que tanto la inhibición de las enzimas MAO y COMT, así como la infusión de ANP no alteran la expresión proteica de OCT-1, OCT-2 y OCT-3 renales comparadas al grupo control. Si bien no se encontró una diferencia significativa con el tratamiento con ANP, se pudo observar una tendencia al incremento de la expresión proteica de OCT-2 y OCT-3 en el grupo tratado con ANP *versus* el grupo control.

Figura 3A: Expresión proteica del OCT-1 mediante western blot utilizando GAPDH como control de carga. El histograma muestra los resultados expresados como la relación entre la densidad óptica (DO) de OCT-1 sobre DO de GAPDH en unidades arbitrarias.

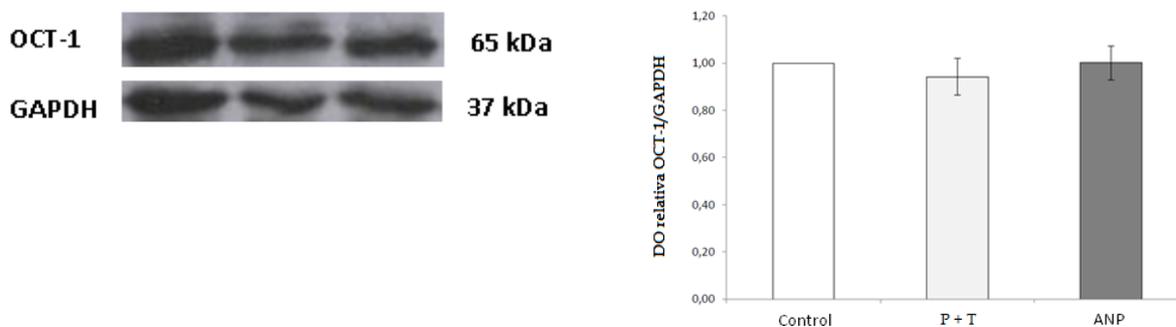


Figura 3B: Expresión proteica del OCT-2 mediante western blot utilizando GAPDH como control de carga. El histograma muestra los resultados expresados como la relación entre DO de OCT-2 sobre DO de GAPDH en unidades arbitrarias.

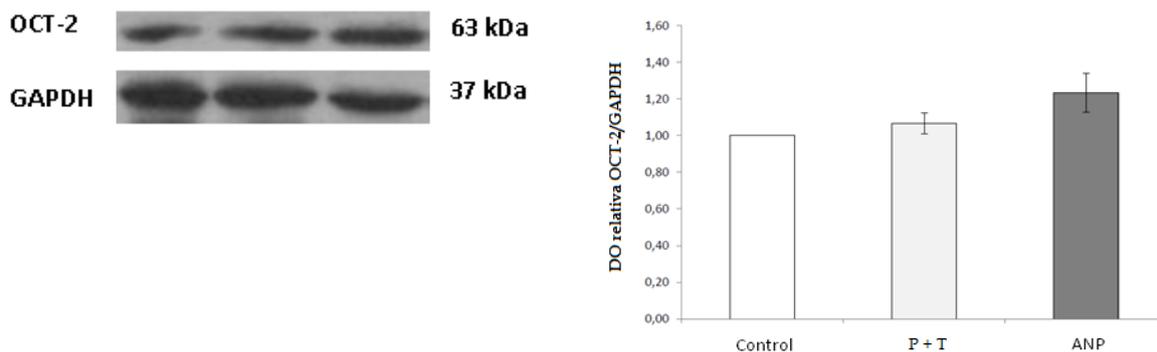
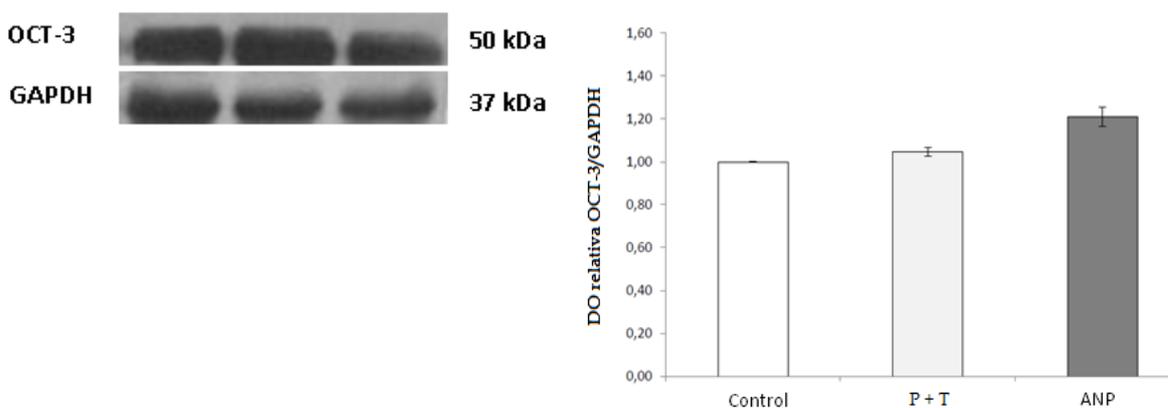
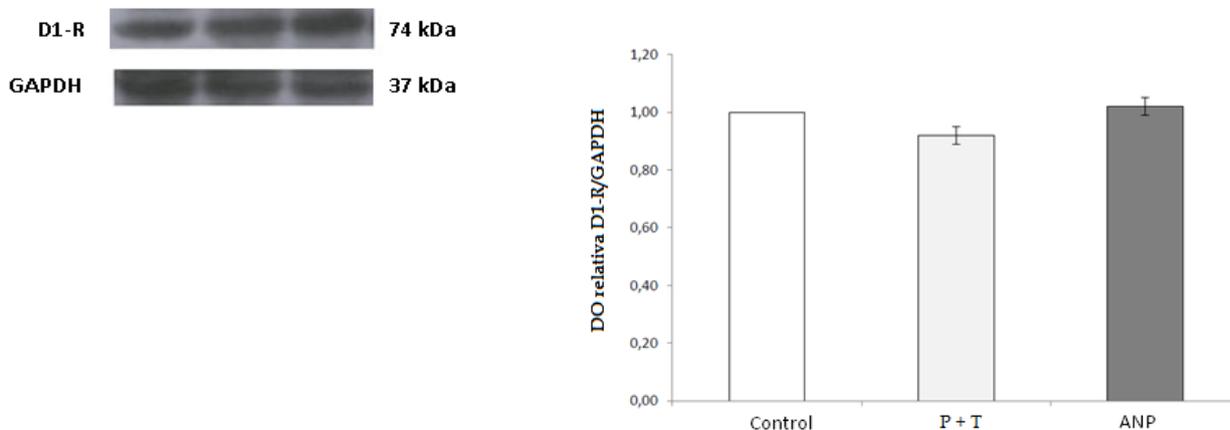


Figura 3C: Expresión proteica del OCT-3 mediante western blot utilizando GAPDH como control de carga. El histograma muestra los resultados expresados como la relación entre DO de OCT-3 sobre DO de GAPDH en unidades arbitrarias.



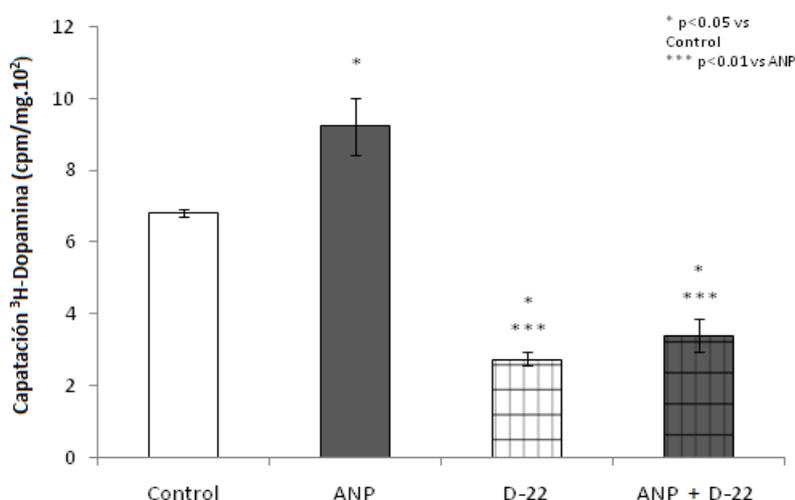
En la figura 4 puede observarse que tanto la inhibición de las enzimas MAO y COMT, así como la infusión de ANP no alteran la expresión proteica del receptor D₁ comparado al grupo control.

Figura 4: Expresión proteica del receptor D₁ mediante western blot utilizando GAPDH como control de carga. El histograma muestra los resultados expresados como la relación entre DO del receptor D₁ sobre DO de GAPDH en unidades arbitrarias.



Por último, para evaluar si la excreción urinaria de DA provocada por la infusión de ANP es causada por estimulación en el transporte tubular de DA mediante los OCTs, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* en cortes de corteza renal usando ^3H -DA como trazador. La figura 5 muestra que 100 nM ANP aumentó significativamente la captación de ^3H -DA (aproximadamente en un 35%) en cortes de corteza renal comparado al grupo control. En presencia del inhibidor específico de los OCTs, D-22 (1 μM), la captación renal de DA se vio significativamente reducida en aproximadamente en un 60%. Puede observarse que en presencia de D-22, el efecto del ANP fue completamente abolido.

Figura 5: Captación de ^3H -DA en cortes de corteza renal por acción del ANP en presencia y ausencia de D-22.



PARTE 2) En base a los objetivos y la metodología propuesta, se evaluó en un primer momento los efectos de la dieta rica en fructosa sobre parámetros metabólicos como insulinemia, glucemia, colesterolemia y trigliceridemia (tabla 3), de funcionalidad renal como diuresis, excreción fraccional de sodio (FENa), natriuresis (uNa.V), VFG (estimado por el CICr) (tabla 3 y figura 6) y sobre parámetros hemodinámicos como la PAM (figura 7).

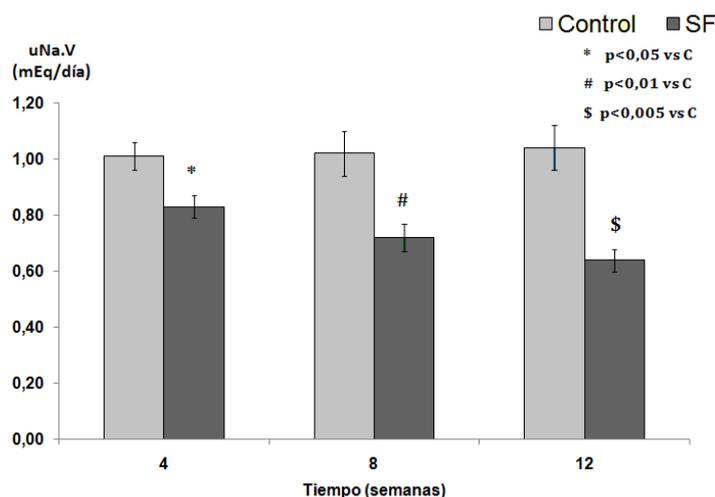
En cuanto al perfil metabólico, el tratamiento con fructosa incrementó significativamente los niveles de insulina plasmáticos desde la semana 4 de tratamiento con respecto al grupo control mientras que los valores de glucemia se incrementaron sólo en la semana 8 de tratamiento. Los niveles de triglicéridos se incrementaron desde la semana 8 de tratamiento, sin cambios significativos en los valores de colesterol total (tabla 3). Con respecto a los parámetros de función renal, los valores de diuresis se incrementaron significativamente desde la semana 4 de tratamiento en las ratas tratadas con fructosa *versus* su respectivo control (tabla 3). Los valores de excreción urinaria y fraccional de sodio se vieron reducidos significativamente en las ratas tratadas con fructosa durante todo el tratamiento (tabla 3 y figura 6). Por otro lado, el VFG no sufrió modificación alguna a lo largo de todo el tratamiento en las ratas tratadas con fructosa con respecto a su correspondiente control (tabla 3).

Tabla 3: Parámetros funcionales y metabólicos en ratas controles y con sobrecarga de fructosa durante las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.

	4 semanas		8 semanas		12 semanas	
	C	SF	C	SF	C	SF
Insulina (ng/mL)	2,20±0,22	3,80±0,56 *	3,55±0,43	5,76±0,84 *	3,44 ± 0,21	5,88 ± 0,91 *
Glucemia (mg/dL)	127±6	145±7	144±12	175±11 *	122±4	147±19
Colesterol (mg/dL)	50±7	61±10	43±7	37±7	63±11	83±14
Triglicéridos (mg/dL)	61±9	49±16	44±8	116±10 &	68±30	153±12 #
CICr (mL/min)	1,35±0,17	1,49±0,13	1,65±0,25	1,69±0,12	1,59±0,15	1,59±0,12
FENa (%)	0,41±0,03	0,28±0,03 *	0,44±0,03	0,31±0,01 *	0,35±0,04	0,18±0,02 #
Diuresis (mL/día)	11,8±1,4	24,5±2,1 *	10,0±1,0	23,5±1,9 *	11,6±1,6	28,4±2,1 *

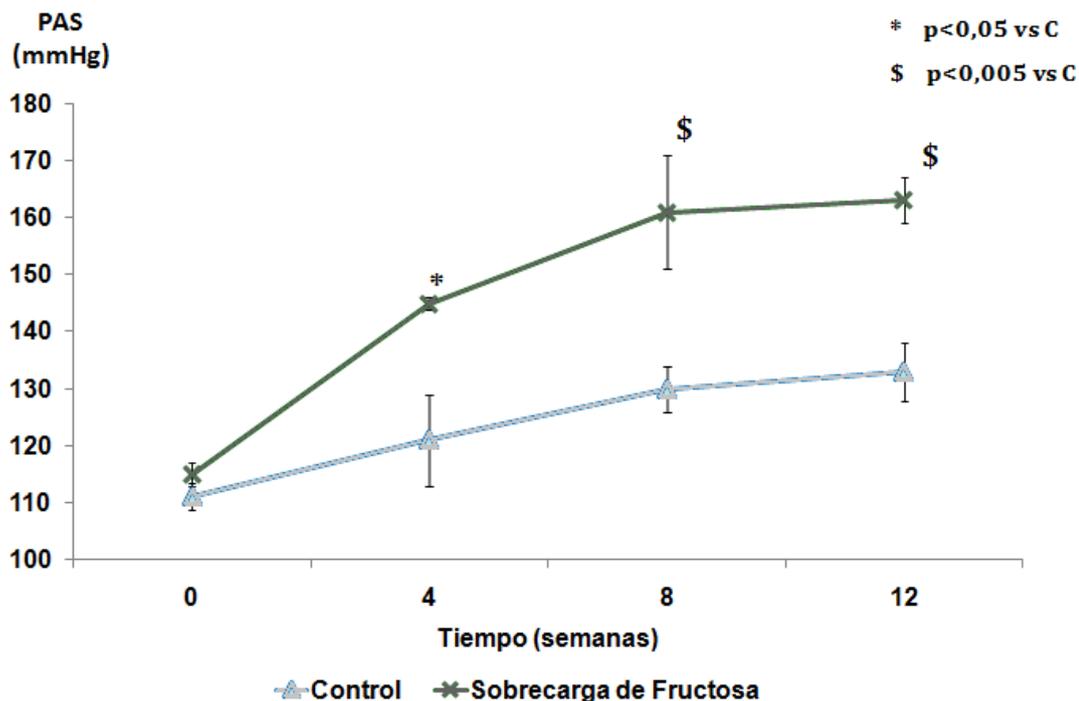
C: grupo control; SF: grupo fructosa 10%; CICr: clearance de creatinina; FENa: excreción fraccional de sodio. *p<0,05; #p<0,01; &p<0,001 *versus* control respectivo.

