



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Efecto de la diabetes sobre la activación de YAP y su papel en la progresión del
daño renal en ratas.**

T E S I S

Que presenta

MARISOL MARTÍNEZ CORREA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de tesis

Dr. José Luis Reyes Sánchez

México, D.F.

Diciembre 2014

COMITÉ TUTORIAL

DR. JOSÉ VICTOR SEGOVIA VILA

DRA. MARÍA EUGENIA DEL CARMEN MENDOZA GARRIDO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme siempre en el camino y permitirme cumplir un proyecto más en mi vida.

A mi esposo Christopher por apoyarme cuando me sentí rendida y motivarme para seguir adelante a pesar de las dificultades.

A mis padres René y Esmeralda y a mis hermanas Norma, Esmeralda y Yesenia, quienes a pesar de la distancia me apoyaron en todo momento.

Al Sr. José Tamayo, quien desde el inicio de este proyecto me brindó todo su apoyo.

A Rafael Rodríguez, Eduardo Molina, Carmen Namorado, Yazmín Debray y al Dr. Pérez por sus enseñanzas, su orientación y amistad.

A Brenda Luna, con quien viví tantas aventuras y situaciones complicadas, pues no sólo compartimos un espacio de trabajo, sino también una bonita amistad.

A mis amigos de generación, compañeros de lucha y resistencia en el inicio de este viaje.

A mis revisores de tesis, el Dr. Segovia y la Dra. Mendoza por sus valiosas aportaciones y recomendaciones a mi trabajo.

Al Dr. José Luis Reyes por confiar en mis capacidades y por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Al CINVESTAV por ser mi casa de estudios y de formación profesional, pues gracias a los recursos que me brindó este centro de investigaciones me fue posible explorar el mundo científico.

Este proyecto fue realizado con el apoyo de una beca CONACyT, número de registro: 288915.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
Introducción.....	4

CAPÍTULO I. MARCO TERÓRICO.

1.1 El riñón	6
1.1.1 La nefrona.....	7
1.1.2 El glomérulo	9
1.1.3 Barrera de filtración glomerular	10
1.1.3.1 Endotelio capilar	11
1.1.3.2 Membrana basal glomerular (MBG).....	11
1.1.3.3 Epitelio.....	12
1.1.3.4 Células mesangiales	12
1.2 Diabetes y nefropatía diabética	13
1.2.1 Diabetes y daño glomerular.....	15
1.3 Sobrevida de podocitos	16
1.4 YAP	16
1.4.1 Vía Hippo y YAP	17
1.4.2 Activación de YAP	18
1.4.3 Hiperglucemia y PP2A	20

CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

2.1 Justificación.....	22
2.2 Hipótesis.....	23
2.3 Objetivos	24
2.3.1 General.....	24
2.3.2 Específicos.....	24

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo de diabetes experimental.....	26
3.2 Animales.....	26
3.3 Proteinuria y depuración de creatinina	27
3.4 Obtención del tejido renal	27
3.5 Aislamiento de glomérulos.....	27
3.6 Fraccionamiento glomerular y obtención de proteínas	28
3.6.1 Glomérulos totales.....	28
3.6.2 Fracción citoplasmática	28
3.6.3 Fracción nuclear	29
3.7 Western blot (WB)	30
3.8 Inmunofluorescencias (IF).....	31
3.9 Análisis de datos.....	31

CAPITULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados	33
4.1.1 Inducción de diabetes con STZ	33
4.1.2 Pruebas de función renal.....	34
4.1.2.1 Proteinuria.....	34
4.1.2.2 Depuración de creatinina	35
4.1.3 Expresión de caspasa-3.....	36
4.1.4 Expresión de YAP en los glomérulos.....	37
4.1.5 Expresión citoplasmática y nuclear de YAP	39
4.1.6 Expresión de LATS	41
4.1.7 Expresión de PP2Ac	42
4.1.8 Expresión de PCNA.....	43
4.2 Discusión	44

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones	49
5.2 Perspectivas	50
Glosario	51
Referencias	55
Aprobación de la tesis	58

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Localización y anatomía del riñón.....	6
Figura 2. Estructura de la nefrona	8
Figura 3. Estructura del glomérulo.....	9
Figura 4. Conformación de la barrera de filtración glomerular	10
Figura 5. Capilar glomerular	11
Figura 6. Diafragma en hendidura.....	12
Figura 7. Lesiones patológicas de la nefropatía diabética.....	15
Figura 8. Organización de los dominios de YAP.....	17
Figura 9. Vía Hippo conservada en <i>Drosophila</i> y mamíferos.....	18
Figura 10. Vía Hippo y YAP.....	19
Figura 11. La hiperglucemia aumenta la actividad de PP2Ac	20
Figura 12. Fraccionamiento glomerular	29
Figura 13. Monitoreo de la glucemia 1,2 y 3 semanas después de la inducción con estreptozotocina.....	33
Figura 14. La diabetes aumenta la proteinuria 3 semanas después de la administración de estreptozotocina.....	34
Figura 15. La diabetes aumenta la depuración de creatinina 3 semanas después de la administración de estreptozotocina	35
Figura 16. La diabetes aumenta la expresión de la procaspasa-3 y caspasa-3 p20 en los glomérulos	36
Figura 17. La diabetes aumenta la expresión de YAP en los glomérulos, IF	37

Figura 18. La diabetes aumenta la expresión de YAP en los glomérulos, WB.....	38
Figura 19. Control de pureza del fraccionamiento glomerular	39
Figura 20. Expresión citoplasmática y nuclear de YAP en los glomérulos	40
Figura 21. La diabetes modifica la expresión de LATS en los glomérulos	41
Figura 22. La diabetes modifica la expresión de PP2Ac en los glomérulos	42
Figura 23. La diabetes modifica la expresión de PCNA en los glomérulos	43
Figura 24. YAP en la diabetes.....	46

RESUMEN

La incidencia mundial de diabetes ha aumentado en los últimos años y cerca del 40% de los pacientes desarrollan nefropatía diabética (ND), siendo esta la principal causa global de enfermedad renal en fase terminal. La proteína YAP (Yes Asociated Protein) es un *co-activador transcripcional* regulado por la vía Hippo, se encuentra inactiva cuando se *fosforila* por la cinasa LATS (Large Tumor Suppressor Kinase). Además, la subunidad catalítica de la fosfatasa PP2A (Protein Phosphatase 2A) puede *desfosforilarla* y favorecer su *traslocación* nuclear donde interactúa con factores transcripcionales como TEAD, p73, Runx2, entre otros que participan en procesos de proliferación, sobrevivencia, *transición epitelio mesénquima* (TEM) y *apoptosis* celular. Se sabe que estos fenómenos suceden en la ND. Sin embargo se desconoce la función de la proteína YAP en las células glomerulares durante etapas iniciales de la ND.

En este estudio se evaluó la función renal en ratas hembra Wistar a la 1^a, 2^a y 3^a semana después de la inducción de la diabetes con estreptozotocina (STZ, 60 mg/kg, i.v.), para ello se midió la proteinuria y la filtración glomerular y se encontró que en la diabetes aumentan ambos parámetros. Con la finalidad de investigar la localización y posible función de YAP en células glomerulares en la fase temprana de la ND, se evaluó la expresión de YAP en glomérulos de rata mediante inmunofluorescencia y Western blot (WB) de las fracciones citoplasmática y nuclear, así como la expresión glomerular de las proteínas: caspasa-3, vimentina, LATS, PP2Ac y PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) en el curso temporal de la diabetes hasta la 3^a semana.

Se encontró que la diabetes aumentó la expresión total y nuclear de YAP, mientras que la expresión de LATS permaneció sin cambios y, por el contrario, PP2Ac aumentó. Estos hallazgos sugieren que en condiciones diabéticas hay un aumento en la activación de YAP. Además, se encontró un aumento en la expresión de vimentina, caspasa-3 y PCNA en la diabetes. Esto sugiere que la diabetes induce la TEM, apoptosis y proliferación de células glomerulares. En conclusión, es posible que los fenómenos de TEM y apoptosis en podocitos, así como proliferación de células mesangiales estén regulados por la activación de YAP en etapas iniciales de la ND.

Palabras clave: YAP, nefropatía diabética, vía Hippo, PP2Ac, LATS, proliferación.

ABSTRACT

The worldwide incidence of diabetes has increased in the last years, about 40% of diabetic patients develops diabetic nephropathy (DN). DN is considered the first global cause of end stage renal disease. Yes Associated Protein (YAP) is a transcriptional co-activator regulated by the Hippo pathway, which is inactivated when is phosphorylated by large tumor suppressor kinase (LATS). YAP is dephosphorylated by protein phosphatase 2A (PP2A) thus favoring its nuclear localization where interacts with transcriptional factors such as TEAD, p73 and Runx2. This transcriptional factors participate in proliferation, survive, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and apoptosis. Exist evidence that these phenomena occur in DN. Nevertheless, the role of YAP in these processes in glomerular cells during early stages of DN is unknown.

In this study we evaluated the renal function of female Wistar rats at 1st, 2nd and 3rd weeks after diabetes induction with streptozotocin (STZ, 60 mg/kg body weight). We measured proteinuria and glomerular filtration and it was found that diabetes increased both parameters. In order to investigate YAP localization and possible function in glomerular cells in early stages of DN, we evaluated YAP expression in rat glomerulus by immunofluorescence and Western blot (WB) of nuclear and cytoplasmic fractions. Also, glomerular expression of caspase-3, vimentin, LATS, PP2Ac and *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) was evaluated along the study.

We found that diabetes increased the expression of total and nuclear YAP. In contrast, LATS expression did not change and PP2Ac expression increased. These findings suggest that under diabetic conditions YAP activation increased. Also, we found increased expression of vimentin, caspase-3 and PCNA under diabetic conditions. These findings suggest that diabetes promotes EMT, apoptosis and proliferation of glomerular cells. In conclusion, it is likely that EMT and apoptosis of podocytes, as well as, proliferation of mesangial cells are regulated by YAP activation in early stages of DN.

Key words: YAP, diabetic nephropathy, Hippo pathway, PP2Ac, LATS, proliferation.

ABREVIATURAS

AGEs: productos finales de glicosilación avanzada (advanced glycation end products)

DB: Diabetes.

DH: diafragma en hendidura.

EEM: error estándar de la media.

ERC: enfermedad renal crónica.

ERFT: enfermedad renal en fase terminal.

i.v.: intrayenosa

IF: immunofluorescencias

LATS: large tumor suppressor kinase

MBG: membrana basal glomerular

Mst: mammalian Ste20-like

ND: nefropatía diabética.

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PP2Ac: protein phosphatase 2a catalytic subunit

RAGEs: receptores de los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs)

RKB: ringer Krebs bicarbonato

S127 y S381: serina 127 y 381, respectivamente.

STZ: estreptozotocina

TEAD: TEA-domain-containing

TEM: transición epitelio mesénquima

TFG: tasa de filtración glomerular.

WB: Western blot

YAP: yes associated protein

INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que en la actualidad se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. Las causas de la enfermedad están asociadas a factores como: la obesidad y sobrepeso, edad, dieta no saludable (alta en carbohidratos y grasas), sedentarismo y factores genéticos. La prevalencia de este padecimiento es predominante en la edad adulta.^[1]

Esta enfermedad se caracteriza por la incapacidad del cuerpo para metabolizar y aprovechar los carbohidratos que se consumen en la dieta, en consecuencia, el nivel de glucosa en sangre se mantiene elevado (*hiperglucemia*). Las personas con diabetes son propensas a desarrollar otras enfermedades, ya que la glucosa en altas concentraciones daña órganos que tienen un flujo sanguíneo alto como el corazón, ojos, cerebro y riñones.^[2]

En el caso particular del riñón, el daño se denomina como nefropatía diabética (ND), afecta a ~40% de los pacientes diabéticos y es una de las principales causas de muerte^[3]. La función más importante del riñón es la mantener la homeostasis del cuerpo, pero el daño causado por la ND, hace que este órgano pierda progresivamente su función conduciendo al paciente a un estado de insuficiencia renal. Lo anterior trae como consecuencia la necesidad de realizar diálisis peritoneal, hemodiálisis o trasplante para sustituir la función los riñones, y así eliminar el riesgo de muerte para el paciente.

En la actualidad, la incidencia de diabetes en México es elevada, esto aumenta la probabilidad de que existan nuevos casos de ND, lo que a su vez, tiene consecuencias económicas y sociales para los países. El dilucidar el mecanismo por el cual se daña el riñón permitiría desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de la ND.

Debido a la incidencia de la ND y a las consecuencias que tiene para el paciente con diabetes, el objetivo de esta investigación es estudiar las alteraciones tempranas a nivel fisiológico y molecular del daño renal provocado por la diabetes.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 EL RIÑÓN.

Los riñones son órganos que forman parte del sistema urinario, se localizan en la cavidad retroperitoneal uno a cada lado de la columna vertebral. Tienen forma de frijol y son de color marrón rojizo debido a que son irrigados constantemente; normalmente reciben 1.100mL/min de sangre, lo que equivale al 22% del gasto cardiaco. En el humano adulto, cada riñón pesa de 125 a 170 g y tiene el tamaño de aproximado es de 11 cm de longitud, 6 cm de anchura y 3 cm de grosor. En la parte superior de cada riñón se localiza la glándula suprarrenal y el borde interno contiene una hendidura llamada hilio, por la que pasan la arteria y la vena renales, los vasos linfáticos, el plexo nervioso y el uréter, que transporta la orina desde el riñón hasta la vejiga (Figura 1A). Un corte sagital muestra tres regiones principales: 1) la corteza que se encuentra justo debajo de la cápsula renal. 2) La médula es la parte central que contiene las pirámides. 3) La papila, que proyecta hacia la pelvis renal, ésta forma cálices mayores y menores que recogen la orina de los túbulos de cada papila y la llevan al uréter (Figura 1B).^[4-6]

Los riñones son los responsables de mantener la homeostasis del organismo ya que realizan diversas funciones tales como: eliminación de productos metabólicos de desecho y *xenobióticos*, mantenimiento el equilibrio hídrico-electrolítico y ácido-base, devuelven nutrientes y productos químicos a la sangre, regular la presión arterial, llevan a cabo gluconeogénesis, secretan hormonas, entre otras.^[4]

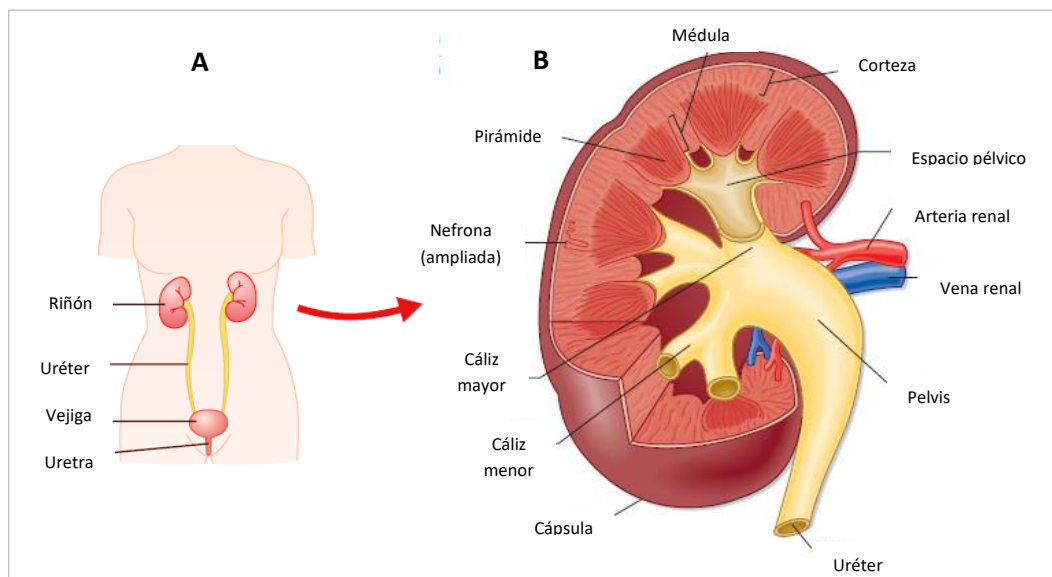


Figura 1. Localización y anatomía del riñón, tomado de: [7, 8].

El riñón está formado por unidades especializadas denominadas **nefronas**, dentro de las cuales se lleva a cabo la filtración de la sangre y la formación de la orina.

