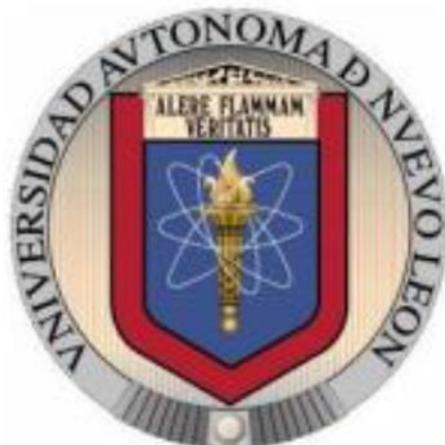


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE WT1 EN LA AFECCIÓN
RENAL ASOCIADA A UN PROCESO INFLAMATORIO**

POR

M.C. MARIELA ARELLANO RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

ABRIL, 2019



EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE WT1 EN LA AFECCIÓN RENAL ASOCIADA
A UN PROCESO INFLAMATORIO

COMITÉ DE TESIS

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente

Dr. Pablo Zapata Benavides
Secretario

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal



EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE WT1 EN LA AFECCIÓN RENAL ASOCIADA
A UN PROCESO INFLAMATORIO

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director

Dr. Pablo Zapata Benavides
Co Director

AGRADECIMIENTOS



Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a todo el personal.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Gracias Dra. Cristina Rodríguez Padilla por su apoyo y por recibirme para la realización de este proyecto, así como por la dirección de ésta tesis.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, gracias por el apoyo y los ánimos brindados durante el desarrollo de este proyecto de investigación, por ser un gran doctor, un gran amigo y un gran ejemplo, Gracias.

Al Dr. Edgar Mendoza, Dr. Moisés Franco y Dra. Diana Reséndez, gracias por ser mis maestros por su disponibilidad y forjar en mí un deseo de superación, así como ser parte de mi comité de tesis.

Al Dr. Adolfo Soto Domínguez por su asesoría, su disponibilidad, apoyo y consejos para el desarrollo del trabajo experimental, así como un gran amigo y también un gran ejemplo.

A mi padre por estar incondicionalmente a mi lado y su gran apoyo.

A mi madre por ser parte de mi formación y de mi vida.

A Cecy quien ha sido una gran compañera de vida y apoyo incondicional, gracias hermanita.

A Rodolfo por ser parte de mi vida y formar parte de este proceso.

Gracias Nedy, Ara, Ana, Conchis, Belen, Juve, Nancy y Edgar, son parte importante en i vida y por lo tanto en este proyecto, ¡los quiero mucho!

Al Dr. Edgar Manilla Muñoz por el apoyo brindado y gran amigo.

A mis compañeros y grandes amigos, Yareellys, Felipe, Claudia, Alex y Ashanti, por su apoyo y aliento para seguir.

A mis compañeros del laboratorio y grandes amigos Juan Manuel, Genaro, Mónica y Gerardo por su apoyo en lo profesional, en lo personal y proporcionar un buen ambiente de trabajo, Gracias.

DEDICATORIA

A mi familia...

INDICE

COMITÉ DE TESIS	ii
DIRECCIÓN DE TESIS.....	iii
INDICE	viii
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE GRÁFICAS	xii
INDICE DE TABLAS	xii
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Epidemiología de la enfermedad renal.....	3
2.2. Riñón: estructura y función.....	3
2.3. Estructura y función del glomérulo.....	4
2.3.1. Podocito	5
2.4. WT1	7
2.4.1. WT1 y su localización nuclear o citoplasmática.....	9
2.4.2. WT1 en cáncer	10
2.4.3. WT1 en el desarrollo del riñón	10
2.4.4. WT1 en el podocito.....	12
2.4.5. WT1 en patologías renales.....	13
2.5. Síndrome Nefrótico (SN).....	14
2.5.1.- Clasificación del SN	15
2.6. Sistema Inmune en el desarrollo de la lesión renal	16
2.6.1. Inflamación en la enfermedad renal.....	17
2.6.2. Inflamación en lesión renal aguda.....	18
2.6.3. Inflamación en la regulación de WT1	19
2.7.- Mecanismos de modulación de WT1	20
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS.....	21

5. OBJETIVO GENERAL.....	22
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
7.1. Material Biológico	24
7.2. Tratamiento con LPS y determinación de proteína total en orina.....	24
7.3. Obtención de rebanadas de tejido renal (Explantes)	24
7.4. Extracción de RNA	25
7.5. Síntesis de cDNA.....	25
7.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para las isoformas de WT1	26
7.7. PCR para expresión de WT1, Nefrina y G3PDH.....	26
7.8. qPCR para cuantificar la expresión relativa de WT1	27
7.9. Western blot.....	28
7.9.1. Extracción de proteínas	28
7.9.2. Cuantificación de Proteínas	28
7.9.3. Electroforesis en gel de Poliacrilamida.....	29
7.9.4. Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	29
7.9.5. Inmunodetección.....	29
7.10. Citocinas inflamatorias por inmunoensayo de ELISA.....	29
7.11. Fijación e inclusión de tejido	30
7.11.1. IFI en biopsia de riñón	30
7.11.2. IHQ de biopsia de ratón	30
7.12. Análisis Estadístico	31
8. RESULTADOS.....	32
8.1. Evaluación del daño renal por administración de LPS en ratones BALB/c.....	32
8.1.1. Análisis histológicos del daño glomerular en los diferentes tiempos de la Inflamación Sistémica aguda.	32
8.1.2. Análisis de proteínas en orina	33
8.2. Secreción de citocinas inflamatorias en daño renal agudo por LPS	35
8.3. Modulación de WT1 en el proceso inflamatorio.....	37
8.3.1. Análisis de la expresión de las isoformas WT1 KTS±/17AA±	37
8.3.2. Expresión relativa de WT1 en biopsias renales tratadas con LPS	38
8.3.3. Expresión de la proteína WT1 por Western blot.....	39
8.3.4. Localización (nuclear/citoplasmática) y fosforilación de WT1	40

8.3.5. WT1 fosforilado en biopsias renales de ratones tratados con LPS	41
8.3.6. Localización nuclear/citoplasmática de WT1 por IFI	42
8.3.7. Expresión del RNAm de WT1 y Nefrina en riñón de los ratones con LPS	42
8.3.8. Expresión del RNAm de WT1 y Nefrina en explantes renales tratados con TNF α e IL-1 β	43
8.3.10. Localización nuclear/citoplasmática de WT1 por IFI en explantes renales	44
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	51
11. PERSPECTIVAS	53
12. BIBLIOGRAFÍA	54
13. RESUMEN BIOGÁFICO.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del riñón	4
Figura 2. Estructura del glomérulo.	5
Figura 3. Estructura y proteínas del podocito.	7
Figura 4. Representación esquemática del gen WT1, RNAm y proteínas	8
Figura 5. Localización de WT1.	9
Figura 6. Estructura y proteínas del podocito.	12
Figura 7. Estructura del glomérulo con lesión en el podocito	13
Figura 8. Análisis histológico de la progresión de daño glomerular	34
Figura 9. Incremento de proteína en orina por SDS-PAGE	35
Figura 10. Análisis de la expresión de las isoformas KTS± y 17AA± de WT1	39
Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína WT1	41
Figura 12. Análisis de la proteína WT1 fosforilado	42
Figura 13. Localización de la proteína WT1 por IFI en podocitos	43
Figura 14. Análisis de la expresión del RNAm de Nefrina	44
Figura 15. Análisis de la expresión del RNAm de WT1 en explantes	45
Figura 16. Localización de WT1 por IFI en explantes tratados con TNF α e IL-1 β	46

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Incremento de la concentración de albúmina en orina	35
Gráfica 2. Concentración de proteína total en orina	36
Gráfica 3. IL-6 en proceso inflamatorio sistémico	37
Gráfica 4. TNF α en suero de ratones con inflamación sistémica	37
Gráfica 5. IL-1 β en suero de ratones en inflamación sistémica	38
Gráfica 6. Expresión relativa de mensajero de WT1	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de Primers para amplificación de isoformas	27
Tabla 2. Secuencias de Primers para amplificación de WT1 y Nefrina	28
Tabla 3. Protocolo de reacción para PCR	28
Tabla 4. Protocolo de reacción para qPCR de WT1	29

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide
TBST	Tris Buffer Salino con Tween 20, por sus siglas en inglés
HRP	Peroxidasa de rábano, por sus siglas en inglés
DAB	Diaminobencidina
GA3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IHQ	Inmunohistoquímica
WT1	Gen Tumor de Wilm's
WT1p	Proteína WT1 fosforilada
Rojo TX	Rojo Texas
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
TNFR2	Receptor 2 de TNF
H&E	Hematoxilina y Eosina
NIM	Nefropatía Idiopática Membranosa
NPHS1	Nefrina
PODX	Podocalixina
LPS	Lipopolisacárido
SDS	Dodecilsulfato sódico
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
qPCR	PCR en tiempo real
RT	Retrotranscripción

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
LTR	Receptor tipo Toll
Kb	Kilobases
KTS	Lisina, Treonina y Serina
kDa	kilodalton
MBG	Membrana Basal Glomerular
DF	Diafragma de Filtración
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
17 AA	Splicing alternativo en exón 9 de 17 aminoácidos
GDNF	Factor Neuronal derivado de células glial
SN	Síndrome Nefrótico
GFS	Glomeruloesclerosis Focal Segmentaria
CM	Cambios Mínimos
PKC	Proteína Quinasa C
aPKC	Proteína Quinasa C atípica
NCM	Nefropatía de Cambios Mínimos
NM	Nefropatía Membranosa
GMP	Glomeruloesclerosis Membranosa Proliferativa
SNCS	Síndrome Nefrótico Sensible a Esteroides
SNCR	Síndrome Nefrótico Resistente a Esteroides
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno

RESUMEN

Las enfermedades renales se definen por la pérdida de proteína en la orina, pueden ser ocasionadas por varias entidades patológicas resultando en un proceso inflamatorio que puede ocasionar glomerulonefritis, que es común entre los diferentes tipos de daño renal. El gen del tumor de Wilm's (WT1) codifica para un factor de transcripción que modula la expresión de Nefrina y Podocalixina, proteínas necesarias para la estabilidad del podocito y la filtración glomerular. En pacientes con síndrome nefrótico resistentes a corticoesteroides, se ha observado una disminución y des-localización nuclear de WT1, por lo que el objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de citocinas proinflamatorias sobre el patrón de expresión de WT1, proteínas moduladas y su relación con las enfermedades renales en un modelo murino. Para inducir la inflamación se formaron 6 grupos que se les administró con Lipopolisacárido (LPS) y fueron analizados a diferentes tiempos (12, 24, 36, 48 y 72 h) y un grupo control con solución salina. El daño renal se determinó mediante histología presentando proliferación de células mesangiales, se cuantificaron proteínas totales en orina por el método de Lowry y la albúmina mediante SDS-PAGE mostrando una mayor concentración a las 24 y 36 h posterior al tratamiento. La concentración de TNF α , IL-1 β e IL-6 en suero de ratones se determinó mediante ELISA, con una mayor concentración a las 36 h para TNF α (4.44 \pm 0.1 ng/mL) e IL-1 β (17 \pm 0.5 ng/mL) estadísticamente significativa comparado con el grupo control (2.3 \pm 0.2; 7 \pm 2, con $p < 0.05$) con un incremento de IL-6 a las 12 h (49.96 \pm 5 ng/mL, $p < 0.0001$). Los resultados mostraron la disminución del RNAm por RT-PCR y la proteína de WT1 mediante Western blot a lo largo del proceso inflamatorio, así como una deslocalización nuclear y fosforilación de la proteína por Inmunofluorescencia e Inmunihistoquímica, mostrando una disminución en la expresión del RNAm de Nefrina. Por lo tanto, el proceso inflamatorio juega un papel importante en el daño renal principalmente por las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α que modulan post-transcripcionalmente a WT1 suprimiendo su función de factor de transcripción que conduce a la disminución de las principales proteínas que forman la barrera de filtración y conduciendo a la pérdida de proteínas a través de la orina como principal síntoma de falla renal. Por lo que posteriormente se pretende determinar si las citocinas proinflamatorias modulan la expresión de proteínas antiinflamatorias como IL-10 a través de WT1 en riñón.

ABSTRACT

Renal diseases are defined by the loss of protein in the urine, can be caused by several pathological entities resulting in an inflammatory process that can cause glomerulonephritis, this inflammatory process is common among different types of kidney damage. The Wilm's tumor gene (WT1) codes for a transcription factor that modulates the expression of Nephricin and Podocalyxin, proteins necessary for podocyte stability and glomerular filtration, in patients with corticosteroid-resistant nephrotic syndrome, a decrease has been observed and nuclear de-localization of WT1, so the objective of this work was to determine the effect of proinflammatory cytokines on the expression pattern of WT1, modulated proteins and their relationship with renal diseases in a murine model. Six groups were formed to which 8 mg/kg of Lipopolysaccharide (LPS) was administered and analyzed at different times (12, 24, 36, 48 and 72 h) and the control group was administered saline solution. Renal damage was determined by histology showing mesangial proliferation and infiltration of inflammatory cells, total proteins were quantified in urine by the Lowry method and albumin by SDS-PAGE showing a higher concentration at 24 and 36 h after treatment. The concentration of TNF α , IL-1 β and IL-6 in the sera of mice was determined by the ELISA test, with a higher concentration at 36 h for TNF α (4.44 ± 0.1 ng / mL) and IL-1 β (17 ± 0.5 ng / mL) statistically significant compared to the control group (2.3 ± 0.2 , 7 ± 2 , with $p < 0.05$) with an increase in IL-6 at 12 h (49.96 ± 5 ng/mL, $p < 0.0001$). In this study, the decrease in RNAm was found by RT-PCR and the WT1 protein by Western blot along the inflammatory process, as well as a nuclear delocalization and phosphorylation of the protein by Immunofluorescence and Immunohistochemistry, respectively, showing a decrease in the expression of Nephricin RNAm. Therefore the inflammatory process plays an important role in renal damage mainly by the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α that modulates post-transcriptionally to WT1 suppressing its transcription factor function that leads to the decrease of the main proteins that form the filtration barrier and leading to the loss of proteins through the main urine symptom of renal failure. Therefore, in the future, we intend to determine whether proinflammatory cytokines modulate the expression of antiinflammatory proteins such as IL-10 through WT1 in the kidney.

1. INTRODUCCIÓN

La afección renal es un problema de salud pública con una creciente incidencia y prevalencia, con altos costos en el diagnóstico y tratamiento. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se registran 830 000 muertes cada año, ocupando el lugar 12 en defunciones. En las enfermedades renales generalmente hay un daño en la membrana de filtración, lo que permite el escape de proteínas hacia la orina. Dentro de las principales entidades patológicas se encuentran alteraciones autoinmunes, metabólicas, genéticas e infecciosas provocadas por virus, hongos y bacterias. Los lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* funcionan como ligandos de receptores tipo Toll (TLR) induciendo inflamación sistémica, resultando en glomerulonefritis y albuminuria, asociados con la producción de citocinas proinflamatorias y una disminución del RNAm del nefrina, proteína de adhesión presente en el diafragma de filtración, cuya expresión es regulada positivamente por el gen del tumor de Wilm's (WT1). WT1 se encuentra localizado en el cromosoma 11p13, consta de 10 exones y genera un RNAm de 3 kb con tres sitios de inicio de la traducción, lo que da origen a tres isoformas principales de diferente peso molecular (36-38, 52-54 y 62-64 kDa). Además, presenta 2 eventos de splicing alternativo, uno en el exón 5, donde se insertan o eliminan 17 aminoácidos, y el otro en el exón 9, donde se insertan o remueven 3 aminoácidos: lisina, teronina y serina (\pm KTS) entre tercer y cuarto dedo de zinc, generando las isoformas conocidas como A (WT1^{-/-}), B (WT1^{+/-}), C (WT1^{-/+}) y D (WT1^{+/+}). WT1 juega un papel central en el desarrollo del sistema genitourinario, de tal forma que se han asociado mutaciones heterocigotas en este gen con tres síndromes llamados WAGR (Tumor de Wilm's, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental), síndrome Denys Drash y síndrome Fresier; en el adulto, WT1 mantiene expresión basal en podocitos, donde es considerado un gen maestro que modula más del 50% de las proteínas específicas como nefrina y podocalixina y se ha reportado que la disminución y deslocalización de WT1 en pacientes con Síndrome Nefrótico resistentes a terapia antiinflamatoria resulta en el desprendimiento del podocito, lo cual es una característica común de diversas nefropatías.

Debido a lo anterior el propósito de esta tesis es determinar el efecto del proceso inflamatorio sobre el patrón de expresión de WT1, las proteínas moduladas por éste y su relación con las afecciones renales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de la enfermedad renal

La enfermedad renal es un problema de salud pública con una creciente incidencia y prevalencia con altos costos en su diagnóstico y tratamiento (Katagiri et al., 2013). De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud y el proyecto de carga global de la enfermedad, las enfermedades renales y del tracto urinario son responsables de aproximadamente 830,000 muertes cada año, ocupando el lugar 12 como causa de defunción en todo el mundo y el lugar 17 en cuanto a discapacidad. En México 11,955 defunciones ocupando el lugar 11 en el año 2012 (Schieppati et al., 2005; INEGI 2014).

2.2. Riñón: estructura y función

Los riñones son los órganos principales del sistema excretor, están situados a ambos lados de la columna vertebral por debajo del diafragma y el hígado. Un riñón de adulto pesa aproximadamente 160g con 11 cm de largo y de 5 a 7 cm de grosor, contiene una capsula fibrosa transparente que envuelve cada riñón y da un aspecto fresco y brillante.