Figura 6: Valores de excreción urinaria de sodio (uNa.V) en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



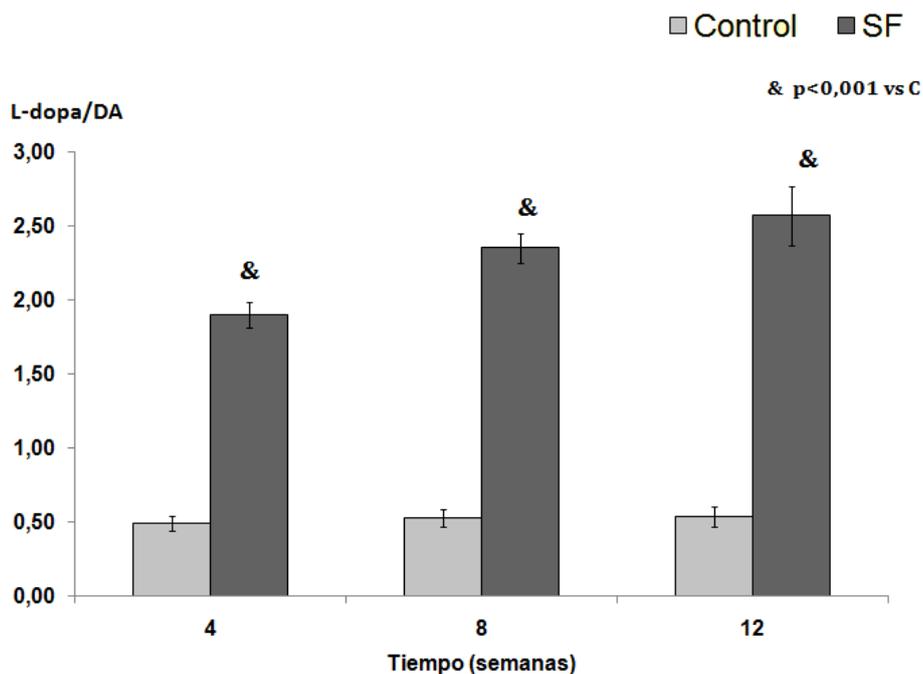
En cuanto a los parámetros hemodinámicos, se observó que los valores de PAS aumentaron significativamente desde la semana 4 de tratamiento en las ratas tratadas con fructosa *versus* su respectivo grupo control (figura 7).

Figura 7: Valores de presión arterial sistólica en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Para evaluar la existencia de alteraciones en el sistema dopaminérgico renal que permitieran explicar los cambios metabólicos, hemodinámicos y de funcionalidad renal observados en las ratas con sobrecarga de fructosa, se determinó el índice L-dopa/DA urinario (figura 8). Los resultados mostraron un incremento significativo del índice en las ratas tratadas con fructosa desde la semana 4 de tratamiento, *versus* sus respectivos controles.

Figura 8: Valores del índice L-dopa/DA urinario en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Para determinar si existe una relación entre los cambios observados en los niveles de PAS y la natriuresis en las ratas con sobrecarga de fructosa, y las alteraciones de los valores de los índices de L-dopa/DA urinario en los mismos animales, se procedió a evaluar la existencia de una correlación significativa de estos parámetros. Se comprobó que efectivamente los valores de PAS y el índice L-dopa/DA urinario se correlacionan positivamente durante el período de estudio de 12 semanas (figura 9). Por otro lado, se observó la existencia de una correlación negativa entre los niveles de natriuresis y el índice L-dopa/DA urinario (figura 10).

Figura 9: Gráfico de correlación entre los valores de PAS y el índice L-Dopa/DA urinario

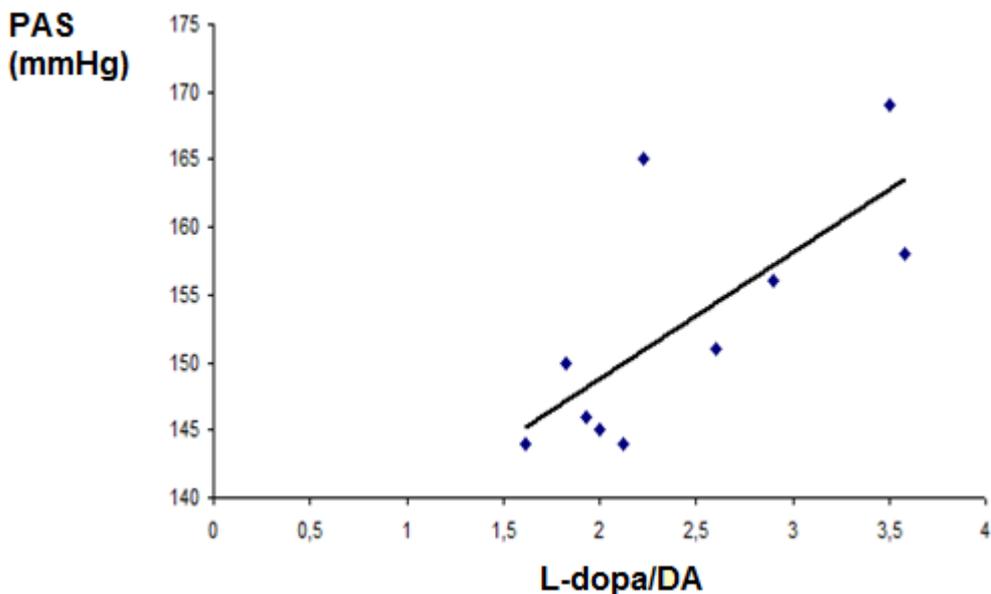
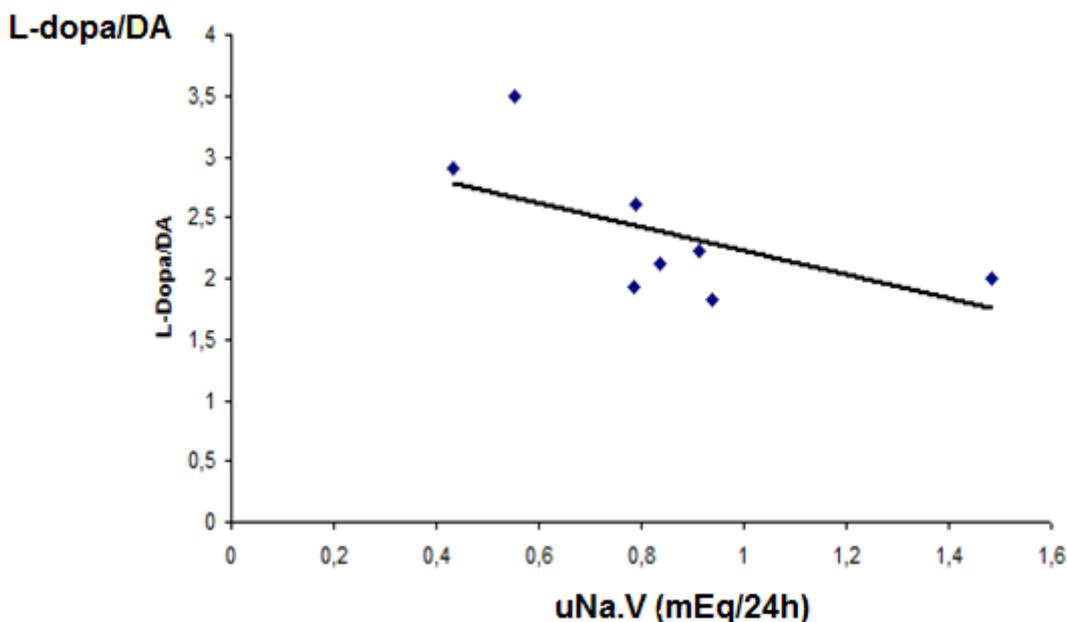
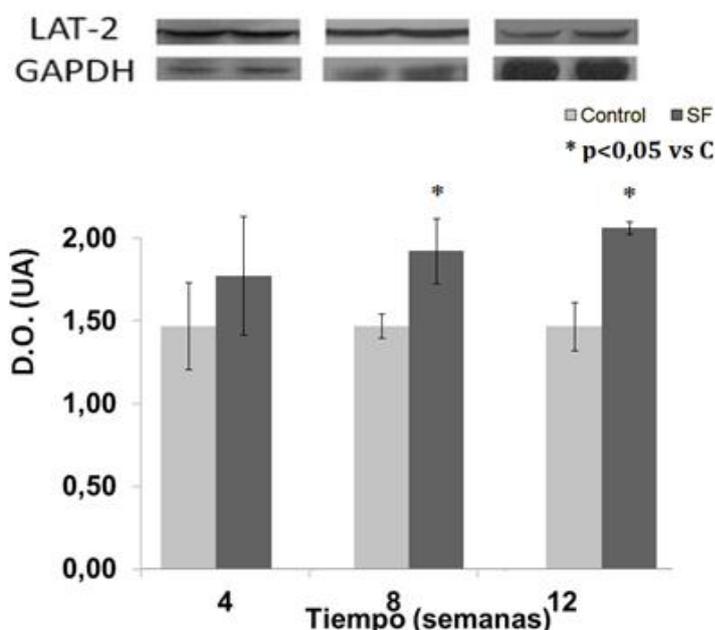


Figura 10: Gráfico de correlación entre los valores de uNa.V y el índice L-Dopa/DA urinario



Para continuar con el estudio sobre la alteración del sistema dopaminérgico renal en animales hipertensos con sobrecarga de fructosa, se procedió a evaluar la expresión del transportador tubular de L-dopa, LAT-2 en corteza renal, mediante la técnica de western blot (figura 11). Se observó un incremento significativo de la expresión de LAT-2 en las semanas 8 y 12 de tratamiento con fructosa con respecto al grupo control.

Figura 11: Valores de expresión proteica de LAT-2 en corteza renal para ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Por otro lado, se observó una disminución significativa de la concentración de ANP plasmático en las ratas con sobrecarga de fructosa en las semanas 8 y 12 de tratamiento (figura 12). Esta reducción en la concentración fue acompañada por una disminución en la expresión proteica del NPR-A en tejido renal, en las ratas con sobrecarga de fructosa en las mismas semanas de tratamiento (semana 8 y semana 12). (Figura 13)

Figura 12: Niveles de concentración de ANP plasmático para ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.

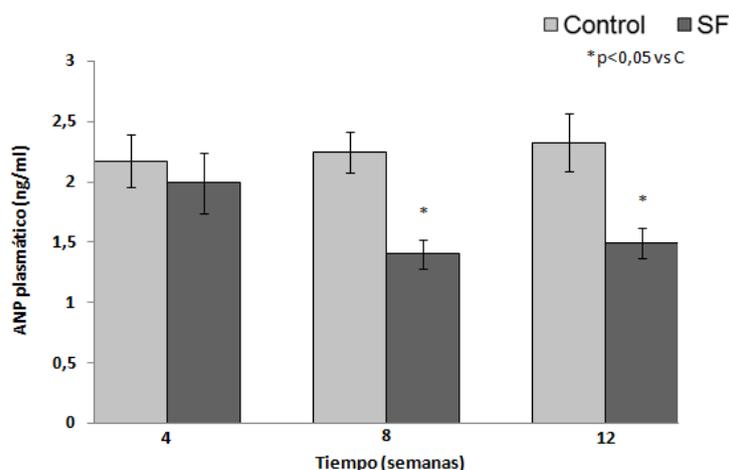
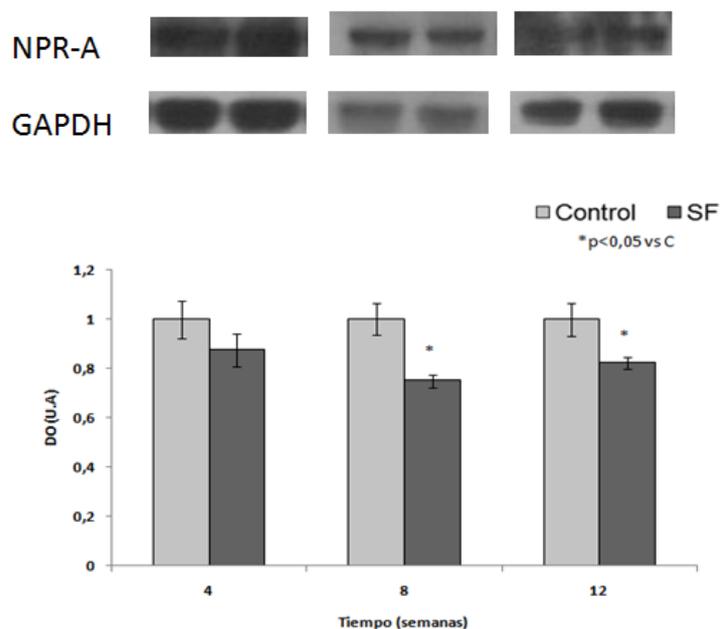


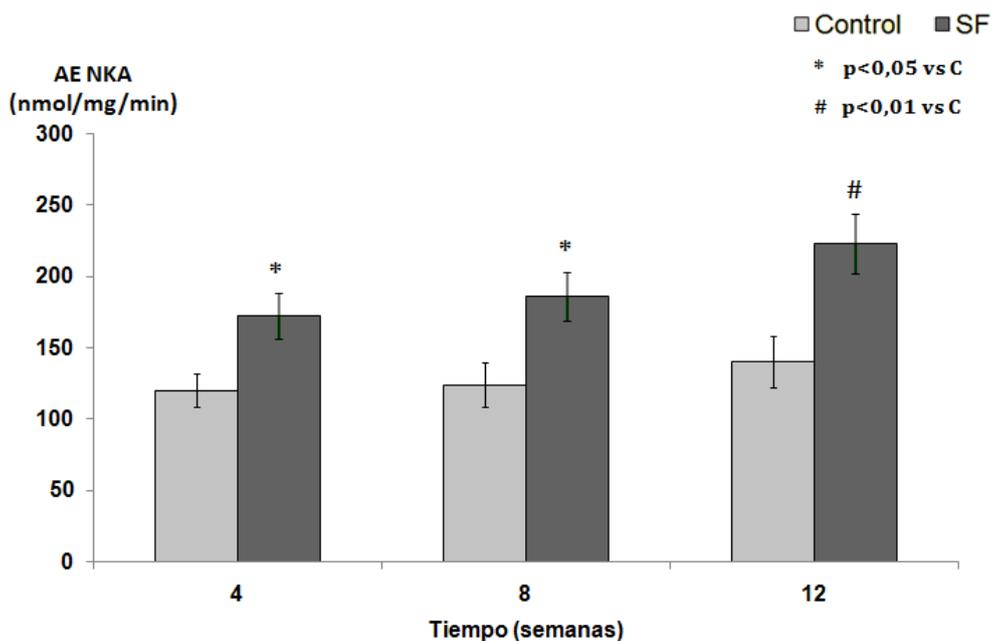
Figura 13: Valores de expresión proteica de NPR-A en tejido renal para ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Posteriormente, se procedió a investigar si las alteraciones en el sistema dopaminérgico renal y en el sistema del ANP conducen como un mecanismo final común a inducir cambios en el perfil de expresión y actividad de la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa renal. La actividad específica de la enzima fue determinada mediante la técnica de Fiske-Subarow, mientras que la expresión de la Na^+ , K^+ -ATPasa total y de la subunidad fosforilada en Ser 23 fueron determinadas mediante western blot e inmunofluorescencia.