1.1.1 LA NEFRONA.

La unidad anatómica y funcional del riñón es la nefrona, cada riñón del humano contiene de 600, 000 a 1, 400, 000 nefronas y la rata adulta aproximadamente 30, 000.^[5] Este número puede reducirse a causa de lesiones, enfermedades e incluso el envejecimiento, ya que el riñón no puede generar nuevas nefronas^[4]. Como se observa en la Figura 2, la nefrona es una estructura formada por:

- **Glomérulo:** es una red de capilares que forman una especie de madeja, reciben la sangre proveniente de la circulación con una presión hidrostática alta. Los capilares glomerulares están rodeados por una estructura esférica llamada cápsula de Bowman. Dentro del glomérulo se lleva a cabo la ultrafiltración de la sangre; el líquido filtrado pasa al espacio de Bowman y después al túbulo renal.^[4, 8]

- **Túbulo renal:** consta de varios segmentos, conectado con la cápsula de Bowman inicia el **túbulo contorneado proximal** que continúa hasta el **asa de Henle** (ascendente y descendente), el **túbulo contorneado distal** y finalmente el **túbulo colector** que desemboca en los cálices mayores. Cada segmento de los túbulos es funcionalmente distinto y las células epiteliales que los conforman tienen características específicas. Las células del túbulo contorneado proximal tienen gran número de vellosidades en su cara apical denominado borde en cepillo, esta característica le permite tener mayor superficie de absorción, además contienen muchas mitocondrias. En contraste, las células del asa ascendente y descendente de Henle son planas y con pocas mitocondrias. A lo largo del túbulo renal se **reabsorben** nutrientes y sustancias que son benéficas para el organismo, se **secretan** (eliminan) los productos de desecho del metabolismo celular además de *xenobióticos* que finalmente **se excretan** en de la orina (Figura 2); esto es gracias a que los túbulos son rodeados por capilares peritubulares a través de los cuales se lleva a cabo el intercambio de sustancias.^[7, 8]

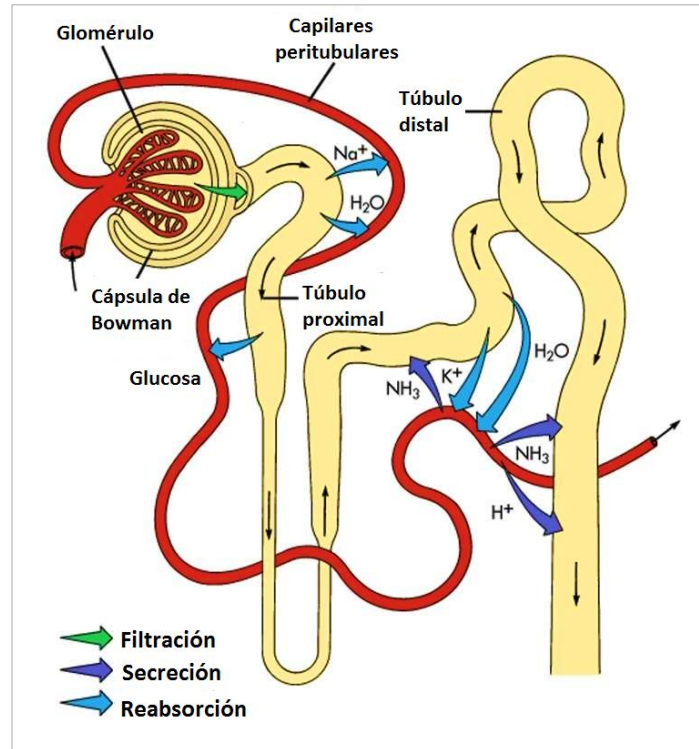


Figura 2. Estructura de la nefrona, tomado de: [9].

De acuerdo a la localización de las nefronas se clasifican en: a) **nefronas corticales superficiales** que tienen los glomérulos en la corteza externa, sus asas de Henle son cortas y sólo descienden hasta la médula externa y b) **nefronas yuxtamedulares**, las cuales tienen sus glomérulos cerca del borde corticomedulal, sus asas de Henle son más largas y descienden hasta la médula interna y la papila; los glomérulos son más grandes que los corticales y en consecuencia la tasa de filtración glomerular es mayor. El flujo sanguíneo difiere en estos dos tipos de nefronas, en las corticales los capilares peritubulares se ramifican de las arteriolas eferentes, nutren a las células epiteliales y aportan la sangre para la reabsorción y secreción de sustancias. En las nefronas yuxtamedulares los capilares peritubulares poseen una red de vasos especializados llamados vasos rectos, los cuales siguen el mismo recorrido que de asas de Henle y sirven de intercambiadores osmóticos en la producción de orina concentrada.^[7, 8]

El proceso de **filtración** glomerular es muy importante. Para poder comprender como se lleva a cabo se debe conocer la estructura del glomérulo y la barrera de filtración formada por capilares glomerulares.

1.1.2 EL GLOMÉRULO.

El glomérulo también conocido como corpúsculo renal, es la parte inicial de la nefrona donde se lleva a cabo una de las funciones primarias del riñón, la **filtración de la sangre** y posteriormente la formación de la orina.^[7]

El glomérulo consiste de una red de capilares formados a partir de la **arteriola aferente** y terminan en la **arteriola eferente**, estos están cubiertos por células epiteliales viscerales especializadas. Rodeando al glomérulo se encuentra la **cápsula de Bowman**, estructura esférica formada por una capa parietal de células epiteliales planas. Entre ambas capas epiteliales se encuentra el espacio urinario o **espacio Bowman**, donde se produce el primer filtrado renal. El sitio donde entran los capilares glomerulares se le denomina **polo vascular** y la parte que conecta con el túbulo proximal es el **polo urinario**, Figura 3.^[4, 5, 7]

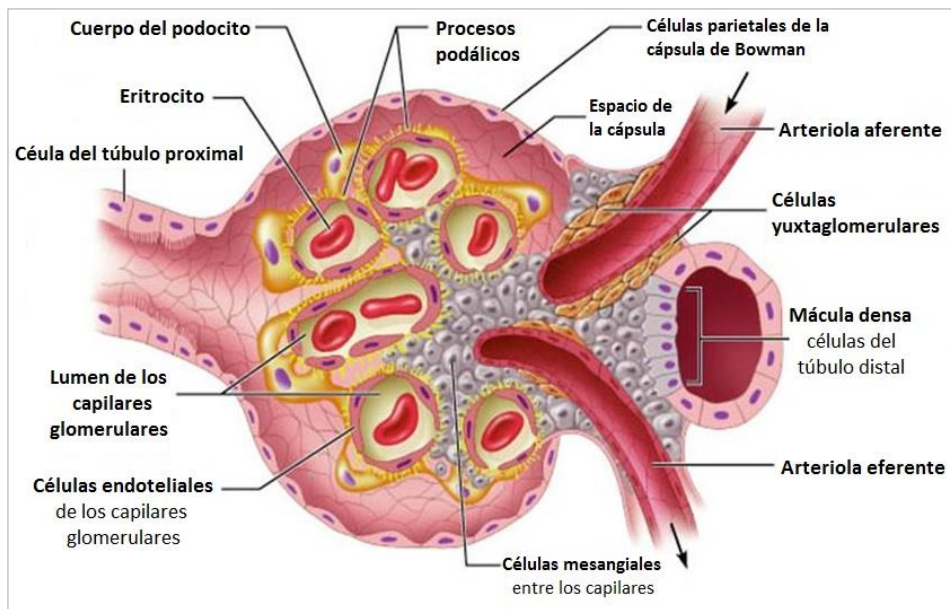


Figura 3. Estructura del glomérulo, tomado de: [10].

La filtración comienza cuando la sangre llega a los capilares glomerulares con una presión hidrostática de 60 mmHg que impulsa el líquido a través de la **barrera de filtración** hacia el espacio de Bowman, si la presión no es la adecuada no hay filtración. El ultrafiltrado

glomerular es similar al líquido intersticial, su composición en sales y moléculas orgánicas no varía mucho respecto al plasma sanguíneo, sólo carece de proteínas y células.^[4, 8]

En general, el glomérulo es un filtro con permeabilidad selectiva que restringe el paso de macromoléculas a través de la barrera de filtración glomerular con base en su tamaño, carga y configuración física.^[11]

1.1.3 BARRERA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR.

La barrera de filtración glomerular es una membrana biológica organizada, se compone por los capilares glomerulares, la membrana basal glomerular y células epiteliales especializadas que rodean a los capilares denominadas podocitos, Figura 4. Dicha barrera permite la filtración de agua y moléculas pequeñas pero restringe el paso a células sanguíneas y proteínas de alto peso molecular. En el humano diariamente se filtran 180 litros de sangre y sólo se excreta el 10% del filtrado.^[11]

Lo que determina la *tasa de filtración glomerular* y las características del filtrado, es decir qué y cuánto se filtra, son las propiedades físicas de la barrera de filtración glomerular.^[8] A continuación se describen los componentes de la barrera.

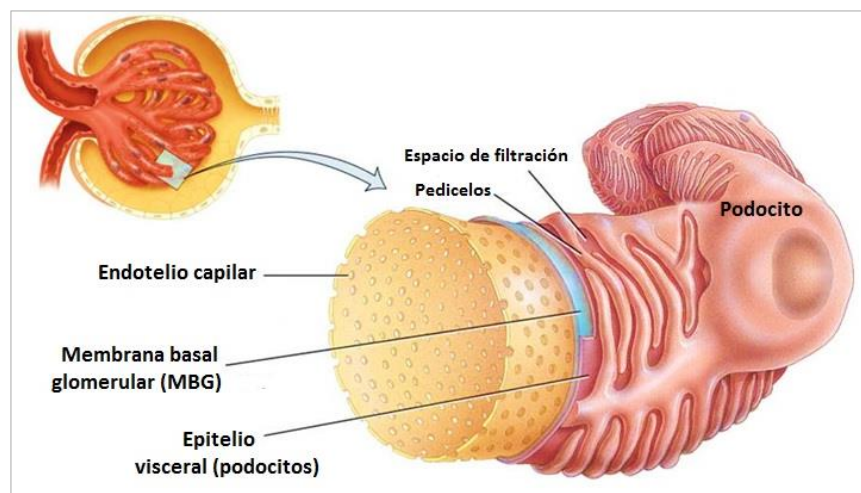


Figura 4. Conformación de la barrera de filtración glomerular, tomado de: [12].

1.1.3.1 Endotelio capilar.

Las células del endotelio forman la pared capilar, la cual está perforada por miles de poros denominados fenestras (Figura 4), estos tienen un diámetro de 70-100 nm en el humano, son permeables al agua y a pequeños solutos (sodio, glucosa, urea, creatinina, etc.) pero son impermeables a albúmina, eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Debido a que las células endoteliales expresan glucoproteínas cargadas negativamente en su superficie, dificultan la filtración de grandes proteínas aniónicas hacia el espacio de Bowman. Además de funcionar como filtro, las células endoteliales sintetizan sustancias vasoactivas que son importantes en el control del flujo plasmático renal como, el óxido nítrico (vasodilatador) y la endotelina ET-1 (vasoconstrictor), Figura 4.^[5, 7]

1.1.3.2 Membrana basal glomerular (MBG).

Rodeando al capilar se localiza la MBG (Figura 5), membrana porosa de aproximadamente 240-370 nm. Está compuesta de una red de colágeno tipo IV, laminina, entactina, fibronectina, glicoproteínas y proteoglicanos que tienen espacios a través de los cuales pueden filtrarse el agua y los solutos. Su función más importante es servir como filtro selectivo de carga en la difusión de proteínas aniónicas o neutras, debido a las cargas eléctricas negativas de los proteoglicanos.^[5, 7, 11]

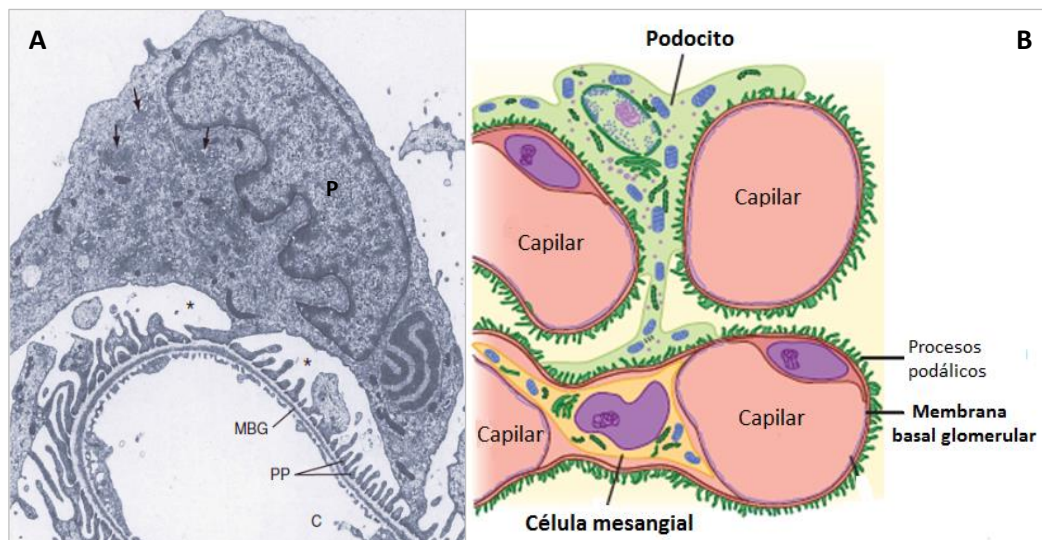


Figura 5. Capilar glomerular. **A**, microscopía electrónica que muestra un capilar (C) rodeado de la membrana basal glomerular (MBG) y por los procesos podócitos (PP) de los podocitos (P). **B**, caricatura de los detalles de varios capilares glomerulares, tomado de: [7, 13].

1.1.3.3 Epitelio.

El epitelio visceral glomerular está formado por células altamente especializadas y diferenciadas denominadas **podocitos** que participan en la filtración selectiva por tamaño, tienen cuerpo grande, núcleo prominente y el citoplasma que extienden para formar los **pedicelos** (procesos podálicos), éstos se interdigitan con otros pedicelos contiguos y rodean a los capilares glomerulares, ver Figura 4.^[11, 13] Las interdigitaciones de los podocitos se unen a la MBG por medio de integrinas y dextróglicos, proteínas de adhesión membranal, entre las digitaciones se forma una hendidura de filtración.^[14, 15] Estas hendiduras tienen un diámetro de 25-60 nm de diámetro y contienen un delgado diafragma llamado **diafragma en hendidura (DH)** con poros de 40X140 Å, el cual está compuesto por diversas proteínas como nefrina, podocina, Neph 1/2, entre otras que son indispensables para mantener la permeabilidad glomerular selectiva.^[7, 14] La Figura 6 muestra un esquema de las proteínas que conforman el DH en dos pedicelos.

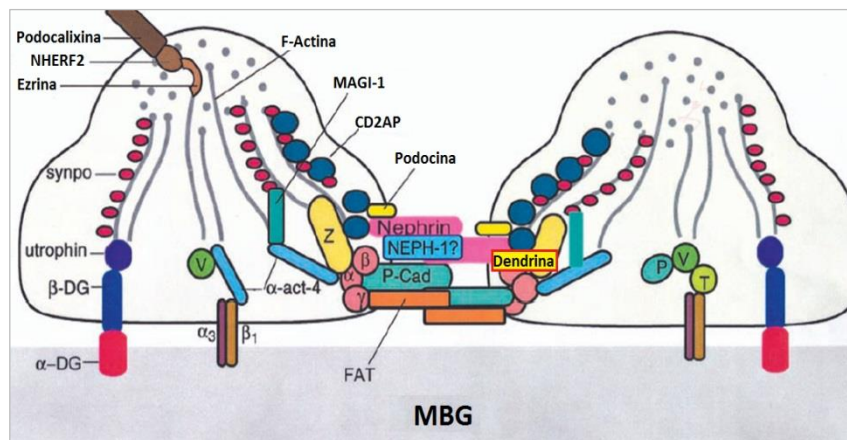


Figura 6. Diafragma en hendidura. Caricatura que muestra la estructura del diafragma en hendidura y las proteínas que lo conforman, tomado de: [7, 15].

1.1.3.4 Células mesangiales

Las células mesangiales forman la parte central del glomérulo (Figura 3 y 5B), se hallan entre la lámina basal y el endotelio; sus núcleos son densos y tienen citoplasmas alargados. Aunque no están consideradas como parte de la barrera de ultrafiltración, se ha descrito que debido a su contractilidad, contribuyen a la regulación del flujo capilar glomerular y a la

filtración, además proporcionan soporte estructural a los capilares glomerulares, tienen propiedades fagocíticas, sintetizan factores de crecimiento, producen matriz mesangial que sirve para unir las células, favorecen la contracción y migración, entre otras. Las células mesangiales y la matriz que producen contribuyen a la patofisiología de un gran número de enfermedades glomerulares entre ellas, la nefropatía diabética (ND).^[5, 13, 16]

Estas células trabajan con intensidad y funcionan por muchos años, sin embargo, enfermedades como la diabetes pueden dañarlas y provocar enfermedad renal crónica (ERC).