Los riñones están constituidos por tres regiones: una corteza renal (región más externa) medula renal y pirámides medulares (Figura 1). Los cálices recogen la orina a la pelvis renal, fluye por el uréter hasta un almacenamiento temporal llamado vejiga.

La función de los riñones es la filtración de la sangre para la eliminación de productos de desechos como urea y creatinina, regula la concentración de electrolitos como Na^+ , K^+ y HCO_3^- , pH y el volumen del plasma sanguíneo.

Cada riñón está constituido por más de un millón de nefronas, estas son las unidades funcionales del riñón, cada nefrona contiene un glomérulo y un túbulo renal (Stuart; Elaine 2008, Anatomía y Fisiología Humana).

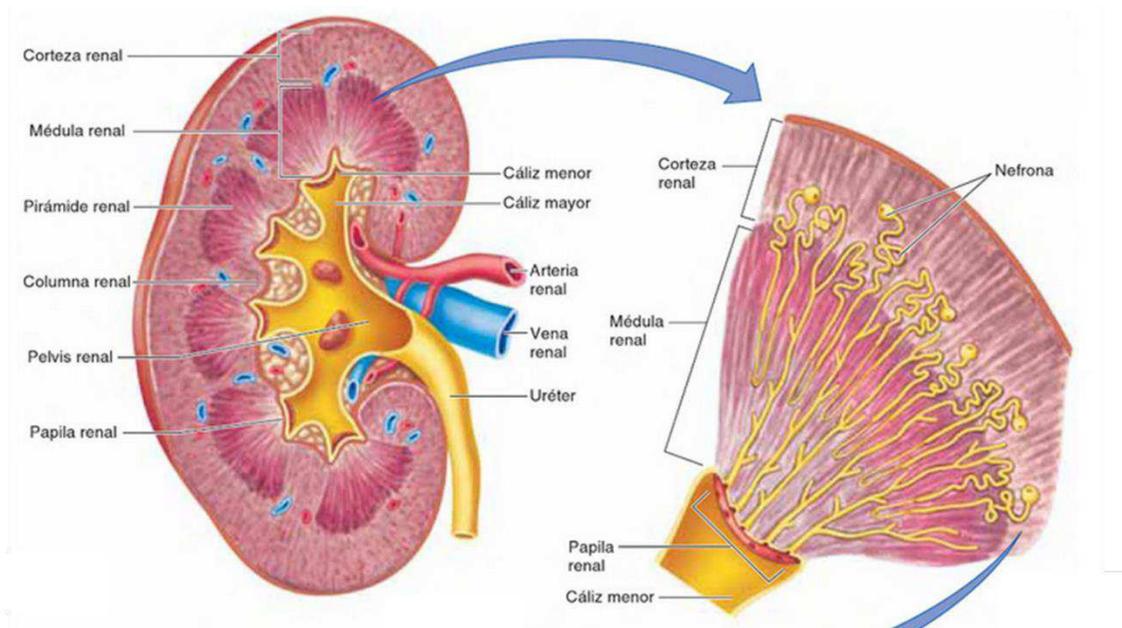


Figura 1. Estructura del riñón. Riñón seccionado que ilustra su morfología del riñón. Nefronas corticales (Tomado de Stuart Ira Fox).

2.3. Estructura y función del glomérulo

Los glomérulos son el componente central de las nefronas y constituyen el 10% del tejido renal, estos contienen una microvasculatura que contiene tres tipos de células altamente especializadas que son: células endoteliales fenestradas, células mesangiales y podocitos que conjuntamente forman una barrera permeable a través de la cual se filtra la sangre y se produce la orina (Takemoto M et al., 2002).

La filtración glomerular depende del tamaño de las moléculas, impidiendo el paso de macromoléculas y en función de la electronegatividad de la pared capilar. La existencia de cargas es alta en la superficie de las células endoteliales, por lo que las moléculas cargadas negativamente la atraviesan con mayor dificultad y dado que la mayoría de las proteínas séricas tienen carga negativa a un pH normal, estas tienden a ser rechazadas por fuerzas electrostáticas cuando intentan atravesar la barrera de filtración glomerular, independiente de su peso molecular. La barrera de filtración lo constituyen células epiteliales de la cápsula de Bowman, células del mesangio, células endoteliales y células

epiteliales glomerulares (podocitos), capaces de responder a estímulos vasomotores con el fin de regular la filtración glomerular. En la fisiopatología de la proteinuria se ha implicado a la membrana basal y al podocito (Arrizabalaga 2005) Figura 2.

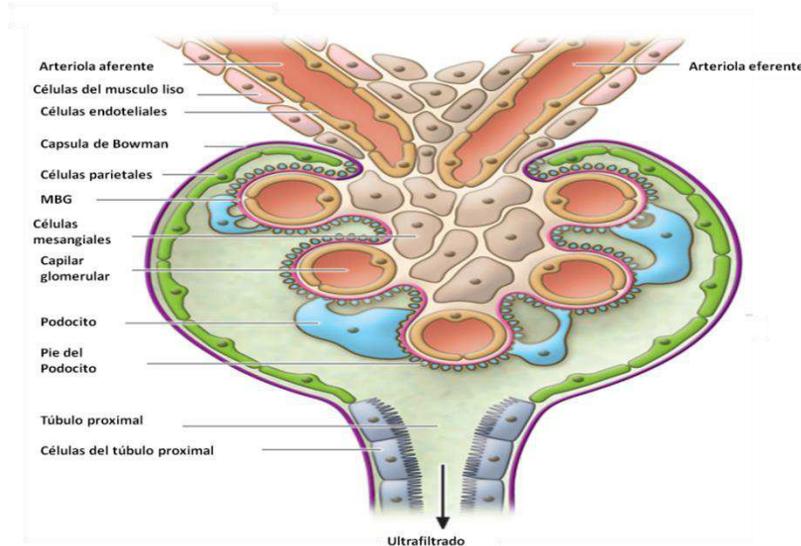


Figura 2. Estructura del glomérulo. Estructura de un glomérulo normal sin lesión en podocitos (Tomado de Fogo, 2011).

2.3.1. Podocito

El podocito es la célula epitelial visceral altamente especializada y fundamental para mantener la estructura y función normal del glomérulo, estos actúan como un filtro para macromoléculas y son fundamentales para la permeabilidad selectiva, rodea la superficie del capilar glomerular a través de los pedicelos, los cuales se interdigitan con los pedicelos de podocitos vecinos. Los podocitos junto con las células endoteliales de los capilares forman su propia lámina basal donde se fusionan para formar la Membrana Basal Glomerular (MBG) que proporcionan estabilidad estructural. La MBG es una estructura laminar continúa formada principalmente por moléculas como glicoproteínas como es el colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, entactina, proteoglicanos como el heparán sulfato y la arginina (Arrizabalaga 2005).

El espacio entre los pedicelos forma hendiduras de filtración denominadas diafragmas de filtración (DF) (Sinha y Bagga 2012). Los podocitos son células altamente diferenciadas y especializadas, no se dividen, por lo que existiría un número de podocitos inicial que se pierden en forma progresiva e irreversible en la lesión glomerular. El núcleo de los podocitos sufre mitosis frente a estímulos mitogénicos extremos, pero no puede completar la división celular (Ortiz et al., 2002). Los podocitos tienen una organización celular y citoarquitectura compleja que se adquiere durante las primeras etapas del desarrollo de los glomérulos, primero comienzan a perder las uniones con células laterales excepto con la MBG, finalmente los cuerpos de los podocitos maduros extienden largas prolongaciones (pies o pedicelos), que se van dividiendo en otras intermedias y se conectan con otras prolongaciones vecinas. El pedicelo del podocito contiene un sistema contráctil que permite la movilidad y se compone de actina, miosina II, α -actina 4, talina y vinculina. Los pedicelos son anclados a la MBG por la integrina $\alpha 3 \beta 1$ y distroglicanos. Las proteínas involucradas en las uniones adherentes del DF son la Nefrina, P-caderina, CD2AP, ZO-1, FAT, Podocina y la Neph 1 (Mundel et al., 2002). Las interdigitaciones entre los pedicelos son de entre 25 a 60 nm de longitud alrededor de los capilares y son atravesados por proteínas de unión con un diámetro de 40 nm dejando poros de 4 x 14 nm y es el único espectro del desarrollo glomerular fundamental para mantener la función renal (Srichai et al., 2004; Asanuma y Mundel 2003; Kreidberg et al., 2006; Figura 3).

WT1 es una proteína que se expresa de manera basal durante toda la vida del podocito, es importante para la regulación y mantenimiento de la función normal ya que regula un número considerable de genes para su mantenimiento (Dong et al., 2015).

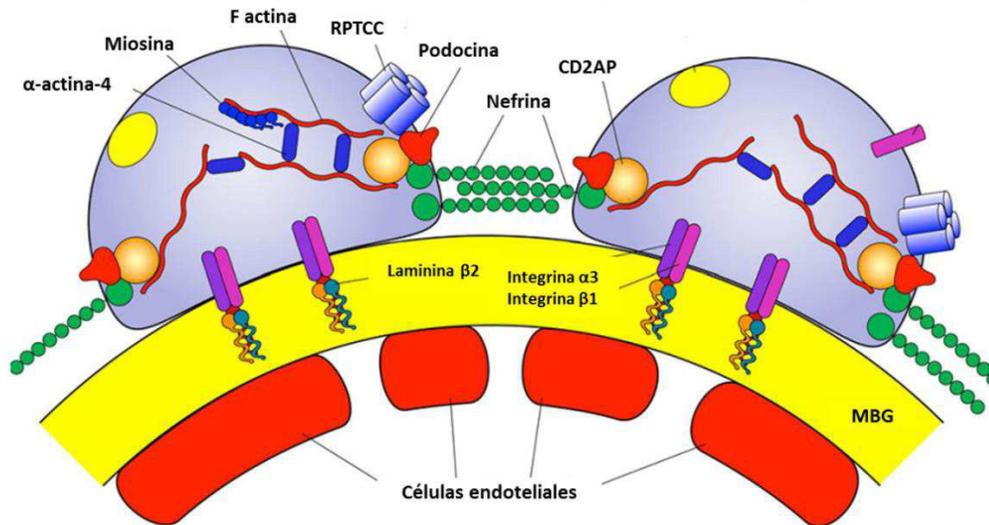


Figura 3. Estructura y proteínas del podocito. Receptor potencial Transitorio de canal catiónico (RPTCC), CD2 Asociada a Proteína (CD2AP), Membrana Basal Glomerular (MBG) (Imagen modificada de Simic et al., 2013).

2.4. WT1

El gen de tumor de Wilm's (WT1) codifica un factor transcripcional involucrado en los procesos de proliferación y diferenciación celular, apoptosis y diferenciación sexual. Fue identificado inicialmente en pacientes con nefroblastoma o tumor de Wilm's, en la actualidad se sabe que mutaciones en este gen solo están presentes en el 10% de estos pacientes. Inicialmente WT1 se describió como un gen supresor de tumor, pero se ha encontrado mediante experimentos de transfección que también puede comportarse como un oncogen ya que puede potenciar o reprimir genes específicos, tal es el caso de -Myc donde puede activar o reprimir la transcripción de este.

Mutaciones heterocigotas de WT1 se han asociado con tres síndromes llamados WAGR (Tumor de Wilm's, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental), síndrome Denys Drash y síndrome Friesier (Yang et al., 2007).

El gen se encuentra localizado en el cromosoma 11p13 que consta de 10 exones constituido por aproximadamente 50 kilobases (kb) y genera un RNAm de 3 kb con tres sitios de inicio de la traducción, que da origen a tres isoformas, la más común de 52-54 kDa (449 aa), 62-64 y 36-38 (Wagner et al., 2003) y debido a modificaciones post-

transcripcionales del pre-RNAm permitiendo la producción de al menos 36 isoformas. Sufre 2 eventos de splicing incluidos en el exón 5 en donde se insertan o eliminan 17 aminoácidos ($\pm 17aa$) y en el exón 9 donde se remueven 3 aminoácidos: Lys-Thr-Ser ($\pm KTS$) entre tercer y cuarto dedo de zinc, responsable de 4 isoformas de la proteína conocidas como A (WT1^{-/-}), B (WT1^{+/-}), C (WT1^{-/+}) y D (WT1^{+/+}) (Lopotová et al., 2012; Han et al., 2007; Figura 3).

El gen WT1 codifica el dominio C-terminal del exón 7 al 10 responsable de la unión al DNA así como a RNA y proteínas, contiene 4 dedos de zinc tipo Kruppel las cuales se unen a secuencias ricas en GC y un dominio N terminal rico en prolina y glutamina implicados en interacciones de RNA y proteínas, que es el sitio requerido para la transcripción de WT1 (Yang et al., 2007).

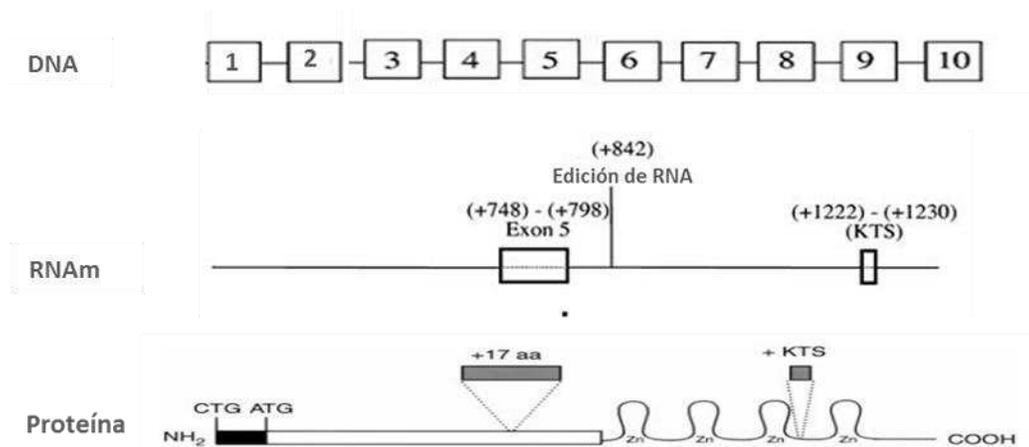


Figura 4. Representación esquemática del gen WT1, RNAm y proteínas. El gen está constituido por 10 exones y 9 intrones. **RNAm** cuenta con 2 splicing alternativos el exón 5 (caja grande) y exón 9 (caja pequeña). **Proteína** esquematiza la estructura típica de la proteína de 52-54 kDa donde se observan las diferentes isoformas (Exon 5 y +/- KTS) de la proteína. Imagen modificada de Menk et al., 1998; Yang et al., 2007.

2.4.1. WT1 y su localización nuclear o citoplasmática

De acuerdo a las isoformas de WT1 17AA+/- y KTS+/- se ha observado diferente localización tanto nuclear como citoplasmática. Englert C. en 1995 observo un patrón homogéneo nuclear por Inmunofluorescencia en la línea celular de fibroblastos de riñón de mono (COS-7) transfectados con la isoforma KTS-, ahora se sabe que esta isoforma tiene mayor afinidad al DNA así como factor de transcripción, también observo un patrón granular citoplásmico con un péptido de la porción N terminal de la proteína WT1 (Figura 5a). Larson S et al., 1995 reporta que la isoforma KTS+ colocaliza con proteínas citoplasmáticas del spliceosoma, a esta isoforma se le ha atribuido que lleva a cabo una función en el procesamiento del RNA además de presentar un patrón granular en el citoplasma (Figura 5b), en el caso de la isoforma KTS negativo colocaliza con proteínas nucleares como SP1 y PAX 6, presentando un patrón homogéneo en el núcleo (Figura 5 c).

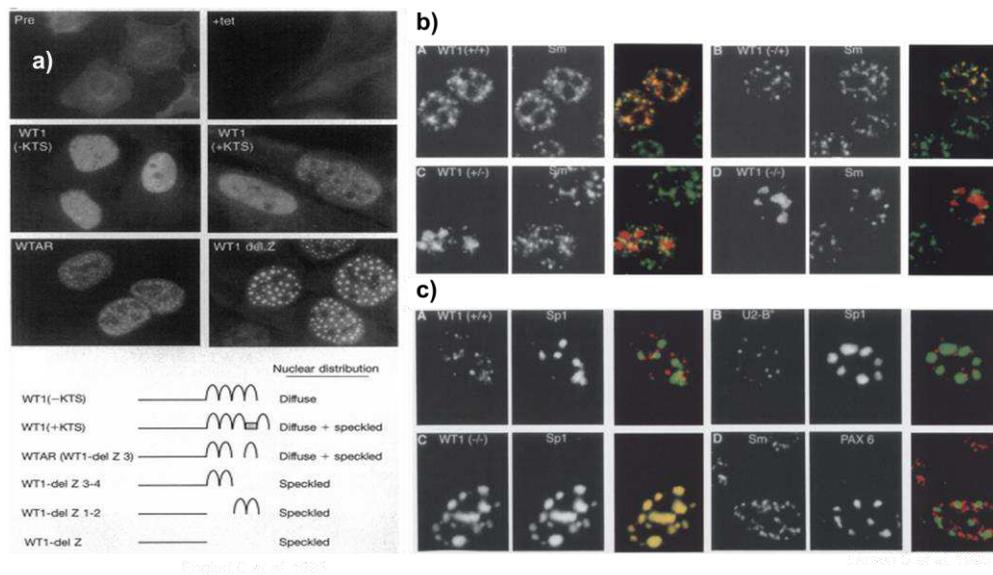


Figura 5. Localización de WT1. a) Se presenta patrón homogéneo por Inmunofluorescencia en isoforma KTS-, patrón granular y homogéneo en isoforma KTS+, patrón homogéneo y granular en WTAR y patrón granular en WT del Z (péptido sin incluir dedos de zinc). b) WT1 KTS+ colocaliza (amarillo) con proteínas citoplasmáticas (Sm), c) WT1 KTS - colocaliza (amarillo) con proteínas nucleares (SP1 Y PAX 6). Imagen tomada de Englert C et al., 1995; Larson S et al., 1995.

