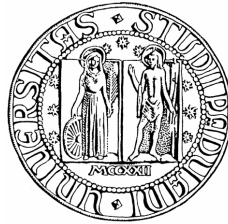


Università degli Studi di Padova
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.



Laurea di primo livello in Biologia Molecolare

Elaborato di laurea

**TEST DI NEFROTOSSICITA' IN VITRO:
L'USO DELLE "RENAL CORTICAL SLICES"**

Tutor: **Prof. ANDREA TREVISAN**
Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica

Co-Tutor: **Dr. EDOARDO ZANETTI**
Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica

Laureanda: **MARTINA MARINELLO**

Anno Accademico 2006-2007

Sommario

Abstract	4
1. Introduzione	5
1.1 Anatomia e fettine renali	5
1.2 Fisiologia e fettine renali.....	6
1.2.1 Energia cellulare	6
1.2.2 Meccanismi di trasporto.....	6
1.2.3 Metabolismo <i>in situ</i>	6
2. Scopo della tesi	8
3. Materiali e metodi	9
3.1 Preparazione delle fettine di corteccia renale.....	9
3.2 Dosaggio della malonildialdeide.....	9
3.3 Determinazione del riassorbimento del PAI	10
3.4 Inattivazione della cistein-coniugato β -liasi.....	10
4. Risultati	12
4.1 Perossidazione lipidica.....	12
4.2 Riassorbimento del PAI	12
4.3 Protezione dagli effetti della TCVC per mezzo dell' AOAA, inibitore specifico della cistein-coniugato β -liasi.....	13
5. Discussione	14
6. Conclusioni	16
Bibliografia	17

Abstract

L'uso delle fettine di tessuto è stato introdotto alcuni anni fa per valutare fenomeni fisiologici e biochimici come la respirazione tissutale. All'inizio, le fettine di tessuto sono state utilizzate per studiare il fegato, ma più tardi sono state introdotte le fettine di rene per studiare i processi di trasporto.

Nel presente elaborato vengono riportati gli studi di tossicità eseguiti in vitro mediante il modello sperimentale delle fettine di corteccia renale. Per mezzo di questo modello sperimentale sono stati studiati gli effetti nefrotossici di un metabolita cistein-coniugato del tetracloroetilene, la triclorovinilcisteina (TCVC). Sono stati inoltre studiati gli effetti dell'acido aminoossiacetico (AOAA) sulla tossicità indotta dalla TCVC. L'AOAA è un inibitore specifico degli enzimi piridossal-fosfato dipendenti, classe cui appartengono anche la transaminasi di cui fanno parte le cistein-coniugato β -liasi. La TCVC causa in vitro sul modello sperimentale delle fettine di corteccia renale una importante perossidazione lipidica dose-dipendente, come dimostrato dal rilevante rilascio di MDA nel medium di incubazione. La perossidazione lipidica appare particolarmente rilevante quando le fettine sono cimentate con la concentrazione più elevata di TCVC (1,0 mM). Oltre che indurre perossidazione lipidica, la TCVC causa una riduzione significativa del riassorbimento del PAI del 50% con la dose 0,5 mM e del 70 con quella 1,0 mM. La dose più bassa (0,1 mM) non causa invece variazioni significative del riassorbimento degli anioni organici.

Il pretrattamento con l'AOAA, inibitore specifico della cistein-coniugato β -liasi riduce in maniera significativa (circa della metà) gli effetti causati dalla concentrazione 1,0 mM di TCVC sia quelli sulle membrane (perossidazione lipidica), sia quelli sul trasporto e il riassorbimento degli anioni organici. I risultati dimostrano chiaramente come la TCVC sia tossica per il tubulo prossimale, causando una rilevante perossidazione lipidica dose-dipendente ed una riduzione importante del riassorbimento (e quindi del trasporto) del PAI. La tossicità tubulare causata dalla TCVC viene in parte prevenuta dal pretrattamento con l'AOAA, evidenziando come uno dei meccanismi di tossicità del metabolita sia determinato dal clivaggio del cistein-coniugato ad un tiochetene. Alla tossicità, vista la sola parziale protezione offerta dall'AOAA, potrebbe ulteriormente concorrere un effetto di tipo diretto, un effetto ischemico o meccanismi al momento non noti.

1. Introduzione

L'uso delle fettine di tessuto è stato introdotto alcuni anni fa per valutare fenomeni fisiologici e biochimici come la respirazione tissutale. All'inizio, le fettine di tessuto sono state utilizzate per studiare il fegato, ma più tardi sono state introdotte le fettine di rene per studiare i processi di trasporto (Forester, 1948, Cross e Taggart, 1950).

Più recentemente, le conoscenze acquisite sui meccanismi fisiologici renali sono state applicate per studiare gli effetti tossici delle sostanze xenobiotiche. Da allora, un numero rilevante di sostanze nefrotossiche (farmaci e sostanze chimiche come metalli e solventi) sono stati studiati *in vitro* per mezzo del modello sperimentale delle fettine di corteccia renale (Hook et al, 1982; Smith et al, 1982; Smith e Hook, 1983; Smith, 1988; Wolfgang et al, 1989a; Trevisan et al, 1993; Zhang et al, 1994).