1.2 DIABETES Y NEFROPATÍA DIABÉTICA.

La insulina es una hormona que se sintetiza en las células beta del páncreas, se libera en la sangre y llega a las células donde activa a los *receptores de insulina* localizados en la membrana celular. Esto produce un aumento en la captación de glucosa de las células y su posterior aprovechamiento para obtener energía. La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que se caracteriza por la alteración del metabolismo de los carbohidratos debido a la falta de producción de insulina o a que no es reconocida por los receptores. En consecuencia, las células adiposas y musculares no captan ni utilizan de modo eficiente la glucosa y por lo tanto, se mantiene elevada en sangre (*hiperglucemia*) por periodos prolongados.^[3, 17]

De acuerdo a las características, la diabetes mellitus se clasifica en tres tipos:

- 1) **Diabetes tipo 1:** también llamada insulino dependiente o diabetes juvenil, aunque también se presenta en adultos. Es causada por la falta de producción de insulina debido a la destrucción de las células beta del páncreas, como resultado de un proceso autoinmune.^[3, 8, 17]
- 2) **Diabetes tipo 2:** también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta. Se debe a la disminución de la sensibilidad de los tejidos a la insulina, es decir, el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (resistencia a la insulina). Se asocia con obesidad y representa el 90% de los casos.^[3, 8]
- 3) **Diabetes gestacional:** estado hiperglucémico que aparece durante el embarazo. Se desconocen las causas que la provocan.^[3]

Se ha descrito que el *estrés oxidativo* se incrementa en la diabetes, esto favorece la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés). Los AGEs pueden acumularse en los tejidos y unirse a receptores específicos como los RAGEs, esta interacción produce un aumento adicional del *estrés oxidativo* y en consecuencia toxicidad celular. Se ha descrito que los AGEs se incrementan en los pacientes con diabetes debido a la *hiperglucemia* esto, sumado a otros factores, contribuye al desarrollo de complicaciones como enfermedades cardiovasculares, retinopatía, neuropatía y **nefropatía**.^[3, 18-20]

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay más de 347 millones de personas con diabetes y ~40% de los pacientes desarrollan ND. La mayoría de los pacientes con ND evolucionan hasta enfermedad renal en fase terminal (ERFT); en esta etapa es necesario intervenir con hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante para sustituir la función renal. A pesar de estos tratamientos, la ND es una de las principales causas de muerte.^[3, 21]

Los factores de riesgo que se relacionan con el desarrollo de la ND son principalmente la *hiperglucemia persistente*, hipertensión arterial, *dislipidemia*, obesidad, fumar, la inactividad física, alimentación, entre otros. Además un factor de riesgo importante es la predisposición genética.^[22]

La ND es una enfermedad que evoluciona lentamente; varios estudios reportan a pacientes que desarrollan ERFT diez o quince años posteriores al diagnóstico de la diabetes. Esta enfermedad progresa en cinco etapas:^[2, 22-24]

1. Hiperfiltración glomerular,
2. *Microalbuminuria*, se utiliza como diagnóstico temprano para los pacientes con diabetes tipo I y sirve como marcador de desarrollo de nefropatía para los pacientes con diabetes tipo II. Aunque se ha descrito que hay pacientes con ND que no la presentan.
3. *Macroalbuminuria/proteinuria persistente*,
4. Disminución de la tasa de filtración glomerular y finalmente
5. Enfermedad renal en fase terminal.

1.2.1 DIABETES Y DAÑO GLOMERULAR.

En la ND, el **glomérulo** se daña como resultado de la *hiperglucemia* persistente. Como se observa en la Figura 7, entre las lesiones estructurales características se encuentran: engrosamiento de la MBG, *hipertrofia* las células mesangiales, desprendimiento o muerte por *apoptosis* de podocitos y, como mecanismo compensatorio, los podocitos viables se *hipertrofian* para cubrir los espacios de los que se perdieron, también los pedicelos se aplanan y el DH se pierde. Debido a que las células que conforman la barrera de filtración se modifican o mueren, se pierde la selectividad de filtración por tamaño/carga y por lo tanto, la albúmina se filtra libremente. Lentamente en etapas avanzadas la función glomerular se pierde, en consecuencia el riñón es incapaz de mantener la homeostasis del organismo.^[21, 23-25]

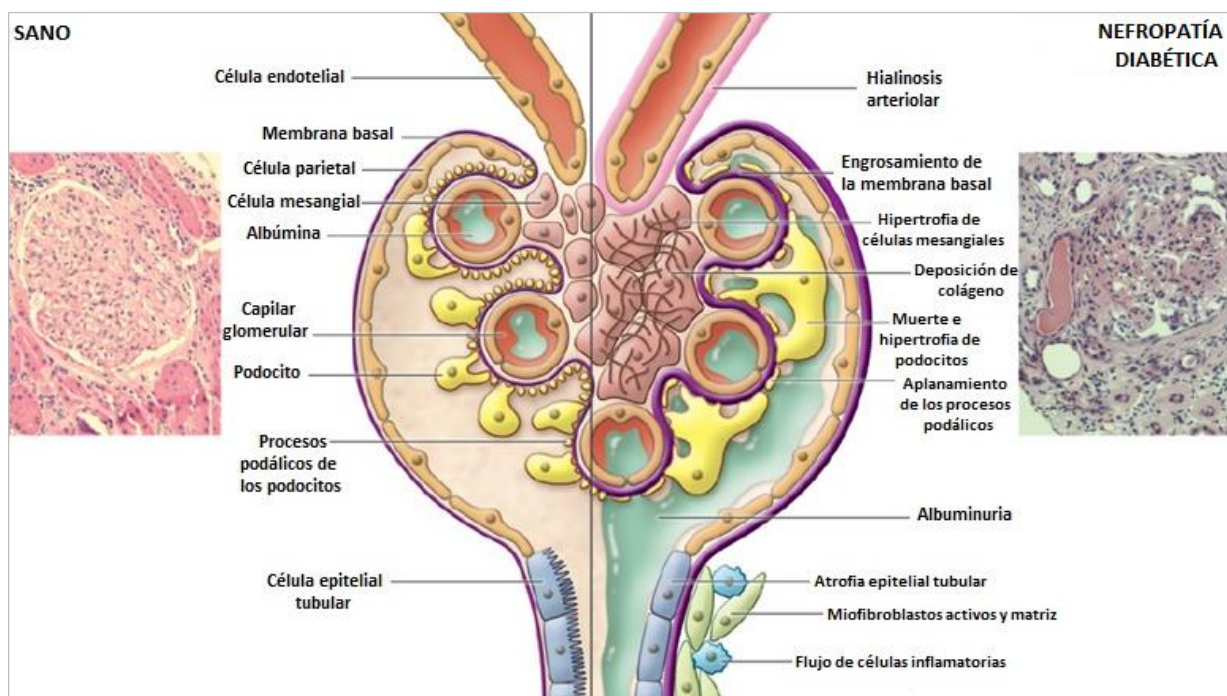


Figura 7. Lesiones patológicas de la nefropatía diabética. En el glomérulo sano se observa la organización de cada una de las células que lo conforman, evitando la filtración de albúmina hacia el espacio de la cápsula. En contraste, el glomérulo con nefropatía diabética muestra alteraciones en las células que conforman la barrera de filtración y en consecuencia hay presencia de albuminuria. En las imágenes de inmunohistoquímica, se muestra a la derecha una sección de un glomérulo de una persona sana en comparación de uno con ERD a la izquierda, tomado de:[21].

Desafortunadamente las opciones terapéuticas existentes para evitar que los pacientes desarrollen ND son limitadas, la principal alternativa es disminuir los factores que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad mediante la administración de fármacos para el control de la hiperglucemia, hipertensión, síndrome metabólico, etc. Debido a la gravedad de esta pandemia, actualmente la investigación en ésta área ha aumentado con la finalidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas.^[26]

1.3 SOBREVIDA DE PODOCITOS.

En los últimos años se han estudiado los mecanismos a través de los cuales se daña el riñón en diversos modelos de daño renal, con la finalidad de encontrar proteínas o moléculas que puedan evitar el daño glomerular.

Recientemente Mundel *et al.* demostraron en un modelo de daño renal con *adriamicina* que la *dendrina* (Figura 6), frente al daño se desprende del DH, se *trasloca* al núcleo de los podocitos y genera una señal *pro-apoptótica* provocando su muerte. Además, demostraron por medio de inmunofluorescencia que la proteína **YAP** se *expresa* en los núcleos de podocitos, se asocia a *dendrina* y favorece la supervivencia de los podocitos al inhibir la señal *apoptótica* generada por ésta. Con estos hallazgos los autores sugieren que **YAP** podría servir como inhibidor fisiológico de la *apoptosis* y que abre nuevas puertas en el desarrollo de terapias protectoras para podocitos.^[27]

La proteína **YAP** se *expresa* en varios tipos de células y está involucrada en diversos procesos celulares que se describen a continuación.

1.4 YAP.

La proteína YAP (Yes associated protein) inicialmente se identificó por su habilidad para asociarse a la *cinasa* c-Yes, de ahí su nombre. Pesa 65 kDa y tiene varios *dominios* como: de unión a las *proteínas 14-3-3*, unión a factores transcripcionales TEAD, unión a *dominios SH3*, unión a *dominios PDZ* y a los *dominios WW* que se unen a proteínas con *motivos PPxY* (prolina-prolina-cualquier amino ácido-tirosina) que son abundantes en diversos *factores de transcripción*, Figura 8.^[28]

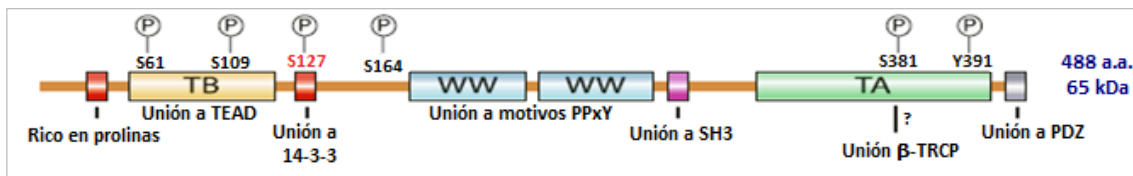


Figura 8. Organización de los dominios de YAP, tomado de: [28].

YAP tiene dos *isoformas* en el humano debido a *procesamiento del ARNm*, YAP1 con un *dominio WW* y YAP2 con dos *dominios WW*. En general cuando se menciona sólo YAP, se refiere a la mayor *isoforma* en el humano que es YAP2. YAP es una proteína citoplasmática y nuclear, por lo que es un *co-activador transcripcional*, regula varios eventos celulares dependiendo de la naturaleza, características y condiciones de las células.^[28, 29]

YAP puede ser modificada para su regulación, por ejemplo cuando se *fosforila* en la serina 127 (S127) se genera un *motivo* de unión para la familia de *proteínas 14-3-3*, lo cual favorece su retención citoplasmática y su estabilización. Cuando es *fosforilada* en la serina 381 (S381) se degrada en el *proteosoma*, esta se denomina degradación dependiente de *fosforilación*. También se puede *desfosforilar* y *traslocarse* al núcleo. Actualmente se considera a YAP como parte de la vía de señalización **Hippo**, la cual se describe a continuación.^[30, 31]

1.4.1 VÍA HIPPO Y YAP.

La vía Hippo se descubrió en la mosca *Drosophila melanogaster*, participa en el desarrollo de los órganos durante la embriogénesis y su desregulación conduce al desarrollo de tumores. Está formada por dos *quinasas*, Hippo (Hpo) y Warts (Wts) también llamada LATS (Large Tumor Suppressor), una proteína de andamiaje Salvador (Sav) y cofactor Mob (Mats); estas proteínas interactúan física y funcionalmente y juntas constituyen el centro de la vía. Se desconocen las proteínas río arriba que activan a Wts, pero se sabe que al activarse *fosforila* y evita la *traslocación* nuclear del *co-activador transcripcional* Yorkie (yki).^[31-33]

La vía Hippo está altamente conservada entre las moscas y los mamíferos, incluyendo al humano. Las proteínas que conforman la vía toman otros nombres en el mamífero, la función y el orden son los mismos. La proteína *ortóloga* de Hpo es la Mst (mammalian Ste20-like), de Sav es hww45, de Wts son Lats1/2 (large tumor suppressor kinase 1/2) y de yki es YAP, (Figura 9).^[28, 32]

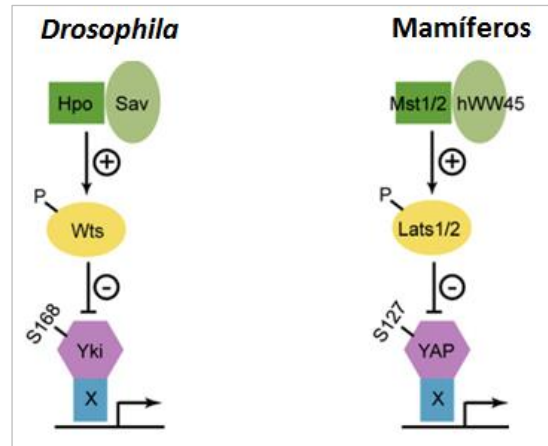


Figura 9. Vía Hippo conservada en *Drosophila* y mamífero tomado de: [32].

Esta vía y YAP tienen varias funciones, por ejemplo participan en el control del desarrollo y tamaño de los órganos como el hígado^[32, 34], modulan la expansión y proliferación del *tejido epidérmico* durante el desarrollo^[35, 36], participa en carcinogénesis^[28, 37], entre otras.

1.4.2 ACTIVACIÓN DE YAP.

LATS es una *cinasa* de serina/teonina que *fosforila* a YAP en S127 y promueve su **inactivación** mediante su retención en el citoplasma, donde se une a otras proteínas y se mantiene estable^[29, 32]. Un estudio se demostró que la subunidad catalítica de la *fosfatasa inespecífica* PP2A (*protein phosphatase 2a*) interactúa con YAP, de modo que la **activa** favoreciendo su traslocación nuclear, donde se une a diversos *factores de transcripción*, Figura 10.^[35] Los principales *factores de transcripción* que activa YAP son:

- Las cuatro proteínas de la familia **TEAD** (**TEA-domain-containing**) relacionados con *proliferación* de: *células progenitoras* de epidermis, *células progenitoras* de hígado, miofibroblastos, entre otros.^[30, 35, 38]
- **Runx2** (Runt-related transcription factor), participa en la diferenciación de osteoblastos.^[28, 30, 38]
- **p73** es un miembro de la familia p53, en respuesta al daño del ADN, YAP interacciona con éste en el núcleo y promueve apoptosis.^[28, 30, 39]

- **TBX5** (T-Box), participa en varios procesos de desarrollo, entre ellos del corazón, vasos sanguíneos y extremidades.^[28]

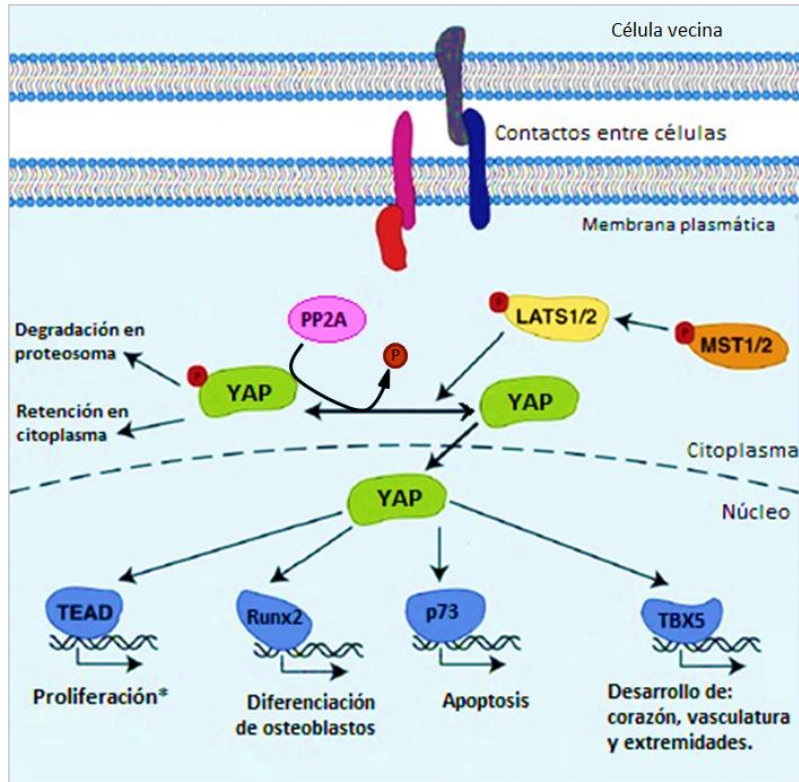


Figura 10. Vía Hippo y YAP. La vía Hippo regula la función de YAP, cuando esta vía se activa, la cinasa LATS fosforila a YAP y la inactiva reteniéndola en el citoplasma. La fosfatasa PP2A interacciona con YAP y la activa desfosforilandola y se promueve su traslocación nuclear. YAP es un co-activador transcripcional que, cuando se trasloca al núcleo, activa a diversos factores de transcripción relacionados con proliferación, diferenciación, apoptosis, entre otros, tomado de: [38].