2.4.2. WT1 en cáncer

La expresión normal de WT1 es en el sistema urogenital en la embriogénesis, en el adulto WT1 se expresa de forma basal en el riñón, Sistema Nervioso central y tejidos involucrados en la hematopoyesis (médula ósea y nódulos linfáticos) Yang L et al., 2007.

WT1 fue clasificado inicialmente como un gen supresor de tumores, y posteriormente con una función oncogénica, ahora se sabe que la proteína grande con sitio de inicio de la traducción en el codón de inicio CUG induce la transformación celular e incremento de la expresión de genes como c-Myc, Bcl-2 y EGFR, mientras que la sobreexpresión de WT1 con inicio de la traducción en el codón AUG reprime la formación de colonias de células cancerosas inhibiendo la expresión de los mismos genes diana mediante el reclutamiento de la histona desacetilasa 1 (HDAC1) Lee KY et al., 2017. WT1 se encuentra expresado en muchos tipos de tumores malignos como Leucemia mieloide aguda, Leucemia Linfocítica Aguda, Leucemia Mielogena Crónica, síndromes mielodispásicos y cánceres sólidos (Oka Y et al., 2008).

2.4.3. WT1 en el desarrollo del riñón

En el desarrollo del riñón, el proceso de inducción de la yema uretral y morfogénesis están implicados genes en la regulación de la matriz extracelular y la adhesión celular, factores de crecimiento, factores de transcripción y el ciclo celular (Fernández 2009).

El gen WT1, Factor neuronal derivado de células glial (GDNF) y la proteína morfogénica ósea-7 han sido identificados como reguladores maestros de la nefrogénesis y la deficiencia en cualquiera de estos resulta en una alteración. La diferenciación de células renales por WT1 está mediada en gran parte por el control transcripcional de genes implicados en la epitelización y la señalización de la matriz extracelular y mutaciones en este gen dan como resultado la formación de tumores, anormalidades del desarrollo tales como el síndrome Denys Drash que presentan esclerosis mesangial difusa y el síndrome de Frasier en el cual el SN progresa lentamente y se le atribuye GFS y CM. Dentro de los genes implicados incluyen Syndecan 1, Pax-2, GDNF, receptor α ácido retinoico y E-cadherina (Ramos et al., 2006; Mrowka y Schedl 2000).

El desarrollo normal del riñón es un proceso complejo que requiere alta especialización en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. El desarrollo ocurre principalmente en 3 etapas: El paso de mesodermo intermedio al blastema metanéfrico, la ramificación de la yema uretral y la interacción de estos con la maduración del tejido metanéfrico, en tejido renal maduro. A partir del mesodermo intermedio se originan pronefros, mesonefros y metanefros (Fernández 2009).

Mesonefros aparece al día 24 de gestación y la porción caudal continua su desarrollo formando los conductos de Wolff, los cuales darán origen al conducto deferente, epididimo y mesosalpinx. Metanefros dará origen al riñón adulto que incluye cambio de tejido mesenquimal a tejido epitelial y se dan por interacciones con la yema uretral proveniente de los conductos de Wolff, durante el día 35. Con el cambio de células hay la aparición de células madre que dan origen a las vesículas renales y nefronas (Kreidberg 2010; Ramos et al., 2006).

La yema uretral dará origen a los túbulos colectores, cálices, pelvis y uréteres, el metanefros dará origen a las nefronas. Estudios *in vitro* sugieren que solo se induce el cambio del mesenquima siempre y cuando exista una expresión adecuada de WT1 (Mrowka y Schedl 2000; Fernández et al., 2009).

La expresión de WT1 en adultos es: en el sistema urogenital, sistema nervioso central y tejidos involucrados en la hematopoyesis como médula ósea y nódulos linfáticos (Yang et al., 2007). WT1 en el sistema urogenital se expresa de manera basal en podocitos maduros y su persistencia a lo largo de la vida sugiere que desempeña un papel en la homeostasis del podocito. Regula la expresión de Nefrina y Podocina, proteínas importantes en la filtración glomerular y se ha reportado que la disminución de los niveles de WT1 provoca nefropatías y disminución en la expresión de Nefrina y Podocina provocando el desprendimiento del podocito (Guo et al., 2002; Bariety et al., 2006; Gao et al., 2012; Bollain et al., 2011).

2.4.4. WT1 en el podocito

Durante la embriogénesis en el desarrollo del riñón, es esencial la expresión de WT1, y se mantiene de manera basal a lo largo de la vida del podocito. WT1 es un factor de transcripción implicado en la regulación de un gran número de genes importantes en el desarrollo y mantenimiento del podocito. Esta proteína regula genes del diafragma de filtración como nefrina (NPHS1), podocina (NPHS2), Magi2, proteína asociada a CD2 (CD2AP), NCK adaptador de la proteína 2 (NCK2) entre otras. WT1 modula proteínas de adhesión mediante la regulación la integrina $\alpha 3$ (Itga3), integrina $\beta 1$ (ITGB1), laminina $\alpha 5$ (Lama5), y laminina $\beta 2$ (Lamb2).

WT1 también controla los componentes del citoesqueleto y sus reguladores como la sinaptopodina (SYNPO), α -actinina-4, la miosina no muscular (MYH9), proteína Rho GTPasa de activación 24 (Arhgap24) y la proteína quinasa C atípica (aPKC) por sus siglas en inglés (Dong et al., 2015) Figura 6.

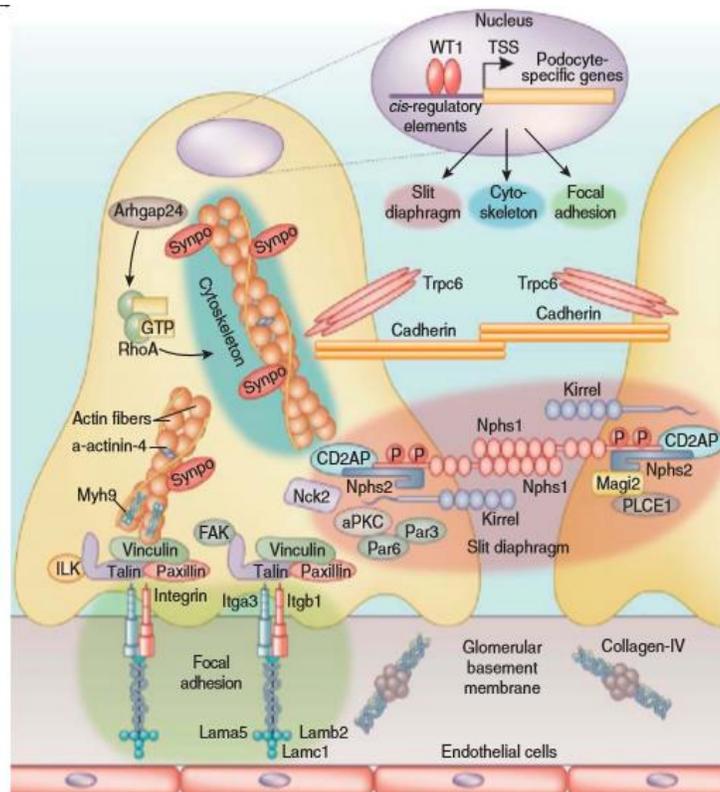


Figura 6. Estructura y proteínas del podocito. Esquema de las redes controladas por WT1 para el establecimiento de la morfología específica de los podocitos. WT1 regula los componentes complejos de la hendidura de diafragma como la nefrina (NPHS1), podocina (NPHS2), PD, Magi 2, CD2 Asociada a Proteína (CD2AP), NCK adaptador de la proteína 2 (NCK2), etc, Por sus siglas en inglés (Imagen tomada de Dong et al., 2015).

La lesión o pérdida de los podocitos permite el paso de proteína hacia la orina con reducción en la función renal (Figura 7). El desprendimiento del podocito es común en enfermedades glomerulares y como resultado de esta pérdida, de un 20 a 40% tienen como resultado cicatrización. Se ha reportado que el decremento de la expresión de WT1 induce baja regulación en los genes PODX (podocalxina) y NPHS1 (nefrina) así como polimorfismos en el gen NPHS1, que son cruciales para la arquitectura del podocito induciendo al colapso, desestabilización y desprendimiento de este (Mundel et al., 2002).

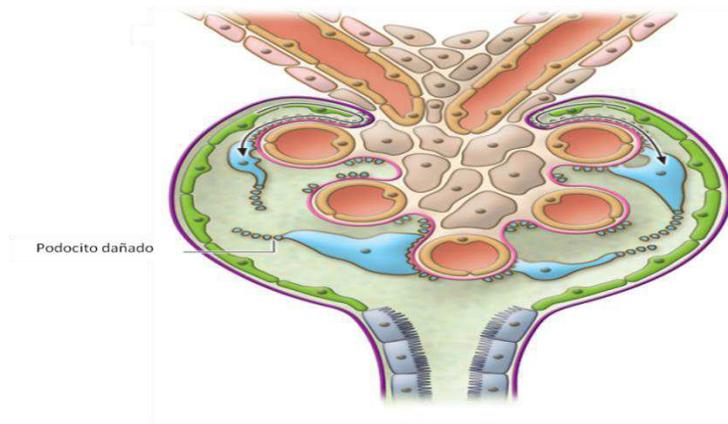


Figura 7. Estructura del glomérulo con lesión en el podocito. Lesión a nivel de podocito con desprendimiento de la membrana basal glomerular. (Tomado de Fogo, 2011).

2.4.5. WT1 en patologías renales

De acuerdo a las evidencias de diversos grupos de investigación, sugieren que WT1 es el responsable del mantenimiento normal del podocito, en humanos las mutaciones de la línea germinal de WT1 están asociados con tumores de Wilm's y las malformaciones urogenitales (Kreidberg et al., 1993) y las mutaciones en este gen que están presentes en el 94% de los pacientes con Denys Drash, en pacientes con nefropatía y pacientes con Síndrome Nefrótico. Ratones Knockout con WT1 inducible se demostró que la disminución en los niveles de WT1 resulta en glomerulonefritis seguido de la disminución de Nefrina y Podocalixina (Takemoto et al., 2002).

Los pacientes con el síndrome Denys Drash presentan nefropatía, disgenesia gonadal y tumor de Wilm's, la predisposición a este síndrome se debe a WT1, ya que estos pacientes presentan mutaciones puntuales entre los exones que codifican el segundo y tercer dedo de zinc, se cree que estas mutaciones alteran la unión de los dedos de zinc de WT1 al DNA diana por mutación dominante negativa o por reconocimiento de otro sitio del DNA (Little, M. et al., 1993).

El síndrome de WAGR (Tumor de Wilm's, Aniridia, Anomalías Genitales y retraso mental) tiene un alto riesgo a desarrollar Tumor de Wilm's, estos pacientes portan deleciones génicas heterocigotas en el cromosoma 11p13 que causan haploinsuficiencia de los genes WT1 y PAX (Gessler et al., 1993; Han et al., 2008).

En el caso del síndrome de Friser es una enfermedad que se caracteriza por presentar glomerulopatía progresiva con presencia de proteinuria infantil y síndrome nefrótico, avanzando a la insuficiencia renal terminal en la adolescencia o adultez temprana, también se presenta pseudohermafroditismo masculino con presencia de genitales externos femeninos normales y cariotipo XY, estos pacientes con frecuencia desarrollan gonadoblastoma. El síndrome de Friser es causado por mutaciones en el sitio de splicing en el intrón 9 de WT1 con la disminución de la proporción de las isoformas +KTS/-KTS (Barboux et al., 1997).

El síndrome Nefrótico (SN) puede deberse a trastornos genéticos, enfermedades secundarias asociadas, medicamentos, infecciones o neoplasias (Eddy, A. A., & Symons, J. M. (2003). Se han identificado mutaciones genéticas en niños resistentes a esteroides (Ruf R., 2004), mutaciones en WT1 en niños con esclerosis mesangial difusa aislada y mutaciones en podocina en pacientes con Glomeruloesclerosis Focal Segmentaria (Eddy y Symons 2003).

2.5. Síndrome Nefrótico (SN)

El SN es una glomerulopatía la cual se define por pérdida de proteína en orina \geq a 3.5g en 24 h en adultos, y en niños, \geq 40mg/m², asociado con hipoalbuminemia (albúmina

sérica <2.5g/dL), hiperlipidemia (colesterol en suero < 200 mg/dL), hipercoagulabilidad y edema. Los criterios de diagnóstico son de acuerdo al ISKDC (International Study of Kidney Disease in Children por sus siglas en inglés) (Sinha y Bagga 2012; Segarra et al 2012).

Las enfermedades renales que causan este síndrome tienen en común la pérdida de la selectividad de la barrera de filtración glomerular, permitiendo el flujo de proteínas hacia el espacio urinario. La principal proteína que se pierde en la orina es la albúmina que representa más del 80% de la proteinuria y el resto lo constituye proteínas como Inmunoglobulinas, proteínas de anclaje, complemento y factores de coagulación (Dinesh et al.,2014).

Las glomerulopatías pueden ser congénitas e infantil, primarias o idiopáticas. El SN congénito e infantil se presenta antes de un año de edad y se le ha asociado a mutaciones en genes que codifican proteínas en los podocitos, así como a infecciones (sífilis, toxoplasmosis, entre otras), éste SN es resistente a esteroides y particularmente si se presenta en los primeros 3 meses de vida es probable se deba a mutaciones genéticas (Davin y Rutjes 2012).

El SN idiopático es la glomerulopatía en la cual no es posible establecer una enfermedad sistémica responsable, en niños de 1 a 10 años representa el 90% de los casos y en niños mayores de 10 años representa más del 50%. La mayoría de estos pacientes corresponden a Cambios mínimos (CM) mediante Biopsia renal. El SN secundario incluye lesiones renales que aparecen como consecuencia de otras enfermedades que se acompañan de signos y síntomas extra renales como la nefropatía diabética y nefropatías por depósito de inmunoglobulinas (Jane 2014).

2.5.1.- Clasificación del SN

El SN se clasifica de acuerdo a las características histológicas y en respuesta clínica a esteroides que tienen una función inmunomoduladora. Las lesiones histopatológicas comúnmente responsable del SN en las Glomerulopatías Idiopáticas son Nefropatía de Cambios Mínimos (NCM) en un 77 %, Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria (GFS)

7%, la Nefropatía Membranosa 2% (NM), y la Glomerulonefritis Membranoproliferativa 8% (GMP) (Segarra et al., 2012).

Dentro de la respuesta a esteroides es clasificado en Síndrome Nefrótico corticosensible (SNCS), cuando el paciente responde al tratamiento dentro de las primeras 4 semanas y el Síndrome Nefrótico Corticorresistente (SNCR), cuando no responde al tratamiento en este tiempo. Dentro de los corticosensibles se encuentran el SN con recaídas frecuentes (sí hay más de 2 recaídas en los primeros seis meses o más de 4 en 12 meses) y los corticodependientes (cuando existe interrupción del tratamiento y dentro de las primeras 2 semanas se presenta una recaída) (Gellermann, J et al., 2004; Krishnan 2012).

Cerca de un 90% de pacientes con SN idiopático son SNCS y logran una buena remisión de la enfermedad con buen pronóstico renal a largo plazo, para el SNCR el buen pronóstico es pobre, de un 30-40% desarrollan Enfermedad Renal Terminal (ERT) donde es requisito la diálisis o trasplante renal (Joshi 2013).

2.6. Sistema Inmune en el desarrollo de la lesión renal

Audar et al., 2008 describen que la estimulación inmunológica activa la inmunidad innata y se ha demostrado que los podocitos bajo ciertas circunstancias pueden adquirir el fenotipo de células dendríticas y expresar CD80, que es una proteína transmembranal expresadas en células presentadoras de antígenos que al unirse a su ligando CD28 de linfocitos T proporciona una señal de co-estimulación a estos para su activación. La expresión de CD80 en podocitos es inducida por el estrés oxidativo o tras la estimulación con lipopolisacáridos a través de señales mediadas por receptores tipo toll-like-4 e IL-13 que inducen cambios estructurales en el podocito y son capaces de alterar la selectividad de la filtración glomerular causando SN. En 1974 Shalhoub propuso que el daño renal podría ser causado por la producción de una linfocina producida por los linfocitos T y a partir de ese momento se han identificado factores circulantes que se originan de la activación de estas células como la hemopexina plasmática y el receptor de uroquinasa (uPAR). La hemopexina plasmática tiene actividad antioxidante, considerado como un reactante en fase aguda. En sujetos sanos circula en forma inactiva y la isoforma activa es capaz de inducir lesiones glomerulares. En modelos

experimentales murino se ha demostrado que la inducción de señalización a través de uPAR en los podocitos causa fusión podocitaria a través de la activación de la α -V β 3-integrina (Segarra et al., 2012).

2.6.1. Inflamación en la enfermedad renal

La inflamación es un mecanismo de protección en respuesta a la infección o trauma, donde se puede presentar un estado pro-inflamatorio agudo o crónico. El proceso comienza con la desgranulación de los mastocitos por la activación de la vía del complemento y la liberación de citocinas inflamatorias como la IL-1 (Interleucina 1), IL-6 y Factor de necrosis tumoral α (TNF α), comenzando así cascada de eventos que intervienen en la respuesta inmune (Dungey et al., 2013).