1.1 Anatomia e fettine renali

Il rene di piccoli animali (topi, ratti e conigli) ha una semplice organizzazione unipapillare (Figura 1): tagliando lungo l'asse cortico-papillare, dalla superficie sono distinguibili la corteccia, la midollare esterna (divisa ulteriormente in striscia esterna ed interna) e la midollare interna. I nefroni, conformemente alla loro distribuzione nella corteccia, sono distinguibili in superficiali, medio-corticali e juxtamidollari (vicini alla midollare esterna). Inoltre, la corteccia è suddivisa nel labirinto corticale che contiene i glomeruli, i segmenti convoluti del tubulo prossimale (segmento S_1), i tubuli convoluti distali, i tubuli connettori e l'inizio dei tubuli collettori, oltre ai vasi interlobulari e al gomitolino dei capillari, e nei raggi midollari che contengono i tubuli retti prossimali e distali (segmento S_3) e i dotti collettori. Il segmento S_2 del tubulo prossimale inizia nel labirinto corticale e continua nei raggi midollari. La *pars recta* (l'ultima porzione del segmento S_2 e l'intero segmento S_3) dei nefroni superficiali e juxtamidollari è generalmente localizzata nella zona corticale vicino alla striscia esterna della midollare esterna.

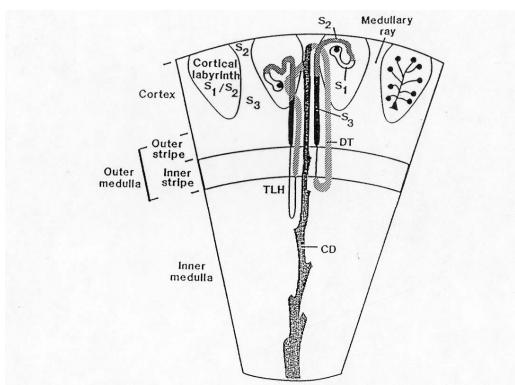


Figura 1 – sezione cortico-midollare

1.2 Fisiologia e fettine renali

L'elevato flusso sanguigno nella corteccia renale apporta elevate concentrazioni di sostanze anche tossiche e le strutture della corteccia, prevalentemente i tubuli prossimali, sono molto vulnerabili agli insulti da parte delle sostanze chimiche. Mediante il modello delle fettine di corteccia renale è possibile ottenere *in vitro* lo stesso aspetto di danno cellulare selettivo ottenibile *in vivo*, suggerendo che la nefrotossicità non è soltanto dovuta al convogliamento al rene di sostanze tossiche, ma anche alle intrinseche proprietà dei singoli tipi cellulari. Queste proprietà sono correlate a) all'energia cellulare, b) ai meccanismi di trasporto e c) al metabolismo *in situ* delle sostanze xenobiotiche.

1.2.1 Energia cellulare

La corteccia renale ha un importante gradiente di ossigeno: la pressione di ossigeno a livello corticale è di circa 70-90 mm Hg, simile alla pressione di ossigeno arteriosa. La pressione di ossigeno decresce in maniera rilevante al di sopra della congiunzione cortico-midollare (10-20 mm Hg), assai vicino alla pressione critica, livello cui la citocromo ossidasi mitocondriale si riduce assieme alla respirazione (Balaban e Silvia, 1981). I segmenti S₁ e S₂ del tubulo prossimale hanno *in vivo* il maggior consumo di ossigeno, mentre la *pars recta* è maggiormente suscettibile all'ipossia (Ruegg e Mandel, 1990). La mancanza di ossigeno *in vivo* causa un'ulteriore riduzione della perfusione a livello della midollare esterna con conseguente anossia del segmento S₃, mentre i segmenti S₁ e S₂ estraggono l'ossigeno necessario dalle ramificazioni capillari prossimali. D'altro canto, i segmenti S₁ e S₂ sono più suscettibili all'ipossia indotta *in vitro* (Wolfgang et al, 1989b; Ruegg e Mandel, 1990), suggerendo come la mancanza di ossigeno che causa un danno di questi segmenti sia legata ad una uniformità regionale nel trasporto di ossigeno e che le cellule dei segmenti S₁ e S₂ sono intrinsecamente più suscettibili agli effetti della privazione di ossigeno.

1.2.2 Meccanismi di trasporto

Il trasporto degli ioni organici è un processo attivo che può concentrare le sostanze nefrotossiche a livello cellulare. Il trasporto degli anioni organici avviene a livello della membrana baso-laterale (*lumen* vascolare) e sono presenti almeno quattro sistemi di trasporto fondamentali (Ullrich e Rumrich, 1988): 1) sistema solfato/ossalato; 2) sistema di co-trasporto Na⁺-dicarbossilato; 3) sistema del p-aminoippurato (PAI) e 4) sistema di trasporto di piccoli acidi grassi e sostituiti come il lattato. Il sistema di trasporto del PAI è probenecide-sensibile. Studi nei conigli hanno localizzato il trasporto del PAI prevalentemente nel segmento S₂ (McKinney, 1982), mentre studi nei ratti prevalentemente nel segmento S₃ (Roch-Ramel e Weiner, 1980). Al contrario, è presente un solo trasportatore di cationi che nel coniglio (McKinney, 1982) è attivo nel segmento S₁ dei nefroni superficiali e nei segmenti S₁/S₂ dei nefroni juxtamidollari.