1.4.3 HIPERGLUCEMIA Y PP2A.

La PP2A es una *fosfatasa* inespecífica de serina/treonina altamente conservada en diferentes especies, entre ellos el humano. Regula varias funciones celulares tales como: remodelación del citoesqueleto, *proliferación*, progresión del ciclo celular, secreción de hormonas y *apoptosis*. Es una proteína heterotrimérica formada por una subunidad A de andamiaje, una subunidad B reguladora y una subunidad C catalítica (con dos isoformas α/β de 36/38 kDa respectivamente). Se ha reportado que la carboximetilación reversible en el C-terminal de la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac), mediada por la carboximetil transferasa 1, **activa** a la *fosfatasa*; por el contrario, se **inactiva** cuando es *fosforilada* en la tirosina 307 de esta misma subunidad.^[40, 41]

Estudios realizados en cultivos de células endoteliales de aorta de bovino^[42] y en células β de páncreas de rata^[41] muestran que, en condiciones de hiperglucemia aumenta significativamente la carboximetilación de la PP2Ac y por lo tanto, su actividad (Figura 11). Estos autores relacionan su actividad con la muerte celular endotelial y con la pérdida de la secreción de insulina inducida por la glucosa en células β -pancreáticas. En general, la actividad de PP2A se relaciona con diversos procesos celulares como metabolismo, *apoptosis*, diferenciación, transformación oncogénica, entre otros; esto sugiere que la función de PP2A es dependiente de las condiciones y características de las células^[40].

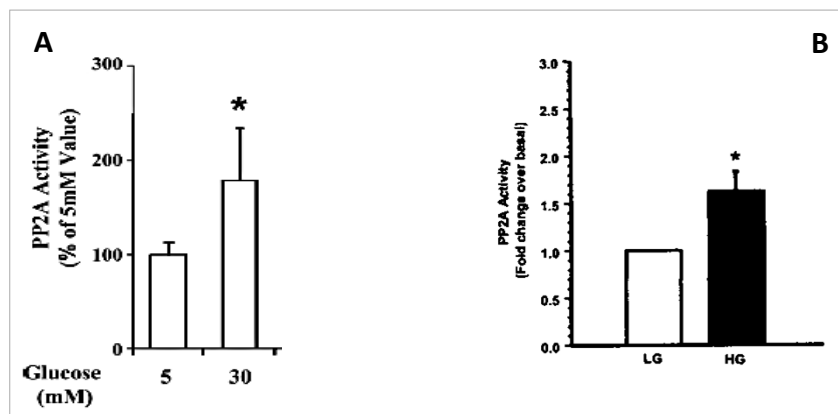


Figura 11. La hiperglucemia aumenta la actividad de PP2Ac. La actividad de PP2Ac aumenta en condiciones de hiperglucemia en: **A**, células de endotelio de aorta de bovino, **B** células de islotes de páncreas de rata (LG= Glucosa normal y GL= Glucosa elevada, tomado de: [41, 42]).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 JUSTIFICACIÓN.

La incidencia de la diabetes ha aumentado a nivel mundial en los últimos años, en México la diabetes es un problema de salud pública que se presenta sobre todo en la población adulta y se asocia principalmente a la obesidad. A medida que se diagnostican más casos, es más probable que aumente el índice de nefropatía diabética.

Los pacientes diabéticos necesitan con urgencia tratamientos que detengan, reviertan o al menos retrasen la progresión del daño renal. Para desarrollar nuevos tratamientos es necesario identificar los procesos a través de los cuales se daña el riñón y dilucidar las vías de señalización celular potenciales que puedan ser nuevos blancos terapéuticos.

Se desconoce el papel que desempeña la activación de YAP en el glomérulo durante etapas tempranas de la nefropatía diabética. Con base en los antecedentes mencionados y dada la incidencia de la nefropatía diabética, se evaluó el efecto de la diabetes sobre la localización nuclear y citoplasmática de YAP en células glomerulares en un modelo murino de diabetes.

2.2 HIPÓTESIS.

Si la diabetes incrementa la translocación nuclear de YAP, inducirá la activación de genes relacionados con proliferación y apoptosis celular durante etapas tempranas de la nefropatía diabética.

2.3 OBJETIVOS.

2.3.1 General.

Investigar si la diabetes aumenta la expresión y *traslocación* nuclear de YAP en las células glomerulares durante etapas tempranas de la nefropatía diabética en un modelo murino de diabetes.

2.3.2 Específicos.

Estudiar el efecto temprano de la diabetes sobre:

- El daño glomerular midiendo la proteinuria y la *tasa de filtración glomerular* evaluada mediante la depuración de creatinina.
- La expresión de la caspasa-3, como marcador de muerte celular.
- La expresión y localización celular de YAP.
- La expresión de la *cinasa* LATS y la *fosfatasa* PP2Ac, las cuales intervienen en la regulación de YAP.
- La expresión de PCNA (proliferating cell nuclear antigen), como marcador de *proliferación celular*.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL.

Para reproducir el modelo de diabetes en ratas se utilizó estreptozotocina (STZ, 2-dioxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos), sustancia producida por la bacteria *Streptomyces achromogenes* y ampliamente utilizada para inducir diabetes experimental dependiente. Esta sustancia entra a las células beta del páncreas (productoras de insulina) a través de los transportadores de glucosa GLUT2, ya que su estructura es similar a la glucosa, provoca toxicidad y lleva a la muerte de las células por *necrosis*. En ratas adultas comúnmente se utiliza una sola dosis intravenosa (i.v.) de entre 40 y 60 mg/kg de peso.^[43, 44]

3.2 ANIMALES.

Se utilizaron ratas hembra Wistar de 200 a 250 g de peso corporal, se sometieron a ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h, temperatura de $24 \pm 1^\circ \text{C}$ y humedad de $50 \pm 5\%$. Recibieron agua purificada y alimento estándar para rata (LABDIET® FORMULAB DIET) *ad libitum*. Los animales se dividieron en dos grupos:

- a) Ratas diabéticas (n=15), se les indujo diabetes tipo 1 mediante la administración de una dosis única de STZ (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) 60 mg/kg de peso corporal i.v., diluida en 500 μl de buffer de citrato de sodio, pH 6.0. Posteriormente, se subdividieron en tres subgrupos (n=5): 1^a, 2^a y 3^a semanas de diabetes.
- b) Ratas control no diabéticas (n=5), se les administró 500 μl de buffer de citrato de sodio, pH 6.0.

Después de 3 días de la administración de STZ, la diabetes se confirmó midiendo la concentración de glucosa sanguínea (previo ayuno de 8 h) con un glucómetro OneTouch Ultra blood (Milpitas, CA, USA). Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y bajo las normas de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. Protocolo No. 491 aprobado para este estudio.

3.3 PROTEINURIA Y DEPURACIÓN DE CREATININA.

Una vez cumplido el tiempo para cada grupo experimental de 1^a, 2^a y 3^a semanas de diabetes y controles, se realizaron las pruebas de función renal. Las ratas se colocaron individualmente en jaulas metabólicas (Nalge Co., Rochester, NY) 24 horas previas a su sacrificio y recibieron solo agua purificada *ad libitum*. Las muestras de orina se recolectaron y se midieron los volúmenes totales. Los animales se anestesiaron con pentobarbital (30 mg/kg i.p.) y se colectó la sangre por punción cardíaca, el suero se separó del paquete celular por medio de centrifugación a 1400 rpm durante 10 minutos. Las proteínas totales urinarias se midieron por el método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), este valor se corrigió con la depuración de creatinina en orina dividiendo la concentración de proteína urinaria/concentración de creatinina urinaria. La creatinina urinaria y sérica se midió por medio de la reacción de Jaffé modificada, la depuración de creatinina en orina de 24 h se calculó como se describió previamente^[45], por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Depuración de creatinina de 24 h} = \frac{[(\text{Creatinina orina})(\text{flujo urinario ml/min})]}{\text{Creatinina suero}}$$

Dónde: flujo urinario = volumen orina/1440 minutos (24 horas)

3.4 OBTENCIÓN DEL TEJIDO RENAL.

Una vez obtenida la sangre de cada grupo de ratas, se cortaron la vena y arteria abdominal para drenar los riñones de sangre, estos se removieron rápidamente y se coloraron en una solución de ringer Krebs bicarbonato (RKB) en baño de hielo.

3.5 AISLAMIENTO DE GLOMÉRULOS.

Los glomérulos se aislaron como previamente se describió.^[46] Cada riñón se decapsuló y con un bisturí se removió la corteza renal, sitio dónde anatómicamente se localiza la mayor cantidad de glomérulos. La corteza se cortó en trozos pequeños en un vidrio sobre hielo hasta obtener un aspecto homogéneo. Posteriormente, el tejido se pasó a través de una malla con tamaño de poro de 117 μm (8321A44; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) aplicando fuerza suave con un recipiente de cristal. La malla se lavó varias veces con RKB frío hasta

hacer pasar todo el tejido, el cual se recolectó en una caja Petri de cristal. El tejido recolectado, **enriquecido glomerular**, se hizo pasar nuevamente por otra malla con tamaño de poro de 74 μm (8321A58; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) y se lavó varias veces con RKB; esta malla retiene a los glomérulos ya que estos miden $\sim 100 \mu\text{m}$ (rata adulta). El tejido que se retuvo en la malla se recolectó con RKB frío y se centrifugó 15 min a 950 rpm a 4°C. El sobrenadante se desechó y el sedimento, que contenía los glomérulos, se resuspendió y lavó nuevamente con RKB.

3.6 FRACCIONAMIENTO GLOMERULAR Y OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS.

3.6.1 Glomérulos totales.

Los glomérulos aislados se trataron como se describió previamente.^[47] Se resuspendieron en 100-300 μl de amortiguador de lisis RIPA; nM (Tris-HCl 40, pH7.6/ NaCl 150/ EDTA 2/ glicerol 10%/ Tritón X-100 1%/ desoxiclorato de sodio 0.5% y dodecilsulfato sódico (SDS)) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, la muestra se sonicó tres veces durante 30s a 40 de amplitud en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra Cell; Sonics & Materials, Inc., Danbury, CT, USA) y se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso.

3.6.2 Fracción citoplasmática.

Para obtener el citoplasma, se modificó la metodología previamente descrita.^[48] Los glomérulos totales se resuspendieron con 150-300 μl de amortiguador de sacarosa [solución de sacarosa 0.32M/ Tris-HCl 10mM (pH 8.0)/ CaCl₂ 3mM/ acetato de magnesio 2mM/ EDTA 0.1mM/ DTT 1mM /PMSF 0.5mM/ NP-400.5% (v/v)/ mezcla de inhibidor de proteasas, Complete (Roche diagnostics, GmbH)] frío. Posteriormente, se trasladaron a un homogeneizador de tejidos Dounce de vidrio (3432N72, 2 ml; Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) frío y se golpeó 50 veces con el pistilo T para romper los glomérulos. La muestra se centrifugó 10 min a 1200 rpm 4°C, el sedimento se guardó para obtener los núcleos y el sobrenadante (citoplasma) se volvió a centrifugar 30 min a 1200 rpm 4°C, Figura 12. El sobrenadante se almacenó -70°C hasta su uso.

3.6.3 Fracción nuclear.

Los núcleos se obtuvieron modificando la metodología previamente descrita.^[48] Después de resuspender los glomérulos totales con 150-300 μ l de solución de sacarosa fría (descrito en párrafo anterior), se golpeó la muestra 50 veces en el homogeneizador Dounce de vidrio y se centrifugó 10 min a 1200 rpm, 4°C. El sedimento se resuspendió nuevamente con 300-500 μ l de solución de sacarosa fría, se golpeó 50 veces más en el homogeneizador de vidrio y se hizo pasar a través de una malla de nylon (cell strainer BD Falcon; Benford, MA 01730 USA) con tamaño de poro de 40 μ m, la cual permite el paso de los núcleos que miden entre 6-10 μ m. Se recolectó la muestra y se centrifugó 15 min a 1200 rpm 4°C. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en buffer de lisis (RIPA) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, la muestra se sonicó tres veces durante 30s a 40 de amplitud en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra Cell) y se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4°C, Figura 12. El sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su uso.

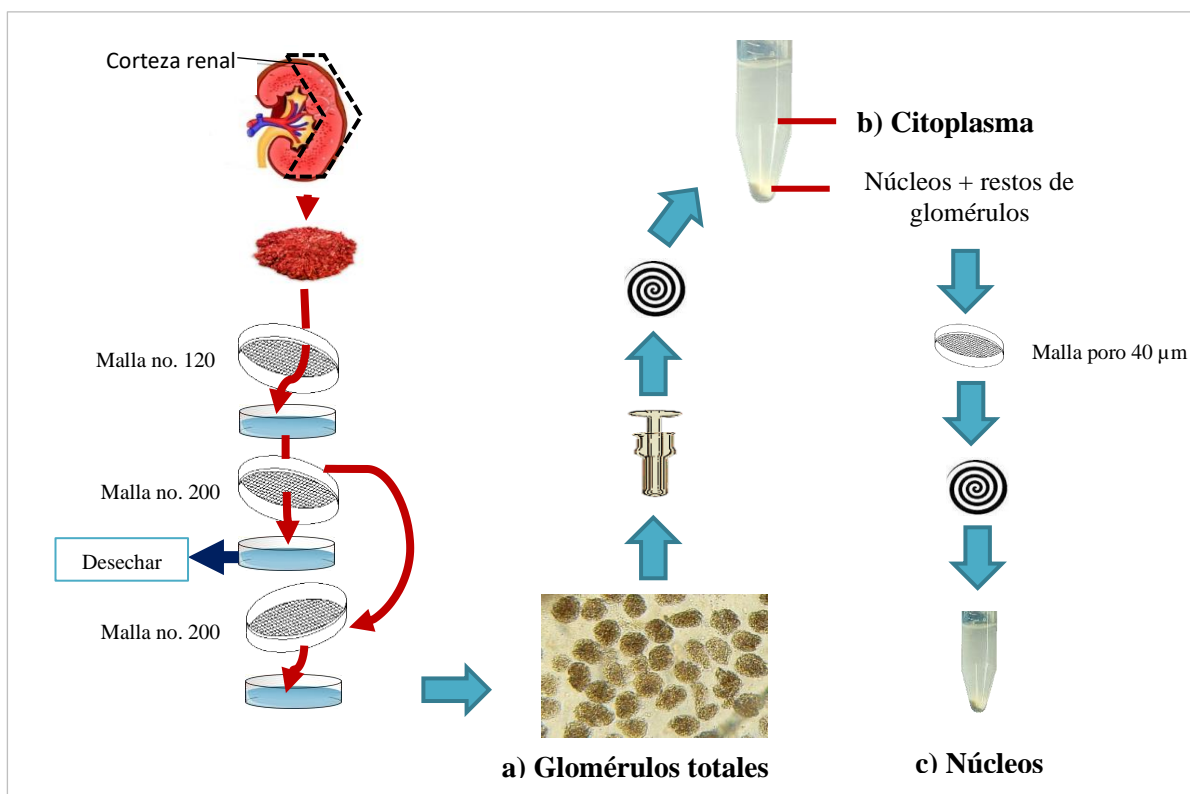


Figura 12. Fraccionamiento glomerular. a) Obtención de los glomérulos totales de la corteza renal a través de mallas con tamaños de poro diferentes. b) Los glomérulos se golpean con el homogeneizador para desintegrarlos, se centrifugan con una solución de sacarosa y se obtiene el citoplasma. c) El sedimento se resuspende y se hace pasar por una malla de poro de 40 μ m por la cual pueden pasar los núcleos que miden de 6-10 μ m

3.7 WESTERN BLOT (WB).

La cuantificación de las proteínas totales de cada grupo experimental se hizo de acuerdo al método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). El análisis por WB se realizó como previamente se describió.^[45, 47] Las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas durante 12 min y después se diluyeron 1:5 en Laemmli 5 x con urea (5 M). Posteriormente se cargaron en geles al 10% (YAP, PP2Ac, Caspasa 3 y PCNA) y al 12% (LATS) de SDS-PAGE. Los marcadores de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) se corrieron en paralelo a las muestras. Al finalizar, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). Los sitios de unión no específicos para las proteínas de interés se bloquearon incubando las membranas con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS 1x durante 1 h. Después, las membranas se incubaron toda la noche con los anticuerpos correspondientes para cada proteína: rabbit anti-YAP (sc-15407: Santa Cruz Biotechnology, Inc), goat anti-LATS (sc-12494: Santa Cruz Biotechnology, Inc), rabbit anti-PP2Ac (#2259: Cell Signaling, Tec.), rabbit anti-caspasa-3 (sc-7148: Santa Cruz Biotechnology, Inc), mouse anti-PCNA (#2586: Cell Signaling, Tec.), rabbit anti- β -Tubulina (sc-9104: Santa Cruz Biotechnology, Inc), mouse anti-GAPDH (#MAB374: Millipore), rabbit anti-Histona-H4 (sc-34263: Santa Cruz Biotechnology, Inc) con dilución 1:500. Transcurrido este tiempo, se lavaron las membranas durante 10 min. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios: para GAPDH las membranas se incubaron con HRP (626520: Invitrogen), dilución 1:10,000 durante 1 h a temperatura ambiente. Para incrementar la señal de las demás proteínas se utilizó biotina-estreptavidina, biotilado (goat) anti-rabbit (B2770: Invitrogen), biotilado (rabbit) anti-goat (BA5000: Vector), biotilado (horse) anti-mouse anti-goat (BA2000: Vector), respectivamente y HRP estreptavidina conjugado (434323: Invitrogen) ambos a una dilución 1:30,000 durante 10 min a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar y los inmunoblots se revelaron utilizando el reactivo de detección de WB ECL Prime (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La quimioluminiscencia se cuantificó en un sistema de imágenes EC3 (UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK) y las densidades de la banda de la proteínas detectadas se cuantificaron por densitometría de transmitancia (UVP BioImaging Systems software).