En pacientes con Enfermedad Renal Crónica existe un estado pro-inflamatorio que contribuye sustancialmente a la morbilidad y mortalidad mediante la liberación de citocinas y el aumento de moléculas de adhesión, promoviendo la adhesión de linfocitos T, su migración al intersticio y atracción de macrófagos tipo 2 (Silverstein 2009).

Takno y cols. 2007 proponen un nuevo mecanismo en donde los macrófagos participan en la inducción de la proteinuria. Observan una disminución de nefrina independientemente de WT1 inducido por citocinas derivadas de macrófagos (IL-1 β y TNF α) en un cocultivo de podocitos importalizados con macrófagos activados, resultando en la activación una parte de la vía de fosfoinositol-3-quinasa.

En Nefropatía diabética se ha observado la infiltración de células como mastocitos, macrófagos y células dendríticas que secretan citocinas inflamatorias que desempeñan un papel clave en la inflamación como citocinas, endotelinas, factores de crecimiento y enzimas proteolíticas. Se ha observado un incremento de TNF α en riñón de rata diabética y en pacientes con nefropatía diabética es excretada en grandes cantidades. TNF α secretado localmente podría tener efectos potentes sobre el riñón, como el reclutamiento de neutrófilos y monocitos polimorfonucleares, la generación local de

especies reactivas de oxígeno y un aumento de la permeabilidad glomerular con pérdida de albúmina (Balakumar P y Singh M 2009; Shikata et al., 2012; Chung et al., 2015)

El Síndrome Nefrótico es una glomerulopatía que está asociado a citocinas pro-inflamatorias con mayor aumento en los niveles de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) (Dogra GK et al., 2002). Algunos de estos pacientes responden a tratamientos con esteroides que son inmunosupresores e inmunomoduladores, una sólida evidencia de la participación del sistema inmunológico (Segarra et al., 2012).

2.6.2. Inflamación en lesión renal aguda

La sepsis es una consecuencia exagerada en respuesta a una infección, se caracteriza por una inflamación sistémica con liberación de mediadores pro-y anti-inflamatorios. La lesión renal aguda (IRA) es común en pacientes críticamente enfermos en presencia de sepsis y un fuerte vínculo en la progresión a enfermedad renal crónica (Nouri et al., 2016; Chen H et al., 2015). Existe la evidencia que la inflamación juega un rol importante en el daño de varios órganos incluyendo el riñón (Trostel and García 2015) en el cual la permeabilidad capilar aumenta resultando en la excreción de albúmina en la orina (Carrillo et al., 2014; Khodir et al., 2014).

La principal causa de lesión de múltiples órganos se le atribuye al lipopolisacárido (LPS). El LPS es una molécula glicolipídica, considerada el principal componente antigénico de la membrana de las bacterias Gram negativas (Khodir et al., 2014). El LPS activa a macrófagos mediante TLR-4, resultando en la síntesis de mediadores de la inflamación como TNF α e IL-1 β , además de activar la producción de moléculas co-estimuladoras requeridas para una respuesta inmunológica adaptativa (Raetz et al., 2002).

En el hospedero el LPS se une a la proteína de unión al LPS (LBP) formando el complejo LPS-LBP, de esta manera se asocia al receptor CD14 que tiene como función transferir al LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR-4/MD-2). Una vez formado el complejo LPS-TLR4/MD-2, el TLR4 sufre una oligomerización, luego comienza la interacción con proteínas celulares que poseen dominios TIR (Receptores

Toll de Interleuquina 1) como son MyD88: proteína de diferenciación mieloide; TIRAP: proteína adaptadora del dominio TIR; TRIF: proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón β ; TRAM: molécula adaptadora relacionada con el TRIF y SARM: proteína inhibidora de la señal del TRIF. La interacción de estas proteínas resulta en la producción de citocinas inflamatorias o interferones tipo I (Hurtado y Irregui 2010).

La señal de transducción del LPS a través del TLR4 ha sido dividida en dos rutas, la vía dependiente de la proteína MyD88 y la vía dependiente de la proteína TRIF que concuerdan en la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Hurtado y Irregui 2010). En podocitos sensibles a LPS, la señalización mediada por LTR-4 resulta en una reorganización del citoesqueleto de actina, lo que conduce a la modificación de la estructura del podocito y a la pérdida de proteína en orina (Greka y Mundel 2011).

2.6.3. Inflamación en la regulación de WT1

En pacientes con SRNS se han encontrado mutaciones esporádicas en el gen WT1 con asociación a tumor de Wilm's, malformaciones urinarias o genitales (Ruf et al., 2004). Zapata y colaboradores en el 2017 encontraron una localización citoplásmica en muestras de pacientes con SNRE lo que limita su función como factor de transcripción y no puede modular la expresión de los genes modulados como nefrina y podocalixina, se ha observado que WT1 es regulado por proteína quinasa A (PKA) que media la fosforilación en la Serina 365 y 393 de WT1 que induce la traslocación al citoplasma (Sakamoto et al., 2012). Marcet et al., 2007 en células LEC humana tratadas con TNF observo la translocación de WT1 del núcleo al citosol y un incremento en la expresión de matrix metalloproteinase-9 (MM-9) para el cual WT1 es un represor (Marcet et al., 2007), por otra parte se ha observado que el LPS es capaz de modificar los patrones de localización nuclear de WT1 y suprime la transcripcional de la nefrina en los podocitos de ratones tratados. A las 76 h después de la exposición del LPS, la localización nuclear de WT1, los niveles de nefrina y RNAm se estabilizaron, indicando un efecto transitorio (Kato et al., 2010). Por lo tanto, proponemos un modelo de sepsis inducido por LPS que explica el papel de WT1 en el proceso inflamatorio en alteraciones renales.

2.7.- Mecanismos de modulación de WT1

Los RNA antisentido son reconocidos con gran importancia en la regulación de genes de mamíferos con la interacción de los transcritos. WT1 tiene un antisentido transcripcional conservado (WT1-AS) para regular los niveles de la proteína WT1. WT1-AS se originan dentro del intrón 1 con un promotor antisentido, se exporta al citoplasma y forma heteroduplex con el RNAm de WT1 en la región de interacción WT1 exón 1 y continuando río arriba, un importante regulador a través de interacción RNA: RNA (Dallosso et al., 2007).

La fosforilación es uno de los mecanismos pos-traduccionales por la cual se regula la actividad de factores de transcripción, proteínas de unión a DNA fueron fuertemente fosforiladas por la PKA y PKC *in vitro*. WT1 se localiza principalmente en el núcleo y mediante la activación de PKA resulta en la retención citoplasmática de este, es por esto que la fosforilación puede jugar un papel importante en la actividad reguladora de la transcripción de WT1 (Ye Y et al., 1996).

Por otro lado, se ha visto la sobreexpresión de PKC α aumenta la expresión de WT1 y se ha reportado que la curcumina imita inhibidores de PKC α en tratamiento en células K562, donde WT1 es inhibido independientemente de los efectos en la degradación de la proteína o desestabilización del RNAm, sino con la auto regulación de éste (Semsri et al., 2011).

Anteriormente hemos observado una localización citoplásmica de WT1 en pacientes resistentes al tratamiento con corticoesteroides que tienen capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora, posiblemente existiendo un mecanismo de modulación de WT1 que las citocinas inflamatorias están directamente relacionadas en este proceso. Kato et al., reporta en un modelo de sepsis en ratón donde observan un decremento de nefrina y deslocalización nuclear de WT1, es por eso que en esta tesis pretendemos realizar la evaluación de la movilidad de WT1 al citoplasma y si la fosforilación es la posible responsable de la inactivación como factor de transcripción en un modelo murino con sepsis y cultivo de podocitos con interleucinas proinflamatorias, ya que la inflamación es un proceso común en pacientes con enfermedad renal.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las afecciones renales son un problema de salud pública en México, con una creciente incidencia y prevalencia. Los pacientes con enfermedad renal tienen en común un proceso inflamatorio agudo o crónico presentando infiltración de células del sistema inmune principalmente macrófagos. Los pacientes con SN presentan una localización de WT1 hacia citoplasma perdiendo posiblemente su capacidad como factor de transcripción. WT1 está implicado en la regulación de en más del 60% de proteínas de los podocitos, por lo cual es importante determinar si las citocinas proinflamatorias son responsables de la fosforilación de WT1 y su movilidad hacia citoplasma, este trabajo ayudará a aumentar el conocimiento a nivel molecular y el posible rol que juega WT1 en la fisiopatología de las enfermedades renales.

4. HIPÓTESIS

El proceso inflamatorio modifica los patrones de expresión y localización de WT1, resultando en una afección renal.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del proceso de las citocinas pro-inflamatorias sobre el patrón de expresión de WT1, las proteínas moduladas por este y su relación con las afecciones renales, empleando un modelo de inflamación agudo murino.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la expresión de WT1 en riñones de ratones tratados y no tratados con lipopolisacáridos.
- 2.- Analizar las isoformas de WT1 en riñones de ratones tratados y no tratados con lipopolisacáridos.
- 3.- Determinar la expresión de la proteína nefrina en biopsias renales de ratones tratados con lipopolisacáridos.
- 4.- Correlacionar los patrones de expresión de WT1 y la expresión de citocinas inflamatorias en ratones tratados y no tratados con lipopolisacáridos.
- 5.- Determinar des-localización y fosforilación de la proteína WT1 en podocitos de ratones tratados y no tratados con lipopolisacárido.
- 6.- Evaluar la expresión de WT1 en explantes renales murinos tratados con citocinas inflamatorias.
- 7- Analizar des-localización de la proteína WT1 en explantes de riñón tratados con citocinas inflamatorias.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material Biológico

Se emplearon seis grupos de ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 a 10 semanas de edad con una n=5 en cada grupo (Harlan México, S.A. de C.V.) y 4 ratones para explantes renales. Los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones libres de patógenos. El manejo de los ratones se realizó de acuerdo el protocolo establecido por el comité de manejo y ética animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

7.2. Tratamiento con LPS y determinación de proteína total en orina

Los ratones fueron tratados con 8 mg/kg de LPS intraperitoneal, se recolectaron las muestras de suero y orina en el grupo control (sin LPS), a las 12, 24, 36, 48 y 72 h.

Para determinar la concentración de albúmina en orina se colocaron 40 µL de muestra de orina en un gel de poliacrilamida al 12% y un ng de albúmina sérica como control, se realizó un corrimiento electroforético y el gel fue teñido con Azul de Coomassie, la cuantificación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry (Bio-Rad DC™ Protein Assay Reagent B, US).

7.3. Obtención de rebanadas de tejido renal (Explantes)

Para el proceso de obtención de rebanadas de riñón de ratón se realizó en condiciones asépticas y con material y reactivos estériles. Los riñones obtenidos se colocaron en solución buffer Krebs-Henseleit (KB) para posteriormente pasarlos al rebanador Brendel-Vitron, con flujo constante de solución Krebs-Henseleit a 4⁰C y una mezcla de O₂/CO₂ (95.5%) obteniendo rebanadas con un diámetro aproximadamente de 5 mm y de 150-200 mm de grosor. Las rebanadas obtenidas se colocaron en un vaso de precipitados de 500 mL con solución Krebs-Henseleit a 4⁰C.

Las rebandas se incuban en medio TYI por 1 hora a 37⁰C y 5% de CO₂ en agitación lenta (40 rpm) en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiotico antimicótico. Los explantes fueron tratados con TNF α , IL-1 β y LPS como control a las 6, 12 y 24 h. Las muestras se fijaron en formol y otras se mantuvieron a -80⁰C hasta su uso.

7.4. Extracción de RNA

Los ratones fueron sacrificados por desnucamiento y se extrajeron los riñones, se maceró la quinta parte del tejido de riñón y se adicionó 1mL de Trizol para la lisis celular, se incubó por 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 s, la mezcla se dejó en incubación por 2 ó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4⁰C.

Después de centrifugar la muestra se tomó la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA, la precipitación se realizó en un tubo eppendorf con 500 μ L de isopropanol, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min, enseguida se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4⁰C, se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75 %, se mezcló y después fueron centrifugadas a 7,500 g por 5 min a 4⁰C, se dejó secar de 5 a 10 min para posteriormente re suspender en 50 μ L de agua libre de RNAsa. Las muestras se incubaron a 55⁰C de 10 a 15 min para posteriormente leer su concentración.

7.5. Síntesis de cDNA

Para cada reacción se adicionó en un tubo eppendorf un volumen de 10 μ L que contenía 5 μ g de RNA, 2 μ L de 10X TR Buffer, 0.8 μ L de 25X dNTP MIX, 2 μ l de 10X RT Random Primers, 1 μ L de Multiscribe TM Revers Transcriptase y 4.2 μ L de agua libre de RNAsa. La reacción se llevó a cabo en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 min a 25⁰C, 120 min a 37⁰C y 5 min a 85⁰C.

7.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para las isoformas de WT1

La reacción se realizó con 5 µL de cDNA, 5 µl de 5X My Taq Reaction, 0.5 µL de Primers Forward y Reverse, 0.5 µL My Taq DNA Polimerase y agua suficiente para un volúmen total de 25 µL.

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 60 s para la desnaturalización, 60°C por 60 s para la alineación de primers y la extensión a 72°C por 90 s con un total de 35 ciclos.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2 % para la isoforma 17AA y en gel de poliacrilamida al 8% para KTS+/-, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con la luz ultravioleta (UV).

Tabla 1. Secuencias de primers para determinar las isoformas de WT1

Localización	Secuencia	Producto
EXON 5	Forward 5'-GACCTGGAATCGATGAACTTAG-3'	17AA+ 471 pb
	Reverse 5'-GAGAACTTTCGCTGACAACTT-3'	17AA- 420 pb
EXON 9	Forward 5'-GTGTGAAACCATTCAGTGTA-3'	KTS + 132 pb
	Reverse 5'-TTCTGACAACTTGGCCACCG-3'	KTS - 123 pb

7.7. PCR para expresión de WT1, Nefrina y G3PDH

La reacción se realizó con 5 µL de cDNA, 5 µL de 5X My Taq Reaction, 0.5 µL de Primers Forward y Reverse, 0.5 µL My Taq DNA Polimerase y agua suficiente para un volúmen total de 25 µL. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2 % y se observaron en el fotodocumentador.

Tabla 2. Secuencias de primers para determinar WT1 y Nefrina

Gen	Primers	Fragmento
WT1	Forward 5'-CACATGAGAGAAACGCCCTTCATGTG-3' Reverse 5'-TTTGAGCTGGTCTGAACGAGAAA-3'	160pb
Nefrina	Forward 5'- CCC CAA CAT CGA CTT CAC TT -3' Reverse 5'- GGC AGG ACA TCC ATG TAG AG -3'	372pb
GA3PDH	Forward5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' Reverse5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452pb

Tabla 3. Condiciones de reacción PCR

Gen	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos
WT1	94°C 40s	64°C 30s	72°C 30s	35
NEFRINA	94°C 30s	60°C 30s	72°C 30s	30
GA3PDH	94°C 40s	60°C 30s	72°C 40s	35

7.8. qPCR para cuantificar la expresión relativa de WT1

Se tomaron 4 µL de DNAc para cada reacción de WT1, 10µL de Master Mix, 1 µL de GA3PDH (Control endógeno), 0.7 µL de sonda de WT1 y se llevó a un volumen de 20 µL con agua tratada con DEPC. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y el análisis de resultados se realizó con ayuda del software del termociclador PCR en Tiempo Real (Applied Biosystems 7500 Software v2.0.1).

Tabla 4. Protocolo de reacción para qPCR (WT1)

Paso	Temperatura °C	Tiempo
Activación de Uracil DNA Glycosylasa	50	2 min
Desnaturalización inicial	95	10 min
40 ciclos de reacción de PCR (alineamiento, extensión y lectura del fluoróforo)	95	15 s
	60	1min

Para determinar la expresión relativa del RNAm, está dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

En el cual: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{muestra}) - \Delta\text{Ct} (\text{calibrador})$

$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{muestra}) - \text{Ct} (\text{normalizador})$

Donde Ct (muestra) y Ct (normalizador) es el ciclo al cual la muestra y el normalizador respectivamente alcanza el nivel umbral de fluorescencia en el ensayo de PCR en tiempo real (Livak y Schmittgen 2001).

7.9. Western blot

7.9.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se maceró la cuarta parte del riñón, posteriormente se adiciono 200 μL de Buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150 mM, Tris 25 mM pH 7.6), se incubó en hielo por 1h con 1 μL de Fenil Metil Sulfonil Fluoride (PMSF) y 1 μl de un coctel de inhibidores de fosfatasa (POO44 Sigma adrich, US), se centrifugó a 10, 000 rpm durante 3 min y se recolecto el sobrenadante.

7.9.2. Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el kit DC Protein Assay de Bio-Rad. Se agregó a cada pozo 5 μL de la muestra en una dilución 1:10 y de los estándares, 25 μL de la solución A' y 200 μL de la solución B', se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 750 nm en un lector de placa.

7.9.3. Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Las muestras se prepararon con 40 µg de proteína con 5 µL de buffer de carga (β-mercaptoetanol, Azul de bromofenol, SDS, Glicerol), se desnaturalizaron a 95°C por 5 min y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12 % en la cámara de electroforesis a 40 volts hasta salir del gel concentrador para después correr a 100 volts por aproximadamente 2 h.

7.9.4. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Se formó el casete para realizar la transferencia en el siguiente orden: esponja, papel filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulosa, nuevamente papel filtro y esponja. Se corrió en cámara húmeda de transferencia a 24 volts toda la noche a 4°C.