Los niveles de actividad específica de Na^+ , K^+ -ATPasa en corteza renal se incrementaron significativamente a partir de la cuarta semana del tratamiento con fructosa, con respecto al grupo control (figura 14).

Figura 14: Valores de actividad específica de la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa en corteza renal en ratas controles y con sobrecarga de fructosa en las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Los valores de expresión de Na⁺, K⁺-ATPasa total y fosforilada en Ser 23 se incrementaron significativamente en médula renal desde la semana 4 de tratamiento con fructosa (figuras 15 y 16).

Figura 15: Valores de expresión proteica de NKA total en médula renal en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.

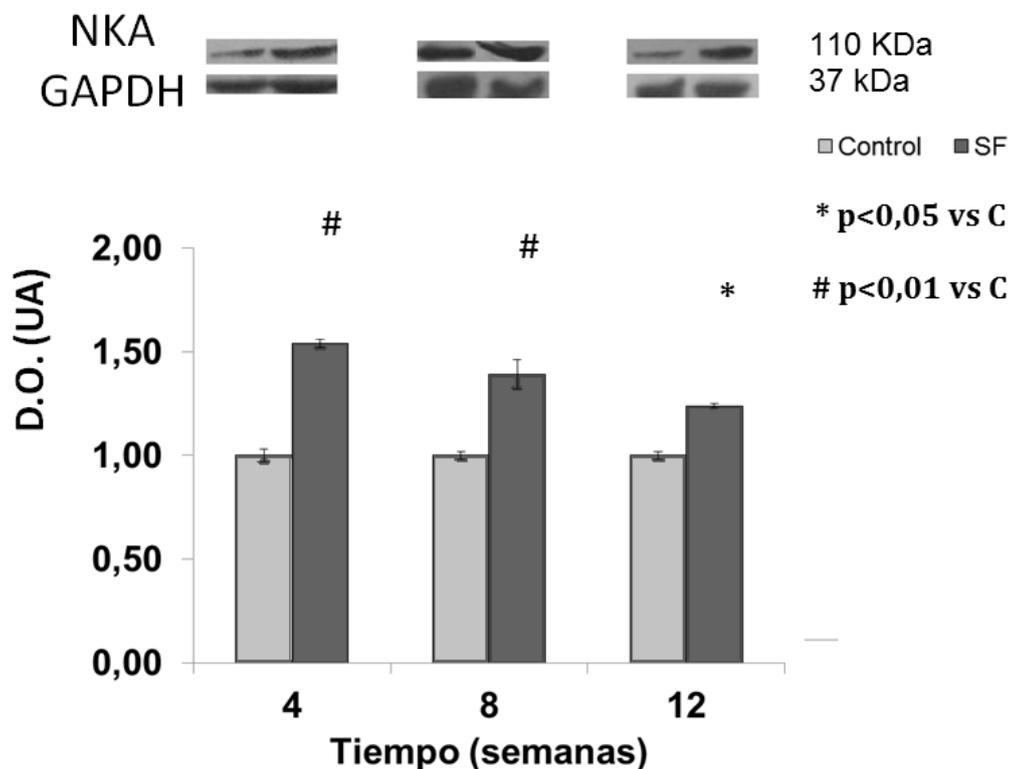
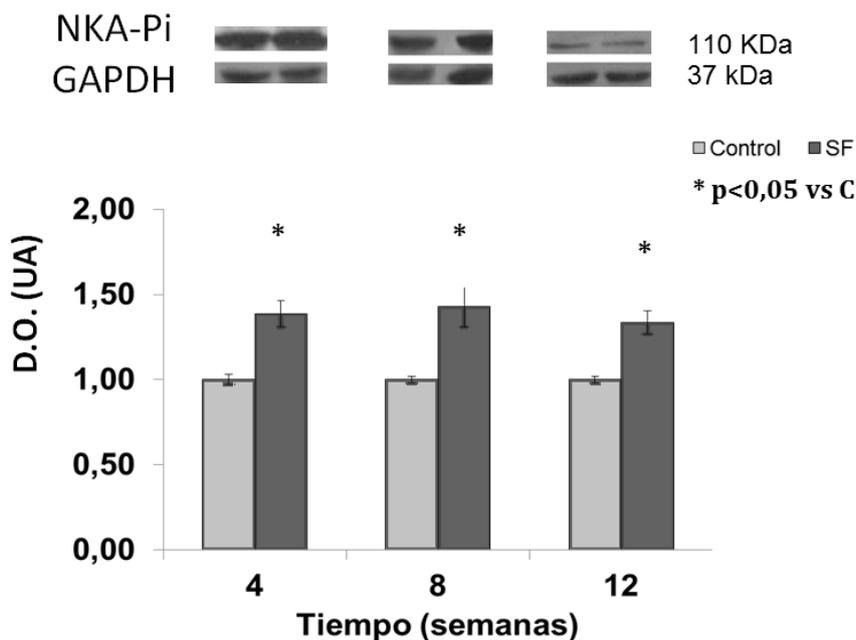
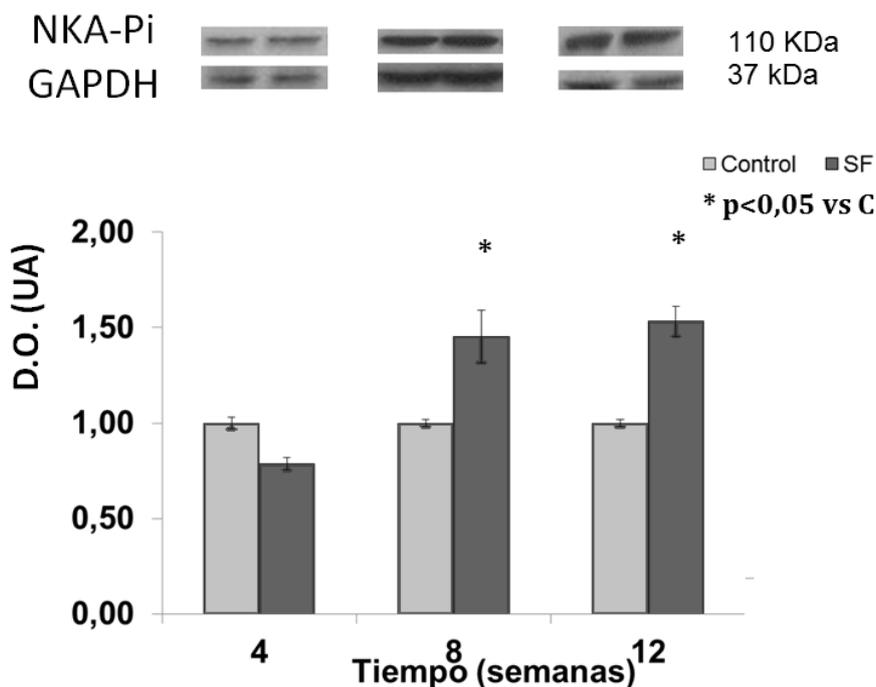


Figura 16: Valores de expresión proteica de NKA fosforilada en residuo serina 23 en médula renal en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Por otro lado, los valores de expresión de Na⁺, K⁺-ATPasafosforilada en Ser 23 se incrementaron significativamente en corteza renal en las semanas 8 y 12 de tratamiento con fructosa (figura 17).

Figura 17: Valores de expresión proteica de NKA fosforilada en residuo serina 23 en corteza renal en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento.



Por inmunofluorescencia, se observó un aumento de la expresión de Na⁺, K⁺-ATPasa en las ratas tratadas con fructosa a partir de la semana 4 de tratamiento en corteza renal, mientras que este incremento se observó en las semanas 8 y 12 en médula renal (figuras 18 y 19).

Figura 18: Inmunofluorescencia de Na⁺, K⁺-ATPasa en corteza renal en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento

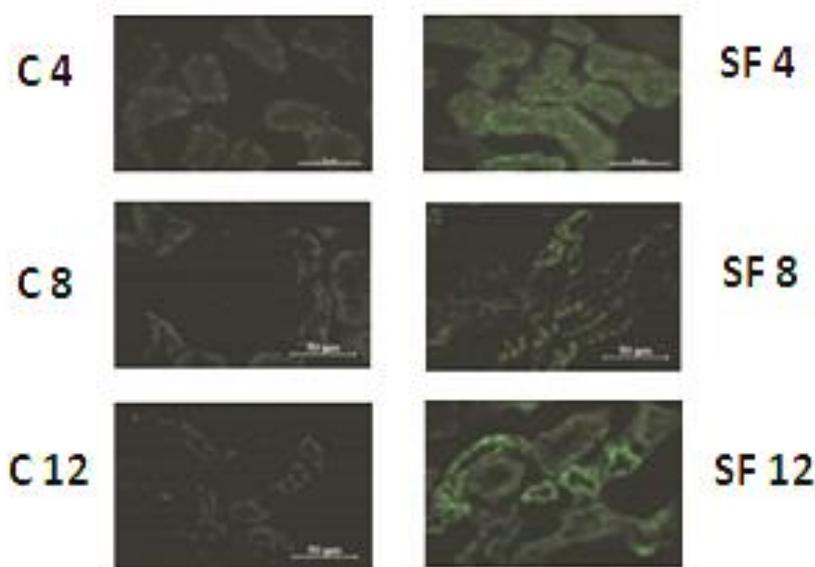
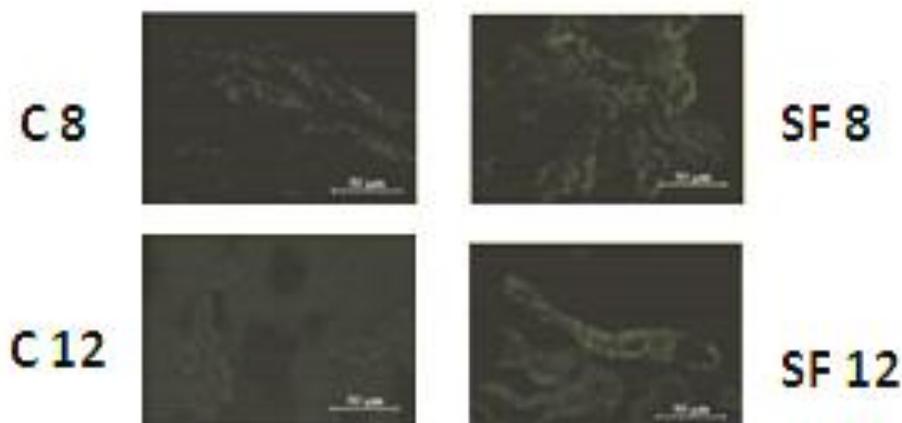


Figura 19: Inmunofluorescencia de Na⁺, K⁺-ATPasa en médula renal en ratas controles y con sobrecarga de fructosa a las semanas 4, 8 y 12 de tratamiento



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestro grupo de trabajo expuso las primeras evidencias de la existencia de una interrelación entre los sistemas de los péptidos vasculares y el sistema dopaminérgico renal, demostrando a través de 9 publicaciones, que el ANP, el urodilatin y la ANG II regulan *in vitro* el metabolismo de la DA renal, modulando su captación y liberación tubular, su síntesis y catabolismo renal, y como consecuencia de este proceso, afectan también a la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal [17, 58-63, 71, 72].

Comprobamos que tanto el ANP como el urodilatin aumentan la captación de DA por los túbulos renales en forma concentración dependiente, por estimulación de los receptores de los péptidos natriuréticos tipo A (NPR-A), caracterizando el tipo de captación como extraneuronal (hidrocortisona sensible) y temperatura dependiente [60]. Asimismo el ANP y el urodilatin disminuyeron el catabolismo de la DA renal y su velocidad de recambio, efectos que en conjunto aumentan el contenido endógeno de DA renal, produciendo una mayor inhibición de la actividad específica de la Na⁺,K⁺ ATPasa [62, 71].

A nivel clínico, la DA es considerada una droga esencial en las unidades de terapia intensiva y es utilizada hoy en día como agente vasopresor especialmente en pacientes adultos con hipotensión refractaria a reanimación mediante fluidos [92]. Debido a su interacción con diferentes receptores de catecolaminas, el perfil farmacológico de la DA es dosis-dependiente [93]. A bajas dosis (0.3-5 µg/kg por minuto), la DA estimula a los receptores D₁ y D₂ induciendo natriuresis, diuresis y aumento del flujo sanguíneo renal por vasodilatación. A dosis mayores, cuando prevalece la estimulación adrenérgica, la DA incrementa el flujo sanguíneo renal mediante aumento del gasto cardíaco [92-94]. En adultos jóvenes sanos, la administración de DA en bajas dosis, incrementó el flujo sanguíneo renal, la natriuresis y diuresis [95, 96]. Por estas razones, la DA en bajas dosis representa una opción terapéutica para limitar o prevenir la falla renal en pacientes críticamente enfermos por aumento del flujo sanguíneo renal [97]. Sin embargo, a pesar de esta evidencia, un alto número de estudios clínicos indican que la administración de DA en bajas dosis podría no ejercer ningún efecto protector para prevenir el advenimiento o mejorar el pronóstico de una falla renal aguda, y que contrariamente, su uso podría incrementar el riesgo de padecerla [92, 93, 98-101]. Esta falta de acción de la DA exógena podría estar relacionada, entre otras causas, a una alteración en el transporte tubular de DA desde el torrente sanguíneo hacia la luz tubular, donde ésta ejerce sus acciones al actuar sobre los receptores D₁ y D₂. Esta afectación podría estar ligada a cambios en la activación y/o expresión de los OCTs. En la mayor parte de los estudios clínicos, el reclutamiento de pacientes incluye a aquellos que padecen enfermedad renal crónica o riesgo de desarrollarla, la cual es una condición clínica en donde el estado funcional de los OCTs se desconoce [102-104]. De la misma manera, en la mayor parte de los estudios clínicos, la excreción urinaria de

DA no fue determinada, siendo éste un dato que podría ser utilizado como marcador directo de la cantidad de DA infundida que alcanza la luz tubular y por lo tanto, se encuentra disponible para estimular a los RD1. Otra cuestión a considerar es que el 95% de la DA localizada en el torrente sanguíneo se encuentra sulfoconjugada, y por lo tanto, no puede cruzar la barrera de filtrado glomerular y de esta manera alcanzar la luz tubular[105].