3.8 INMUNOFLUORESCENCIAS (IF).

Las IF de cortes de riñón se realizaron modificando la metodología descrita. ^[45, 47, 49] Una vez obtenidos los riñones, se hicieron cortes de aprox. 0.5 cm y se *criopreservaron* sumergiéndolos 1 min en 2-metil-butano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente se introdujeron en nitrógeno líquido durante 5 min, al pasar este tiempo se almacenaron a -170 °C en hidrógeno líquido hasta su uso. Se hicieron cortes de 6-8 µm en un criostato Leica (CM 1100 cryostat, Wetzlar, Germany) a -22 °C, los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados y se almacenaron a -20 °C. Las muestras se fijaron con paraformaldehído (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 4% toda la noche, se lavaron 3 veces entre cada paso con PBS. Se hicieron IF para YAP y vimentina (18-0052, Invitrogen) que se utilizó para marcar el citoesqueleto, Después, éstas se colocaron en buffer de citrato de sodio 10nM con pH 6.0 y 80-90 °C durante 20 min, se permeabilizó con PBS-Tween 20 al 1% durante 10 min, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con albúmina sérica bovina libre de IgG (1331-A Research Organics, Cleveland, OH, USA) al 0.5%, 1 h a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo primario (dilución 1:50) toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse y DAPI para teñir los núcleos (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) y a una dilución de 1:500. Las IF se analizaron en un microscopio confocal invertido (TCS-SP2, Leica, Heidelberg, Germany) con objetivo de inmersión de 63X y las imágenes obtenidas se analizaron con el software LAS AF lite (Leica Heidelberg, Germany). Estos experimentos se repitieron al menos tres veces.

3.9 ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar de la media (\pm EEM). Se utilizó como prueba estadística el análisis de varianza (ANOVA) entre los grupos experimentales. Se utilizó la prueba de múltiples comparaciones de Dunnett y el valor de $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS.

4.1.1. INDUCCIÓN DE DIABETES CON STZ.

El primer objetivo de este trabajo, fue administrar STZ y monitorear la *glucemia* para corroborar la inducción de la diabetes y obtener los grupos experimentales. Las ratas presentaron niveles de *glucemia* de 421.2 ± 13.0 EEM mg/dL, mientras que el grupo control mostró un valor de 83.4 ± 2.9 mg/dL, Figura 13. Los datos anteriores nos confirman la inducción de la diabetes.

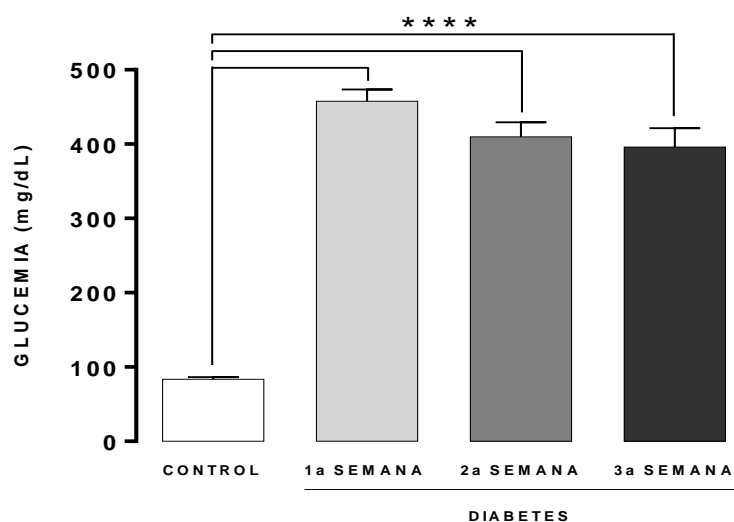


Figura 13. Monitoreo de la glucemia 1,2 y 3 semanas después de la administración de estreptozotocina. Las ratas diabéticas mostraron concentraciones de glucemia de 421.2 ± 13.0 mg/dL y los controles 83.4 ± 2.9 mg/dL. Se muestra la media \pm EEM, n= 5. **** $p < 0.0001$.

4.1.2 PRUEBAS DE FUNCIÓN RENAL.

Con la finalidad de evaluar si existen alteraciones glomerulares en etapas tempranas de la ND y si estos cambios se reflejan en la fisiología renal del animal, se evaluó la proteinuria y la depuración de creatinina de 24 horas.

4.1.2.1 Proteinuria.

La *proteinuria* refleja el daño temprano al glomérulo, como se mencionó anteriormente, cuando existe daño en la barrera de filtración glomerular aumenta su permeabilidad a diversos componentes de la sangre, entre ellos las proteínas, aumentando de ésta forma la *proteinuria*. Se observó que en la 3ª semana después de la inducción de la diabetes, la proteinuria aumenta significativamente, Figura 14.

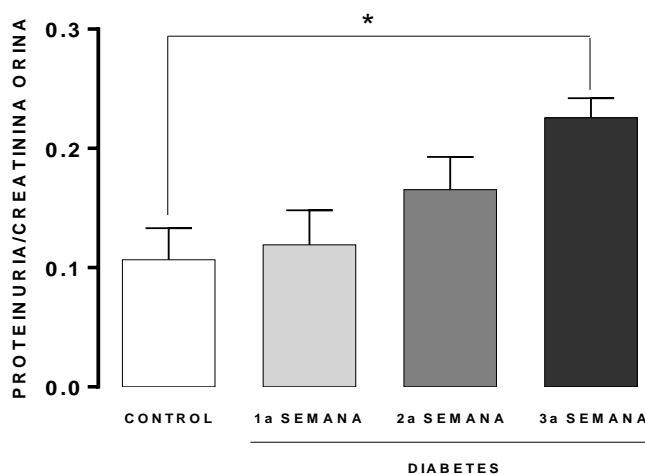


Figura 14. La diabetes aumenta la proteinuria 3 semanas después de la administración de estreptozotocina. Se muestra la media \pm EEM, $n=5$. * $p < 0.05$.

4.1.2.2 Depuración de creatinina.

La *tasa de filtración glomerular* (TFG) es un indicador de la función renal. La creatinina es el producto del metabolismo del músculo esquelético y se utiliza comúnmente para determinar la TFG debido a que se filtra en el glomérulo y no se reabsorbe a nivel tubular.^[7]

Los resultados muestran que existe un aumento significativo en la depuración de creatinina y por lo tanto un aumento en la TFG a las 3 semanas de inducción de la diabetes, Figura 15.

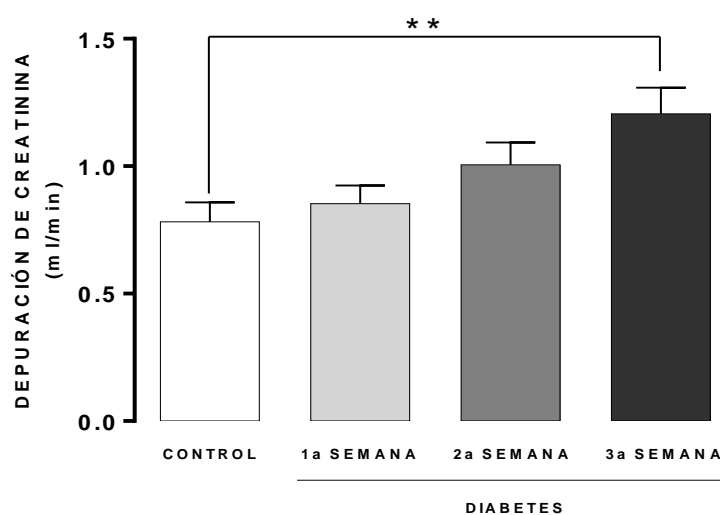


Figura 15. La diabetes aumenta la depuración de creatinina 3 semanas después de la administración de estreptozotocina. Se muestra la media \pm EEM, $n=5$. ** $p < 0.01$.

Los datos anteriormente descritos, nos sugieren que existe disfunción renal significativa a partir de la 3^a semana de la administración de STZ.

4.1.3 EXPRESIÓN DE CASPASA-3.

Se ha reportado que la diabetes induce *apoptosis* de las células que conforman la barrera de filtración glomerular, principalmente los podocitos.^[21] Por lo tanto, fue importante determinar si existía muerte de células glomerulares en etapas tempranas de la diabetes. Se evaluó la *expresión* de la procaspasa-3 y la caspasa-3 (caspasa activa) como marcadores de *apoptosis*. En la imagen de WB se observa un aumento significativo en la expresión de procaspasa-3, sin cambios en la 1ª y 2ª semana comparado con el grupo control, con respecto a la caspasa-3 p20 se encontró un aumento significativo a partir de la 2ª semana de diabetes, sin cambios en la 1ª semana con respecto al grupo control, Figura 16. Lo anterior sugiere que la diabetes induce *apoptosis* en los glomérulos a partir de la 2ª semana de la administración de STZ.

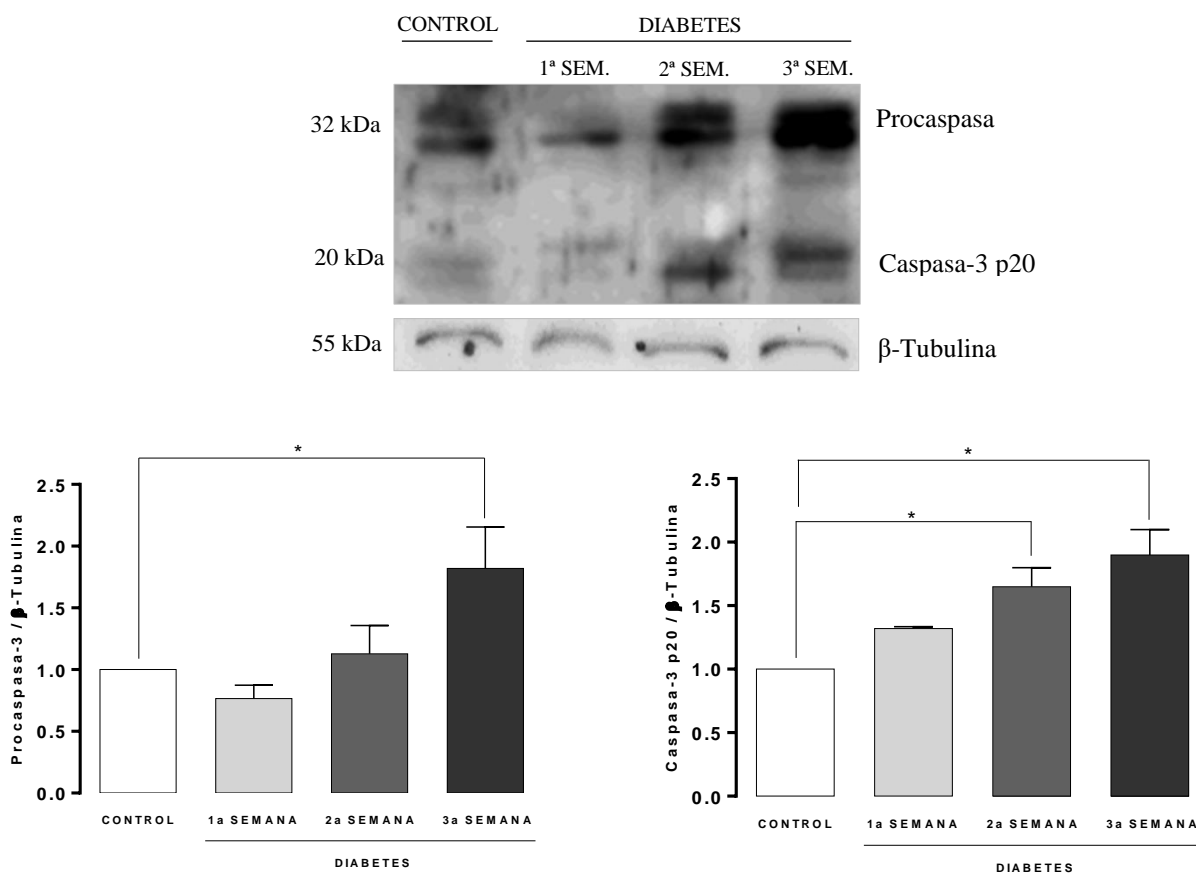


Figura 16. La diabetes aumenta la expresión de la procaspasa-3 y la caspasa-3 p20 en los glomérulos. La expresión de la procaspasa-3 aumenta significativamente en la 3ª semana de la diabetes y la caspasa-3 p20 aumenta significativamente a partir de la 2ª semana de diabetes comparada con el grupo control. Los valores del grupo control y de los grupos experimentales se expresan como densidad relativa de 5 ratas/grupo normalizados con β -Tubulina como control de carga. Se muestra media \pm EEM, $n = 3$. * $p < 0.05$.

4.1.4 EXPRESIÓN DE YAP EN LOS GLOMÉRULOS.

El siguiente objetivo fue estudiar si la diabetes afecta la *expresión* de YAP en los glomérulos, esto se hizo por medio de dos métodos: IF y WB. En la Figura 17 se muestra la IF de los glomérulos de cada grupo experimental. Se observa un aumento en la expresión de vimentina (utilizada para marcar el *citoesqueleto*) y YAP en la 3ª semana de la diabetes.