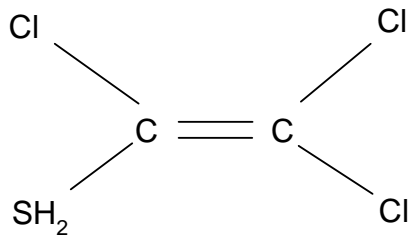
1.2.3 Metabolismo *in situ*

Il metabolismo ossidativo renale è minore (il contenuto in citocromo P-450 è circa il 10%) di quello del fegato (Zenser et al, 1978). Nella corteccia renale il maggior contenuto in citocromo P-450 è nel tubulo prossimale e il segmento S₂, nel coniglio, ne contiene la maggior parte. Nel rene di ratto sono state identificate

diverse isoforme dell'enzima (Tarloff et al, 1990) quali l'isoforma 1A1, 2C2, 2D1, 2D2, 4A1 e, in particolare, 2E1. Sono state inoltre evidenziate differenze legate al sesso, poiché il contenuto in citocromo P-450 è 3-4 volte maggiore nei maschi che nelle femmine (nel ratto). La castrazione riduce il contenuto enzimatico nei maschi, ma non nelle femmine, mentre il trattamento delle femmine e dei maschi castrati con testosterone ne aumenta il contenuto. Ciò suggerisce che l'espressione renale dell'enzima è inducibile dagli androgeni (Henderson et al, 1990; Henderson e Wolf, 1991). Anche l'attività della glutatione S-transferasi è minore che nel fegato. Nel ratto l'enzima è localizzato nel tubulo prossimale e nel coniglio è presente solo nei segmenti S₂ e S₃ (Fine et al, 1978). Il catabolismo e la sintesi del glutatione, inoltre, avviene prevalentemente nel segmento S₃. La cistein-coniugato β -liasi, infine, non è stata ancora definitivamente localizzata, perchè alcuni autori (Jones et al, 1988) mostrano una uniforme distribuzione lungo tutti e tre i segmenti, mentre altri (MacFarlane et al, 1989) suggeriscono una prevalente localizzazione nel segmento S₃. Più recentemente, Kim et al (1997) e Trevisan et al (1998), pur con tecniche differenti, concordano con una uniforme localizzazione lungo tutto il tubulo prossimale.

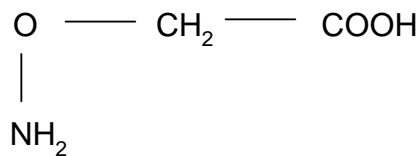
2. Scopo della tesi

Nel presente elaborato vengono riportati gli studi di tossicità renale eseguiti *in vitro* mediante il modello sperimentale delle fettine di corteccia renale. Attraverso questo modello sono stati studiati gli effetti nefrotossici di un metabolita cistein-coniugato del tetracloroetilene, la triclorovinilcisteina (TCVC). La TCVC è un derivato cisteinico del metabolismo degli acidi mercapturici dopo coniugazione col glutatone ridotto del tetracloroetilene.



Formula di struttura della TCVC

Sono stati inoltre studiati gli effetti dell'acido aminoossiacetico (AOAA) sulla tossicità indotta dalla TCVC. L'AOAA è un inibitore specifico degli enzimi piridossal-fosfato dipendenti, classe cui appartengono anche le transaminasi di cui fa parte la cistein-coniugato β -liasi.



Formula di struttura dell'AOAA

3. Materiali e metodi

3.1 Preparazione delle fettine di corteccia renale

Le fettine di corteccia renale vengono preparate da reni di ratti Wistar, maschi, adulti (età 3 mesi). Immediatamente dopo il prelievo, i reni vengono immersi in soluzione salina fredda e per mezzo di uno strumento appositamente costruito, lo “slicer” di Brendel-Vitron (Figura 2), sono preparate fettine di corteccia renale (100 ± 10 grammi) dello spessore di circa $250\ \mu\text{m}$ (è necessario uno spessore inferiore a $500\ \mu\text{m}$ per permettere l’adeguata perfusione da parte dell’ossigeno).

Appena preparate, le fettine vengono immerse in un *medium* composto da NaCl 97 mM, KCl 40 mM, CaCl_2 0,74 mM e tampone Na/fosfato 7,4 mM, pH7,4 (*medium* di incubazione) fino alla fine del completo processamento per allontanare il sangue e gli enzimi rilasciati dalle cellule danneggiate durante il processo di “slicing”.



Figura 2 – “slicer” di Brendel-Vitron

Dopo la preparazione, le fettine vengono trasferite in beute da 25 ml contenenti 4 ml di *medium* di incubazione (vedi sopra) e trattate con $10\ \mu\text{l}$ di soluzione 0,1, 0,5 e 1 mM di TCVC disciolta nel *medium* di incubazione mediante una microsiringa Hamilton. Alle beute di controllo sono stati aggiunti ulteriori $10\ \mu\text{l}$ di *medium* di incubazione.

Le beute sono state quindi tappate con tappi in gomma, e le fettine trattate per 5 minuti sotto flusso di ossigeno al 100% di 3 l/minuto. Successivamente le fettine sono state incubate a 37°C per 90 minuti in un bagno agitato tipo Dubnoff a 100 cicli/minuto.

Ogni campione è stato testato in triplicato e con due test successivi.

3.2 Dosaggio della malonildialdeide

Al termine dell’incubazione, le fettine sono state trasferite in un nuovo *medium* di incubazione mentre quello prelevato alla fine dell’incubazione è stato processato per il dosaggio della malonildialdeide (MDA) col metodo di Younes e Siegers (1981).