7.9.5. Inmunodetección

Se colocó la membrana de nitrocelulosa en solución de bloqueo (TBS-Tween con leche descremada al 5%) durante 1 h. Posteriormente se colocó la membrana de nitrocelulosa con el primer anticuerpo monoclonal (anti-WT1 F-6, Santa Cruz Biotechnology, U.S.) a una dilución de 1:3000 en una solución de TBS-Tween con 2.5 % leche descremada y se dejó incubando toda la noche a 4°C, después se lavó la membrana tres veces 10 min cada una con TBS-Tween y se agregó el segundo anticuerpo (anti-raton-HRP, Santa Cruz Biotechnology, U.S.) en una dilución de 1:3000, se dejó incubar 2 h, se lavó nuevamente tres veces con TBS-Tween, y se agregó el sustrato de quimioluminiscencia (partes iguales de Luminol A y B) por 7 min y se reveló.

7.10. Citocinas inflamatorias por inmunoensayo de ELISA

Para la determinación de la concentración de TNFα (Murine TNFα Mini ABTS ELISA, cat: 900-M54, PreproTech, México), IL-1β (Murine IL-1β Mini ABTS ELISA, cat: 900-M47, PreproTech, México) e IL-6 (Murine IL-6 Mini ABTS ELISA, cat: 900-M50, PreproTech, México) se determinó mediante ELISA en suero en los ratones en los

diferentes tiempos de la inflamación sistémica, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.11. Fijación e inclusión de tejido

Un riñón de cada ratón se fijó en formalina al 10% y se procedió a la inclusión en parafina en un lapso no mayor a 72 h, seguido con cortes de 4 micras de grosor, el tejido se tiñó con hematoxilina-Eosina para observar morfología, además de realizarse cortes para Inmunohistoquímica (IHQ) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

7.11.1. IFI en biopsia de riñón

Para la determinación de la localización nuclear o citoplasmática de WT1 se realizó por IFI, para lo cual se inició con la desparafinización de los tejidos a 60°C durante 20 minutos, en seguida se hidrataron con un tren de alcoholes de mayor a menos concentración por tres minutos cada uno (Etanol absoluto, etanol 95 %, etanol 70 %, agua destilada).

Posterior a la hidratación de los tejidos se permeabilizó las membranas con solución Tris-buffer salino (TBS) + Tween 20 (1%) por 3 minutos. Para la exposición de antígenos se introdujeron las laminillas en TRS y se llevaron a una olla de vapor durante 10 min (100°C) y se dejó reposar durante otros 10 min.

Se aplicó en anticuerpo primario F6 (1:50) de WT1 de Santa Cruz Biotechnology toda la noche a 4°C, seguido de un lavado por 3 min con TBST y la aplicación del anticuerpo secundario anti-Ratón conjugado con Rojo Texas (1:200) por 1.5 h. Se lavó y se contrastó con DAPI por 30 min, se montó con PBS/Glicerol (3:7). Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal (Olympus BX61W1) con un objetivo de agua 60X utilizando un láser de 405 para DAPI y 559 nm para Rojo Texas. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ.

7.11.2. IHQ de biopsia de ratón

Para la determinación de la localización nuclear o citoplasmática de WT1 se realizó por IFI, para lo cual se inició con la desparafinización de los tejidos a 60°C durante 20 minutos, en seguida se hidrataron con un tren de alcoholes de mayor a menos

concentración por tres minutos cada uno (Etanol absoluto, etanol 95 %, etanol 70 % , agua destilada).

Posterior a la hidratación de los tejidos se permeabilizo las membranas con solución Tris-buffer salino (TBS) + Tween 20 (1%) por 3 minutos. Para la exposición de antígenos se introdujeron las laminillas en TRS y se llevaron a una olla de vapor durante 10 min (100°C) y se dejó reposar durante otros 10 min. Se continuó con el bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3 % por 10 minutos, seguido de un lavado en TBST durante 3 min.

Se aplicó en anticuerpo primario para WT1 fosforilado en la serina 393 y 365 para los cuales se usaron los policlonales R-393 y 363-WT1 (Santa Cruz, Biotechnology, sc-12933 and sc-12934-R, Dallas, Texas, USA) en una concentración 1:100 toda la noche a 4°C, seguido de un lavado por 3 min con TBST y la aplicación del ac secundario de VECTOR. Se añadió la solución de estreptavidina-HRP y se dejó incubar durante 30 min, se procedio con un lavado en TBST de 3-5 minutos, por último se revelo con solución de sustrato-cromógeno DAB (3´3-diaminobencidina) al 5% de 7-10 minutos.

7.12. Análisis Estadístico

El análisis de resultados se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), con un post-Tuckey para observar las diferencias entre las medias y correlación de Pearson para observar la asociación entre los grupos considerándose significativo con $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación del daño renal por administración de LPS en ratones BALB/c

Para determinar el daño renal inducido por la inflamación sistémica aguda en el modelo murino tratado con LPS, se realizó el análisis histológico para determinar el grado del daño glomerular, niveles de albúmina y proteína total en orina en los diferentes tiempos de la inflamación sistémica.

8.1.1. Análisis histológicos del daño glomerular en los diferentes tiempos de la Inflamación Sistémica aguda.

Para determinar daño renal posterior a la inducción de inflamación sistémica con LPS, se realizaron cortes de tejido de 4 μ m y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. En los cortes histológicos de las biopsias control no se observaron cambios aparentes en el glomérulo sin embargo en las biopsias de los riñones de los ratones tratados con LPS, a partir de las 12 h se observaron cambios como disminución del espacio de la cápsula de Bowman y el incremento de núcleos, con un efecto mayor a las 36 h donde se reduce totalmente el espacio de la cápsula de Bowman, hay proliferación de células mesangiales, hiper celularidad e incremento del tamaño del glomérulo, a las 48 h empieza a observarse la fase regresiva en las alteraciones (Figura 8).

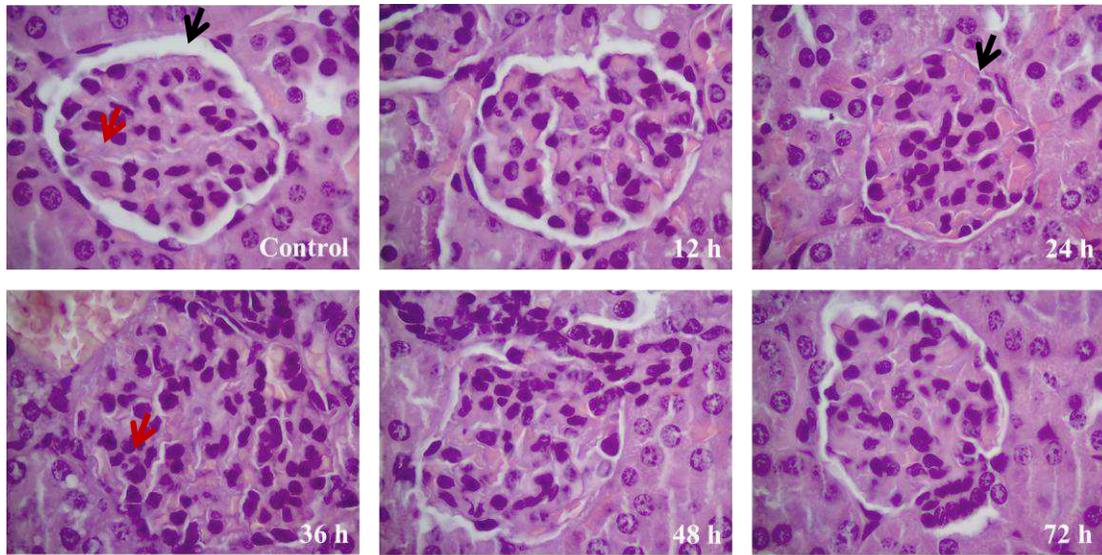


Figura 8. Análisis histológico de la progresión de daño glomerular. En el análisis histológico mediante Hematoxilina-Eosina, se observa una modificación de la estructura glomerular a partir de las 12 h, con un mayor daño a las 36 h como es la reducción del espacio de la capsula de Bowman (flechas negras) y un incremento en el número de células mesangiales (flechas fojas) posteriores al tratamiento con LPS.

8.1.2. Análisis de proteínas en orina

La presencia de grandes cantidades de proteínas en la orina es un signo característico de falla renal por pérdida de la barrera de filtración glomerular, razón por la que se determinaron los niveles de proteína en orina de manera cuantitativa (por el método de Lowry) y cualitativa en un gel de poliacrilamida al 12 % teñido con Azul de Coomassie poniendo énfasis en los niveles de albúmina excretada (Figura 9), por ambos métodos se puede observar el incremento general de la proteína excretada en los grupos de ratones con el tratamiento de LPS comparados con el grupo control, observándose el mayor incremento después de las 12 h del tratamiento con una disminución a las 48 y 72 h. La concentración de albúmina se determinó por densitometría presentándose una concentración de 215.87 ± 3.22 y 190 ± 36.78 $\mu\text{g/mL}$ en la orina de ratones a las 24 y 36 h con una diferencia estadística significativa comparada con el control sano ($p > 0.0001$) (Gráfica 1).

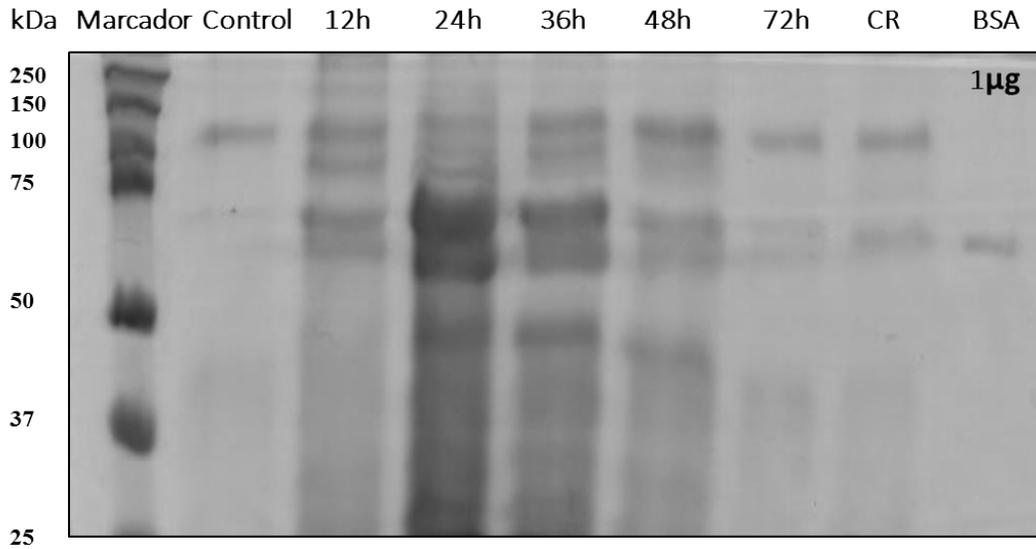
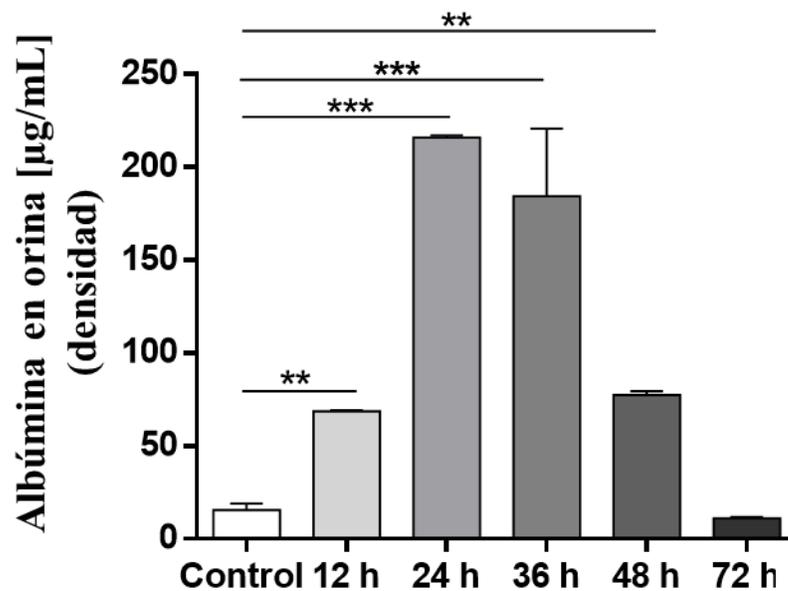
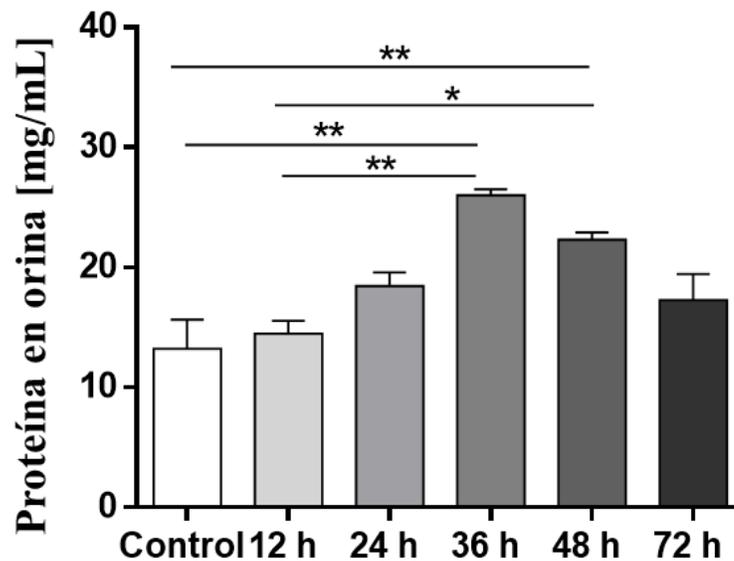


Figura 9. Incremento de proteína en orina por SDS-PAGE. 40 μ L de orina de los ratones tratados con LPS a diferentes tiempos y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomassie en el cual se observa un incremento de proteinuria después de las 12 h de tratamiento con LPS y el control sin LPS. CR: grupo crónico como control positivo, BSA: Albúmina sérica bovina.



Gráfica 1. Incremento de la concentración de albúmina en orina. Se determinó la concentración de albúmina en orina usando como control 1 μ L de BSA (Albúmina Sérica Bovina) mediante densitometría del gel de poliacrilamida. Se observa un incremento mayor de la concentración en μ g/mL de proteína a las 24 y 36 h posteriores a la inducción de la inflamación sistémica con una diferencia estadística significativa comparada con el control ($p < 0.001$).

La concentración en mg/mL muestra un incremento de proteína total en orina después de las 12 h del tratamiento con LPS, con un mayor incremento a las 36 h comparado con el grupo control con $p = 0.01$ (Gráfica 2).



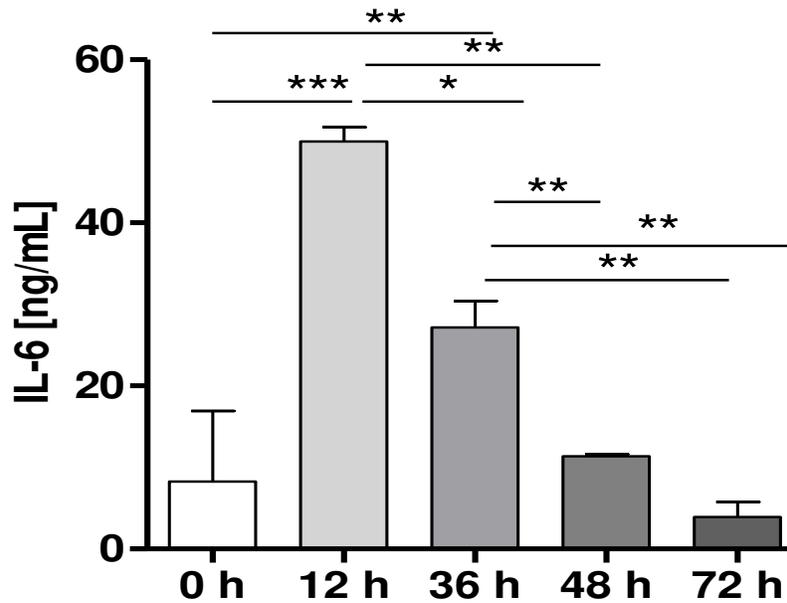
Gráfica 2. Incremento de la concentración de proteína en orina durante inflamación sistémica. Mediante el método de Lowry se observa un incremento de la concentración en mg/mL de proteinuria por el método de Lowry después de las 12 h de tratamiento con LPS comparado con el control. ** = $p \leq 0.01$; * = $p \leq 0.05$.

8.2. Secreción de citocinas inflamatorias en daño renal agudo por LPS

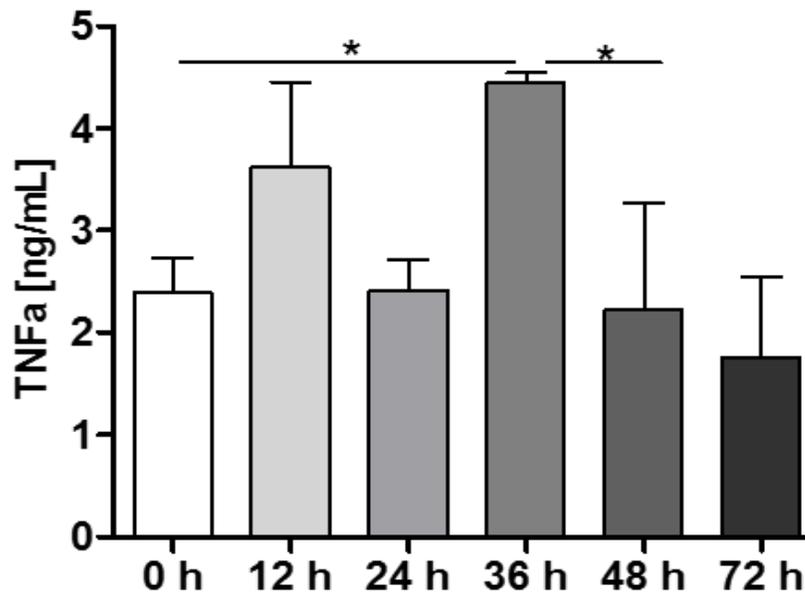
Los resultados de la ELISA presentan que la endotoxemia inducida por el LPS eleva los niveles de las citocinas proinflamatorias analizadas: IL-6, TNF α e IL-1 β .