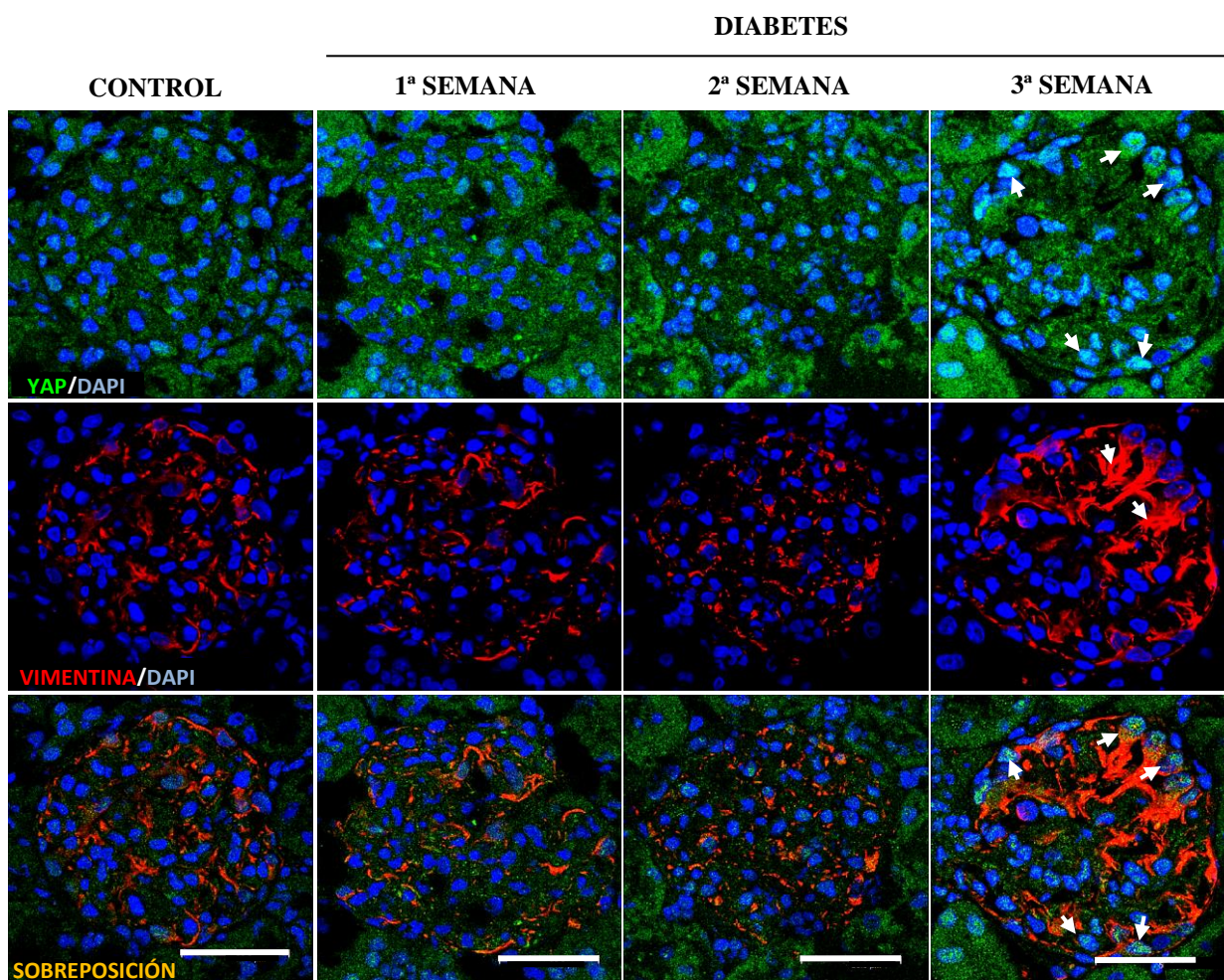


Figura 17. La diabetes aumenta la expresión de YAP en los glomérulos, IF. Se utilizó vimentina (rojo) para marcar el citoplasma y DAPI (azul) para marcar los núcleos. Al hacer la sobreposición de las imágenes se observa que a medida que progresa la enfermedad, YAP (verde) y vimentina aumentan su expresión en las células que conforman el glomérulo. Las puntas de flecha indican las zonas en las que se observa mayor expresión de YAP y vimentina. La barra representa 50 μ m. Se analizaron 3 glomérulos de cada grupo de 3 animales diferentes. Se muestra la imagen representativa.

El resultado anterior se comprobó por medio de WB en un enriquecido glomerular. Se confirmó lo obtenido en las IFs, la diabetes aumentó significativamente la expresión de YAP en la 3ª semana sin cambios en la 1ª y 2ª semana comparada con el grupo control, Figura 18.

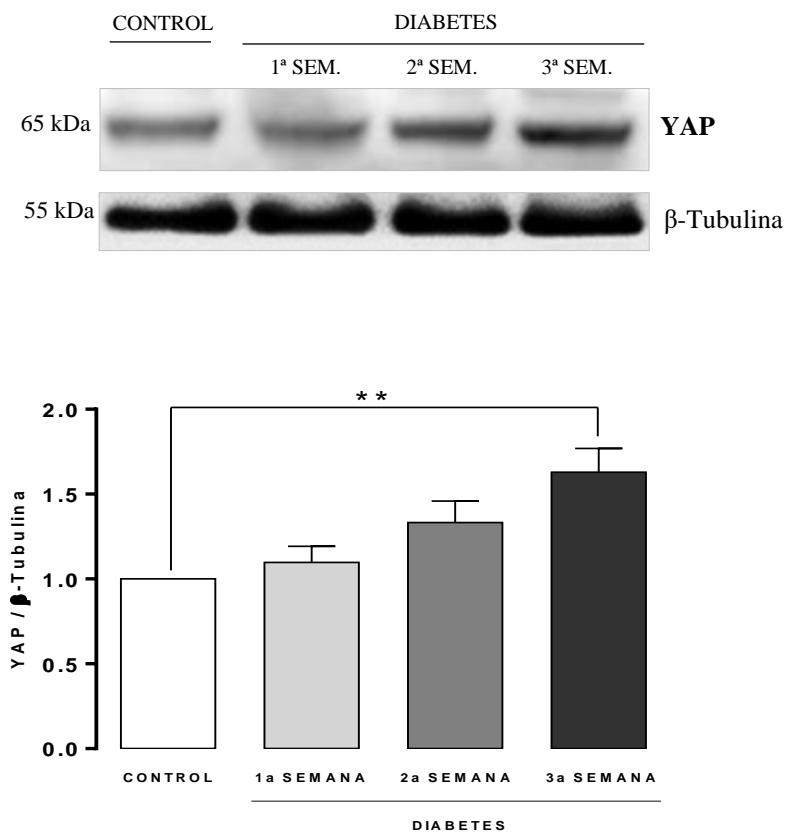


Figura 18. La diabetes aumenta la expresión de YAP en los glomérulos, WB. La expresión de YAP aumenta significativamente en la 3ª semana de diabetes sin cambios en la 1ª y 2ª semana comparada con el grupo control. Los valores de los grupos experimentales se expresan como densidad relativa de 5 ratas/grupo normalizados con β -Tubulina, utilizado como control de carga. Se muestra media \pm EEM, $n = 3$. ** $p < 0.01$.

4.1.5 EXPRESIÓN CITOPLASMÁTICA Y NUCLEAR DE YAP.

Debido a que YAP es una proteína citoplasmática y nuclear, fue conveniente determinar su expresión por medio de WB mediante un fraccionamiento glomerular de citoplasma y núcleo. Con la finalidad de comprobar la pureza del fraccionamiento celular, se determinaron marcadores para citoplasma (GAPDH y vimentina) y núcleo (histona-H4), Figura 19. Como se aprecia en el WB, se logró obtener un enriquecido puro de ambas fracciones.

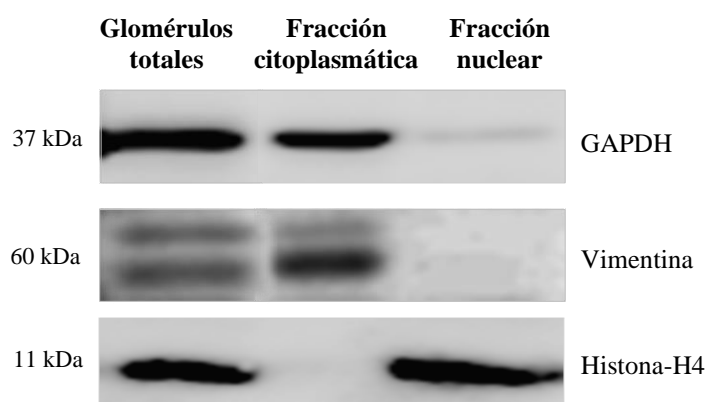


Figura 19. Control de pureza del fraccionamiento glomerular. El Western blot muestra que GAPDH y vimentina (proteínas del citoplasma) se expresan únicamente en la fracción citoplasmática y total mientras que, histona-H4 (proteína nuclear) se expresa sólo en la fracción nuclear y total.

Como se aprecia en la Figura 20, a medida que progresa la enfermedad, aumenta la expresión de YAP en los núcleos comparada con el grupo control. También se observa un aumento en la expresión citoplasmática. Este hallazgo se corroboró mediante el análisis por WB de las fracciones citoplasmática y nuclear.

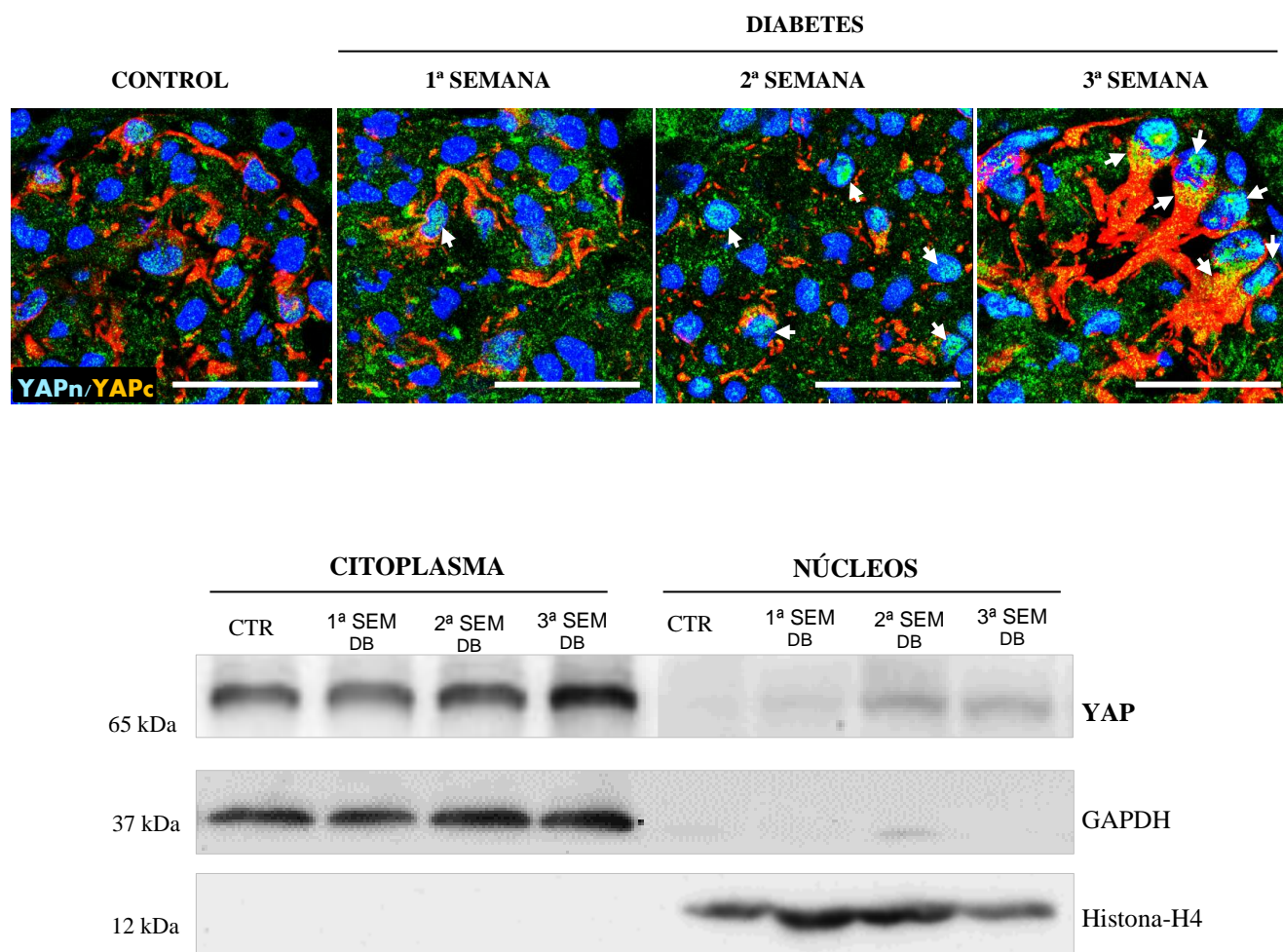


Figura 20. Expresión citoplasmática y nuclear de YAP en los glomérulos. Se muestra la sobreposición de las imágenes: YAP (verde), vimentina (rojo) como marcador citoplasmático y DAPI (azul) como marcador nuclear. Se observa un aumento en la expresión nuclear de YAP (azul + verde = azul claro) y citoplasmática (rojo + verde = naranja) en la 3ª semana. Las puntas de flecha indican las zonas en las que se observa mayor expresión de YAP y la barra en las imágenes representa 30µm; YAPn = YAP nuclear y YAPc = YAP citoplasmática. El análisis por Western blot de las fracciones glomerulares muestra un aumento de YAP en los núcleos en la 2ª y 3ª semana comparados con el control. El WB es de 5 ratas/grupo.

4.1.6 EXPRESIÓN DE LATS.

LATS es la responsable de *fosforilar* a YAP y promover su retención citoplasmática, es por ello que evaluamos su *expresión*. Como se observa en el WB (Figura 21), la diabetes disminuye la *expresión* de LATS en la 1ª semana pero se recupera en la 3ª semana.

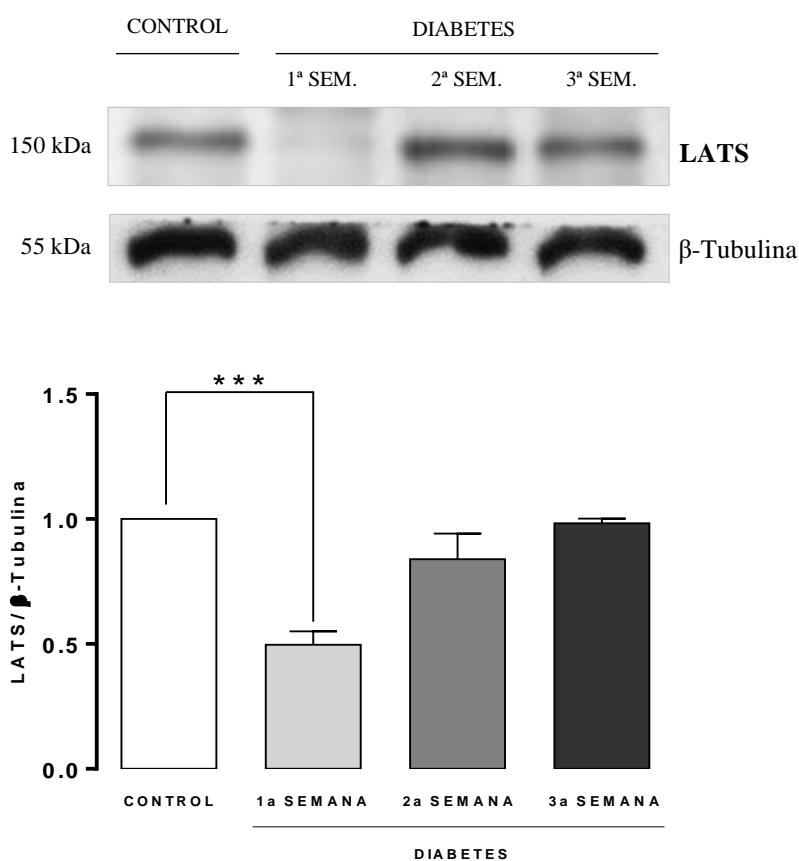


Figura 21. La diabetes modifica la expresión de LATS en los glomérulos. La expresión de LATS disminuye significativamente en la 1ª semana de diabetes y después se recupera. Los valores del grupo control y de los grupos experimentales se expresan como densidad relativa de 5 ratas/grupo normalizados con β -Tubulina, utilizado como control de carga. Se muestra media \pm EEM, n= 3. *** $p < 0.01$.

4.1.7 EXPRESIÓN DE PP2Ac.

El siguiente objetivo fue estudiar el comportamiento de PP2Ac, ya que esta *desfosforila* a YAP y favorece su *traslocación* nuclear. El WB muestra un aumento significativo en la *expresión* de PP2Ac en la 3ª semana de la diabetes, Figura 22.

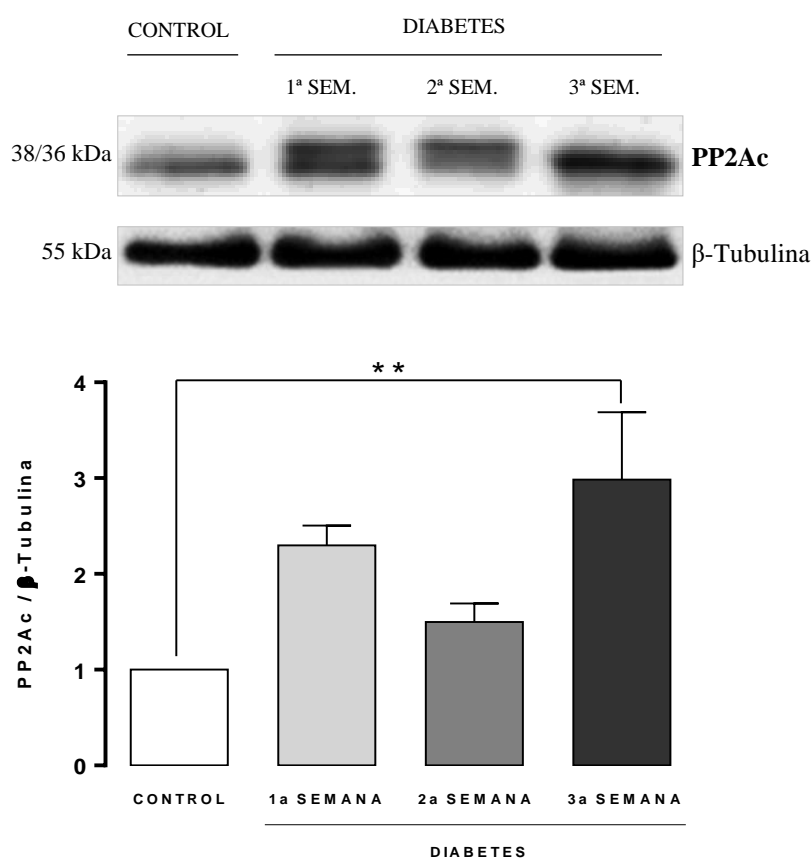


Figura 22. La diabetes aumenta la expresión de PP2Ac en los glomérulos. La expresión aumenta significativamente en la 3ª semana de diabetes comparada con el control. Los valores del grupo control y de los grupos experimentales se expresan como densidad relativa de 5 ratas/grupo normalizados con β -Tubulina, utilizado como control de carga. Se muestra media \pm EEM, n= 3. ** $p < 0.01$.