La MDA è il marker della perossidazione lipidica e la metodica prevede il trattamento di 1 ml di *medium* con 1 ml di acido tricloroacetico al 10%. Il campione viene quindi centrifugato per 15 minuti a 3500 rpm e ad 1 ml di supernatante vengono aggiunti 1,2 ml di acido tiobarbiturico 0,67% in H₂O. Il tutto viene fatto bollire per 15 minuti con successivo raffreddamento in ambiente per 30 minuti. Le letture vengono eseguite a 535 nm contro H₂O. La concentrazione di MDA viene espressa in nmoli 100 mg di tessuto⁻¹.

3.3 Determinazione del riassorbimento del PAI

Dopo la prima incubazione con la sostanza tossica e il lavaggio, le fettine vengono reincubate per 90 minuti a 25°C in un bagno agitato tipo Dubnoff a 100 cicli/minuto sotto flusso di ossigeno al 100% di 1 l/minuto in un medium di incubazione arricchito con 1 mM di lattato (acido lattico) e 75 µM di PAI (acido p-aminoippurico) per studiare il riassorbimento di questo anione organico. Alla fine dell'incubazione, le fettine vengono rapidamente trasferite in una soluzione al 3% di TCA (10 ml/100 mg di tessuto) per evitare l'efflusso del PAI e omogenate con omogenizzatore Politron. Ad una aliquota di 1 ml del *medium* di incubazione vengono aggiunti 4 ml di TCA al 3%. Omogenato e *medium* sono quindi centrifugati a 1000g per 10 minuti a temperatura ambiente e il supernatante viene preparato per la determinazione del PAI con la metodica di Smith et al (1945) come segue: a 2 ml di supernatante (omogenato e *medium*) sono stati aggiunti 0,4 ml di HCl 1,2 N e 0,2 ml di NaNO₂ 0,1%. Dopo 4 minuti sono stati aggiunti 0,2 ml di ammonio solfamato 0,5% e dopo altri 4 minuti 0,2 ml di N-(1-naftil)etilendiamina dicloruro 0,1%. Dopo 10 minuti i campioni sono stati letti a 540 nm. Il contenuto in PAI delle fettine è espresso in µg g tessuto⁻¹, quello del *medium* in µg ml⁻¹. Per determinare la quota riassorbita di PAI si divide il contenuto delle fettine per quello del *medium* e il risultato viene espresso come rapporto fettine(F)/*medium*(M).

3.4 Inattivazione della cistein-coniugato β-liasi

La cistein-coniugato β-liasi è una transaminasi presente in numerosi organi e tessuti, ma molto attiva anche nel rene, in grado di metabolizzare i cistein-coniugati derivanti dalla sintesi di acidi mercapturici (Figura 3) in amoniaca, acido piruvico e un tiochetene cui sono imputati gli effetti nefrotossici.

Un inibitore noto delle transaminasi è l'acido aminoossiacetico (AOAA) che viene utilizzato per studiare i meccanismi di tossicità via cistein-coniugato β-liasi. La protezione totale o parziale degli effetti tossici sul rene, causati dalle sostanze xenobiotiche, suggerisce come uno dei meccanismi d'azione sia quello legato alla via delle β-liasi.

In breve, prima dell'incubazione con la sostanza xenobiotica in esame le fettine si preincubano a 37°C in un bagno agitato tipo Dubnoff a 100 cicli/minuto (senza flusso di ossigeno) per 30 minuti in un *medium* arricchito con AOAA 10⁻³ M, procedendo poi come indicato.