Hasta el momento se desconocen si los efectos diuréticos y natriuréticos de la DA tienen implicancia y repercuten sobre la función renal en un modelo animal *in vivo* con todos sus sistemas de regulación funcionantes, y si realmente los resultados obtenidos *in vitro* se traducen en cambios efectivos en la diuresis y natriuresis final. En base a los resultados obtenidos como antecedentes nos planteamos entonces, el objetivo de demostrar, *in vivo*, si los efectos del ANP sobre la función renal, que son dependientes de la captación tubular de DA, se producen a través de la regulación de la actividad y función de transportadores de membrana del tipo extraneuronal de aminas, postulando como candidatos a los OCTs, afectando de esta manera el manejo renal de la DA.

Asimismo se desconocen en la actualidad los mecanismos que controlan el ingreso, almacenamiento y liberación de la DA por parte de las células tubulares renales. Los OCTs parecerían ser al menos uno de los responsables en este aspecto, participando en el manejo y por ende en la disponibilidad de DA en la luz tubular, sitio donde se ubica la mayor densidad de receptores dopaminérgicos, y a consecuencia final de ello sobre la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa [27]. Los OCTs se localizan principalmente a nivel de la membrana basolateral y mediarían el ingreso, desde la circulación sistémica hacia el interior de la célula tubular, de cationes orgánicos, entre ellos la DA [9]. No obstante, se ha descrito que los OCTs poseen también la propiedad de mediar la salida de determinados cationes, convirtiéndolos en transportadores con características bidireccionales [13]. Mientras que el OCT-1 y el OCT-2 muestran una alta especificidad de sustrato por la DA, el OCT-3 tiene una pobre especificidad hacia la amina [9]. Todos los OCTs son sensibles a la inhibición por isocianinas y corticosteroides [9, 13]. Dado que la DA renal tiene un papel importante en la regulación del balance hidrosalino, los OCTs podrían estar involucrados en este proceso fisiológico al incidir sobre el transporte tubular de la DA renal y de esta manera, repercutir en su biodisponibilidad a nivel de la luz tubular. Por lo tanto aquellos factores que son capaces de modificar el sistema dopaminérgico renal, como el ANP, podrían ejercer sus acciones por medio de la regulación de la actividad o expresión de los OCTs.

De acuerdo con los antecedentes de nuestros trabajos anteriores, nos planteamos entonces las siguientes hipótesis:

1- Parte de los efectos natriuréticos y diuréticos del ANP se producirían de manera indirecta estimulando la captación renal de DA al regular en más la funcionalidad de los OCTs.

2- A través de sus efectos sobre el sistema dopaminérgico renal, el ANP modificaría indirectamente la función de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal. El ANP incrementa la disponibilidad tubular de DA, produciendo una mayor activación de receptores D_1 y una mayor inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, disminuyendo de esta manera, la reabsorción de sodio y agua.

Se demostraría así, una vía efectora común final mediante la cual el ANP regula la captación tubular de DA, justificando así los efectos fisiológicos renales indirectos sobre la regulación de la reabsorción de sodio y agua y su repercusión en el balance hidrosalino. De esta manera, además de sus efectos directos natriuréticos y diuréticos propios, el ANP y la DA se potenciarían para disminuir la reabsorción de agua y Na^+ , contribuyendo de esta manera a incrementar la excreción de sodio y agua.

En el marco de las hipótesis y objetivos planteados, el primer planteo fue evaluar la participación de los OCTs como los transportadores tubulares necesarios para que la DA administrada exógenamente pudiese ejercer sus efectos natriuréticos y diuréticos. De esta manera se comprobó que a una dosis de $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, la DA administrada exógenamente logró un aumento significativo, con respecto al grupo control, del volumen urinario, con aumento de la excreción fraccional y urinaria de sodio a los 90 y 120 minutos. Estos cambios no se acompañaron de modificaciones significativas en el ClCr y en la PAM (tabla 1), lo que indica que los efectos observados de la DA a las dosis indicadas son puramente tubulares, cumpliendo así una premisa necesaria para el diseño y validez de los protocolos experimentales.

Posteriormente se evaluó la participación de los OCTs como transportadores específicos y necesarios para las acciones tubulares de la DA investigando si la administración de D-22 como bloqueante selectivo de los OCTs era capaz de inhibir los efectos de la DA. La mayor cantidad de DA urinaria proviene de la síntesis endógena a partir de la filtración de L-dopa por el glomérulo y decarboxilación posterior en el túbulo proximal [105]. La DA que proviene del plasma, como la que se infunde por vía intravenosa, se halla mayoritariamente en forma de sulfoconjugados, por lo que no atraviesa la barrera glomerular, debiendo ser captada basolateralmente por los OCTs para alcanzar la luz tubular, sitio donde se secreta principalmente la DA para ejercer sus acciones tubulares [9, 105]. Dado que los experimentos realizados para evaluar la participación de los OCTs en las acciones de la DA exógena se llevaron a cabo en condiciones de síntesis endógena inhibida (con benserazida) así como de inhibición de su catabolismo enzimático (con pargilina y tolcapone), los efectos sobre los parámetros urinarios observados con la infusión de DA depende exclusivamente de la presencia y actividad de transportadores responsables de su captación plasmática. Como se desprende del análisis de los valores presentados en la tabla 1, el incremento producido por la DA sobre la diuresis, la natriuresis y la excreción fraccional de sodio, fue en los tres casos inhibido por la presencia del bloqueante de los OCTs, D-22. Por el contrario, ni la DA ni el co-tratamiento con D-22 afectó el filtrado glomerular, la PAM o FC, de acuerdo a los valores presentados en la tabla 2.

Estos resultados permiten establecer la siguiente conclusión: los efectos renales de la DA exógena sobre la excreción de agua y sodio dependen de la actividad de los OCTs, pues la inhibición farmacológica de estos transportadores, bloquea los efectos de la DA, al disminuir su captación tubular.

Comprobado entonces que los transportadores de cationes orgánicos están involucrados en los efectos renales de la DA circulante, pasamos a investigar si los efectos estimulantes del ANP sobre la captación renal tubular de DA dependen de un efecto regulatorio del ANP sobre la actividad de los OCTs.

Los resultados obtenidos demuestran que en condiciones basales, a dosis de $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, el ANP administrado exógenamente incrementó la diuresis, la natriuresis, la excreción fraccional de sodio, sin alterar el ClCr, ni la PAM y FC (tablas 1 y 2). Por otro lado, la administración de ANP más DA (grupo ANP+DA) generó una respuesta mayor en la diuresis y excreción urinaria y fraccional de sodio, en comparación con el valor basal o con los grupos con infusión de ANP o DA solamente. La administración de D-22 también disminuyó significativamente los efectos natriuréticos y diuréticos de la co-infusión de ANP y DA (grupo ANP+DA+D-22) a valores semejantes a los registrados con el grupo ANP y grupo DA en forma separadas.

Estos resultados permiten establecer una segunda conclusión: la integridad en la actividad de los OCTs es necesaria no sólo para que la DA ejerza sus efectos natriuréticos y diuréticos, sino también para que el ANP alcance su máxima acción natriurética y diurética.

El filtrado glomerular (estimado por ClCr) aumentó sólo en el grupo con ANP más DA (grupo ANP+DA), respecto a sus valores basales y comparados con el grupo control y P+T, mientras que no se modificó en el resto de los grupos experimentales (tabla 1). La PAM y FC no se vieron alterados en ningún grupo experimental a lo largo de los 120 minutos de infusión, con excepción del grupo con ANP más DA (ANP+DA) en el cual los valores de PAM disminuyeron respecto a sus valores basales y a los valores obtenidos en los grupos control y P+T (tabla 2). Este efecto depresor observado en forma conjunta con ANP y DA, y a las dosis empleadas en nuestros experimentos, sería consecuencia de la suma de sus efectos fisiológicos sobre la presión arterial que se observan luego de su administración por infusión endovenosa [106, 107].

Una vez determinada la participación de los OCTs en los efectos indirectos renales del ANP, evaluamos la posibilidad de que a consecuencia de esta interacción, se produzcan cambios en la actividad específica de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, que pudieran explicar o justificar los resultados obtenidos en los parámetros de función renal. De esta manera, y en concordancia con los hallazgos observados en la diuresis y natriuresis, los resultados de la figura 1 muestran que tanto la infusión de DA o como la de ANP, efectuadas por separado, disminuyeron la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal. Más aún, la co-infusión de ANP y DA incrementó en mayor medida la inhibición de la actividad de la bomba, mostrando una respuesta significativamente aumentada con respecto a la inhibición ejercida por ANP o DA en forma separada. Por otro lado, la inhibición de los OCTs mediante D-22, previno la inhibición de la bomba Na^+ , K^+ -ATPasa causada por la infusión de DA

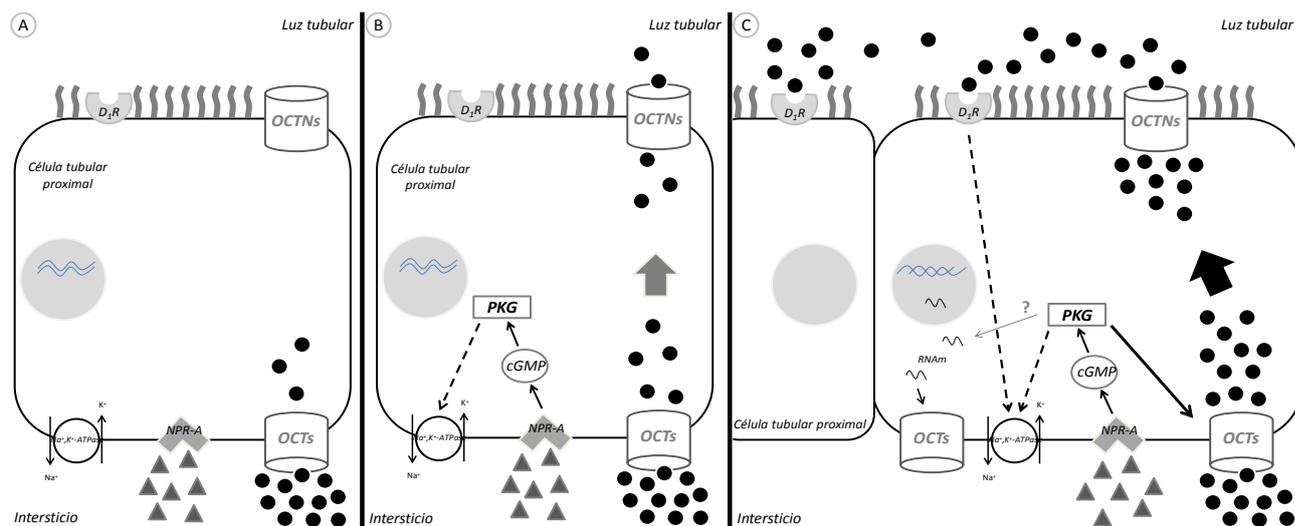
solamente y también la sobreinhibición causada por la co-infusión de DA más ANP. Estos resultados permiten concluir que el ANP estimula la captación de DA mediante la estimulación de la síntesis y/o actividad específica de los OCTs.

Para verificar y descartar que los efectos conjuntos del ANP y la DA sobre la excreción renal de sodio y agua y sobre la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal no sean el resultado de una simple suma de los efectos independientes de cada uno de los dos sistemas natriuréticos por separado, sino una consecuencia del efecto estimulante del ANP sobre el transporte tubular de DA, mediante los OCTs, se procedió a determinar si la excreción urinaria de DA puede ser alterada por la administración de ANP o inhibiendo a los OCTs con D-22. Para comprobar este objetivo, se procedió a determinar la excreción urinaria de DA urinaria durante la última parte del período de infusión, comprendida entre los 90 y 120 minutos (figura 2). Teniendo en cuenta que la síntesis endógena de DA estaba inhibida por la administración de benserazida, debe considerarse que prácticamente la totalidad de la DA urinaria procedió de la administración exógena de DA. Los resultados obtenidos muestran una reducción en la excreción urinaria de DA por inhibición de los OCTs mediante D-22. Este resultado es acorde con el hallazgo en el que observamos que la administración de D-22 redujo la inhibición de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal y la excreción de sodio y agua, inducidas por la DA. Más aún, la co-infusión de ANP y DA incrementó en mayor medida los niveles de excreción urinaria de DA comparados con grupo tratado con DA solamente, siendo este incremento también bloqueado por el D-22 mediante la inhibición de los OCTs. Todos estos resultados en conjunto, sugieren que el ANP promueve el transporte de la DA exógenamente administrada, a la luz tubular y se correlacionan con los hallazgos en los que observamos que la co-infusión de ANP+DA también incrementa la excreción de sodio y agua y sobre-inhíbe la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal. Es importante destacar que estos resultados resaltan el hecho que los OCTs son esenciales para transportar DA hacia la luz tubular, permitiendo de esta manera que la DA pueda ejecutar sus acciones fisiológicas.

Para testear si el incremento de la excreción urinaria de DA producido por la infusión del ANP se debe a la estimulación de la actividad de los OCTs por el ANP, procedimos a investigar *in vitro* en cortes de corteza renal los efectos del péptido natriurético sobre la captación de ^3H -DA (figura 5). Se observó que el ANP estimula la captación renal de ^3H -DA y que la inhibición de los OCTs con D-22 la reduce. Nuevamente, estos resultados demuestran que los OCTs son los transportadores específicos de DA en los túbulos renales, y que su participación es crítica en el proceso de captación de DA por el riñón. Pero la inhibición de los OCTs con D-22 también redujo la captación renal de ^3H -DA estimulada por el ANP en comparación con el grupo control, lo que demuestra taxativamente que el ANP estimula la captación renal de DA mediante un incremento de actividad de los OCTs. Considerando la totalidad de estos resultados, podemos postular a los OCTs como los transportadores renales que median el efecto estimulante del ANP sobre la captación renal de DA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la interpretación que surge es la siguiente (figura 20): en condiciones basales, con síntesis endógena de DA conservada (no inhibida) y sin adicionar DA exógena, el ANP estimula el transporte de entrada de DA a la célula tubular renal desde el lado basolateral efectuado por los OCTs, contribuyendo, de esta manera, a aumentar la biodisponibilidad tubular de DA para que ésta pueda estimular a sus receptores D_1 y/o D_2 y así sobreinhibir indirectamente la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal. En virtud que la cantidad de DA plasmática es prácticamente despreciable si no se administra de manera exógena, los efectos del bloqueo de los OCTs con D-22 sobre la natriuresis y diuresis ANP dependientes, no pueden ser evidentes de manera significativa, ya que la cantidad de DA circulante que es captada por el ANP es de menor cuantía con respecto a la síntesis endógena de DA.

Figura 20: Representación esquemática de los efectos del ANP sobre el transporte de DA tubular a través de los OCTs.