En el análisis de la IL-6 se observó un incremento en el suero de ratones a lo largo del proceso inflamatorio de las 12 a las 48 h con respecto al control, sin embargo su máximo nivel lo alcanza a las 12 h con 49.96 ± 5 ng/mL, lo cual es estadísticamente significativo comparado con el control $p < 0.0001$ como se muestra en la gráfica 3. En TNF α se observó un incremento en los diferentes tiempos de la inflamación sistémica, la mayor concentración se mostró a las 36 h con 4.44 ± 0.1 ng/mL con una diferencia significativa comparada con el control $p < 0.05$ como se muestra en la gráfica 4. Los niveles de IL-1 β muestran un incremento en los niveles de expresión en todos los tiempos analizado con

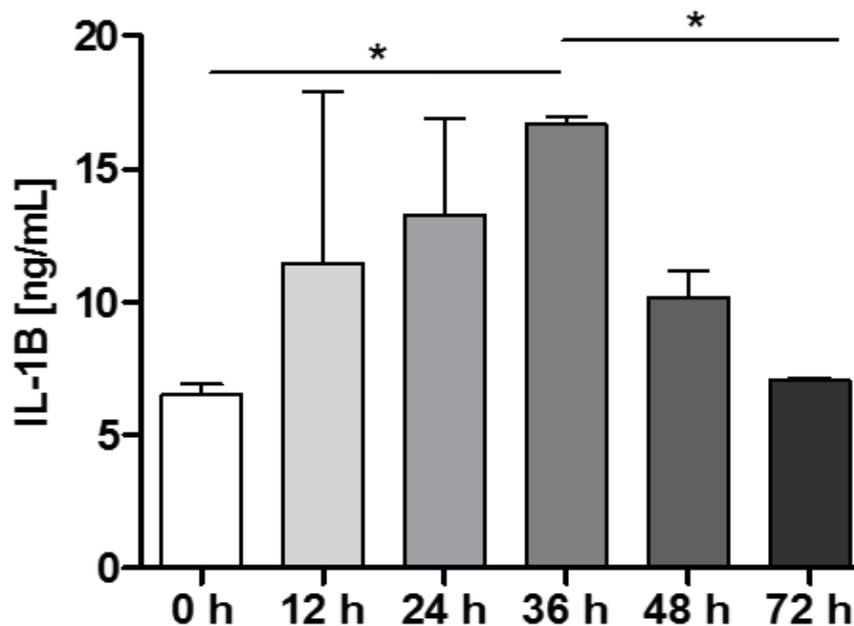
respecto al control, sin embargo su concentración más alta se observa a las 36 h con una diferencia estadística a las 36 h ($p < 0.05$) como se muestra en la gráfica 5.



Gráfica 3. IL-6 en el proceso inflamatorio sistémico. Se observa un incremento de la concentración en ng/mL de IL-6 a las 12, 36 y 48 h posterior a la inducción de la inflamación sistémica, con una mayor concentración a las 12 h ($p < 0.0001$).



Gráfica 4. TNFα en suero de ratones con inflamación sistémica. TNFα muestra un incremento de las 12 a las 48 h posteriores a la inducción de la inflamación, se observa un incremento mayor a las 36 h con una diferencia estadística significativa comparada con el control con $p < 0.05$.



Gráfica 5. IL-1 β en suero de ratones posterior a la inducción de la inflamación sistémica. IL-1 β muestra un incremento a partir de las 12 h posteriores a la inducción de la inflamación, se observa un incremento mayor a las 36 h con una diferencia estadística significativa comparada con el control con $p < 0.05$.

8.3. Modulación de WT1 en el proceso inflamatorio

El gen WT1 presenta 4 isoformas de acuerdo a sus splicing alternativos en el exón 5 y en el exón 9 con diferentes funciones biológicas.

8.3.1. Análisis de la expresión de las isoformas WT1 KTS \pm /17AA \pm

Para observar si existe una desregulación o expresión diferencial de las isoformas de WT1 KTS \pm /17AA \pm en daño renal, se analizó mediante PCR punto final, en el que se observó mayor expresión en la banda de la isoforma KTS+ en relación con la isoforma KTS-, mientras que el análisis de las isoformas 17AA \pm que se observa en la misma proporción tanto en controles como en los tratamientos, los productos de PCR fueron observados en geles de poliacrilamida para obtener mejor resolución en la separación de bases, no observándose un desbalance entre las isoformas en los diferentes tiempos del

daño renal transitorio al tener similitud en la expresión del control sin tratamiento (Figura 10).

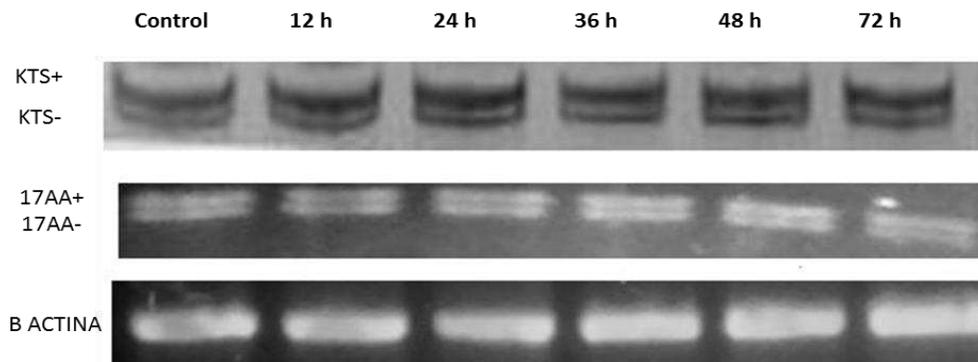
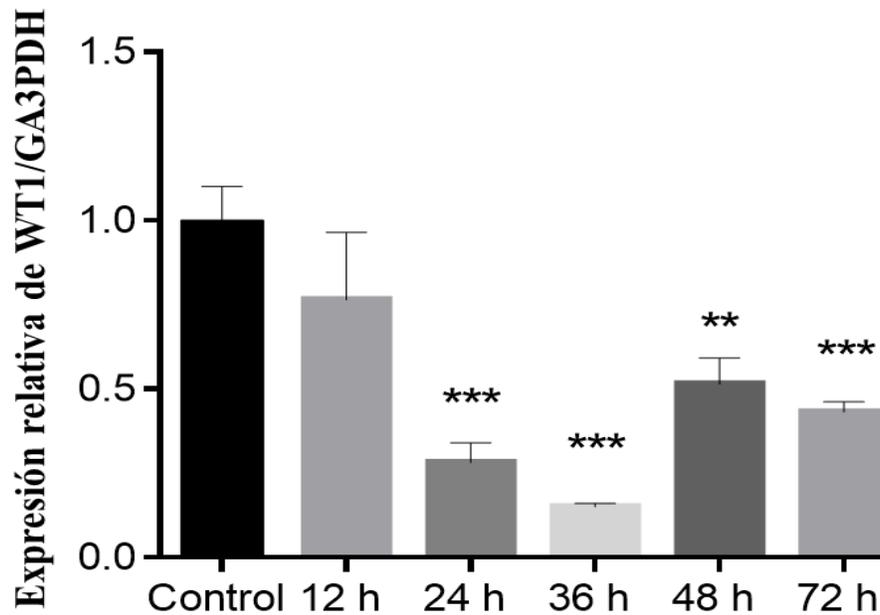


Figura 10. Análisis de la expresión de las isoformas KTS± y 17AA± de WT1 mediante PCR. No se observa desregulación de la expresión de las isoformas de WT1 KTS±/17AA± en daño renal inducido con LPS en ningún tiempo posterior al tratamiento.

8.3.2. Expresión relativa de WT1 en biopsias renales tratadas con LPS

Con la finalidad de responder nuestra pregunta central, si ¿WT1 era modulado por el proceso inflamatorio y este repercutía en la afección renal?, se determinó la expresión total del gen WT1 en biopsias renales de los ratones con inflamación sistémica en los diferentes tiempos del curso de la inflamación, se analizó por medio de la prueba de PCR en tiempo real y se normalizó con el gen constrictivo GA3PDH y se determinó la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) del RNAm como se explica en material y métodos. En la gráfica de expresión relativa se observó una disminución en todos los tiempos analizados con respecto al control sin embargo en punto más bajo es a las 36 h de la inducción de la inflamación sistémica como se muestra en la gráfica 6. La expresión relativa del RNAm de WT1 tiene una correlación negativa con TNF α ($p= 0.05$) e IL-1 β ($p= 0.29$).



Gráfica 6. Expresión relativa del RNA mensajero de WT1. En la expresión relativa del RNAm de WT1 mediante RT-qPCR en los diferentes tiempos de la afección renal se observa la disminución de la expresión en los diferentes tiempos de daño renal, mediante el método de Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$. Con una diferencia estadística significativa comparado con el control (***= $p < 0.001$), GA3PDH como gen endógeno.

8.3.3. Expresión de la proteína WT1 por Western blot

En el análisis de la expresión de la proteína WT1 mediante la técnica de Western blot se observó una disminución de la proteína en todo el transcurso de la inflamación sistémica y el análisis de densitometría figura 11.

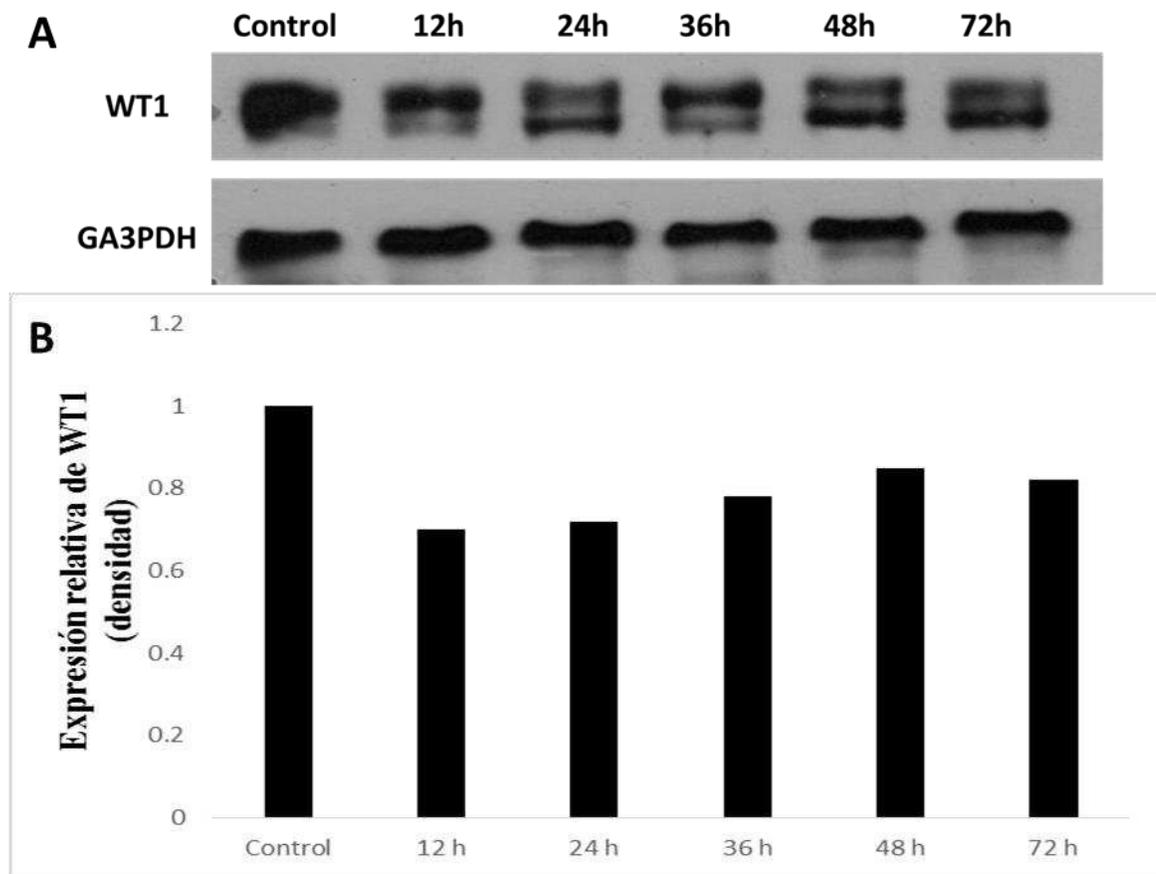


Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína WT1. En el análisis de la expresión de la proteína de WT1 mediante western blot (A), se observa un decremento posterior a las 12 h después de la inducción de la inflamación sistémica, el cual fue medido mediante densitometría y normalizando con GA3PDH (B).

8.3.4. Localización (nuclear/citoplasmática) y fosforilación de WT1

Uno de los eventos importantes en la modulación post-traduccional de la proteína de WT1 es la fosforilación en los residuos de aminoácido 363 y 393 que induce el desplazamiento de la proteína al citoplasma. Para ello se determinó la presencia de WT1 fosforilado en los podocitos así como la localización de WT1 por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

8.3.5. WT1 fosforilado en biopsias renales de ratones tratados con LPS

El análisis y la fosforilación de WT1 se analizó por IHQ indicando la presencia de WT1 fosforilado en la serina 363 y 393 en el citoplasma de las células en cortes de tejido renal a partir de las 12 h de la inducción de la inflamación sistémica manteniéndose hasta las 72 h como se muestra en la figura 12.

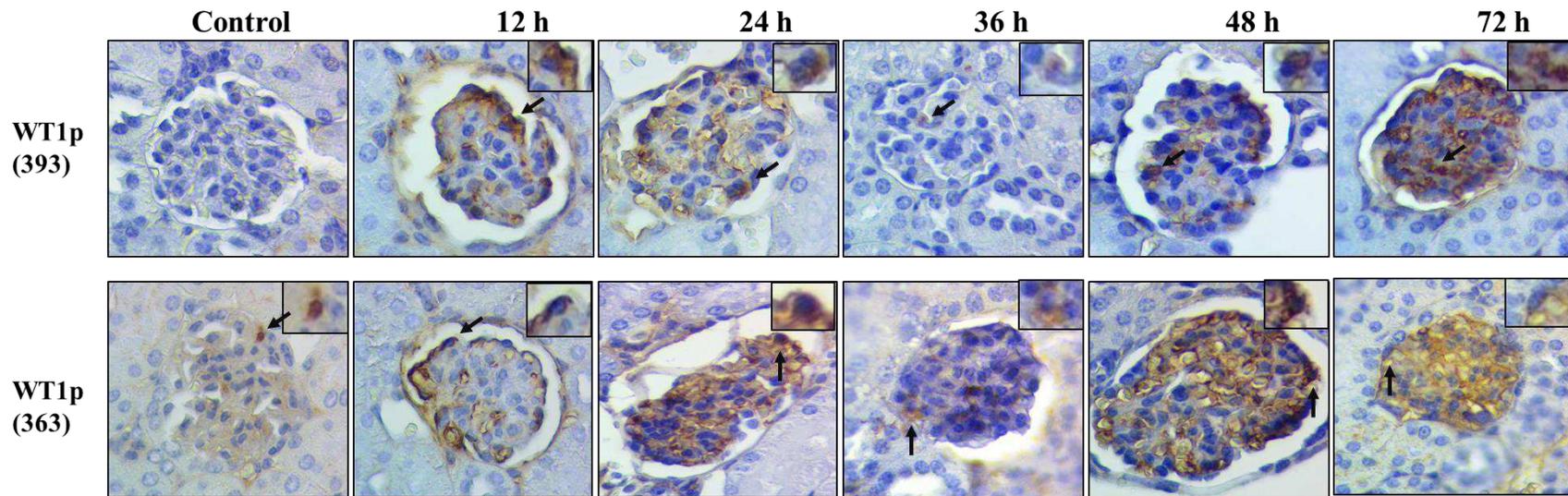


Figura 12. Análisis de la proteína WT1 fosforilado. En el análisis de la proteína de WT1p (WT1 fosforilado) se realizó mediante IHQ (Inmunohistoquímica), en el cual se observa un incremento de la proteína fosforilada en las serinas 393 y 363 (ó 365 según isoforma) en el proceso de daño renal a partir de las 12 h de la administración del LPS. Los recuadros que se observan en la parte superior derecha, son aumentos de la región que marca la flecha.

8.3.6. Localización nuclear/citoplasmática de WT1 por IFI

Para determinar la localización de la proteína WT1 en las biopsias de riñones de los ratones en los diferentes tiempos de la afección renal se analizó mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la cual fueron observadas por microscopia confocal, como se menciona en material y métodos. Al analizar las células del glomérulo se observó una localización nuclear de WT1 en los podocitos de las muestras control, no así para las muestras con mayor daño (36 h), en las cuales se observó una localización principalmente citoplasmática como se muestra en la figura 13.