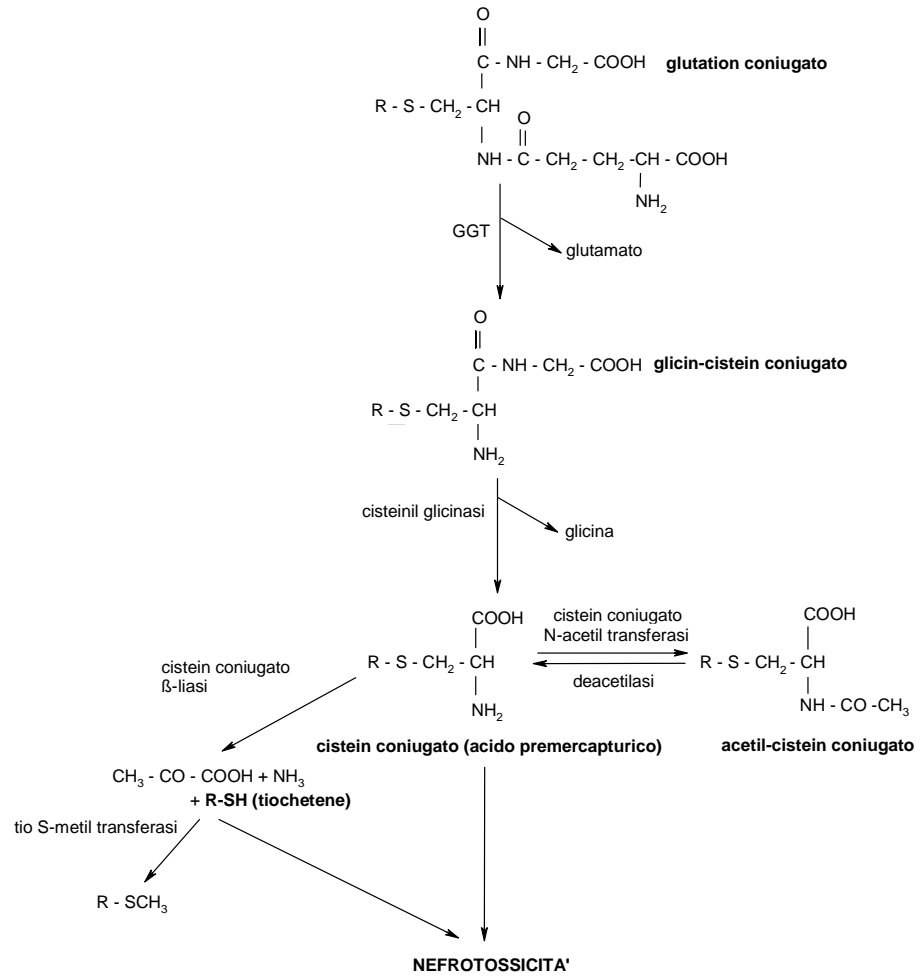


Figura 3 – sintesi degli acidi mercapturici e tossicità renale.

4. Risultati

4.1 Perossidazione lipidica

La TCVC causa in vitro sul modello sperimentale delle fettine di corteccia renale una importante perossidazione lipidica dose-dipendente (Figura 4), come dimostrato dal rilevante rilascio di MDA nel *medium* di incubazione. La perossidazione lipidica appare particolarmente significativa quando le fettine sono cimentate con la concentrazione più elevata di TCVC (1,0 mM).

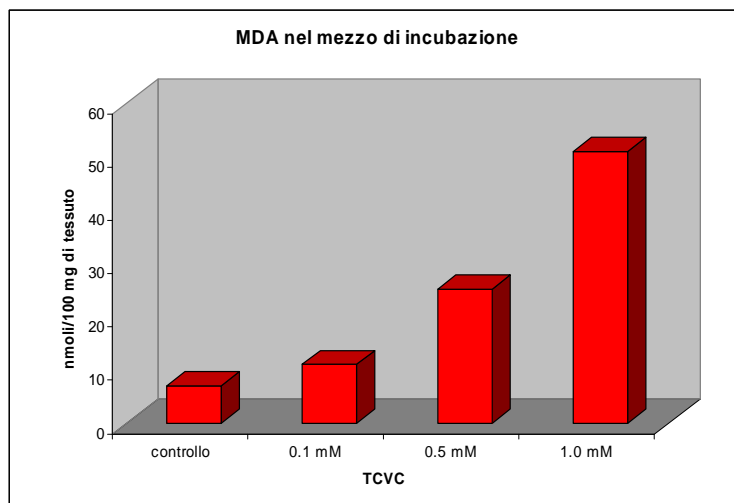


Figura 4 – MDA nel medium di incubazione con e senza trattamento con TCVC a tre differenti concentrazioni.

4.2 Riassorbimento del PAI

Oltre che indurre perossidazione lipidica, la TCVC causa una riduzione significativa del riassorbimento del PAI (Figura 5), del 50% con la dose 0,5 mM e del 70% con quella 1,0 mM. La dose più bassa (0,1 mM) non causa invece variazioni significative del riassorbimento degli anioni organici.

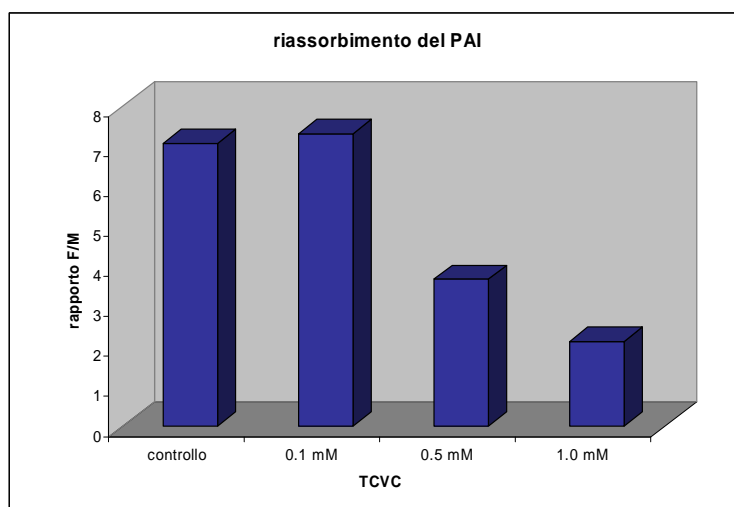


Figura 5 – Riassorbimento del PAI da parte delle fettine di corteccia renale dopo trattamento con TCVC a tre differenti concentrazioni.

4.3 Protezione dagli effetti della TCVC per mezzo dell'AOAA, inibitore specifico della cistein-coniugato β -liasi.

Il pretrattamento con l'AOAA, inibitore specifico della cistein-coniugato β -liasi, riduce in maniera significativa (circa della metà) gli effetti causati dalla concentrazione 1,0 mM di TCVC, sia quelli sulle membrane (perossidazione lipidica) (Figura 6), sia quelli sul trasporto e il riassorbimento degli anioni organici (Figura 7).

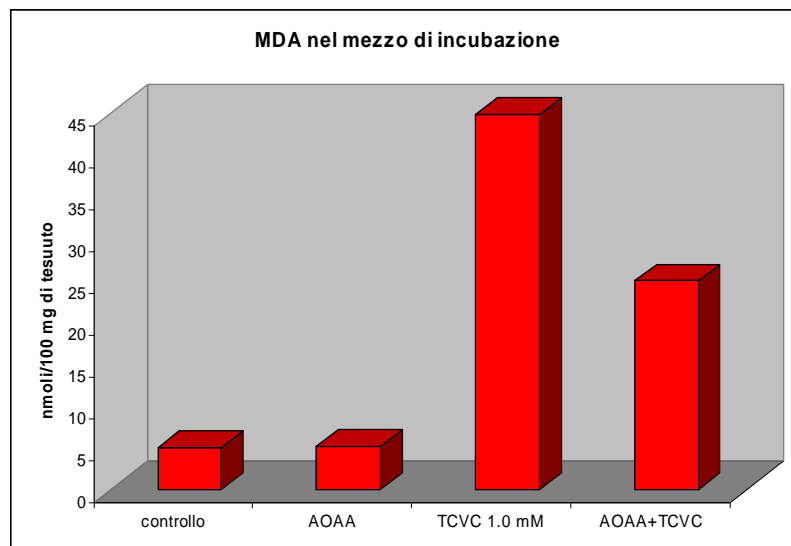


Figura 6 – Influenza dell'AOAA, inibitore della cistein-coniugato β -liasi, sulla perossidazione lipidica (evidenziata dalla presenza di MDA nel mezzo di incubazione) causata dalla TCVC alla concentrazione 1,0 mM.

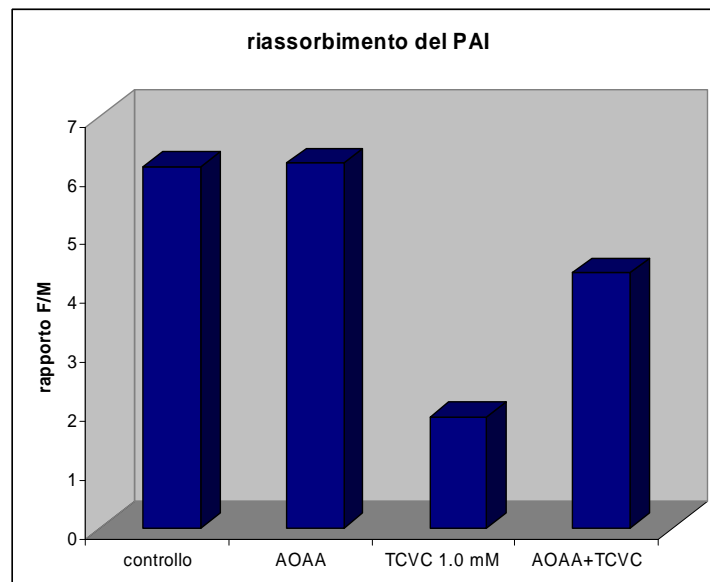


Figura 7 – Influenza dell'AOAA, inibitore della cistein-coniugato β -liasi, sull'inibizione del riassorbimento del PAI da parte delle fettine di corteccia renale causata dalla TCVC alla concentrazione 1,0 mM.

5. Discussione

Il modello sperimentale delle fettine di corteccia renale (“renal cortical slices”) è una tecnica di sperimentazione *in vitro* che permette di ottenere importanti risultati, essendo la fettina una porzione di rene architettonicamente integra. Tale tecnica può essere associata o precedere una sperimentazione *in vivo* o *ex vivo*. Inoltre, è possibile misurare numerosi parametri nel *medium* di incubazione, nelle fettine o entrambe.

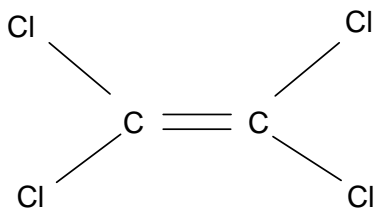
Nelle fettine è possibile determinare il contenuto in glutazione ridotto, possono essere studiate le vie metaboliche ossidative, il consumo di ossigeno, il contenuto in ATP, l'attività Na/K-ATPasi oltre a numerose altre attività enzimatiche; nel *medium* di incubazione sono misurabili il contenuto in glucosio, gli enzimi e altri metaboliti rilasciati dalle cellule danneggiate. Il rilascio di enzimi può essere informativo sul sito subcellulare del danno o sul segmento danneggiato. Gli enzimi citosolici (Trevisan et al, 1992) appaiono però più sensibili di quelli dell'orletto a spazzola. Oltre a ciò è possibile valutare il grado di perossidazione lipidica mediante il dosaggio della MDA e valutare lo stato del trasporto degli ioni organici.

Utilizzando il modello sperimentale delle fettine di corteccia renale è quindi possibile misurare uno svariato numero di parametri; per tale motivo questa tecnica appare estremamente informativa e meno dispendiosa delle tecniche *in vivo*.

E' possibile infine studiare accuratamente il rapporto tra nefrotossicità delle sostanze xenobiotiche e attivazione metabolica, in particolare quella che avviene tramite la via degli acidi mercapturici. E' noto infatti che alcuni aloalcheni (cloro e fluoro alogenati) possono essere attivati via cistein-coniugato β -liasi a tiocheteni tossici (Lock, 1988). Tale via di attivazione può essere studiata *in vitro* per mezzo di inibitori/attivatori.