A: en condiciones basales, la DA exógena ingresa por los OCTs situados en la membrana basolateral y es captado de la circulación y el intersticio por las células tubulares proximales. **B:** Una vez dentro de la célula tubular, la DA puede alcanzar la luz tubular a través de los OCTNs situados en la membrana apical. El ANP inhibe la Na⁺, K⁺-ATPasa a través de la estimulación de los receptores NPR-A, GMPC y PKG. **C:** El ANP facilita el transporte tubular de DA a través de los OCTs, estimulando su actividad específica e incrementando de esta forma la concentración de DA en el lado luminal. La inhibición simultánea de la Na⁺, K⁺-ATPasa por el ANP y la DA promueve una mayor respuesta natriurética. OCTs: transportadores de cationicos orgánicos. OCTNs: transportadores de cationicos orgánicos/carnitina. Círculos negros: dopamina; triángulos grises: ANP. Flecha continua: estimulación; flecha discontinua: inhibición; flecha gris con ?: mecanismo hipotético.

Los resultados de este trabajo confirman la hipótesis de estudio y cumplieron los objetivos propuestos, convalidando *in vivo* los fenómenos demostrados previamente *in vitro*. De esta manera, podemos concluir finalmente que la alteración fundamentada en incremento del transporte tubular de DA estimulado por el ANP, conduce a obtener una mayor disponibilidad de DA en la célula tubular renal, para que la amina pueda traslocarse y estimular a sus receptores D₁ y/o D₂ de membrana, y en consecuencia sobre inhibir la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal, responsable final de la reabsorción regulada de sodio a nivel de los túbulos proximales, con el resultados final de un incremento adicional de la diuresis y natriuresis por la interacción conjunta y potenciadora de los dos sistemas (ANP-DA). Además hemos identificado al transportador de DA (OCT) como el intermediario involucrado en la interrelación renal ANP-DA. Los resultados de este estudio aportan al conocimiento, un novedoso mecanismo fisiológico de regulación acción, mediante el cual el ANP, interaccionando positivamente con la DA, constituyen un sistema regulador local a nivel renal, de la reabsorción y excreción de agua y que impacta en los mecanismos que regulan la formación de orina.

Por lo tanto podemos concluir que:

- 1- El ANP posee efectos directos propios e indirectos sobre el manejo renal del sodio y el agua, siendo estos últimos, vehiculizados a través de su interacción con la DA renal.
- 2- Para regular la captación de la DA circulante, el ANP estimula la actividad de los transportadores OCTs.
- 3- El mayor transporte de DA hacia la célula tubular aumenta la disponibilidad de DA en los túbulos renales, reforzando la actividad inhibitoria de la DA sintetizada en la célula tubular y del propio ANP, sobre la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal.
- 4- Los fenómenos relativos a la interacción ANP-DA intrarrenal, que previamente habíamos demostrado experimentalmente *in vitro*, son reproducibles *in vivo* y repercuten directamente sobre los mecanismos de formación de la orina y control renal del metabolismo del agua y el sodio.

- 5- Este un nuevo aporte al conocimiento de la fisiología renal, revela la existencia de una cooperación positiva entre dos sistemas diuréticos y natriuréticos y cómo la alteración de los mismos puede ser concausa para el desarrollo de la hipertensión arterial.
- 6- El estudio aporta asimismo nuevos conocimientos con posible aplicación mediata para el estudio clínico de la fisiopatología de la hipertensión arterial neurogénica y su diagnóstico precoz
- 7- Asimismo, al haberse identificado que el transportador OCT involucrado en el proceso de captación de tubular de DA, es regulado por sistemas hormonales como el ANP, abre las perspectivas para nuevos estudios farmacológicos de aplicación en la terapéutica de la disfunción renal y la hipertensión arterial.

Por otra parte, en el modelo de insulino-resistencia comprobamos que la sobrecarga de fructosa en la dieta provocó alteraciones en el perfil metabólico de los animales de experimentación utilizados. En primer lugar, y como era esperable, se observa un incremento significativo de la insulinemia contra los respectivos grupos controles, a partir de la cuarta semana de dieta, acompañado de hipertrigliceridemia desde la octava semana de tratamiento. Estos resultados, conjuntamente con el incremento de la PAS, validan el modelo experimental de síndrome metabólico desarrollado en estos animales. La fructosa, luego de ser absorbida a nivel intestinal, se transporta a través del torrente sanguíneo y llega a diferentes tejidos, entre ellos, el hepático. Es conocido que la enzima hexoquinasa I a nivel hepático, es la primera etapa de control de la glucólisis, paso que es saltado por la fructosa. Ésta ingresa directamente a la célula a través de difusión simple y es fosforilada en posición 1 por la enzima fructoquinasa, convirtiéndose en fructosa-1-fosfato, que se desdobra en gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato [108]. A partir de ésta última se produce glicerol-3-fosfato, que reacciona con el metabolito final de la glucólisis, la acetilcoenzima A, y genera triglicéridos [109]. Este proceso explica el incremento plasmático de los triglicéridos en los animales con sobrecarga de fructosa, lo que a su vez genera insulino-resistencia. Esta insulino-resistencia trae aparejada una hiperinsulinemia compensadora que, al actuar sobre tejidos con sensibilidad normal a la insulina (uno de ellos el tejido renal), genera hipertensión arterial. Aunque todavía sigue sin conocerse el mecanismo preciso por el cual se desarrolla la HTA en estados de insulino-resistencia, algunos estudios sugieren que la hiperinsulinemia podría causar retención de sodio y un aumento de la actividad simpática, factores claves para el desarrollo de la HTA. De esta manera, las acciones de la insulina sobre presión arterial pueden verse modificadas en situaciones que conducen a una resistencia a su acción [110]. Así, la vasodilatación inducida por insulina se ve afectada en esta situación debido a defectos en la señalización intracelular de la PI3-quinasa, un mediador de las acciones de insulina en la vasculatura arterial [111]. Otros autores sugieren que el aumento de la reabsorción renal de sodio inducida por insulina está potenciado en la insulino-resistencia. La insulina estimula todos los transportadores implicados en la reabsorción de sodio ubicados en los túbulos proximales, entre ellos la actividad del intercambiador Na^+/H^+ tipo 3 (NHE3), a la bomba $\text{Na}^+,\text{K}^+-\text{ATPasa}$ y al cotransportador basolateral electrogénico $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBCe1). A nivel del asa de Henle, la insulina estimula la reabsorción de sodio y cloro, a través de la estimulación del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC2), mientras que en los túbulos colectores estimula la actividad del canal epitelial de sodio-amiloride sensible (ENaC) [110].

En nuestros experimentos, el incremento de la PAS fue detectado a partir de cuarta semana de tratamiento con fructosa, alcanzando los valores tensionales más altos a las 8 y 12 semanas, con niveles cercanos a los 160 mmHg. Los niveles de la PAS se correlacionaron con la disminución de la excreción fraccional y urinaria de sodio a partir de las 4 semanas de dieta, hechos que reflejan el estado de retención salina en este modelo experimental. Estas alteraciones se explicarían por el incremento simultáneo de la actividad específica de la $\text{Na}^+,\text{K}^+-\text{ATPasa}$ renal, a partir de la cuarta semana de sobrecarga de fructosa. Esta bomba enzimática de localización basolateral en las células tubulares renales, es estimulada en estados de insulino-resistencia y exposición crónica de las células renales a insulina plasmática aumentada, conduciendo a una mayor reabsorción de sodio y agua y por lo tanto, mayor retención hidrosalina [112, 113]. En nuestro estudio, la expresión de la $\text{Na}^+,\text{K}^+-\text{ATPasa}$ total (determinada por western blot) aumentó en médula renal a partir de la cuarta semana de tratamiento con fructosa, resultado consistente con las inmunofluorescencias de 8 y 12 semanas. La expresión de la $\text{Na}^+,\text{K}^+-\text{ATPasa}$ fosforilada en el residuo de serina 23 aumentó en médula renal a partir de la cuarta semana de dieta. En corteza renal, en cambio, la expresión de la Na^+,K^+-

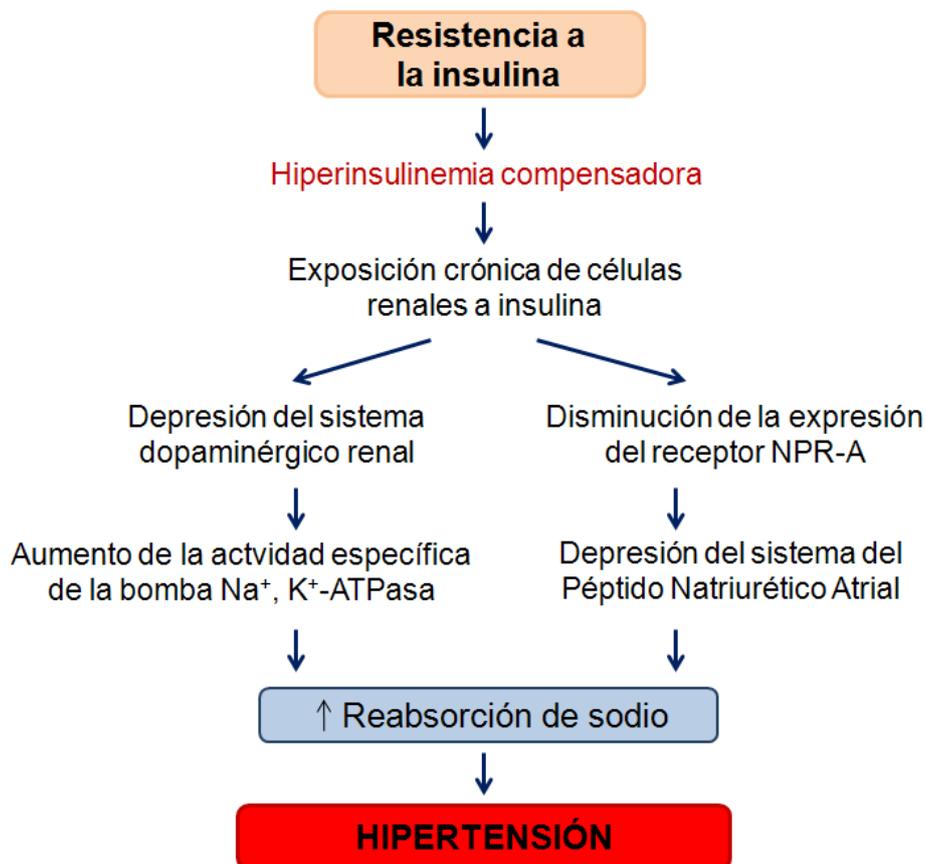
ATPasa total (determinada por inmunofluorescencia) aumenta a partir de la cuarta semana mientras que la fosforilada en el residuo serina 23 (determinada por western blot) aumenta recién a partir de la octava semana. La evidencia actual indica que el residuo serina 23 puede ser fosforilado por las subunidades β y ξ) de la proteinkinasa C (PKC). La PKC β se activa como consecuencia de la unión de la DA biodisponible en la luz tubular a sus receptores D_1 -símiles mientras que la PKC ξ se activa como consecuencia de la unión de la ANG II a su receptor AT_1 [114]. Considerando que en el modelo de sobrecarga de fructosa, el sistema renina-angiotensina se encuentra exacerbado, es posible sugerir que la activación de la PKC ξ sea preponderante con respecto a la PKC β , pues el sistema dopaminérgico renal estaría deprimido.

La exposición crónica de las células renales a la hiperinsulinemia estaría afectando la funcionalidad del sistema dopaminérgico renal [85]. Una evidencia de esta afectación en este modelo, es el progresivo aumento de la relación L-dopa/DA urinaria, a partir de la cuarta semana de tratamiento, que encontramos en el modelo, lo que indica que la captación tubular de L-dopa está disminuida (aumentando así su excreción urinaria) o que existe un déficit de conversión de L-Dopa en DA, en otros términos, que la producción y liberación tubular de DA está disminuida. El incremento de este índice se produjo a expensas principalmente de una disminución significativa de la concentración urinaria de DA desde la cuarta semana de tratamiento. La concentración urinaria de L-dopa también fue menor en las ratas con sobrecarga de fructosa en las semanas 4 y 8 de dieta con respecto a las ratas controles, contrariamente a lo esperado. Sin embargo, se observó un incremento progresivo de la concentración urinaria de L-dopa con el tiempo, y a las 12 semanas de tratamiento no existieron diferencias significativas en los niveles de excreción de L-dopa con respecto a las controles. Por lo tanto, el incremento del índice L-dopa/DA en las ratas sometidas a sobrecarga de fructosa, es consistente con el incremento que encontramos en la expresión del transportador de L-aminoácidos, LAT-2, ubicado en la membrana apical de las células renales y que permite la captación de L-dopa desde la luz tubular, en un paso que es limitante para la síntesis de DA. El aumento de la captación de L-dopa por sobreexpresión de LATs, acompañado por una menor excreción de DA urinaria sugiere distintas posibilidades: a) disminución de la actividad de la enzima dopa decarboxilasa, enzima sintetizadora de DA; b) un catabolismo acelerado de la amina, ya sea a través de MAO o COMT en este modelo experimental; o c) un menor transporte de DA del compartimento intracelular hacia la luz tubular por los OCTNs; todo estos pasos representan futuros experimentos a llevar a cabo para completar el estudio que presentamos.

Por otro lado, se observó una disminución significativa de la concentración de ANP plasmático en las ratas con sobrecarga de fructosa a partir de las 8 semanas, la cual fue acompañada por una disminución de la expresión de receptor NPR-A (determinada por western blot) en tejido renal. Estos resultados son consistentes con la bibliografía, en donde se ha comprobado la existencia de una asociación entre bajos niveles de ANP y altos niveles de glucosa e insulina, así como altos niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos [90]. A su vez, durante la última década, numerosos estudios experimentales han sugerido la posible existencia de una interacción entre los péptidos natriuréticos y el sistema dopaminérgico renal [53, 54]. Sin embargo, los mecanismos implicados en esta interacción no han sido completamente elucidados. En este sentido, nuestros resultados permitirían aportar nuevas evidencias de esta interacción, pudiendo establecer una asociación entre la reducción en la excreción urinaria de DA observada en este modelo de sobrecarga de fructosa en la dieta y una depresión en el sistema del ANP. En trabajos anteriores, hemos demostrado que el ANP estimula la captación de DA por las células tubulares del riñón, a través de la estimulación de los receptores NPR-A acoplados a la guanilato ciclasa, seguido por la formación de GMPc (como segundo mensajero) y la activación de PKG [60, 61]. Asimismo hemos demostrado que el ANP incrementa la síntesis de DA renal al estimular la actividad de la dopa decarboxilasa [115]. Como resultado de los bajos niveles de ANP plasmático observados en este modelo, sería esperable una reducción tanto de la síntesis como de la captación de DA por parte de las células tubulares como consecuencia de la reducción en la expresión de los receptores NPR-A. Estos efectos explicarían la disminución en la excreción urinaria de DA y por lo tanto el incremento en el valor del índice L-dopa/DA observada en nuestros experimentos. Se necesitan estudios posteriores que evalúen la funcionalidad de estos receptores, así como el estado de los receptores NPR-C, para completar la caracterización del sistema de ANP en este modelo.

En la figura 21 se diagrama de qué manera en estadios de hiperinsulinemia, como sucede en el modelo de sobrecarga de fructosa en la dieta, la depresión de los sistemas natriuréticos (dopaminérgico renal y del péptido natriurético atrial) pueden incidir como factores esenciales para el desarrollo fisiopatológico de la hipertensión arterial [116].