4.1.8 EXPRESIÓN DE PCNA

Se ha reportado que YAP participa en *proliferación*, debido a esto el último objetivo planteado fue determinar si había *proliferación* en las células glomerulares. El análisis de WB muestra que en la 1ª semana PCNA disminuye y en la 3ª semana aumenta significativamente respecto al control, Figura 23.

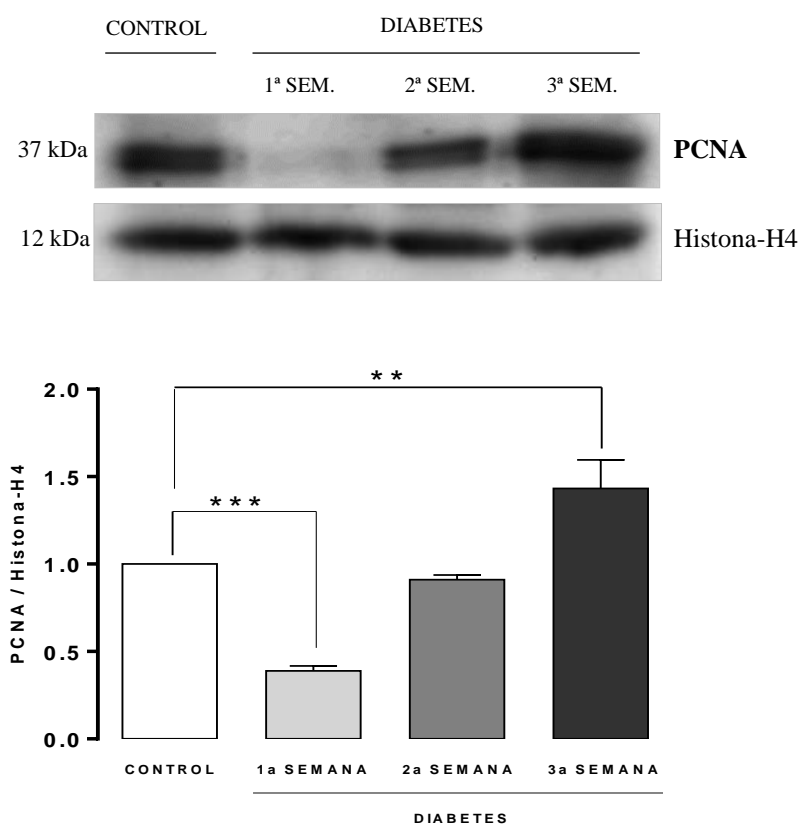


Figura 23. La diabetes modifica la expresión de PCNA en los glomerulos. En la 1ª semana de diabetes la expresión de PCNA disminuye y en la 3ª semana aumenta significativamente comparada con el control. Los valores del grupo control y de los grupos experimentales se expresan como densidad relativa de 5 ratas/grupo normalizados con Histona-H4, utilizado como control de carga. Se muestra media \pm EEM, $n=3$. *** $p < 0.01$ y ** $p < 0.05$.

4.2 DISCUSIÓN

En diversos estudios se ha descrito la importancia de la vía Hippo y YAP en la regulación del tamaño de los órganos. Sin embargo, se conoce poco acerca de la función de YAP en el riñón. En este trabajo se estudió el efecto de la diabetes temprana sobre la expresión y localización de YAP en las células glomerulares y de su posible papel en la *proliferación* y *apoptosis* en un modelo murino.

Se ha descrito que en condiciones normales existen proteínas de bajo peso molecular en la orina. En la ND, se ha reportado que existe incremento en la *microalbuminuria* persistente debido a disfunción de la barrera de filtración glomerular provocada por el incremento en la permeabilidad endotelial, engrosamiento de la MBG, hipertrofia de las células mesangiales, aplanamiento de los pedicelos y desprendimiento y muerte de los podocitos^[21]. En este estudio encontramos que hay una tendencia a un aumento en la proteinuria a partir de la 1^a y 2^a semana de la diabetes, siendo significativa en la 3^a semana, lo cual nos sugiere daño progresivo de la barrera de filtración. Esto es importante debido a que se ha descrito que en la ND, la reabsorción tubular de proteínas que se filtran libremente a través del glomérulo dañado induce inflamación túbulointersticial, incrementa la filtración de proteínas sanguíneas pro-oxidantes y citocinas proinflamatorias, que en su conjunto favorecen la progresión de la ND^[50].

Se sabe que en etapas iniciales de la ND existe un aumento en la TFG, debido a una mayor reabsorción de sodio en el túbulo proximal ^[1]. Esto activa el sistema de *retroalimentación túbuloglomerular* de las arteriolas aferentes, aumentando el flujo sanguíneo renal y la TFG ^[48, 49]. En nuestro estudio utilizamos la depuración de creatinina para medir la TFG y encontramos que este parámetro aumenta progresivamente y es significativo a la 3^a semana, lo que sugiere un aumento en la filtración glomerular, que es característico en etapas tempranas de la ND. En contraste, se ha descrito que a medida que avanza la enfermedad, la TFG desciende hasta desarrollar la IRC^[23, 24].

A nivel celular, se ha descrito ampliamente que la *hiperglucemia* genera un microambiente tóxico que favorece la activación de la *apoptosis* de las células glomerulares, principalmente de podocitos^[21]. La disminución del número de podocitos por glomérulo se asocia con la progresión y gravedad del daño renal^[51]. Debido a esto, consideramos importante

evaluar la muerte celular temprana en los glomérulos, utilizamos como marcadores de *apoptosis* la procaspasa-3 y la caspasa-3 p20; encontramos que la procaspasa-3 aumenta significativamente en la tercera semana y la caspasa-3 p20 activa aumenta desde la segunda. Estos resultados nos sugieren activación de la *apoptosis* desde la segunda semana de la diabetes, lo que concuerda con lo descrito anteriormente.

Debido a que Mundel *et al* reportaron que YAP juega un papel importante en la sobrevivencia de los podocitos en un modelo de daño renal inducido con *adriamicina*^[27], decidimos estudiar el comportamiento de esta proteína en la diabetes. Se observó un aumento significativo en la expresión citoplasmática y nuclear de YAP en el glomérulo a medida que progresa la enfermedad.

Con la finalidad de investigar si la vía Hippo favorece la translocación nuclear de YAP, se estudió el comportamiento de LATS, la *cinasa* responsable de *fosforilar* a YAP y promover su retención citoplasmática cuando la vía está activa^[29, 33]. Se encontró que en la primera semana de la diabetes la *expresión* de LATS disminuye, lo que favorecería la acumulación nuclear de YAP. Sin embargo, como se describe en la Figura 20, en este tiempo no se encontró un aumento significativo en la *expresión* de YAP. Posteriormente, la expresión de LATS se recupera a niveles iguales que el grupo control. Basados en los hallazgos descritos, se requieren más estudios para determinar si la recuperación de LATS en la 2ª y 3ª semana es funcional, es decir, si se encuentra en estado *fosforilado* lo que favorecería su retención citoplasmática.

Schlegelmilch *et al* describieron que la subunidad catalítica de la fosfatasa PP2A interacciona con YAP y la *desfosforila* favoreciendo su traslocación nuclear, lo que sugiere que esta fosfatasa es un modulador de la localización de YAP^[35]. Por otra parte, otros grupos de trabajo reportaron que la actividad de esta *fosfatasa* aumenta en cultivos celulares de endotelio capilar y de páncreas expuestos a altas concentraciones de glucosa, durante 48 y 96 horas, respectivamente, sin observar cambios en la expresión de la subunidad catalítica (PP2Ac)^[38, 39]. Con base en estos hallazgos, decidimos estudiar la expresión de PP2Ac en condiciones diabéticas. En este estudio *in vivo*, encontramos que la diabetes aumenta significativamente la *expresión* de PP2Ac en la tercera semana. Este resultado sumado a los estudios reportados sugieren que la diabetes aumenta la *expresión* y actividad de PP2Ac, favoreciendo su interacción con YAP y en consecuencia su *traslocación* nuclear. En este estudio no exploramos

el estado de *fosforilación* de YAP. Sin embargo, estos hallazgos sugieren que en condiciones diabéticas podría existir una disminución en la *fosforilación* de la proteína.

El siguiente objetivo fue evaluar el efecto de YAP sobre la proliferación de las células glomerulares. Como se mencionó anteriormente, YAP está involucrada en diversas funciones celulares y gran parte de los estudios están enfocados en la *proliferación* durante el desarrollo de los órganos y en diferentes tipos de cáncer^[32, 33, 35, 36, 52]. Otros estudios han reportado que la disminución en la expresión de LATS1/2 también favorece la proliferación celular en diferentes tipos de cáncer^[37, 53]. Con base en estos antecedentes se evaluó el marcador de proliferación PCNA y se encontró que este disminuye en la primera semana de la diabetes y que aumenta significativamente en la tercera semana comparado con el grupo control, lo cual sugiere que existe proliferación celular en la 3ª semana de la diabetes.

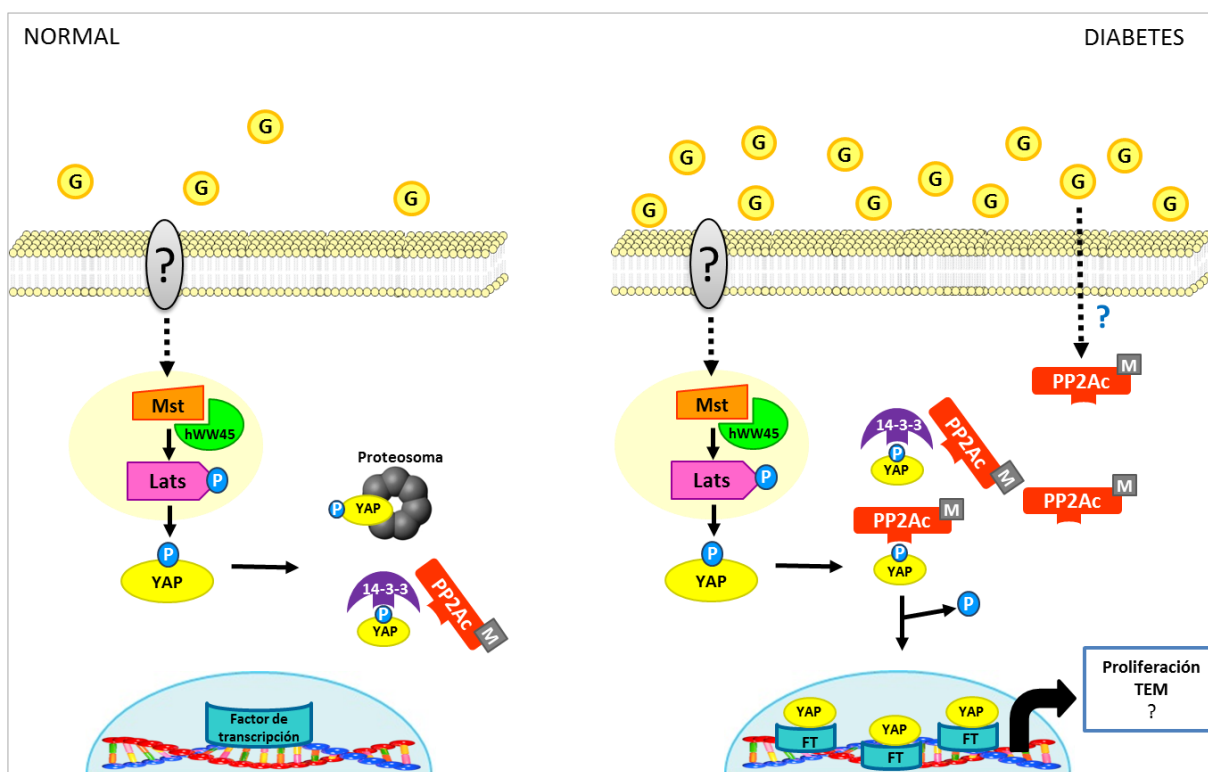


Figura 24. YAP en la diabetes. En la imagen se describe el mecanismo propuesto a través del cual YAP se trasloca al núcleo en la 3ª semana de diabetes y su posible función. La vía Hippo se encuentra inactiva en la diabetes y la hiperglucemia aumenta la expresión y activación de PP2Ac, lo que favorece la activación de YAP y su traslocación nuclear donde interactúa con factores transcripcionales relacionados con proliferación y/o transición epitelio mesénquima (TEM). G= glucosa, M= metilación, FT= factor de transcripción y P= fosforo.

Además, se ha demostrado que YAP favorece la *transición epitelio-mesénquima* (TEM) de diversas *estirpes celulares*^[54, 55]. Se ha reportado que esta transición contribuye a la fibrosis tubulointersticial y a la progresión de la enfermedad renal; además Yamaguchi *et al* propusieron a la TEM como un mecanismo que favorece la pérdida de podocitos en la diabetes^[56, 57]. En las imágenes de IF se observa que a medida que avanza la enfermedad, aumenta la *expresión* de vimentina, proteína de los *filamentos intermedios* y que se utiliza comúnmente como marcador de TEM^[54]. Este dato sugiere que probablemente YAP está promoviendo la TEM de células glomerulares.

Con los datos que se tienen hasta este momento, no sabemos en qué *estirpe celular* se expresa YAP, apoyándonos en las imágenes de IF se observa que se *expresa* en células con núcleos grandes y citoplasmas extensos. Se sabe que los podocitos son células con núcleos prominentes y citoplasmas grandes, se han utilizado anticuerpos anti-vimentina para marcarlos, sin embargo también se pueden marcar algunas células mesangiales^[5, 58, 59]. Por otra parte, las células mesangiales son de forma irregular también poseen núcleos densos y citoplasmas grandes que rodean a los capilares glomerulares^[5]. El aumento en la *expresión* de vimentina puede ser debido a que tanto las células mesangiales como los podocitos se *hipertrofian* ante el daño con la *hiperglucemia* o bien, se activa el mecanismo de TEM.

Es necesario marcar específicamente a las células mesangiales y podocitos para determinar en dónde se expresa YAP. Esto puede resolverse utilizando marcadores específicos como WT1^[27] para núcleos de podocitos y PDGFR^[16], para el factor de crecimiento derivado de plaquetas, presente en las células mesangiales.

Con estos hallazgos, aún no podemos determinar en qué células glomerulares aumenta YAP, como se mencionó anteriormente, YAP participa en procesos de: proliferación y TEM. Se sabe que los podocitos no tienen capacidad de proliferar ya que son células altamente diferenciadas^[60] y por otro lado que las células mesangiales no sufren TEM. Sin embargo, es posible que YAP participe en mecanismos diferentes dependiendo de las células glomerulares en donde se exprese. Por ejemplo que en podocitos promueva la TEM y que en las células mesangiales participe en proliferación. En la figura 24 se muestra un esquema del efecto de la hiperglucemia sobre el estado y localización celular de YAP.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES.

Con estos hallazgos se concluye que la diabetes aumenta la expresión glomerular de YAP, cuyo estado de activación puede estar regulado por la cinasa LATS y la fosfatasa PP2A. Es posible que la participación de YAP en vías como *apoptosis*, TEM y *proliferación* sea diferencial dependiendo de la estirpe celular.

5.2 PERSPECTIVAS.

Debido a que los cambios significativos de interés se presentan en la 3^a semana de la diabetes, sería interesante realizar los siguientes experimentos adicionales en esta etapa de la enfermedad.

- Determinar si LATS se encuentra inactiva, es decir si está *fosforilada*, en la tercera semana, esto puede hacerse también estudiando la expresión de la *cinasa* Mst, encargada de su activación.
- Medir la actividad de la PP2Ac.
- Evaluar la *expresión* de los factores de transcripción TEAD, que están involucrados en la proliferación celular.
- Medir el ARNm de YAP para determinar si el aumento en la expresión se debe a que hay una mayor producción de la proteína.
- Identificar en que tipos de células glomerulares se activa YAP.
- Determinar la función de YAP en estas células.
- Estudiar el comportamiento de YAP a largo plazo, es decir, en la nefropatía diabética avanzada.