Il pretrattamento con un inibitore specifico della cistein-coniugato β -liasi come l'AOAA (Elfarra et al, 1986) o di un attivatore come l' α -chetobutirrato (Elfarra et al, 1987), modificano la tossicità dei derivati tiolici. L'acivicin (AT-125), specifico inibitore delle γ -glutamilttransferasi, può fornire indicazioni analoghe (Dohn et al, 1985). Tutte queste tecniche sono state testate su cellule isolate (Dohn et al, 1985), su frazioni mitocondriali (Elfarra et al, 1986) o su entrambe (Elfarra et al, 1987), ma sono anche utilizzabili con le fettine di corteccia renale (Trevisan et al, 1993).

Inoltre, le fettine possono essere studiate dopo trattamento *in vivo* con induttori (β -naftoflavone) o inibitori (piperonil-butossido) del metabolismo ossidativo renale o con depletanti del glutazione (DL-butionina-[S,R]-sulfossimina) (Lock et al, 1984; Trevisan et al, 1993; Secondin et al, 1999).



Formula di struttura del tetracloroetilene

Il presente elaborato ha studiato gli effetti *in vitro* del metabolita cisteinico, la TCVC, del tetracloroetilene. Il tetracloroetilene è un solvente della famiglia degli idrocarburi alifatici alogenati insaturi largamente utilizzato in larghi settori industriali e artigianali come sgrassante, ma in particolare nelle lavanderie a secco, ove ha completamente sostituito il tricloroetilene.

Il tetracloroetilene viene metabolizzato in misura modesta, ma è sufficientemente elettrofilo per coniugarsi direttamente col glutatione ridotto per essere quindi metabolizzato via sintesi degli acidi mercapturici a TCVC e successivamente a tricloroacetil-cisteina. La TCVC è un potente nefrotossico, ma sono necessarie dosi elevate di tetracloroetilene per formare dosi tossiche di TCVC, poiché il metabolismo attraverso questa via è solo dello 0,02-0,04%. D'altro canto, a questo metabolita è anche riconosciuto un potenziale nefrocancerogeno.

Nel presente studio, gli effetti della TCVC sulle fettine di corteccia renale sono stati studiati anche in relazione alla protezione da parte di un inibitore della cistein-coniugato β -liasi come l'AOAA.

I risultati dimostrano chiaramente come la TCVC sia tossica per il tubulo prossimale, causando una rilevante perossidazione lipidica dose-dipendente ed una riduzione importante del riassorbimento (e quindi del trasporto) del PAI. La tossicità tubulare causata dalla TCVC viene in parte prevenuta dal pretrattamento con l'AOAA, evidenziando come uno dei meccanismi di tossicità del metabolita sia determinato dal clivaggio del cistein-coniugato ad un tiochetene. Alla tossicità, vista la sola parziale protezione offerta dall'AOAA, potrebbe ulteriormente concorrere un effetto di tipo diretto, un effetto ischemico o meccanismi al momento non noti.

6. Conclusioni

Le fettine di corteccia renale sono un adeguato modello *in vitro* per studiare gli effetti sul rene delle sostanze xenobiotiche. Il vantaggio dell'uso di questo modello è la semplice tecnica di preparazione del campione, la possibilità di utilizzare un tessuto architettivamente integro e di valutare gli effetti delle sostanze xenobiotiche sul rene indipendentemente da variabili quali le alterazioni del flusso renale, l'ipossia/anossia e gli effetti di metaboliti derivanti dal fegato.

L'eterogeneità anatomica, fisiologica e biochimica della corteccia renale può spiegare alcune differenze di risultati anche nello stesso esperimento e indica la necessità di preparare campioni che siano comprensivi di tutta l'area corticale, dalla superficie alla midollare esterna.

Il modello è stato utile per lo studio *in vitro* degli effetti della TCVC, metabolita del tetracloroetilene, dimostrandone chiaramente la tossicità e permettendo di comprendere almeno in parte i meccanismi con cui la tossicità si esprime.

Il modello delle fettine di corteccia renale appare quindi semplice, economicamente vantaggioso e altamente informativo sulla nefrotossicità delle sostanze xenobiotiche.