Figura 21: asociación entre la resistencia a la insulina, la afectación del sistema dopaminérgico renal y la del sistema del péptido natriurético atrial, en la fisiopatología de la hipertensión arterial.



Listado de abreviaturas:

ANG II: angiotensina II
ANP: péptido natriurético atrial
CaMKII: Calcio-Calmodulina kinasa II
CFNa: carga filtrada de sodio
ClCr: clearance de creatinina
COMT: catecol-O-metil transferasa
DA: dopamina
DAG: diacilglicerol
FC: frecuencia cardíaca
FENa: excreción fraccional de sodio
IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato
LAT: transportador de L-amino ácidos
MAO: monoamino-oxidasa
NPR-A: receptor del tipo A de péptidos natriuréticos
OCT: transportador de cationes orgánicos
PAM: presión arterial media
PAS: presión arterial sistólica
PBS: buffer fosfato salino
PKC: proteinkinasa C
PKG: proteinkinasa G
RTNa: reabsorción tubular de sodio
SSI: solución salina isotónica
VFG: velocidad de filtrado glomerular

Rol desempeñado por cada uno de los autores:

Rukavina Mikusic, Natalia Lucía: Becaria Doctoral de la UBA. Responsable de los experimentos realizados con animales. Recolección y manejo de muestras. Determinaciones por western blot y actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa. Redacción del manuscrito.

Kouyoumdzian, Nicolás Martín: Becario Doctoral del CONICET. Responsable de los experimentos realizados con animales. Recolección y manejo de muestras. Determinaciones por western blot y actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa. Redacción del manuscrito.

Kravetz, María Cecilia: Becaria estímulo UBA. Responsable de los experimentos realizados con animales. Recolección y manejo de muestras. Determinaciones *in vitro* y actividad de Na⁺, K⁺-ATPasa.

Del Mauro, Julieta: Responsable de las determinaciones de HPLC.

Gorzalczany, Susana: Responsable de las determinaciones hemodinámicas.

Puyó, Ana María: Responsable del diseño y manejo de las ratas con sobrecarga de fructosa. Determinación de ANP plasmático por RIA.

Toblli, Jorge: Responsable de las inmunofluorescencias.

Fernández, Belisario Enrique: Dirección General y financiamiento del Proyecto. Redacción y revisión del manuscrito.

Choi, Marcelo Roberto: Investigador Principal del Proyecto y Dirección, coordinación y financiamiento para la ejecución del mismo. Redacción y revisión del manuscrito.

Financiamiento del presente trabajo:

- 1) Péptidos natriureticos y angiotensina II como reguladores de mecanismos fisiologicos y patologicos a nivel cardíaco y renal. UBACYT 20020100100688 (2011-2014).
- 2) Efectos de la Angiotensina II y el Péptido Natriurético Atrial sobre los transportadores renales de dopamina y su repercusión sobre la función tubular renal. UBACYT 20020090300090 (2010-2012).
- 3) Regulación de los transportadores de L- aminoacidos por el péptido natriurético atrial y la angiotensina II y su incidencia sobre el sistema dopaminérgico y la actividad Na⁺, K⁺-ATPasica renales. UBACYT 20020110200048 (2012-2015). Resolución (CS) 4895/12.
- 4) Interaccion peptidos vasoactivos y sistema dopaminergico renal: regulación de los transportadores tubulares renales de L-dopa y dopamina por el peptido natriurético atrial y la angiotensina II. PICT 2012-1775. Resolución N° 09/14.
- 5) Director del subsidio otorgado por la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial (SAHA) 2014-2015: "Participación del sistema dopaminérgico renal y su regulación por el péptido natriurético atrial en la hipertensión arterial insulino-resistente por sobrecarga de fructosa".
- 6) Director del subsidio UBACYT (2014-2017): "Desbalance entre los sistemas dopaminérgico y renina-angiotensina renales como factor etiopatogénico de la hipertensión arterial y la inflamación renal en diferentes modelos experimentales". UBACYT 20020130200105BA (2014-2017). Resolución (CS) 921/2014.

Parte de los resultados que se incluyen en este trabajo fueron parcialmente presentados en los siguientes congresos científicos:

1. "Los transportadores de cationes orgánicos a nivel renal modulan la excreción renal de sodio-dopamina dependiente"
 Autores: Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Gorzalczanic S, Carranza A, Pandolfo M, Kravetz MC, Fernández BE, Choi MR.
 Lugar: Reunión anual Sociedad Argentina de Fisiología, Rosario.
 Fecha: 4 y 5 de octubre de 2012. *Physiological MiniReviews* 6(2): January-February 2013.

2. “¿Antagonismo ANP-ANG II sobre la natriuresis y diuresis mediada por dopamina?: papel de los transportadores de cationes orgánicos renales”
Autores: Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Gorzalczy S, Gironacci MM, Carranza A, Kravetz MC, Pandolfo M, Trida VA, Fernández BE, Choi MR.
Lugar: XX Congreso de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, Rosario.
Fecha: 18-20 de abril de 2013. Libro de Resúmenes, págs. 57-58.
- 3 “Perfil de expresión y actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal y su relación con el índice L-dopa/dopamina urinario en el desarrollo de la hipertensión arterial en ratas con sobrecarga de fructosa
Autores: Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Kravetz MC, Cao G, Gorzalczy S, Carranza MA, Del Mauro J, Lee HJ, Donoso A, Pandolfo M, Uceda A, Peredo HA, Höcht C, Gironacci M, Puyó AM, Toblli J, Fernández BE, Choi MR.
Lugar: LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata.
Fecha: 19-22 de noviembre de 2014. Revista Medicina, Buenos Aires Vol. 74 Supl. III – 2014, págs. 90-91.
- 4 “La alteración del sistema dopaminérgico renal se asocia a cambios en la expresión y actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal: nuevas evidencias de un mecanismo implicado en el desarrollo de hipertensión arterial en ratas con sobrecarga de fructosa.”
Autores: Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Kravetz MC, Cao G, Del Mauro J, Lee HJ, Gironacci MM, Puyó AM, Toblli J, Fernández BE, Choi MR.
Lugar: XXII Congreso de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, Tucumán.
Fecha: 23-25 de abril de 2015. Libro de Resúmenes, págs.41-42.
- 5“ La alteración del sistema dopaminérgico renal se asocia a cambios en la expresión y actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal: nuevas evidencias de un mecanismo implicado en el desarrollo de hipertensión arterial en ratas con sobrecarga de fructosa.”
Autores: Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Kravetz MC, Cao G, Del Mauro J, Lee HJ, Gironacci MM, Puyó AM, Toblli J, Fernández BE, Choi MR.
Lugar: XXII Congreso de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, Tucumán.
Fecha: 23-25 de abril de 2015. Libro de Resúmenes, págs.41-42.
Autores: Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Kravetz MC, Cao G, Gorzalczy S, Carranza MA, Del Mauro J, Lee HJ, Donoso A, Pandolfo M, Uceda A, Peredo HA, Höcht C, Gironacci M, Puyó AM, Toblli J, Fernández BE, Choi MR.
Lugar: LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata.
Fecha: 19-22 de noviembre de 2014. Revista Medicina, Buenos Aires Vol. 74 Supl. III – 2014, págs. 90-91.
- 6“ La alteración del sistema dopaminérgico renal se asocia a cambios en la expresión y actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa renal: nuevas evidencias de un mecanismo implicado en el desarrollo de hipertensión arterial en ratas con sobrecarga de fructosa.”
Autores: Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Kravetz MC, Cao G, Del Mauro J, Lee HJ, Gironacci MM, Puyó AM, Toblli J, Fernández BE, Choi MR.
Lugar: XXII Congreso de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial, Tucumán.
Fecha: 23-25 de abril de 2015. Libro de Resúmenes, págs.41-42.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aperia A. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:621-647.
- [2] Beltowski J, Gorny D, Marciniak A. The mechanism of Na⁺, K⁺-ATPase inhibition by atrial natriuretic factor in rat renal medulla. *J Physiol Pharmacol* 1998; 49:271-83.
- [3] Holtbäck U, Kruse MS, Brismar H, Aperia A. Intrarenal dopamine coordinates the effect of antinatriuretic and natriuretic factors. *Acta Physiol Scand* 2000; 168:215-8.
- [4] Rosenzweig A, Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:229-55.
- [5] Webb RL, Della Puca R, Manniello J, Robson RD, Zimmerman MB, Ghai RD. Dopaminergic mediation of the diuretic and natriuretic effects of ANF in the rat. *Life Sci* 1986; 38:2319-27.
- [6] Marin-Grez M, Briggs JP, Schubert G, Schnermann J. Dopamine receptor antagonists inhibit the natriuretic response to atrial natriuretic factor (ANF). *Life Sci* 1985; 36:2171-2176.
- [7] Wang ZQ, Siragy HM, Felder RA, Carey RM. Intrarenal dopamine production and distribution in the rat. Physiological control of sodium excretion. *Hypertension* 1997; 29:228-34.
- [8] Carranza A, Nowicki S, Barontini M, Armando I. L-Dopa uptake and dopamine production in proximal tubular cells are regulated by beta(2)-adrenergic receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279:77-83.
- [9] Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther* 2001; 91:35-62.
- [10] Carey RM. Theodore Cooper Lecture: Renal DA system: paracrine regulator of sodium homeostasis and blood pressure. *Hipertension* 2001, 38:297.
- [11] Pinho MJ, Serrao MP, Soares-da-Silva P. High-salt intake and the renal expression of amino acid transporters in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 1452-63.
- [12] del Amo EM, Urtti A, Yliperttula M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* 2008; 35:161-74.
- [13] Koepsell H, Lips K, Volk C: Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. *Pharm Res* 2007; 24:1227-51.
- [14] Stokes GS; Monaghan JC; Pillai DN. Effects of carbidopa and of intravenous saline infusion into normal and hypertensive subjects on urinary free and conjugated DA. *Journal of Hypertension* 1997, 15:761-8.
- [15] Mühlbauer B; Osswald H. Urinary DA excretion in conscious rats: effect of carbidopa in different states of sodium balance. *Renal Physiol Biochem* 1993, 16:117-24.
- [16] Ball SG; Lee MR. The effect of carbidopa administration on urinary sodium excretion in man. Is DA an intrarenal natriuretic hormone? *Br J Clin Pharmacol* 1977, 4:115-9.
- [17] Citarella MR; Choi MR; Gironacci MM; Medici C; Correa AH; Fernández BE. Urodilatin and dopamine: a new interaction in the kidney. *Regul Pept* 2009, 153:19-24.
- [18] Soares-da-Silva P; Serrao MP; Vieira-Coelho MA. Apical and basolateral uptake and intracellular fate of DA precursor L-dopa in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998, 274:243-51.
- [19] Wright SH; Dantzer WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004, 84:987-1049.
- [20] Jonker JW; Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 308:2-9.
- [21] Besseghir K; Pearce LB; Rennick B. Renal tubular transport and metabolism of organic cations by the rabbit. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1981, 241:308-14.
- [22] Karbach U; Kricke J; Meyer-Wentrup F; Gorboulev V; Volk C; Loffing-Cueni D; Kaissling B; Bachmann S; Koepsell H. Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000, 279:679-87.
- [23] Gründemann D; Köster S; Kiefer N; Breidert T; Engelhardt M; Spitzenberger F; Obermüller N; Schömig E. Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2. OCT2. *J Biol Chem* 1998, 273:30915-20.

- [24] Breidert T; Spitzenberger F; Gründemann D; Schömig E. Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol* 1998, 125:218–24.
- [25] Graefe KH; Friedgen B; Wölfel R; Bossle F; Russ H; Schömig E. 1,10-Diisopropyl-2,40-cyanine (disprocynium24), a potent uptake2 blocker, inhibits the renal excretion of catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997, 356:115–25.
- [26] Ciarimboli G, Schlatter E. Regulation of organic cation transport. *Pflugers Arch* 2005;449:423-441.
- [27] Hussain T; Lokhandwala MF. Renal dopamine receptors and hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003,228:134–42.
- [28] Zeng C; Sanada H; Watanabe H; Eisner GM; Felder RA; Jose PA. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics*2004,19:233–46.
- [29] Olsen NV. Effects of dopamine on renal haemodynamics tubular function and sodium excretion in normal humans. *Dan Med Bull* 1998, 45:282-97.
- [30] Felder RA; Seikaly MG; Cody P; Eisner GM; Jose PA. Attenuated renal response to dopaminergic drugs in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1990, 15:560–9.
- [31] Nishi A; Eklöf AC; Bertorello AM; Aperia A. Dopamine regulation of renal Na⁺, K⁺-ATPase activity is lacking in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1993, 21:767–71.
- [32] O’Connell DP; Ragsdale NV; Boyd DG; Felder RA; Carey RM. Differential human renal tubular responses to dopamine type 1 receptor stimulation are determined by blood pressure status. *Hypertension* 1997, 29:115–22.
- [33] Teirstein PS; Price MJ; Mathur VS; Madyoon H; Sawhney N; Baim DS. Differential effects between intravenous and targeted renal delivery of fenoldopam on renal function and blood pressure in patients undergoing cardiac catheterization. *Am J Cardiol* 2006, 97:1076–81.
- [34] Zeng C; Felder RA; Jose PA. A new approach for treatment of hypertension: modifying D1 dopamine receptor function. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006, 4:369–77.
- [35] Eklöf AC. The natriuretic response to a dopamine DA1 agonist requires endogenous activation of dopamine DA2 receptors. *Acta Physiol Scand* 1997, 160:311–4.
- [36] José PA; Asico LD; Eisner GM; Pocchiari F; Semeraro C; Felder RA. Effects of costimulation of dopamine D1– and D2–like receptors on renal function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*1998, 275:986–94.
- [37] Aperia A; Holtbäck U; Syrén M-L; Svensson L-B; Fryckstedt J; Greengard P. Activation/deactivation of renal Na⁺,K⁺-ATPase: A final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J* 1994, 8:436–9.
- [38] Chen C; Lokhandwala MF. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat renal proximal tubules by dopamine involved DA-1 receptor activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993, 347:289–95.
- [39] Seri I; Kone BC; Gullans SR; Aperia A; Brenner BM; Ballermann BJ. Locally formed dopamine inhibits Na-KATPase activity in rat renal cortical tubule cells. *Am J Physiol* 1988, 255:666–73.
- [40] Baines AD; Ho P; Drangova R. Proximal tubular dopamine production regulates basolateral Na⁺,K⁺-ATPase. *Am J Physiol* 1992, 262:566–71.
- [41] Fryckstedt J; Aperia A. Sodium dependent regulation of sodium, potassium-adenosine-tri-phosphatase (Na⁺,K⁺-ATPase) activity in medullary thick ascending limb of Henle segments. Effect of cyclic-adenosine-monophosphatase guanosine-nucleotide-bindingprotein activity and arginine vasopressin. *Acta Physiol Scand* 1992, 144:185–90.
- [42] Takemoto F; Cohen HT; Satoh T; Katz AI. Dopamine inhibits Na⁺,K⁺-ATPase in single tubules and cultured cells from distal nephron. *Pflügers Arch* 1992, 421:302–6.
- [43] Bertorello A; Aperia A; Walaas I; Nairn AC; Greengard P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:11359–62.
- [44] Fisone G; Cheng S X-J; Nairn AC; Czernik AJ; Hemmings HC Jr; Höög JO. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K⁺-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1994, 269: 9368–73.