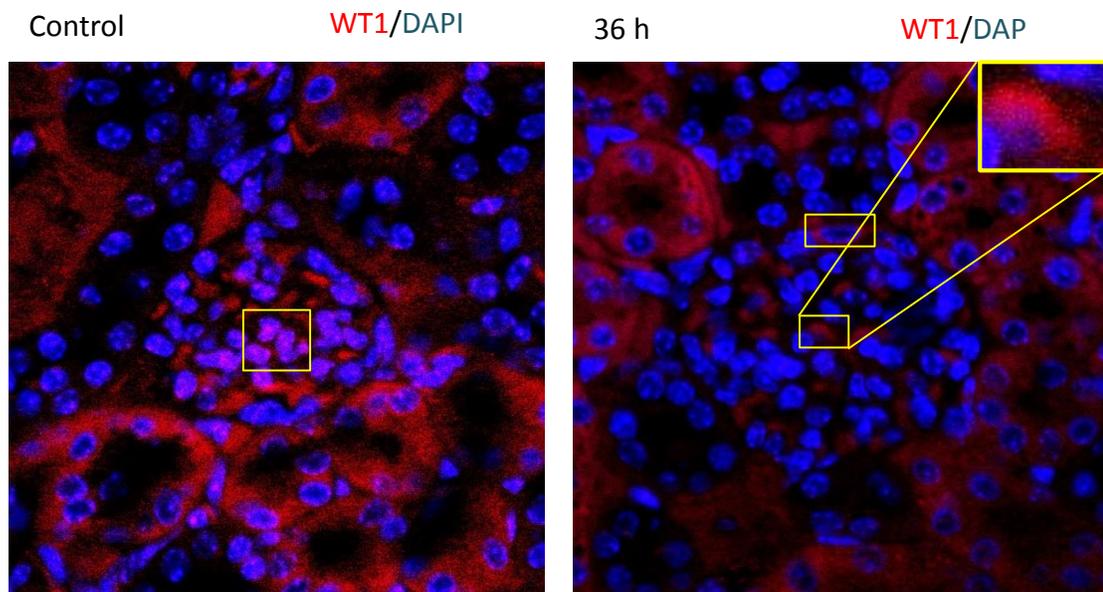


Figura 13. Localización de la proteína WT1 por IFI en podocitos glomerulares. El análisis de la localización de la proteína de WT1 en ratones de grupo control y 36 h posteriores a la administración de LPS. Rojo TX (WT1) y DAPI (Núcleos). En el grupo control se observa una localización de WT1 en el núcleo como el que se muestra en el recuadro amarillo (podocitos) y a las 36 h una localización en citoplasma (Olympus BX61W1 60x).

8.3.7. Expresión del RNAm de WT1 y Nefrina en riñón de los ratones con LPS

Se ha reportado que la des-localización de WT1 bloquea su actividad post-transcripcional y esto repercute en daño renal por lo que se analizó la expresión del RNAm de WT1 y Nefrina por RT-PCR, nefrina en un gen modulado por WT1 e indispensable para la correcta filtración glomerular, el RT-PCR punto final no indica que existe una asociación entre los niveles de expresión de WT1 y nefrina en las h críticas

de la inflamación y daño renal (24 y 36 h) (Figura 14), se usó el gen constitutivo GA3PDH para normalizar y determinar el análisis de densitometría de los 2 genes analizados.

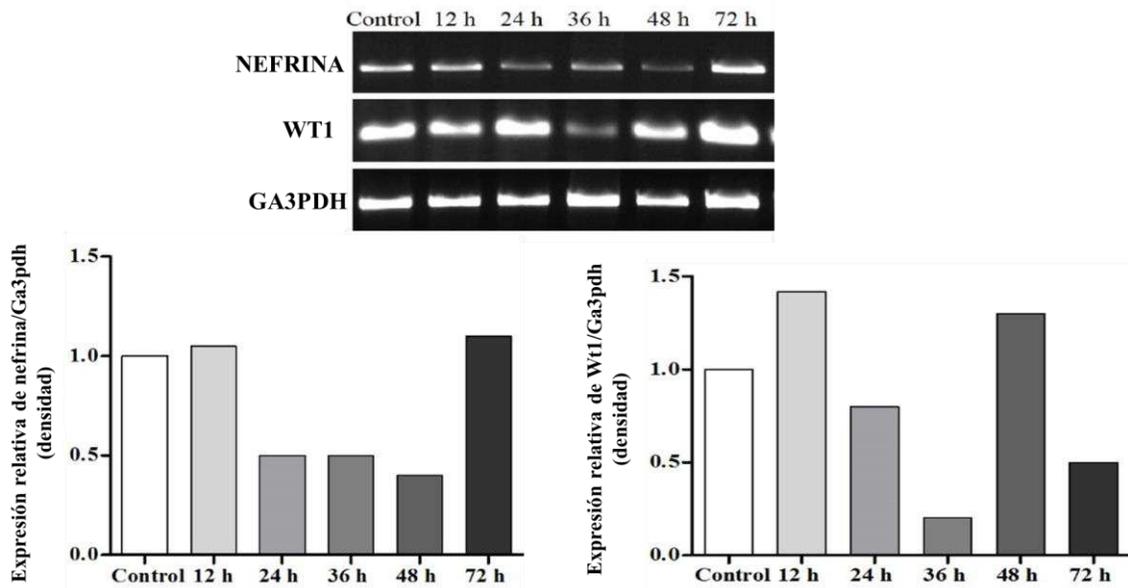


Figura 14. Análisis de la expresión del RNAm de Nefrina. En el análisis de la expresión de Nefrina mediante RT-PCR muestra el decremento a las 24,36 y 48 h posteriores a la inducción de la inflamación sistémica. Las bandas fueron analizadas mediante densitometría y normalizadas con GA3PDH.

8.3.8. Expresión del RNAm de WT1 y Nefrina en explantes renales tratados con TNF α e IL-1 β

Con la finalidad de tener un resultado más limpio sin la interacción de toda la biología del animal, se realizaron cultivos de explantes de tejido renal y fueron tratados con las citocinas TNF α e IL-1 β para analizar la expresión de WT1 y NEFRINA, así como para observar su localización Núcleo/citoplasma de WT1.

Para determinar si las citocinas modulan la expresión de WT1, los explantes renales fueron tratados con IL-1 β y TNF α durante 12 y 24 h, las muestras fueron analizadas por RT-PCR en el cual se observa un incremento del RNAm de WT1 con TNF α e IL-1 β a las 24 h y una disminución en la expresión de nefrina como se observa en la figura 15.

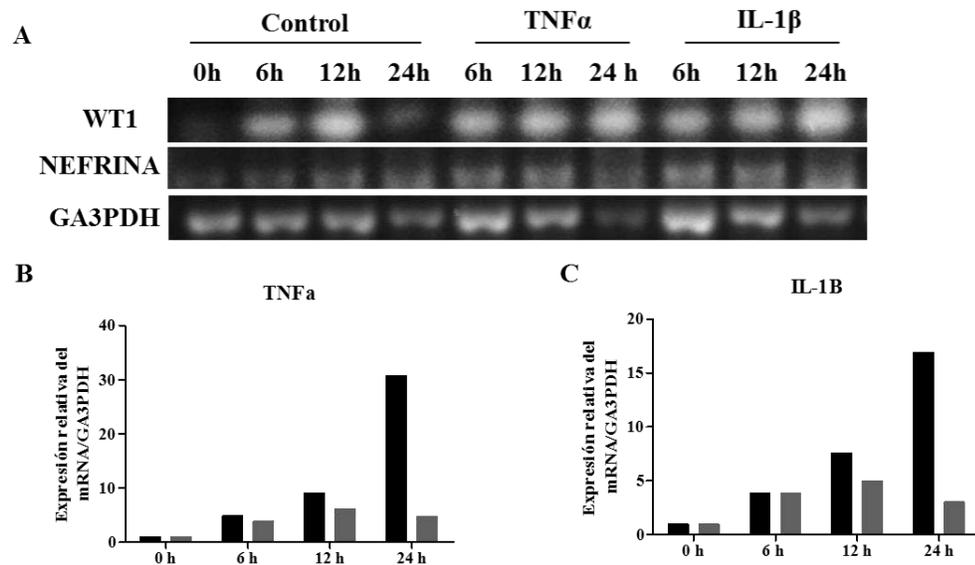


Figura 15. Análisis de la expresión del RNAm de WT1 y Nefrina en explantes renales. En el análisis de la expresión de WT1 y NEFRINA mediante RT-PCR en explantes renales expuestos a 10ng/mL de TNF α y 20 ng/mL de IL-1 β en diferentes tiempos, en el cual se observa un ligero incremento de WT1 con IL-1 β a las 24 h y para TNF α a las 12h y 24 h para TNF α .

8.3.10. Localización nuclear/citoplasmática de WT1 por IFI en explantes renales

Para determinar si TNF α e IL-1 β son las responsables de la deslocalización de la proteína WT1, se realizaron explantes renales de ratón y se trataron con las citocinas TNF α e IL-1 β a las 12 y 24 h, las muestras se analizaron mediante Inmunofluorescencia Indirecta, la cual fueron observadas por microscopia confocal, como se menciona en material y métodos. Se observó una localización principalmente nuclear de WT1 en las muestras control, en los explantes con LPS e IL-1 β se observa una localización núcleo/citoplásmica y una localización citoplasmática para explantes tratados con TNF α como se muestra en la figura 16.

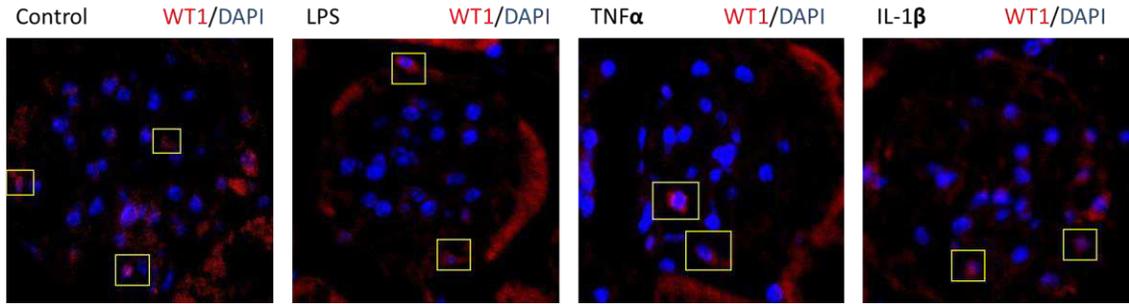


Figura 16. Localización de la proteína WT1 por IFI en podocitos glomerulares de explantes tratados con TNF α e IL-1 β . En el análisis de la localización de la proteína de WT1 en explantes renales tratados con TNF α e IL-1 β se observa una deslocalización nuclear en los explantes tratados con TNF α , y una localización tanto núcleo/citoplásmico para LPS e IL-1 β . Rojo TX (WT1) y DAPI (Núcleo) como se muestra en los recuadros color amarillo (podocitos) (Olympus BX61W1 60x).

9. DISCUSIÓN

El daño renal se caracteriza por la presencia de anomalías de la estructura o función del riñón con síntomas que comprenden la pérdida de grandes cantidades de proteína de la sangre a la orina a través de los glomérulos, particularmente albuminuria (Mogensen et al., 1983). Diferentes estudios de pacientes con algún tipo de daño renal como Nefritis Diabética (Duran y Rubio 20014), Nefritis Lúpica (Lucisano et al., 2015), SN (Tieranu et. al., 2017), muestran una alta relación del daño renal con el proceso inflamatorio. En esta tesis se realizó un análisis del daño renal a nivel molecular e histológico en un modelo murino con un proceso inflamatorio sistémico (Doi et al., 2009) mediante la administración de LPS para producir la lesión renal aguda. Huang et al., 2017 en un modelo con ratas Wistar indujeron daño renal con adriamicina y una dieta rica en lípidos, observaron cambios histopatológicos como expansión glomerular, proliferación de células mesangiales, fusión de pedicelos e infiltración de células inflamatorias en los glomérulos con un incremento significativo de TNF α en este grupo y en el 2018 Wang y colaboradores trabajaron con un modelo murino de Nefropatía Idiopática membranosa (NIM) producida por BSA, la histología renal mediante tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) muestra un engrosamiento difuso de la membrana basal glomerular con incremento de células inflamatorias por IHQ, a diferencia de un grupo de ratones con NIM a los que se inhibió la señalización de TNF α mediante el bloqueo del receptor TNFR1 y TNFR2 en el que no se observan cambios histológicos significativos con menor número de células infiltradas en el glomérulo. Estos resultados concuerdan parcialmente con los nuestros ya que con la inducción de la inflamación sistémica mediante la administración de LPS se observa en cortes renales cambios histopatológicos como expansión glomerular, hiper celularidad e infiltración de células inflamatorias que correlacionan con el incremento de IL-1 β y TNF α en el suero de estos ratones.

Dentro de las principales características de daño renal se encuentra el incremento de la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular (Brinkkoetter et al., 2013), esto debido a múltiples factores que intervienen en el borramiento o desprendimiento de los podocitos, dando origen a un extenso espectro de síndromes clínicos (Pan et al., 2016). En Nefritis Lúpica, una complicación de una enfermedad autoinmune en el que se ha observado desprendimiento de podocitos y disminución en la expresión de la proteína WT1 (Bollain et al., 2011).

La respuesta de los pacientes a terapia inmunosupresiva, en las diferentes afecciones renales indican que el sistema inmune y el proceso inflamatorio juegan un papel importante en el daño renal y las presencia o las mutaciones de WT1 en pacientes con síndrome nefrótico sensible resistente a esteroides indican la importancia de WT1 en la respuesta a la terapia (Dong et al., 2015).

Takano et al., 2007, en un cultivo de podocitos en presencia de TNF α e IL-1 β , observaron un incremento en los niveles del RNAm de WT1, mediante análisis de Northern blot. Estos resultados no concuerdan con los nuestros, en el cual se observó una disminución en la expresión del RNAm partir de las 12 h, con una mayor disminución en a las 36 h posteriores a la administración del LPS, por PCR en tiempo real, también se observó la disminución pero no total de proteína de WT1 mediante western blot, esta diferencia podría deberse a que Takano et al., 2007 utilizan cultivo de podocitos puro y en nuestro caso se trabajó con biopsias de tejido renal de nuestro modelo animal en el cual intervienen gran número de células diferentes, sin embargo si concuerdan con los resultados publicados por Zapata et al., 2017 en el cual reportan una disminución en la expresión de proteína entre los diferentes grupos de estudios en pacientes con Síndrome Nefrótico en biopsias renales mediante el análisis de fluorometría.

Las diferentes isoformas de WT1 juegan un papel importante en la biología celular ya que la isoforma KTS- tiene una función principalmente como factor de transcripción y la isoforma KTS positiva se le ha atribuido en el procesamiento del RNAm (Larson et al., 1995). Klam et al., 1998 en muestras de riñón de pacientes con tumor de Wilm's, control sano y pacientes con síndrome de Frasier, analizaron la expresión de la isoforma KTS+/- mediante RT-PCR, observando una mayor expresión de la isoforma KTS+ en sujetos

sanos y en pacientes con tumor de Wilm's, sin embargo, en pacientes con síndrome de Frasier se observa una desregulación con aumento en la expresión de KTS- y disminución en la isoforma KTS+, sin embargo en algunos síndromes WT1 se encuentra mutado lo que ocasiona la desregulación del sistema genitourinario como en el síndrome Denis Dash sin embargo desarrolla el tumor de Wilm's (Pelletier et al., 1991). Nuestros resultados en biopsia de riñón de ratones tratados con LPS y grupo control muestran mayor expresión de la isoforma KTS+ que concuerdan parcialmente con los reportados por estos autores en riñón sano, no existiendo alguna desregulación de las diferentes isoformas a lo largo de la lesión aguda. Se ha reportado que la isoforma KTS- tiene actividad transactivadora modulando genes involucrados en proliferación, diferenciación y apoptosis, en podocitos se ha descrito que WT1 modula genes importantes en el diafragma de filtración, estructurales y de anclaje a la MBG (Dong et al., 2015), sin embargo, Wells y colaboradores en el 2010 reportan que la isoforma KTS+ es predominante en podocitos renales (Wells et al., 2010).

Debido a la disminución, pero no total de WT1 a nivel de proteína y que no se encuentra desregulación de las isoformas de WT1 (KTS+/-), es importante determinar el papel en el mantenimiento e integridad de los podocitos, WT1 modula varios genes, entre ellos Nefrina y podocalixina, que son proteínas importantes para la estabilidad del podocito y correcta filtración. La expresión del RNAm de Nefrina a lo largo del daño renal agudo, se observa una disminución a las 24, 36 y 48 h, lo que indica una posible regulación post-traducciona de la proteína WT1, se procedió al análisis de la localización nuclear o citoplásmica de la proteína WT1 en tejido renal por IFI, observando una deslocalización nuclear en el grupo posterior a las 36 h cuando existía la mayor concentración de TNF α e IL-1 β en el suero de los animales tratados con LPS, estos resultados concuerdan con los reportados por Kato et al., 2010, en un modelo de daño renal agudo, observan una disminución de nefrina con la disminución de WT1 nuclear y pérdida de albúmina en orina. Zapata et al., 2017 observan una localización WT1 principalmente citoplásmica en pacientes con SN resistente a corticoesteroides comparado con controles sanos que observan una localización principalmente nuclear. Por otro lado, Marcet et al., 2007 en la línea celular A549 epiteliales de pulmón humana que presenta una elevada expresión de WT1 observaron que al ser tratadas con TNF α o con una mezcla de LPS, PMA o

IFN γ que dio como resultado la traslocación de WT1 al citoplasma, así como el incremento de la expresión de la proteína metaloproteínasa 9 (MMP), indicando que WT1 es un represor para la proteína MMP-9. Estos resultados indican que la deslocalización de WT1 conduce a la pérdida de la función de WT1 como factor de transcripción.

La fosforilación es una modificación post-traducciona común entre los factores de transcripción, esta modificación permite la entrada o salida del núcleo mediante la fosforilación por quinasas en residuos de serina, treonina o tirosina (Bigeard y Hirt 2018). Takano et al. 2007 mediante un cultivo de podocitos inmortalizados con citocinas derivadas de macrófagos (IL-1 β y TNF α) suprimieron la actividad promotora del gen de nefrina independiente de WT1 a través de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa. Por otro lado, Sakamoto et al., 2012 reporta que la proteína WT1 expresada exógenamente en los fibroblastos tratados con forskolina activa la proteína quinasa (PKA) dependiente de cAMP que indujo la fosforilación de sitios adicionales en WT1 en la serina 365 y 393 que se encuentran en los dedos de zinc. Estos resultados concuerdan parcialmente con los nuestros ya que en nuestro modelo de inflamación sistémica mediante IHQ en el tejido renal se observó un incremento de WT1 fosforilado a partir de las 12 h posteriores a la inducción del daño renal, sin embargo, nuestro modelo hay una expresión de las citocinas inflamatorias, para poder determinar que citocina tiene el efecto en condiciones controladas se procedió a trabajar con explantes renales tratados con TNF α e IL-1 β , resultando un incremento del RNAm de WT1 A las 24 h, sin embargo, el RNAm de Nefrina gen modulado por WT1 disminuye su expresión con estas mismas citocinas reforzando la modulación post transcripcional de WT1. El incremento de WT1 concuerda con lo reportado por Takano y cols en el 2007 y por Dhebi et al., 1998 en el cual reportan que los miembros de la familia NF- κ B son importantes para activar la expresión de WT1 y residen río arriba de la cascada de señalización reguladora que conduce a la activación de WT1, sin embargo la posible inducción de la fosforilación de TNF α e IL-1 β (Marced et al., 2007; Takano et al., 2007) podría disminuir la expresión de nefrina ya que la fosforilación de WT1 lo conduce al citoplasma y lo limita como factor de transcripción, estos resultados concuerdan con los nuestros en el que se observó la traslocación de WT1 al citoplasma de los podocitos de

explantes renales tratados con TNF α y un incremento en WT1 citoplásmico con IL-1 β y LPS. Estos resultados indican que el proceso inflamatorio juega un papel importante en el daño renal principalmente por las citocinas pro-inflamatorias IL- β y TNF α que a través de PKA modula post-transcripcionalmente a WT1 suprimiendo su función de factor de transcripción que conduce a la disminución de las principales proteínas que forman la barrera de filtración y conduciendo a la pérdida de proteínas a través de la orina, principal síntoma de falla renal.

10. CONCLUSIONES

En el modelo murino inflamatorio agudo se encontró un mayor daño a nivel histológico en biopsia de riñón a las 36 h posteriores a la administración del LPS con un incremento en la pérdida de albúmina a las 24 y 36 h.

El incremento de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en suero de los ratones tratados con el LPS correlacionan con el daño histológico y con el incremento de la proteína en orina.

No existe desregulación en las isoformas de WT1 $\text{KTS}\pm$ y $\text{17AA}\pm$ en riñón de ratones de ratones a lo largo del proceso inflamatorio.

La expresión del RNAm de WT1 disminuye en el riñón a lo largo del proceso inflamatorio, la menor concentración se presenta a las 36 h de la inducción con LPS en modelo murino

La proteína WT1 muestra una ligera disminución de la expresión, manteniéndose a lo largo del proceso inflamatorio en el modelo murino.

El RNAm de Nefrina disminuye principalmente a las 24, 36 y 48 h posteriores a la inducción de la inflamación sistémica.

La fosforilación de WT1 en las serinas 393 y 363 en podocitos renales se observa a lo largo del proceso inflamatorio.

TNF α incrementa la expresión de RNAm de WT1 en podocitos de explantes renales.

La expresión del RNAm de Nefrina disminuye con IL-1 β y TNF α en podocitos de explantes renales.

TNF α induce la deslocalización de WT1 en podocitos de explantes renales.

IL-1 β incrementa WT1 citoplásmico en podocitos de explantes renales

11. PERSPECTIVAS

Determinar el mecanismo por el cual $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ incrementan la expresión de WT1.

Determinar la modulación de citosinas antiinflamatorias (IL-10) y su relación con WT1 a lo largo del proceso inflamatorio

Analizar si la curcumina tiene efecto nefroprotector mediante su actividad antiinflamatoria y su relación con WT1.

Observar si existe una correlación entre miR-15a y miR-16-1 y WT1 en un proceso inflamatorio.

12. BIBLIOGRAFÍA

Arrizabalaga P. 2005. El diafragma de filtración glomerular. Orientación diagnóstica y terapéutica en el síndrome nefrótico. *Nefrología*. 25: 361-367.

Asanuma K, Mundel P. 2003. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clinical and experimental Nephrology*. 7: 255-259.

Balakumar P, Reddy J, Singh M. 2009. Do resident renal mast cells play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy?. *Molecular and cellular biochemistry*, 330: 187.

Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, McElreavey K. 1997. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature genetics*, 17: 467.

Bariety J, Mandet Ch, Hill GS, Bruneval P. 2006. Parietal Podocytes in Normal Human Glomeruli. *Journal of the American Society of Nephrology* 10:70-80.

Bigéard J, Hirt H. 2018. Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in plant science*. 9: 469.

Bollain JJ, González M, Torres F, Daza L, Zapata L, Rodríguez C, AvalosE, Herrera R. 2011. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol*. 21: 166–171.

Bustos C, Gonzalez E, Muley R, Alonso JL, Egidio J. 1994. Increase of tumour necrosis factor α synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome. *European journal of clinical investigation*, 24: 799-805.

Chen H, Zhu J, Liu Y, Dong Z, Liu H, Liu Y, Zhou X, Liu F and Chen, G. 2015. Lipopolysaccharide induces chronic kidney injury and fibrosis through activation of mTOR signaling in macrophages. *American journal of nephrology*. 42: 305-317

Dallosso AR, Hancock AL, Malik S, et al. 2007. Alternately spliced WT1 antisense transcripts interact with WT1 sense RNA and show epigenetic and splicing defects in cancer. 2007:2287-2299.

Davin JC, Rutjes NW. 2011. Nephrotic Syndrome in Children: From Bench to Treatment. International Journal of Nephrology. 2011: 372304

Dehbi M, Hiscott J, Pelletier J. 1998. Activation of the wt1 Wilms' tumor suppressor gene by NF- κ B. Oncogene, 16: 2033.

Dinesh K, Yeun JY, Kaysen GA. 2014. Nutrition in Kidney Disease. Byham-Gray LD, Burrowes JD, Chertow GM, eds. 2014:345-353.

Dogra, G. K., Herrmann, S., Irish, A. B., Thomas, M. A., & Watts, G. F. (2002). Insulin resistance, dyslipidaemia, inflammation and endothelial function in nephrotic syndrome. Nephrology Dialysis Transplantation, 17: 2220-2225.

Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. 2009. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. The Journal of clinical investigation, 119: 2868-2878.

Dong L, Pietsch S, Englert C. 2015. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. Kidney international, 88: 684-690.

Dungey, M., Hull, K. L., Smith, A. C., Burton, J. O., & Bishop, N. C. (2013). Inflammatory factors and exercise in chronic kidney disease. International journal of endocrinology, 2013.

Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF. 2014. Diabetic nephropathy and inflammation. World journal of diabetes, 5: 393.

Eddy AA, Symons JM. 2003. Nephrotic syndrome in childhood. The Lancet, 362: 629-639.

Elaine N. 2008. Anatomía y fisiología humana. The book of knowledge. Pearson Educación S.A: Madrid, pp. 518-538.

Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell RM, Isselbacher KJ, Haber DA. 1995. Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 11960-11964.

Fernandez N, Figueroa V, Perez J. 2009. Gen Wt1. Expresión en la nefrogenesis. *Urología Colombia*. 3:113-120

Fogo A. 2011. The targeted podocytes. *Journal Clinical Investigation*. 6: 2142-2145.

Fogo A. 2011. The targeted podocytes. *Journal Clinical Investigation*. 6: 2142-2145.

Fox SI. 2008. Fisiología humana. The book of knowledge. Mcgraw-hill interamericana. Madrid.

Gao SM, Xing Ch Y, Chen Ch Q, Lin SS, Dong PH, Yu FJ. 2011. miR-15a and miR-16-1 inhibit the proliferation of leukemic cells by down-regulating WT1 protein level. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30:110-118.

Gao SM, Yang JJ, Chen CQ, Chen JJ, Ye LP, Wang LY, Wu JB, Xing ChY, Yu K. 2012. Pure curcumin decreases the expression of WT1 by upregulation of miR-15a and miR-16-1 in leu. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 31:27-36.

Gellermann J, Querfeld, U. 2004. Frequently relapsing nephrotic syndrome: treatment with mycophenolate mofetil. *Pediatric Nephrology*, 19: 101-104

Gessler M, König A, Moore J, Qualman S, Arden K, Cavenee W, Bruns G. 1993. Homozygous inactivation of WTI in a Wilms' tumor associated with the WAGR syndrome. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 7: 131-136.

Greka A, Mundel P. 2011. Balancing calcium signals through TRPC5 and TRPC6 in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, ASN-2011040370.

Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, ammes A, Hastle ND, Schedl A. 2002. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause

crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Human Molecular Genetic* 11:651-659.

Han JC, Liu QR, Jones M, Levinn RL, Menzie CM, Jefferson-George KS, Rennert O M. 2008. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *New England Journal of Medicine*, 359: 918-927.

Herrera-Esparza R, Barbosa-Cisneros O, Villalobos-Hurtado R, Avalos-Diaz E. 1998. Renal expression of IL-6 and TNF α genes in lupus nephritis. *Lupus*, 7: 3: 154-158.

Huang W, Lan X., Li X., Wang D, Sun Y, Wang Q and Yu K. 2017. Long non-coding RNA PVT1 promote LPS-induced septic acute kidney injury by regulating TNF α and JNK/NF- κ B pathways in HK-2 cells. *International immunopharmacology*. 47: 134-140.

Hurtado SR and Iregui CA. 2010. El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*: 19: 37-45.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. Defunciones por Insuficiencia Renal. [Online] disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.

Joshi S, Andersen R, Jespersen B, Rittig S. 2013. Genetics of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing. *Acta Paediatr*. 9:844-856. Audar 2008

Katagiri D, Noiri E, Hinoshita F. 2013. Multiple mieloma and kidney disease. *The Scientific World Journal*. 2013:487285.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74: 679-691.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74: 679-691.

Krishnan RG. 2012. Nephrotic syndrome. *Paediatr Child Health (Oxford)*. 22:337-340

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Hastie ND. 1995. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, 81: 391-401.

Lee KY, Jeon YJ, Kim HG, Ryu J, Lim DY, Jung SK, Dong, Z. 2017. The CUG-translated WT1, not AUG-WT1, is an oncogene. *Carcinogenesis*, 38: 1228-1240.

Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, Hastie ND, Heyningen VV. 1993. Evidence that WT1 mutations in Denys—Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Human molecular genetics*, 2: 259-264.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25:4, 402-408.

Lucisano S, Arena A, Stassi G, Iannello D, Montalto G, Romeo A, Buemi M. 2015. Role of paricalcitol in modulating the immune response in patients with renal disease. *International journal of endocrinology*, 2015.

Marcet-Palacios M, Ulanova M, Duta F, Puttagunta L, Munoz S, Gibbings D, Befus AD. 2007. The transcription factor Wilms tumor 1 regulates matrix metalloproteinase-9 through a nitric oxide-mediated pathway. *The Journal of Immunology*, 179:256-265.

Menke A, McInnes L, Hastie ND, Schedl A. 1988. The Wilms tumor suppressor WT1: Approches to gene function. *Kidney International*. 53: 1512-1518.

Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. 1983. The stages in diabetic renal disease: with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, 32: 64-78.

Mrowka C, Schedl A. 2000. Wilm's tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *Journal of the American Society of Nephrology*.16:106-115.

Mundel P, Shankland ST. 2002. Podocyte Biology and Response to Injury. *Journal of american Society of Nephrology*. 13:3005-3015.

Navarro JF, Mora C. 2006. Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. *The Scientific World Journal*, 6: 908-917.

Nouri M, Ahmadi A, Etezadi F, Barzegar E, Mojtahedzadeh M. 2016. Comparison of the Effects of Subcutaneous Versus Continuous Infusion of Heparin on Key Inflammatory Parameters Following Sepsis. *Anesthesiology and pain medicine*, 6(2).

Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. 2008. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Current opinion in immunology*, 20: 211-220.

Ortiz A, Marrón B, Ramos A. 2002. The fate of podocytes in proteinuric nephropathies. *Nefrología*. 22:425-431.

Pan HC, Chien YS, Jenq CC, Tsai MH, Fan PC, Chang CH, Chen YC. 2016. Acute kidney injury classification for critically ill cirrhotic patients: a comparison of the KDIGO, AKIN, and RIFLE classifications. *Scientific reports*, 6: 23022.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Fine RN. 1991. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*, 67: 437-447.

Ramos K, Falahatpisheh M, Nanez A, He Q. 2006. Modulation of biological regulatory networks during nephrogenesis. *Drug Metabolism*. 38: 677-683.

Ronconi E, Sagrintati C, Angelotti ML, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci L, Carini M, Maggi E, Sergio M, Vanelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P. 2009. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *Journal American society Nephrol*. 2:322-332.

Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, Karle SM, Zalewski I, Mucha B, Haas, JP. 2004. Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney international*, 66: 564-570.

Sakamoto, Y., Yoshida, M., Semba, K., & Hunter, T. (1997). Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1,

by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene*, 15(17), 2001

Schieppati A, Remuzzi G. 2005. Chronic renal disease as a public health problema: Epidemiology, social, and economic implications. *Kidney International*. 68:7-10

Segarra A, Carnicer C, Arbós MA, Quiles MT, Agraz I, Ostos E. 2012. Biological markers of nephrotic Syndrome: a few steps forward in the long way. *Nefrología* 32:558-572.

Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney C, Anuchapreeda S. 2011. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor 1 (WT1) gene expression through the PKC α signaling pathway in leukemic K562 cells. *FEBS Lett*. 585: 2235-2242.

Shalhoub R. 1974. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *The Lancet*, 304: 556-560.

Silverstein, D. M. 2009. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatric nephrology*, 24(8), 1445-1452.

Simic I, Tabatabaeifar M, Schaefer F. 2013. Animal models of nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrol* 28:2079–2088.

Sinha A, Bagga A. 2012. Nephrotic syndrome. *The Indian Journal of Pediatrics*, 79: 1045-1055.

Srichai MB, Konieczkowski M, Padiyar A, Konieczkowski DJ. 2004. A WT1 co-regulator controls podocyte phenotype by shuttling between adhesion structures and nucleus. *The Journal Biological Chemistry*. 279: 14398-14408.

Takano Y, Yamauchi K, Hayakawa K, Hiramatsu N, Kasai A, Okamura M, Kitamura M. 2007. Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS letters*, 581: 421-426.

Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A., Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C. 2002. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *The American journal of pathology*, 161: 799-805.

Tieranu I, Dutescu MI, Constantin BA, Balgradean M. 2017. Preliminary study regarding the association between tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms and childhood idiopathic nephrotic syndrome in Romanian pediatric patients. *Maedica*, 12: 164.

Trostel J, Garcia GE. 2015. Endogenous Inhibitors of Kidney Inflammation. *Journal of nephrology research*, 1: 61.

Yan L, Han Y, Saiz S, Minden M. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 21:868-876.

Yang L, Han Y, Saiz FS, Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21: 868

Ye, Y., Raychaudhuri, B., Gurney, A., Campbell, C. E., & Williams, B. R. (1996). Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *The EMBO journal*, 15: 5606-5615

Zapata-Benavides P, Arellano-Rodríguez M, Bollain-y-Goytia, JJ, Franco-Molina MA, Rangel-Ochoa GA, Avalos-Díaz E, Rodríguez-Padilla C. 2017. Cytoplasmic Localization of WT1 and Decrease of miRNA-16-1 in Nephrotic Syndrome. *BioMed Research International*, 2017.

Brinkkoetter PT, Ising C Benzing, T. 2013. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nature Reviews Nephrology*, 9: 328

13. RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Mariela Arellano Rodríguez

Candidata para obtener el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Inmunobiología.

Tesis: **Expresión y localización de wt1 en la afección renal asociada a un proceso inflamatorio**

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Fresnillo Zacatecas en enero de 1988, hija de Gumara Rodríguez Esquivel y Rogaciano Arellano Hernández.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con orientación en Inmunobiología en 2015.

Egresado de la Universidad Autónoma de Zacatecas, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2011.

Artículos publicados: Zapata-Benavides P, Arellano-Rodríguez M, Bollain-y-Goytia JJ, Franco-Molina MA, Rangel-Ochoa GA, Avalos-Díaz E, Rodríguez-Padilla C. 2017. Cytoplasmic Localization of WT1 and Decrease of miRNA-16-1 in Nephrotic Syndrome. *BioMed Research International*, 2017.

Bollain JJ, Arellano M, Torres FJ, Daza L, Muñoz JF, Avalos E, Herrera R. 2014. Soluble Fas and the-670 Polymorphism of Fas in Lupus Nephritis. *International Journal of Nephrology*. 2014: 780406.

Pablo Zapata-Benavides, Fernanda Guadalupe Thompson-Armendariz, Mariela Arellano-Rodríguez, Moisés Armides Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Santiago Saavedra-Alonso, José Luis Zacarias-Hernández, Laura María Trejo-Avila And Cristina Rodríguez-Padilla. shRNA-WT1 potentiates the anticancer effects of gemcitabine and cisplatin against B16F10 lung metastases in vitro and in vivo. *In vivo*. 2019: 10.21873/invivo.11xxx