Bibliografia

- Balaban RS, Silvia AL (1981) Spectrophotometric monitoring of oxygen delivery to the exposed rat kidney. *American Journal of Physiology* 241, F257-62
- Cross RJ, Taggart JV (1950) Renal tubular transport: accumulation of p-aminohippurate by rabbit kidney slices. *American Journal of Physiology* 161, 181-90
- Dohn DR, Leininger JR, Lash LH, Quebbemann AJ, Anders MW (1985) Nephrotoxicity of S-(2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl)glutathione and S-(2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl)-L-cysteine, the glutathione and cysteine conjugates of chlorotrifluoroethene. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 235, 851-7
- Elfarrá AA, Jakobson I, Anders MW (1986) Mechanism of S-(1,2-dichlorovinyl)glutathione-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology* 35, 283-8
- Elfarrá AA, Lash LH, Anders MW (1987) α -Ketoacids stimulate rat renal cysteine conjugate β -lyase activity and potentiate the cytotoxicity of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine. *Molecular Pharmacology* 31, 208-12
- Fine LG, Goldstein EJ, Trizna W, Rozmaryn L, Arias IM (1978) Glutathione-S-transferase activity in the rabbit nephron: segmental localization in isolated tubules and formation of thiol adducts of ethacrinic acid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 157, 189-93
- Forester R (1948) Use of thin kidney slices and isolated renal tubules for direct study of cellular transport kinetics. *Science* 108, 65-7
- Henderson CJ, Scott AR, Yang CS, Wolf CR (1990) Testosterone-mediated regulation of mouse renal cytochrome P-450 isoenzymes. *Biochemical Journal* 266, 675-81
- Henderson CJ, Wolf CR (1991) Evidence that androgen receptor mediates sexual differentiation of mouse renal cytochrome P450 expression. *Biochemical Journal* 278, 499-503
- Hook JB, Rose MS, Lock EA (1982) The nephrotoxicity of hexachloro-1:3-butadiene in the rat: studies of organic anion and cation transport in renal slices and the effect of monooxygenase inducers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 65, 373-82
- Jones TW, Qin C, Schaeffer VH, Stevens JL (1988) Immunohistochemical localization of glutamine transaminase K, a rat kidney cysteine conjugate β -lyase, and the relationship to the segment specificity of cysteine conjugate nephrotoxicity. *Molecular Pharmacology* 34, 621-7
- Kim HS, Cha SH, Abraham DG, Cooper AJL, Endou H (1997) Intranephron distribution of cysteine S-conjugates β -lyase activity and its implication for hexachloro-1,3-butadiene-induced nephrotoxicity in rats. *Archives of Toxicology* 71, 131-41
- Lock EA, Ishmael J, Hook JB (1984) Nephrotoxicity of hexachloro-1,3-butadiene in the mouse: the effect of age, sex, strain, monooxygenase modifiers, and the role of glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology* 72, 484-94
- Lock EA (1988) Studies on the mechanism of nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity of halogenated alkenes. *Critical Reviews in Toxicology* 19 (1), 23-42

- MacFarlane M, Foster JR, Gibson GG, King LJ, Lock EA (1989) Cysteine conjugate β -lyase of rat kidney cytosol. Characterization, immunocytochemical localization and correlation with hexachlorobutadiene nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 98, 185-97
- McKinney TD (1982) Heterogeneity of organic base secretion by proximal tubules. *American Journal of Physiology* 243, F404-7
- Roch-Ramel F, Weiner IM (1980) Renal excretion of urate: factors determining the actions of drugs. *Kidney International* 18, 665-76
- Ruegg CE, Mandel LJ (1990) Bulk Isolation of renal PCT and PST. II. Differential responses to anoxia and hypoxia. *American Journal of Physiology* 259, F176-85
- Secondin L, Maso S, Trevisan A (1999) Different effects of (cis+trans) 1,3-dichloropropene in renal cortical slices derived from male and females rats. *Human and Experimental Toxicology* 18, 106-10
- Smith HW, Finkelstein N, Aliminosa L, Crawford B, Graber M: The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J Clin Invest* 24: 388-404, 1945.
- Smith JH, Braselton WE, Tonsager SR, Mayor GH, Hook JB (1982) Effects of vanadate on organic ion accumulation in rat renal cortical slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 220, 540-6
- Smith JH, Hook JB (1983) Mechanism of chloroform nephrotoxicity. II. In vitro evidence for renal metabolism of chloroform in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 70, 480-5
- Smith JH (1988) The use of renal cortical slices from the Fischer 344 rat as an in vitro model to evaluate nephrotoxicity. *Fundamental and Applied Toxicology* 11, 132-42
- Tarloff JB, Goldstein RS, Hook JB (1990) Xenobiotic biotransformation by the kidney: pharmacological and toxicological aspects. In: *Progress in Drug Metabolism* (Gibson GG, ed). London: Taylor & Francis, vol 12, pp 1-40
- Trevisan A, Maso S, Meneghetti P (1992) Renal cortical slices: an in vitro model for kidney metabolism and toxicity. *Alternatives to Laboratory Animals* 20, 71-6
- Trevisan A, Meneghetti P, Maso S, Troso O (1993) In vitro mechanisms of 1,2-dichloropropane nephrotoxicity using the renal cortical slice model. *Human and Experimental Toxicology* 12, 117-21
- Trevisan A, Cristofori P, Fanelli G (1998) Glutamine transaminase K intranephron localization in rats determined by urinary excretion after treatment with segment-specific nephrotoxicants. *Archives of Toxicology* 72, 531-5
- Ullrich KJ, Rumrich G (1988) Contraluminal transport systems in the proximal renal tubule involved in secretion of organic anions. *American Journal of Physiology* 254, F453-62
- Wolfgang GHI, Gandolfi AJ, Stevens JL, Brendel K (1989a) In vitro and in vivo nephrotoxicity of the L and D isomers of S-(1,2-dichlorovinyl)-cysteine. *Toxicology* 58, 33-43
- Wolfgang GHI, Gandolfi AJ, Stevens JL, Brendel K (1989b) N-acetyl-S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine produces a similar toxicity to S-(1,2-

- dichlorovinyl)-L-cysteine in rabbit renal slices: differential transport and metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 101, 205-19
- Younes M, Siegers C-P: Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. *Chem Biol Interact* 34: 257-266, 1981.
- Zenser TV, Mattammal MB, Davis BB (1978) Differential distribution of the mixed function oxidase in rabbit kidney. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 207, 719-25
- Zhang JG, Zhong LF, Zhang M, Ma XL, Xia YX, Lindup WE (1994) Amelioration of cisplatin toxicity in rat renal cortical slices by dithiothreitol in vitro. *Human and Experimental Toxicology* 13, 89-93