- [45] Belusa R; Wang Z; Matsubara T; Sahlgren B; Dulubova I. Mutation of the site of protein kinase C phosphorylation on rat $\alpha 1$ Na^+, K^+ -ATPase alters regulation of intracellular Na^+ , pH and influences cell shape and adhesiveness. *J Biol Chem* 1997, 272:20179–84.
- [46] Chibalin AV; Ogimoto G; Pedemonte CH; Pressley TA; Katz AI. Dopamine-induced endocytosis of Na^+, K^+ -ATPase is initiated by phosphorylation of Ser-18 in the rat α subunit and is responsible for the decreased activity in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999, 274:1920–7.
- [47] Aperia A; Fryckstedt J; Holtbäck U; Belusa R; Cheng X-J. Cellular mechanisms for bi-directional regulation of tubular sodium reabsorption. *Kidney Int* 1996, 49:1743–7.
- [48] Cantin M; Genest J. The heart and the atrial natriuretic factor. *Endocr Rev* 1985, 6:107-27.
- [49] de Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 1985, 230:767–70.
- [50] Gutkowska J; Antunes-Rodrigues J; Mc Cann SM. Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev* 1997, 77:465–515.
- [51] Brenner BM; Ballermann BJ; Gunning ME; Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 1990, 70:665–99.
- [52] Goldberg LI. Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacol Rev* 1972, 24:1–29.
- [53] Marin-Grez M; Briggs JP; Schubert G; Schnermann J. Dopamine receptor antagonists inhibit the natriuretic response to atrial natriuretic factor (ANF). *Life Sci* 1985, 36:2171–6.
- [54] Petterson A; Hedner J; Hedner T. The diuretic effect of atrial natriuretic peptide (ANP) is dependent on dopaminergic activation. *Acta Physiol Scand* 1986, 126:619–21.
- [55] Webb RL; Della Puca R; Manniello J; Robson RD; Zimmerman MB; Ghai RD. Dopaminergic mediation of the diuretic and natriuretic effects of ANF in the rat. *Life Sci* 1986, 38:2319–27.
- [56] Israel A; Torres M; Barbella Y. Evidence for a dopaminergic mechanism for the diuretic and natriuretic action of centrally administered atrial natriuretic factor. *Cell Mol Neurobiol* 1989, 9:369–78.
- [57] Katoh T; Sophasan S; Kurokawa K. Permissive role of dopamine in renal action of ANP in volume-expanded rats. *Am J Physiol* 1989, 257:300–9.
- [58] Hedge SS; Chen C-J; Lokhandwala MF. Involvement of endogenous dopamine and DA-1 receptors in the renal effects of atrial natriuretic factor in rats. *Clin Exp Hyper Theory Pract* 1991, 13:357–69.
- [59] Winaver J; Burnett JC; Tyce GM; Dousa TP. ANP inhibits $\text{Na}^+ \text{H}^+$ antiport in proximal tubular brush border membrane: role of dopamine. *Kidney Int* 1990, 38:1133–40.
- [60] Fernández BE; Correa AH; Choi MR. Atrial natriuretic factor stimulates renal dopamine uptake mediated by natriuretic peptide-type A receptor. *Regul Pept* 2005, 124:137-44.
- [61] Correa AH; Choi MR; Gironacci M; Valera MS; Fernández BE. Signaling pathways involved in atrial natriuretic factor and dopamine regulation of renal Na^+, K^+ -ATPase activity. *Regul Pept* 2007, 138:26-31.
- [62] Correa AH; Choi MR; Gironacci M; Aprile F; Fernández BE. Atrial natriuretic factor decreases renal dopamine turnover and catabolism without modifying its release. *Regul Pept* 2008, 146:238-42.
- [63] Choi MR; Correa AH; Turco V; García FA; Fernández BE. Angiotensin II regulates extraneuronal dopamine uptake in the kidney. *Nephron Physiol* 2006, 104:136–43.
- [64] Choi MR; Medici C; Gironacci MM; Correa AH; Fernández BE. Angiotensin II regulation of renal dopamine uptake and Na^+, K^+ -ATPase activity. *Nephron Physiol* 2009, 111:53–8.
- [65] Choi MR; Lee BM; Medici C; Correa AH; Fernández BE. Effects of angiotensin II on renal dopamine metabolism: synthesis, release, catabolism and turnover. *Nephron Physiol* 2010, 115:1-7.
- [66] Gildea JJ. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18:28-32, 2009.
- [67] Sampaio-Maia B, Moreira-Rodrigues M, Serrão P, Pestana M. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:314-23.
- [68] Bae EH, Lee J, Ma SK, Kim SW. Changes of atrial natriuretic Peptide system in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Korean J Physiol Pharmacol* 2009;13:1-7.
- [69] Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport.
- [70] Moreira-Rodrigues M, Quelhas-Santos J, Roncon-Albuquerque R, Serrão P, Leite-Moreira A, Sampaio-Maia B, Pestana M. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012;237:949-55.

- [71] Choi MR; Citarella MR; Lee BM; Lucano F; Fernández BE. Urodilatin increases renal dopamine uptake: intracellular network involved. *J Physiol Biochem* 2011, 67:243-7.
- [72] Choi MR, Citarella MR, Lee BM, Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Fernández BE. Urodilatin regulates renal dopamine metabolism. *J Nephrol* 2013, doi: 10.5301/jn.5000279.
- [73] DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance—a multifactorial syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173–194.
- [74] DeFronzo RA: Insulin resistance, hyperinsulinemia and coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:S1–S16.
- [75] Jarrett RJ, Keen H, McCartney M, et al: Glucose tolerance and blood pressure in two population samples: their relation to diabetes mellitus and hypertension. *Int J Epidemiol* 1978; 7: 15–24.
- [76] Modan M, Halkin H, Almong S, et al: Hyperinsulinemia: a link between hypertension obesity and glucose intolerance. *J Clin Invest* 1985; 75: 809–817.
- [77] DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ: The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in men. *J Clin Invest* 1975; 55: 845–855.
- [78] Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L: Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal in man. *Diabetes* 1981; 30: 219–225.
- [79] Berne C, Fagius J, Pollare T, Hjemdahl P: The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinemia. *Diabetologia* 1992; 35: 873–879.
- [80] Hwang I, Ho H, Hoffman B, Reaven GM: Fructose induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987; 10: 512–516.
- [81] Hasegawa K, Yoshida H, Ura N, Murakami H, Hagiwara M, Shimamoto K. The role of renal natriuretic and depressor systems in insulin-resistant hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004;27(7):501-8.
- [82] Trivedi M, Marwaha A, Lokhandwala M. Rosiglitazone restores G-protein coupling, recruitment, and function of renal dopamine D1A receptor in obese Zucker rats. *Hypertension* 2004;43:376- 82.
- [83] Lokhandwala MF, Hussain T. Defective renal dopamine D1-like receptor signal transduction in obese hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 2000;168(1):251-5.
- [84] Banday AA, Fazili FR, Marwaha A, Lokhandwala MF. Mitogen-activated protein kinase upregulation reduces renal D1 receptor affinity and G-protein coupling in obese rats. *Kidney Int* 2007;71(5):397-406.
- [85] Carranza A, Mendez CF, Barontini M, Nowicki S. Insulin enhances L-dopa renal proximal tubule uptake: a regulatory mechanism impaired in insulin resistance. *Pflugers Arch* 2004;448:85-92.
- [86] Moreira-Rodrigues M, Quelhas-Santos J, Roncon-Albuquerque R, Serrão P, Leite-Moreira A, Sampaio-Maia B, Pestana M. Blunted renal dopaminergic system in a mouse model of diet-induced obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012;237:949-55.
- [87] Birkenfeld AL, Budziarek P, Boschmann M, Moro C, Adams F, Franke G, Berlan M, Marques MA, Sweep FC, Luft FC, Lafontan M, Jordan J. Atrial natriuretic peptide induces postprandial lipid oxidation in humans. *Diabetes*, 2008; 57(12):3199-204.
- [88] Engeli S, Birkenfeld AL, Badin PM, Bourlier V, Louche K, Viguerie N, Thalamas C, Montastier E, Larrouy D, Harant I, de Glisezinski I, Lieske S, Reinke J, Beckmann B, Langin D, Jordan J, Moro C. Natriuretic peptides enhances the oxidative capacity of human skeletal muscle. *J Clin invest*, 2012; 22(12):4675-9
- [89] Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Nakao K. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity, *Diabetes*, 2009; 58(12):2880-92
- [90] Olsen MH, Wachtell K, Tuxen C, Fossum E, Bang LE, Hall C, Ibsen H, Rokkedal J, Devereux RB, Hildebrandt PR. Opposite effects of losartan and atenolol on natriuretic peptides in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy: a LIFE substudy. *J Hypertens*, 2005; 23(5):1083-90.
- [91] Sarda IR, Wigle DA, Flynn TG, Pang SC. Radioimmunoassay for rat B-type natriuretic peptide (BNP-45). *J Immunoassay* 1993 Sep;14(3):167-82
- [92] Marinosci GZ, De Robertis E, De Benedictis G, Piazza O. Dopamine Use in Intensive Care: Are We Ready to Turn it Down? *Transl Med UniSa*. 2012;4:90–94

- [93] Chamorro C, Romera MA, Martinez-Melgar JL, Pardo C, Silva JA. Dopamine dose and renal damage. *Lancet*. 2001;357:1707–1708
- [94] Lee MR. Dopamine and the kidney: ten years on. *Clin Sci (Lond)* 1993;84:357–375
- [95] McDonald RH, Goldberg LI, Mcnay JL, Tuttle EP. Effect of dopamine in man: augmentation of sodium excretion, glomerular filtration rate, and renal plasma flow. *J Clin Invest*. 1964;43:1116–1124.
- [96] Hollenberg NK, Adams DF, Mendell P, Abrams HL, Merrill JP. Renal vascular responses to dopamine: haemodynamic and angiographic observations in normal man. *Clin Sci Mol Med*. 1973;45:733–742.
- [97] Cuthbertson BH, Noble DW. Dopamine in oliguria. *BMJ*. 1997;314:690–691.
- [98] Bellomo R, Chapman M, Finfer S, Hickling K, Myburgh J. Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. *Lancet*. 2000;356:2139–2143.
- [99] Kellum JA, M Decker J. Use of dopamine in acute renal failure: a meta-analysis. *Crit Care Med*. 2001;29:1526–1531.
- [100] Marik PE. Low-dose dopamine: a systematic review. *Intensive Care Med*. 2002;28:877–883.
- [101] Sakr Y, Reinhart K, Vincent JL, Sprung CL, Moreno R, Ranieri VM, De Backer D, Payen D. Does dopamine administration in shock influence outcome? Results of the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Study. *Crit Care Med*. 2006;34:589–597.
- [102] Chen HH, Anstrom KJ, Givertz MM, Stevenson LW, et al. NHLBI Heart Failure Clinical Research Network. Low-dose dopamine or low-dose nesiritide in acute heart failure with renal dysfunction: the ROSE acute heart failure randomized trial. *JAMA* 2013; 310:2533-2543.
- [103] Kellum JA, Decker JM. Use of dopamine in acute renal failure: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2001; 29:1526-1531.
- [104] Marik PE. Low-dose dopamine: a systematic review. *Intensive Care Med* 2002; 28:877-883.
- [105] Ibarra FR, De Luca Sarobe V. Modulation of endogenous levels of renal dopamine. *Medicina (B Aires)* 2006; 66(1):81-85.
- [106] Moe GW, Forster C, de Bold AJ, Armstrong PW. Physiological effects of synthetic atrial natriuretic factor in normal conscious dogs. *Clin Invest Med* 1988;11(6):417-24.
- [107] Zhao RR, Fennell WH, Abel FL. Effects of dopamine D1 and dopamine D2 receptor agonists on coronary and peripheral hemodynamics. *Eur J Pharmacol* 1990;190(1-2):193-202.
- [108] Nseir W, Nassar F, Assy N. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16(21): 2579–2588.
- [109] Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2005; 2:5.
- [110] Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport. *Int J Hypertens* 2011;2011:391762.
- [111] Li R, Zhang H, Wang W, Wang X, Huang Y, Huang C, Gao F. Vascular insulin resistance in prehypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling. *Eur J Pharmacol* 2010;628:140-7.
- [112] Lokhandwala MF, Hussain T. Defective renal dopamine D1-like receptor signal transduction in obese hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 2000;168(1):251-5.
- [113] Banday AA, Fazili FR, Marwaha A, Lokhandwala MF. Mitogen-activated protein kinase upregulation reduces renal D1 receptor affinity and G-protein coupling in obese rats. *Kidney Int* 2007;71(5):397-406
- [114] Efendiev R, Pedemonte CH. Contrary to rat-type, human-type Na,K-ATPase is phosphorylated at the same amino acid by hormones that produce opposite effects on enzyme activity. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(1): 31-38.
- [115] Choi MR, Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Kravetz MC, Fernández BE. Atrial natriuretic peptide and renal dopaminergic system: a positive friendly relationship? *Biomed Res Int*. 2014;2014:710781. doi: 10.1155/2014/710781.

- [116] Choi MR, Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Kravetz MC, Rosón MI, Rodríguez Fermepín M, Fernández BE. Renal dopaminergic system: pathophysiological implications and clinical perspectives. *World J Nephrol* 2015; 4(2) 196-212.
- [117] Efendiev R, Pedemonte CH. Contrary to rat-type, human-type Na,K-ATPase is phosphorylated at the same amino acid by hormones that produce opposite effects on enzyme activity. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(1): 31-38.
- [118] Choi MR, Rukavina Mikusic NL, Kouyoumdzian NM, Kravetz MC, Fernández BE. Atrial natriuretic peptide and renal dopaminergic system: a positive friendly relationship? *Biomed Res Int.* 2014;2014:710781. doi: 10.1155/2014/710781.
- [119] Choi MR, Kouyoumdzian NM, Rukavina Mikusic NL, Kravetz MC, Rosón MI, Rodríguez Fermepín M, Fernández BE. Renal dopaminergic system: pathophysiological implications and clinical perspectives. *World J Nephrol* 2015; 4(2) 196-212.

SEMBLANZA DEL PROF. DR. JORGE DANIEL COUSSIO

El Dr. Jorge D. Coussio se recibió de Farmacéutico (1957) y de Bioquímico (1959) en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires e hizo también su doctorado allí, recibiendo el título de Dr. en Farmacia y Bioquímica en 1962. Perteneció a la Carrera del Investigador Científico, llegando a la categoría de Investigador Superior en 1996.

Comenzó sus tareas docentes desempeñándose primero como ayudante y luego como Jefe de Trabajos Prácticos en la Cátedra de Farmacodinamia y Valoración Biológica de Medicamentos. De esa época datan sus primeros trabajos científicos sobre temas farmacológicos junto con el Dr. Juan A Izquierdo y el Dr. Iván Izquierdo.

Con posterioridad fue designado Jefe de Trabajos Prácticos en el Departamento de Farmacología para el dictado de la Orientación Farmacognosia. Por un período de un año ocupó un cargo de Profesor Titular de Farmacognosia en la Universidad Nacional de Córdoba. A su regreso a la Universidad de Buenos Aires, es nombrado como Profesor Titular con dedicación exclusiva en el Departamento de Biología, Botánica y Farmacognosia para el dictado esta última asignatura. En ese cargo permaneció como Profesor Plenario hasta su retiro en 2000, siendo nombrado luego Profesor Consulto.

Ocupó distintos cargos de importancia en la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Fue Director primero del Departamento de Bioquímica Vegetal y luego del de Farmacología en varias oportunidades. En 1968 fue designado Secretario Académico y entre 1980-1983 fue vicedecano durante el Decanato del Dr. Claudio Sanahuja. En 1982 fue designado Director del Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA), un instituto UBA-CONICET, cargo que desempeñó hasta 2005.

Recibió los siguientes premios: Bernardo Houssay (2003); Académicos Ilustres Prof. A. Bandoni y Luis de Prado (1994) ; Premio CAEME (1979, 1991); Premio Félix de Azara (1984, 1988). Entre otras distinciones, fue además Miembro Titular de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica desde 1978 y Miembro Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de España desde 1987. Actuó como Profesor Visitante en el Instituto de Química de la Universidad Católica del Sacro Cuore y en el Instituto de Productos Naturales de la Universidad de Munich (1970), en la Universidad Central de Venezuela (1978) y en la Universidad Luis Pasteur, Estrasburgo (1980).

Publicó más de 200 trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales, participó en 3 capítulos de libros y presentó sus trabajos en más de 200 congresos científicos de alcance nacional e internacional. Junto con los Dres. R. Rondina y A. Bandoni editó un CD sobre “Plantas silvestres argentinas con reconocidas propiedades medicinales y/o tóxicas”, una base de datos donde se describen los nombres científicos y vulgares y los usos de más de 1500 especies que crecen en la República Argentina y que es de referencia y consulta para los colegas latinoamericanos.

Este es solo un breve resumen de sus antecedentes académicos y científicos. Más importante aún es señalar aspectos sobresalientes relacionados a su personalidad.

En relación a la actividad docente: representó frente a los alumnos una imagen más informal y desestructurada del profesor, incorporando a sus clases teóricas, además de los contenidos propios de la asignatura, comentarios acerca de las últimas investigaciones en el ámbito de los productos naturales.

Además, fue un innovador al implementar una guía teórica para los alumnos, en la que se incluía al final de cada capítulo, correspondiente a los diferentes grupos fitoquímicos, un listado de las principales especialidades medicinales del mercado farmacéutico que contenían extractos o principios activos de origen vegetal. De esta forma vinculaba el conocimiento impartido en sus clases con conceptos que debería manejar el futuro farmacéutico en su actividad profesional.

Fue también un innovador en investigación. Fue uno de los pioneros en la investigación de plantas medicinales argentinas con vistas a una aplicación farmacéutica. Formó en la Cátedra de Farmacognosia un grupo de investigación que se transformó en referente en el análisis de productos naturales bioactivos. Estaba siempre al tanto de las últimas tendencias en la investigación y atento a las últimas novedades en equipamiento. Así, en 1983 introdujo en la Cátedra la primer

computadora, una Apple cuyo costo fue de cerca de 8000 U\$\$, con fondos gestionados ante el Instituto Nacional de Farmacología. Se Implementó además dos cursos de capacitación para que los docentes aprendieran el manejo de esta nueva herramienta. También trajo uno de los primeros equipos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) a la Cátedra.

Una cualidad que merece destacarse del Dr. Coussio fue su habilidad de gestionar recursos tanto económicos como humanos. Fue uno de los creadores del Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA) en 1982, que nucleó en un principio a las Cátedras de Farmacognosia, Química Medicinal y Control de Calidad de Medicamentos. Este instituto fue sufriendo distintas incorporaciones y bajas de grupos hasta ser lo que es en la actualidad, pero siempre manteniendo el espíritu primitivo vinculado a la investigación del fármaco bajo sus distintos aspectos. Hábil conocedor de la gente y de las oportunidades, manifestó siempre ante terceros el aprecio por sus colaboradores. Dueño de un permanente sentido del humor supo crear en el instituto un cálido ambiente de trabajo. Por eso todo el personal de la Cátedra de Farmacognosia y del IQUIMEFA guarda el mejor de los recuerdos.

Dra. Virginia Martino

HOMENAJE AL DR. JOSE ALBERTO SANTOMÉ

26 de Noviembre de 2015

Mis palabras no tienen más pretensión que la de recordar juntos a quien fuera un maestro, un académico, un pionero de la ciencia argentina.

José Alberto Santomé nació en 1927 y creció en el seno de una familia feliz. Después de sus estudios en el Colegio Nacional Rivadavia pasó a la UBA de donde egresó luciendo los títulos de Farmacéutico, Bioquímico y Dr. en Farmacia y Bioquímica. En 1959 recibió el Premio Facultad que se otorga a la mejor tesis doctoral del año.

En 1963 se integró al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica como Profesor Adjunto, en 1967 fue designado Profesor Titular y en 1993 Profesor Emérito de la Universidad de Buenos Aires.

Como investigador, alcanzó la categoría de Investigador Superior del CONICET. Se abocó al estudio de las hormonas de crecimiento hasta principios de la década del 90. Desde entonces, abordó el estudio de las proteínas ligadoras de ácidos grasos.

En relación a las hormonas hipofisarias, en 1966 y con el apoyo de Bernardo Houssay se integró el Centro para el Estudio de las Hormonas Hipofisarias, con Alejandro Paladini y Juan Modesto Dellacha y Juan José Heinrich y César Bergadá, médicos del Centro Endocrinológico del Hospital de Niños, con el fin de aplicar la hormona de crecimiento purificada a partir de hipófisis humanas al tratamiento de niños con defectos hipofisarios. Luego de más de una década de investigación se logró administrar una hormona de crecimiento humana a un niño con enanismo con resultados alentadores.

Por otra parte, se había demostrado que las hormonas de crecimiento constituyen un grupo de proteínas con una peculiar especificidad ya que las hormonas de otros mamíferos no son activas en primates. Era muy importante, entonces, comparar sus estructuras e intentar modificarlas para hacerlas activas en humanos.

Pero para brindar el soporte básico que estas actividades requieren, se necesitaba utilizar herramientas analíticas de avanzada. Paladini, Santomé y González Cadavid habían armado el primer analizador de aminoácidos del país. Eran tiempos de ciencia artesanal en que los investigadores no sólo debían estar actualizados sino también tener habilidad manual y conocimientos técnicos que les permitiera lidiar con aparatos únicos en el país. La actividad biológica se determinaba en ratas hipofisoprivas, Santomé perfeccionó el delicado sistema que permitía la hiposifectomía.

La primera reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB) que tuvo lugar en esta Facultad, en nuestro Departamento de Química Biológica, lo escuchó relatar los primeros avances en aspectos estructurales de las hormonas de crecimiento. Más tarde sería Presidente de SAIB.

Por aquel entonces, cuando solo se conocía la estructura primaria de 4 o 5 proteínas, Santomé encaró con todo su grupo de trabajo el gran desafío de secuenciar varias hormonas de crecimiento por el método de Edman, manual. Se muestra una imagen que es histórica para quienes lo acompañamos en el emprendimiento. Es un pizarrón en que día a día agregábamos un nuevo residuo a la secuencia de alguna hormona.

Terminada la determinación de la estructura primaria de varias de ellas, se inició el estudio de la relación estructura-función.

Los resultados de 20 años de labor bajo su dirección junto con métodos de predicción de estructura permitieron postular un modelo espacial de la hormona de crecimiento bovina. Entre 80 y 90% del modelo fue posteriormente confirmado por difracción de rayos X.

En todos esos años conocí la dedicación del maestro, la seriedad del investigador y la serena y firme personalidad del ser humano.

Por otra parte, toda la actividad vinculada a estos temas fructificó en la realización de 11 tesis doctorales.

Santomé tenía un alto concepto de la inserción de la investigación en la Universidad y de la realimentación de la Institución a partir de la formación de recursos humanos, capaces de elevar la calidad del grado y del posgrado. La mayor parte de quienes fueron sus discípulos ocupa cargos destacados en el ámbito científico-tecnológico en el país o en el extranjero.

Preocupado por el destino institucional luchó por la autonomía universitaria desde muy joven.

Fue miembro del Consejo Directivo de la Facultad, de múltiples Comisiones Asesoras, Director del Departamento de Química Biológica de esta Facultad, Miembro de Comisiones Asesoras y Junta de Calificaciones del CONICET y del Consejo Directivo del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas.

Miembro de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica,

De la Academia de Ciencias del Tercer Mundo, de la Academia de Ciencias de América Latina, de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires. Hasta pocos meses antes de su enfermedad trabajó intensamente para la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

Siempre ví a Santomé tomar decisiones muy elaboradas, maduradas concienzudamente y una vez tomadas luchar por ellas con firmeza, casi con tenacidad. Él estaba convencido de la necesidad de implementar un Centro de prestación de servicios especializados de alta complejidad, en péptidos y proteínas y según normas internacionales. Luchó por ello durante seis años. Lo vimos superar callado, sin altibajos, momentos de incompreensión y decepción. Finalmente, en 1990 se inauguró el hoy bien reconocido LANAIS-PRO, entonces único en Latinoamérica. Su desarrollo apoyó tanto la excelencia académica como la transferencia de conocimientos y fortaleció la vinculación de los centros de investigación con el sector productivo. Bregó por fomentar la conciencia de la importancia del control de calidad de los productos farmacéuticos elaborados en el país y de los que se importa. Se muestra una imagen de Santomé analizando algún resultado al pié de los equipos, pero los equipos sólo pueden aumentar el rendimiento de las ideas. Su capacidad intelectual, su esfuerzo y permanencia constantes, la selección de los recursos humanos que lo acompañaron, fueron los factores más importantes para el funcionamiento exitoso del LANAIS-PRO..

En otro orden de cosas, convencido de la necesidad de brindar asesoramiento especializado, Santomé aportó su experiencia como asesor de BIOSIDUS. Uno de los productos de ese laboratorio es la hormona de crecimiento humana.

Y bien, la imagen del mundo privado de un académico refleja su pertenencia social y su mundo cultural, más allá de lo profesional. Santomé encontró en Beatriz Schiavi, la compañera de todos los momentos; realmente formaron una pareja increíble! Durante sus 60 años de matrimonio transmitieron el amor y la calidez propios de una vida en armonía. La entrega de diploma a su hijo Jorge, quien hoy nos acompaña, debió ser particularmente emotiva.

Alberto amaba la música, disfrutaba con el contacto de la naturaleza y podía pasar largo rato observando pájaros o sus peces o trabajando sus orquídeas. Su embarcación, el Dinghi, fue testigo de muchas horas compartidas en familia, o con amigos; en la imagen con Ulf Hellman, químico de proteínas de la Universidad de Uppsala, tan amigo y que adhiere a este homenaje desde Suecia. Esos paseos estimulaban otro hobby, el de la pesca, para felicidad de sus nietos.

La foto está tomada el 14 de Oct de 2011, el último día que fue al Departamento de Química Biológica donde con Juan Dellacha, quién también nos acompaña hoy, nos regalaron un interesantísimo seminario y anunciaron la edición del libro “Hormona de crecimiento. Epopeya científica argentina” con Santomé y Dellacha como autores de la descripción científica.

En resumen:

una vida pródiga,

solidaridad en cada gesto,

incondicional entrega a la ciencia,

semillero de frutos ya maduros.

Testimonio y legado.

Con nuestro reconocimiento les pido un minuto de silencio en su memoria.

HOMENAJE DR. HORACIO B. RODRIGUEZ

3 de mayo de 2015

Nació en 1928 en Chivilvoy (Pcia. Bs.As.).

Se recibió de Farmaceutico en 1950 y Bioquímico en 1955 en la Farmacia y Bioquímica en UBA. Ejerció en Farmacias, Laboratorios Bioquímicos y la Industria farmacéutica y cosmética nacionales e internacionales.

Fue Profesor y Rector “organizador” del “Colegio de Estudios Secundarios” conocido como colegio polimodal N° 2 “Florida Blanca” de San Julián-Santa Cruz.

Entre los años 1950-1954 fue Ayudante, Ayudante Diplomado y Jefe de Trabajos Prácticos en la Cátedra de Química Orgánica y Síntesis Medicamentos Orgánicos - Profesor Luis Cresta de la Facultad de Farmacia y Bioquímica –UBA.

En el Hospital de Niños “R. Gutiérrez” de la Ciudad de Buenos Aires (1948-51) se desempeñó como Practicante Honorario de Farmacia, Practicante Mayor de Farmacia (1948) y Practicante Honorario de Bioquímica (1949).

Fue Farmacéutico Sub-Jefe y Jefe de Farmacia del Hospital Español de la Ciudad de Buenos Aires (1950); Jefe de Farmacia y Sub-jefe de Departamento del Laboratorio y Farmacia. Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación - Dirección de Obra Social.

A partir del año 1957 se radicó en San Julian en donde desarrolló sus actividades siendo el Primer Bioquímico del Hospital Regional Puerto San Julián (1957-1959).

En San Julián instaló una Farmacia y un Laboratorio de Análisis Clínico – Ejercicio profesional y propietario – San Julián y años más tarde Capital Federal.

En la Industria Farmacéutica y Cosmético desarrolló su actividad como gerente y director en BUROFARM S.R.L. – Especialidades Farmacéuticas, LIPRANDI LABORATORIOS S.A , BYK – LIPRANDI S.A., DR. LAZAR Y CIA. S.A. – U.C.B. , VIA PHARMA S.A Y VIALORENZ S.A. (“VIAVALROSSA”).

Paralelamente realizó trabajos de investigación que publicó en revistas especializadas.

Fue miembro activo ocupando cargos directivos de la Asociación Argentina de Farmacia y Bioquímica Industrial (SAFYBI), la Asociación Argentina de Químicos Cosméticos, el Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal, Presidente de la Asociación Bioquímica Argentina durante 7 periodos consecutivos, Vicepresidente de la Confederación Bioquímica Argentina, Asesor de la Cámara de Diputados de la Provincia de Santa Cruz- Área de Salud, -Representante por ABA en el Tribunal Examinador de Prueba Final de Capacitación profesional (bioquímica) de egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad J.A. Mazza (Mendoza).

Presidió el II Congreso Argentino de Bioquímica donde se iniciaron las Jornadas de Enseñanza y Ejercicio de la Bioquímica de la Asociación de Bioquímica Argentina. Esta organización le otorgó el premio a la trayectoria al cumplir el 75º aniversario.

Fue Secretario General “organizador” del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal.

En la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica fue Vicepresidente y Secretario General y Académico Emérito

El Dr. Rodríguez y el Dr. Iovine escribieron la “Historia de la Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica (AAFyB)- Origen, naturaleza y evolución a Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica” publicada por Editorial Dunken en 2011