GLOSARIO

Ad libitum. Es una expresión del latín que significa “a gusto, a voluntad”.^[61]

Adriamicina. Nombre comercial de la doxorubicina, es un fármaco ampliamente utilizado en la quimioterapia del cáncer^[62]. En la investigación se utiliza para provocar daño renal.^[27]

Apoptosis. Tipo de muerte celular programada, comúnmente llamado suicidio celular.^[63]

ARNm. Ácido ribonucleico mensajero, es el ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del ADN del núcleo celular y determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína ya que actúa como molde.^[63]

Células progenitoras. Conocidas como “stem cells”, presentes en tejidos adultos, poseen habilidad autorregeneradora y dan origen a células diferenciadas terminales del tejido de origen y también de otros linajes diferentes.^[64]

Cinasa. Proteína (enzima) que modifica otras moléculas (sustratos), mediante fosforilación.^[63]

Co-activador transcripcional. Es una proteína que incrementa la *expresión* génica mediante su unión a un activador o un *factor de transcripción* que contiene un *dominio* de unión a ADN. El co-activador es incapaz de unir ADN por sí mismo.^[63]

Criopreservación. Método que utiliza bajas temperaturas para preservar estructuras intactas de tejidos y células.^[45]

Dendrina. Proteína que forma parte del diafragma en hendidura.^[27]

Desfosforilar. Es la remoción de un grupo fosfato, las proteínas fosfatasas son las encargadas de desfosforilar proteínas.^[63]

Dislipidemia. Alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.^[17]

Dominio PDZ. Dominio de 100 aminoácidos se une a ligandos con motivos específicos presentes en el carboxilo terminal. Se asocian a otras proteínas con dominios como SH3.^[31]

Dominio SH3. Dominio de 60 aminoácidos, en general se une a ligandos ricos en prolina, a otros dominios SH3 o WW.^[31]

Dominio WW. Dominio de 38 aminoácidos, se unen a ligandos con dominios ricos en prolina.^[31]

Dominio. Los dominios son regiones de la estructura tridimensional de una proteína con una función específica, pueden unirse a los dominios de otras proteínas.^[63]

Drosophila melanogaster. Es una mosca conocida como “mosca de la fruta”, Recibe su nombre debido a que se alimenta de frutas en proceso de fermentación. Es una especie utilizada frecuentemente en experimentación genética, dado que posee un reducido número de cromosomas (4 pares), breve ciclo de vida (15-21 días) y aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el genoma de las moscas de la fruta, y el 50% de las secuencias proteínicas de la mosca tiene otólogos en los mamíferos.^[65]

Estirpe celular. Linaje o tipo celular.^[61]

Estrés oxidativo. Es un estado caracterizado por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o de radicales libres y los antioxidantes.^[19]

et al. Procede de la expresión latina *et alii* que significa “y otros”.

Expresión de proteínas. También conocida como expresión génica, es el proceso por el cual las células transforman la información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.^[63]

Factor de transcripción. Es una proteína que participa en la regulación de la expresión génica en el núcleo celular. Son estimulados por señales citoplasmáticas.^[63]

Filamentos intermedios. Son cables flexibles de proteínas que forman parte del citoesqueleto de la célula, poseen fuerza de tensión pero no resisten poco la compresión.^[63]

Fosfatasa. Proteína (enzima) que modifica otras moléculas (sustratos), mediante defosforilación.^[63]

Fosforilación. Es la adición de un grupo fosfato a una proteína. Las proteínas cinasas son las encargadas de fosforilar proteínas.^[63]

Glucemia. Medida de la cantidad de glucosa presente en la sangre.^[61]

Hiperglucemia persistente. Hiperglucemia que se mantiene por periodos prolongados.^[2]

Hiperglucemia. Concentración de glucosa en sangre superior a la normal.^[17]

Hipertrofia. Aumento excesivo del volumen de la célula.^[61]

In vivo. Expresión en latín que se refiere a experimentos hechos en el tejido vivo de un organismo vivo. Pruebas con animales y los ensayos clínicos son formas de investigación *in vivo*.

Isoforma. Una isoforma es una versión de una proteína con pequeñas diferencias de otra forma (isoforma) de la misma proteína. Se pueden producir diferentes formas de una proteína a partir

de genes diferentes pero relacionados entre sí, o pueden derivarse del mismo gen por *procesamiento del ARNm*.^[63]

Macroalbuminuria. Excreción de albúmina urinaria mayor a 300mg/24h (200µg/min).^[24]

Mácula densa. Es una especialización celular alargada formada por algunas células de la porción gruesa del Asa ascendente de Henle y del Túbulo contorneado distal de la nefrona en el riñón, censa cambios en la concentración de cloruro de sodio en el túbulo distal.^[4]

Microalbuminuria. Excreción de albúmina urinaria mayor a 30mg/24h (20µg/min) y menor que 300mg/24h (200µg/min).^[24]

Motivos. Son secuencias cortas de aminoácidos presentes en una proteína, habitualmente se asocia a una función concreta y sirven para la interacción específica con otras proteínas.^[63]

Necrosis. Es la muerte accidental de las células causada por una lesión irreversible a la célula o tejido.^[63]

Nódulos de Kimmelstiel-Wilson. Son lesiones patológicas características de la etapa avanzada de la nefropatía diabética y de otras nefropatías. Estos nódulos se forman principalmente por células mesangiales y matriz extracelular.^[23]

Ortólogo. Son las secuencias de genes/proteínas que se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un ancestro común.^[63]

Proliferación celular. Es el incremento del número de células por división celular.^[63]

Procesamiento del ARNm. Es un proceso regulado durante la expresión de genes que resulta en un solo gen codifica para múltiples proteínas.^[63]

Proteínas 14-3-3: son proteínas citoplasmáticas de unión a fosfoserinas y fosfotreoninas y regulan la señal de las fosfatasa CDC25, factores transcripcionales, histonas desacetilasas, entre otras.^[28]

Proteosoma. Es un complejo proteico presente en todas las células, así como en algunas bacterias, que se encarga de realizar la degradación de proteínas (proteólisis) no necesarias o dañadas.^[63]

Receptores a insulina. Es un receptor transmembranal que es activado por la hormona insulina y pertenece a la familia de receptores de factor de crecimiento. Su activación favorece el transporte de moléculas de glucosa desde la circulación sanguínea al interior de los miocitos y los adipocitos, y por lo tanto un incremento en la concentración de glucosa en el interior de las células del músculo y del tejido adiposo.^[63]

Retroalimentación túbuloglomerular. Es uno de los diversos mecanismos que el riñón utiliza para regular la tasa de filtración glomerular (TFG). Los cambios en la TFG se detectan por el túbulo renal, que envía señales de realimentación al glomérulo, para asegurar la llegada constante de cloruro de sodio al túbulo distal y ajustar la reabsorción y excreción de acuerdo a las necesidades del cuerpo.^[4]

Tasa de filtración glomerular. Es igual a la suma de todas las tasas de filtración de las nefronas funcionales, por ello es un indicador de función renal. Por lo tanto, la cantidad de creatinina excretada en la orina por minuto es igual a la cantidad de creatinina filtrada en el glomérulo por minuto.^[7]

Tejido epidérmico. Es el tejido especializado más externo de la piel, debido a que es el más expuesto a las agresiones; debe estar necesariamente adaptado para la renovación y la reparación.^[6]

Transición epitelio-mesénquima (TEM). Es un proceso presente durante la embriogénesis, carcinogénesis, metástasis y recurrencia tumoral. Durante este proceso, las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales: pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad e invasividad, resistencia a apoptosis, y cambios morfológicos. Este complejo proceso involucra diversos factores de transcripción y posteriores objetivos transcripcionales epiteliales y mesenquimales, incluyendo E-Cadherina, β -catenina, fibronectina y vimentina.^[54]

Traslocar. Cuando una proteína de membrana o citoplasmática viaja al núcleo se dice que se traslocó al núcleo.^[63]

Xenobiótico. En toxicología es cualquier sustancia química ajena al organismo.^[66]

REFERENCIAS

1. International Diabetes Federation. *La diabetes: facotres de riesgo*. 2014; Available from: <http://www.idf.org/node/26455?language=es>.
2. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes—2013*. Diabetes Care, 2013. **36**(Supplement 1): p. S11-S66.
3. OMS. *Diabetes*. 2013; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>.
4. Guyton A.C. Hall, J.E., *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. 12a ed. 2011: Elsevier Health Sciences.
5. Madsen K. M., N.S., Tisher C.C, *Brenner & Rector's the Kidney*. 2008: Saunders-Elsevier.
6. Drake, R.L., A.M.W. Mitchell, and A.W. Vogl, *Gray. Anatomía para estudiantes*. 2010: Elsevier Health Sciences Spain.
7. Koeppen, B.M., *Berne y Levy Fisiología* 6a ed. 2009: Elsevier Science Health Science Division.
8. Costanzo, L.S., *Fisiología*. 4a ed. 2011: Elsevier.
9. Patton, K.T. and G.A. Thibodeau, *Anatomy and Physiology*. 5th ed. 2003: Mosby/Elsevier.
10. District, A.C.C. *Urinary System* 2008 19 Octubre 2014]; Available from: <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Renal.html#top>.
11. Haraldsson, B., J. Nystrom, and W.M. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(2): p. 451-87.
12. Pearson Education, I. *Filtration membrane*. 2014; Available from: http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter_18%20Fall%202011.htm.
13. Barret Kim E., B.S.M., Boitano Scott., Brooks Heddwen L., *Ganong, Fisiología Médica*. 23a ed. 210: McGraw-Hill Companies, Inc.
14. Michaud, J.L. and C.R. Kennedy, *The podocyte in health and disease: insights from the mouse*. *Clin Sci (Lond)*, 2007. **112**(6): p. 325-35.
15. Mundel, P. and S.J. Shankland, *Podocyte biology and response to injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(12): p. 3005-15.
16. Schlöndorff, D. and B. Banas, *The Mesangial Cell Revisited: No Cell Is an Island*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009. **20**(6): p. 1179-1187.
17. Hall, J.E., Guyton A.C., *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. 12a ed. 2011: Elsevier Health Sciences.
18. Guo, J., et al., *RAGE Mediates Podocyte Injury in Adriamycin-induced Glomerulosclerosis*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008. **19**(5): p. 961-972.
19. Kalousová, M., et al., *Advanced Glycation End Products in Clinical Nephrology*. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2004. **27**(1): p. 18-28.
20. D'Angelo, A., S. Favaro, and G. Gambaro, *Advanced Glycation End Products in Nephrology*. 2001: Karger.
21. Reidy, K., et al., *Molecular mechanisms of diabetic kidney disease*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(6): p. 2333-40.
22. Lizicarova, D., et al., *Risk factors in diabetic nephropathy progression at present*. *Bratisl Lek Listy*, 2014. **115**(8): p. 517-21.
23. Jefferson, J.A., S.J. Shankland, and R.H. Pichler, *Proteinuria in diabetic kidney disease: A mechanistic viewpoint*. *Kidney Int*, 2008. **74**(1): p. 22-36.
24. Parving H. H., M.M., Ritz E., *Brenner & Rector's the Kidney*. 2008: Saunders-Elsevier.
25. Kriz, W., et al., *The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement*. Vol. 304. 2013. F333-F347.
26. Reiser, J. and S. Sever, *Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease*. *Annu Rev Med*, 2013. **64**: p. 357-66.

27. Campbell, K.N., et al., *Yes-associated protein (YAP) promotes cell survival by inhibiting proapoptotic dendrin signaling*. J Biol Chem, 2013. **288**(24): p. 17057-62.
28. Wang, K., et al., *YAP, TAZ, and Yorkie: a conserved family of signal-responsive transcriptional coregulators in animal development and human disease*. Biochem Cell Biol, 2009. **87**(1): p. 77-91.
29. Oka, T., V. Mazack, and M. Sudol, *Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP)*. J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27534-46.
30. Zhao, B., L. Li, and K.-L. Guan, *Hippo signaling at a glance*. Journal of Cell Science, 2010. **123**(23): p. 4001-4006.
31. Sudol, M. and K.F. Harvey, *Modularity in the Hippo signaling pathway*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(11): p. 627-33.
32. Dong, J., et al., *Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1120-33.
33. Huang, J., et al., *The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP*. Cell, 2005. **122**(3): p. 421-34.
34. Camargo, F.D., et al., *YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells*. Current Biology. **17**(23): p. 2054-2060.
35. Schlegelmilch, K., et al., *Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 782-95.
36. Beverdam, A., et al., *Yap controls stem/progenitor cell proliferation in the mouse postnatal epidermis*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(6): p. 1497-505.
37. Visser, S. and X. Yang, *LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis*. Cell Cycle, 2010. **9**(19): p. 3892-903.
38. Hiemer, S.E. and X. Varelas, *Stem cell regulation by the Hippo pathway*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(2): p. 2323-34.
39. Strano, S., et al., *Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15164-73.
40. Zolnierowicz, S., *Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(8): p. 1225-35.
41. Arora, D.K., et al., *High Glucose Exposure Promotes Activation of Protein Phosphatase 2A in Rodent Islets and INS-1 832/13 β -Cells by Increasing the Posttranslational Carboxymethylation of Its Catalytic Subunit*. Endocrinology, 2014. **155**(2): p. 380-391.
42. Du, Y., A. Kowluru, and T.S. Kern, *PP2A contributes to endothelial death in high glucose: inhibition by benfotiamine*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(6): p. R1610-7.
43. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
44. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
45. Arreola-Mendoza, L., et al., *Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate*. Toxicology, 2006. **218**(2-3): p. 237-246.
46. Bautista-García, P., et al., *Zona occludens-2 protects against podocyte dysfunction induced by ADR in mice*. Vol. 304. 2013, American Journal of Physiology - Renal Physiology. F77-F87.
47. Molina-Jijón, E., et al., *Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy*. Free Radical Biology and Medicine, 2014. **72**(0): p. 162-175.
48. Fuentes-Mera, L., et al., *Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: Members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix*. Experimental Cell Research, 2006. **312**(16): p. 3023-3035.
49. Reginensi, A., et al., *Yap- and Cdc42-Dependent Nephrogenesis and Morphogenesis during Mouse Kidney Development*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003380.

50. Abbate, M., C. Zoja, and G. Remuzzi, *How does proteinuria cause progressive renal damage?* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 2974-84.
51. Pagtalunan, M.E., et al., *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes.* J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 342-8.
52. Sudol, M., D.C. Shields, and A. Farooq, *Structures of YAP protein domains reveal promising targets for development of new cancer drugs.* Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(7): p. 827-33.
53. Hao, Y., et al., *Tumor Suppressor LATS1 Is a Negative Regulator of Oncogene YAP.* Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(9): p. 5496-5509.
54. Overholtzer, M., et al., *Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12405-10.
55. Zhang, H., et al., *Yap1 Is Required for Endothelial to Mesenchymal Transition of the Atrioventricular Cushion.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(27): p. 18681-18692.
56. Yamaguchi, Y., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition as a Potential Explanation for Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy.* American Journal of Kidney Diseases, 2009. **54**(4): p. 653-664.
57. Reidy, K. and K. Susztak, *Epithelial-Mesenchymal Transition and Podocyte Loss in Diabetic Kidney Disease.* American Journal of Kidney Diseases, 2009. **54**(4): p. 590-593.
58. Yaoita, E., et al., *Identification of renal podocytes in multiple species: higher vertebrates are vimentin positive/lower vertebrates are desmin positive.* Histochem Cell Biol, 1999. **111**(2): p. 107-15.
59. Stamenkovic, I., O. Skalli, and G. Gabbiani, *Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli.* Am J Pathol, 1986. **125**(3): p. 465-75.
60. Pavenstädt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell Biology of the Glomerular Podocyte.* Vol. 83. 2003. 253-307.
61. española, D.d.l.r.a.d.l.l. 2014; Available from: <http://www.rae.es/>.
62. Food and Drug Administration, FDA. 2014; Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=ADRIAMYCIN%20PFS>.
63. Pollard, T.D., W.C. Earnshaw, and J. Lippincott-Schwartz, *Cell Biology.* 2nd Edition ed. 2007: Elsevier Health Sciences.
64. Benigni, A., M. Morigi, and G. Remuzzi, *Kidney regeneration.* Lancet, 2010. **375**(9722): p. 1310-7.
65. Enciclopedia of Life. *Drosophila melanogaster.* 2014; Available from: <http://eol.org/pages/733739/overview>.
66. Arizona, T.U.o. *The center of toxicology, definición de conceptos básicos.* 2004; Available from: <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/c1-2.html>.

APROBACIÓN DE LA TESIS

Director de tesis

Dr. José Luis Reyes Sánchez

Comité tutorial

Dr. José Víctor Segovia Vila

Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido