



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EXPRESION, LOCALIZACION Y REGULACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsp) 90 α Y 90 β
EN EL TEJIDO RENAL.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA

Q. F. B. VICTORIA RAMÍREZ GONZÁLEZ

Director de Tesis: Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval



México D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del departamento de Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, y el departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” bajo la tutoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval.

Al comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular.
Dr. Armando Tovar Palacio	Facultad de Química.

Al programa de maestría y doctorado en ciencias bioquímicas de la Facultad de Química UNAM, por todas las facilidades otorgadas.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro (CONACYT, 40182/A1) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico con el registro (DGAPA, IN 208602-3).

Durante la realización de este trabajo de maestría recibí una beca otorgada por la **DGEP** UNAM, además de una beca otorgada por el **CONACyT** con el número de registro 177320

Agradezco la participación y comentarios del jurado de examen antes mencionado.

Al Dr. Gerardo Gamba por sus comentarios y asesoría durante la realización de este trabajo.

Agradezco la asesoría de MVZ. Octavio Villanueva para el manejo de los animales en el bioterio del INCMNSZ.

Quisiera manifestar un profundo reconocimiento a la Dra. Julieta Rubio a la Dra. Clementina Castro y a la Dra. Norma Uribe, por sus conocimientos y valiosa colaboración.

Agradecimientos.

A mis padres: Martha y Ángel. La única palabra que expresa lo que siento es **Gracias**, por todo el amor, por su paciencia, por su comprensión y desinteresado apoyo a lo largo de mi vida, sin ustedes esto no sería posible, los amo.

A mis Hermanos: Angélica, Adriana, Miguel y Ale, por enseñarme algo nuevo cada día, por apoyar mis aciertos y comprender mis errores, los quiero mucho.

A mi Tutora: Norma Bobadilla. Por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo, por su amistad, apoyo, dirección y por transmitirme sus conocimientos que me permiten ser mejor persona y encaminar mi vida hacia nuevos horizontes, gracias.

A mis amigos: Ale, Joyce, Erika, Pawis, Miguel Rosibel, Imelda, Olivier, Maru, Tino e Isaías por los buenos y malos momentos, por su amistad durante todo este tiempo y por apoyarme en todo momento ya que sin ustedes no habría valido la pena.

A mis compañeros y amigos que integran el departamento de nefrología: Por brindarme su amistad y valiosos consejos, por compartir sus conocimientos así como por ofrecerme un excelente ambiente de trabajo.

A Lety, Adelina y Nayeli: Por su valiosa ayuda en los diferentes tramites y problemas administrativos, pero sobre todo por sus consejos y amistad.

Finalmente pero no menos importante quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por permitirme ser parte de ella y realizar uno de mis sueños.

INDICE

	Pagina
I. RESUMEN	vi
II. INTRODUCCIÓN	1
A. Fisiología renal	2
B. Proteínas de choque térmico (Hsp)	4
• Proteínas de bajo peso molecular o “small Hsp’s”	7
• Hsp40 y Hsp60	7
• Hsp70	7
• Hsp’s de 100 a 150 KDa	8
C. Proteínas de choque térmico 90	9
• Regulación transcripcional	10
• Estructura tridimensional	11
• Hsp90 y sus proteínas cliente.	13
D. Hsp90 en el riñón	14
E. Hsp90 en condiciones fisiopatológicas renales	17
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	23
VI. MÉTODOS	24
A. Animales de estudio	25
B. Estudios Bioquímicos	25
• Aldosterona en suero.	25
• Depuración de creatinina	26

•	Electrolitos	27
•	Fracción excretada de sodio (FENa)	28
•	Osmolaridad.	29
•	Proteinuria	29
C.	Expresión de Hsp90	30
•	Extracción de RNA total	30
•	Transcripción reversa (RT)	31
•	RT-PCR semicuantitativa	32
D.	Extracción de proteínas y análisis de “Western blot”	33
E.	Inmunohistoquímica.	34
F.	Análisis Estadístico.	35
VII.	RESULTADOS	36
A.	Extracción de RNA total	37
B.	Cinéticas de amplificación	38
C.	Expresión de Hsp90 en condiciones normales	39
D.	Inmunolocalización de Hsp90α y Hsp90β en condiciones normales	41
E.	Resultados Fisiológicos	43
F.	Expresión de Hsp90α y Hsp90β durante la DBS	45
G.	Análisis de “Western blot “ para Hsp90 en la corteza y medula renal	47
H.	Inmunohistoquímica de Hsp90 durante la DBS	48
VIII.	DISCUSIÓN	52

IX. CONCLUSIÓN	61
X. REFERENCIAS	63
XI. APÉNDICES	72
Artículo publicado durante este trabajo	82
Artículo publicado adicional	92

ABREVIATURAS

CPM	Cuentas por minuto
DBS	Dieta baja en sodio
dNTP	Dinucleótidos trifosfato
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TAM	Tensión arterial media
TCA	Ácido tricloro acético
TR	Transcripción reversa

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

1694-1778. Filósofo y escritor francés.

I. Resumen

La subfamilia de proteínas de choque térmico (Hsp) de 90 KDa está compuesta por dos isoformas conocidas como Hsp90 α y Hsp90 β . El papel conocido de estas proteínas es que regulan la actividad de los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, también están involucradas en la producción de óxido nítrico ON, por la interacción directa con las sintasas de ON. Sin embargo, poco se conoce de la expresión y regulación de estas proteínas en el tejido renal. Por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión y localización de Hsp90 en el tejido renal en condiciones normales y bajo la influencia de la dieta baja en sodio (DBS) para inducir una condición de restricción de sodio mediante RT-PCR semicuantitativa, análisis de Western blot e inmunohistoquímica.

Nosotros encontramos que Hsp90 α y Hsp90 β se expresaron abundantemente a lo largo del tejido renal, sin embargo, la expresión de Hsp90 en la medula fue significativamente mayor que en la corteza renal. El análisis de inmunohistoquímica de Hsp90 α y Hsp90 β mostró que ambas isoformas se localizan en la membrana apical de los túbulos proximales y distales. En la medula externa las proteínas se localizaron en el citoplasma, mientras que en la medula interna se localizaron hacia la membrana basolateral. Por otro lado, la restricción de sodio por la DBS indujo sobreexpresión de Hsp90 α y Hsp90 β en la corteza renal. Aunado a esto observamos redistribución de estas proteínas en las células del asa de Henle desde el citoplasma hacia la membrana basolateral cuando los animales fueron alimentados con dieta baja en sodio.

Nuestros resultados mostraron que Hsp90 α y Hsp90 β son expresadas abundantemente en el tejido renal. La expresión y localización de estas proteínas en condiciones normales y durante la restricción de sodio fue diferente en la corteza y medula renal, lo que sugiere que estas proteínas podrían ser reguladas de forma diferente en el tejido renal. La sobrerregulación de Hsp90 en la corteza renal durante la dieta baja en sodio, junto con la redistribución en el asa de henle sugiere que Hsp90 podría participar en la regulación de la reabsorción de sodio bajo estas condiciones.

Abstract

Two genes encoding the isoforms heat shock proteins (Hsp)90 α and Hsp90 β constitute the Hsp90 subfamily. In addition to their role in regulating mineralocorticoid and glucocorticoid receptors, these proteins have been associated with nitric oxide production. However, little is known regarding Hsp90 isoform expression and regulation in kidney. In this study we characterized the expression and localization of Hsp90 isoforms and evaluated the influence of low sodium intake on their expression and distribution in kidney by using reverse transcription–polymerase chain reaction, Western blot, and immunohistochemistry techniques.

We found that Hsp90 α and Hsp90 β were expressed abundantly in both the renal cortex and the medulla; however, Hsp90 isoform expression was higher in the medulla than in the cortex. Immunohistochemistry of Hsp90 α and Hsp90 β showed intense staining in the apical membrane of proximal and distal tubules. In the outer cortex these proteins were localized in the cytosol, where as in the inner renal medulla they were restricted mainly to the basolateral membrane. Expression of Hsp90 α and Hsp90 β was upregulated in the renal cortex during sodium restriction. In addition, both proteins exhibited redistribution from the cytoplasm to the basolateral membrane in thick ascending limb cells when rats were fed with a low-salt diet. Our results showed that Hsp90 α and Hsp90 β were expressed abundantly in renal tissue.

Expression and localization patterns under normal and salt restricted intake were different between the cortex and the medulla, suggesting that these proteins

may be involved in indifferent processes along the nephron. Hsp90 α and Hsp90 β upregulation induced by a low-sodium diet together with redistribution in thick ascending limb cells suggests that Hsp90 plays a role in the modulation of sodium reabsorption under these circumstances.

Introducción

II Introducción

A. Fisiología renal

En el cuerpo humano, los riñones están situados en la parte posterior del abdomen por fuera de la cavidad peritoneal, cada uno pesa aproximadamente 150 g, hacia la mitad del riñón se observa una muesca llamada hilio en el cual pasa la arteria y vena renal. Mediante un corte sagital del riñón se pueden observar dos regiones principales llamadas corteza y medula renal. En ellos se realizan procesos de filtración y reabsorción de líquidos, electrolitos y nutrientes, el riego sanguíneo en ambos riñones es de 1200 ml/min, lo que representa el 20% del gasto cardíaco¹.

El riñón es un órgano altamente vascularizado encargado de regular el tono vascular y la homeostasis celular, dentro de sus principales funciones se encuentran la excreción de productos de desecho, la regulación del volumen y la composición de los líquidos corporales, además de la regulación de la osmolaridad, el equilibrio ácido base, la excreción de productos de desecho, la regulación de la presión arterial y la secreción de hormonas.

La unidad funcional del riñón es la nefrona y en cada uno de los riñones hay aproximadamente un millón de ellas. Cada nefrona está formada por el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle y el túbulo distal que se conecta al túbulo colector que es común para varias nefronas. Las nefronas pueden clasificarse según sus localizaciones como corticales y yuxtamedulares, las primeras tienen su penacho glomerular en la corteza y las segundas en la parte profunda de la corteza cerca de la médula. El 80% de las nefronas son corticales y el 20%

yuxtamedulares. En la corteza renal se encuentran los glomérulos, túbulos proximales y túbulos distales, mientras que, en la medula se localiza el asa de Henle y los túbulos colectores como se muestra en la Fig 1.

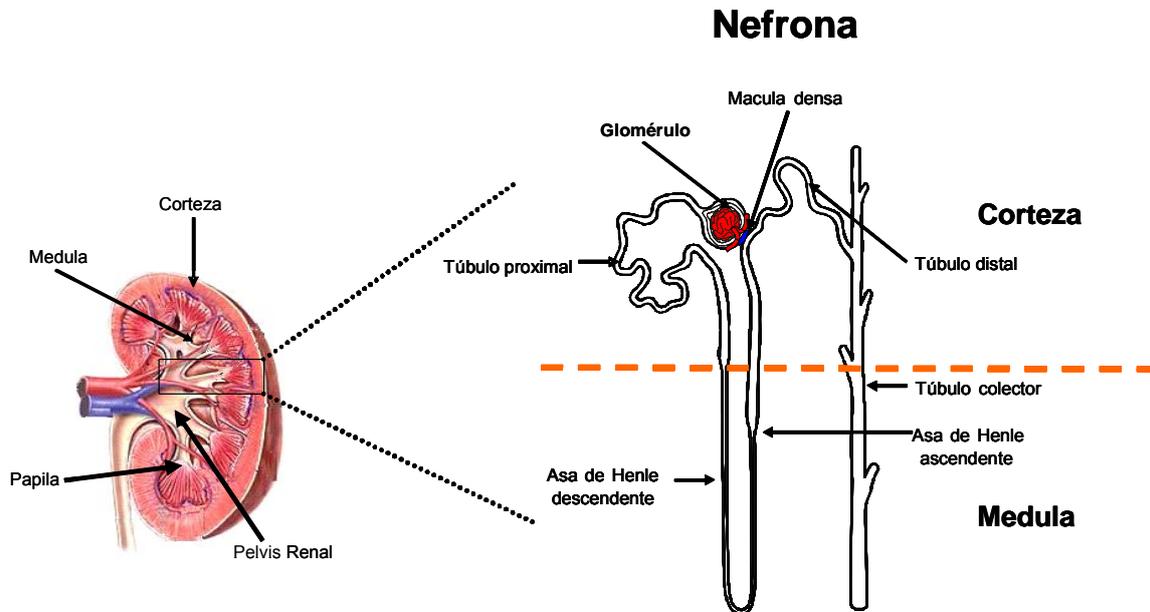


Fig 1. Corte sagital del riñón humano, donde se muestra la corteza y medula renal y una caricatura de la nefrona.

El glomérulo es donde se realiza el proceso de filtración de la sangre y los líquidos corporales, esta constituido por una red de capilares compuestos por células epiteliales, membrana basal glomerular y el endotelio fenestrado. En el glomérulo se filtra la mayoría de los solutos de bajo peso molecular a excepción de las proteínas, este filtrado es conducido del espacio de Bowman hacia el túbulo proximal el cual consta de tres secciones llamadas S1, S2, y S3 estas regiones están provistas de una membrana apical que presenta múltiples invaginaciones llamadas borde en cepillo y es aquí donde hay una selección exhaustiva de la mayoría de los nutrientes como glucosa, electrolitos y aminoácidos para ser

reabsorbidos de manera eficiente en este segmento de la nefrona, se estima que en el túbulo proximal se reabsorbe el 60% del sodio filtrado. El fluido tubular continúa hacia el asa de Henle que está formada por una rama descendente y otra rama ascendente. El asa de Henle descendente es altamente permeable a la urea y al agua se estima que aquí se reabsorbe hasta el 20% del agua filtrada, mientras que la porción ascendente es impermeable al agua. Sin embargo en esta región se reabsorbe hasta un 20% de sodio lo que constituye un mecanismo importante para el mantenimiento de la tonicidad del intersticio. Al finalizar la rama ascendente y comienzo del túbulo distal hay una capa de células situadas en la pared los túbulos así como en la pared de la arteriola aferente (ubicada en el glomérulo) llamadas mácula densa. Se sabe que este grupo especializado de células está encargado de percibir cambios en la concentración de sodio del fluido tubular, de esta manera puede activar los mecanismos pertinentes para la conservación de sodio lo que se conoce como mecanismo de retroalimentación túbulo glomerular. En el túbulo distal se reabsorbe del 10 al 15% de sodio y otros electrolitos y es prácticamente impermeable al agua. Esta parte se conecta con la última sección de la nefrona denominada túbulo colector donde se realizan procesos de reabsorción de sodio y balance ácido base así como la recolección de la orina para ser llevada a la vejiga ^{1,2}.

B. Proteínas de choque térmico (Hsp)

Se conoce que el riñón es susceptible a diferentes condiciones y a factores externos que desequilibran su homeostasis celular. Ante esta situación hay diferentes mecanismos que se activan para tratar de compensar el daño celular.

Uno de estos mecanismos de defensa celular fue descrito por primera vez en 1962 por Ritossa y col³., quienes observaron que en las glándulas salivares de *Drosophila melanogaster* el aumento de la temperatura producía la sobre-expresión de proteínas de 27 y 70 Kilo Daltones (KDa) a las cuales se les denominó proteínas de choque térmico por sus siglas en inglés Hsp (Heat Shock Proteins)⁴. Desde ese momento se abrió un campo nuevo hacia la caracterización de estas proteínas, así como para conocer los mecanismos en los que intervienen para la defensa celular en respuesta a diferentes tipos de agresiones.

Las Hsp forman una familia de proteínas numerosa que se clasifican de acuerdo a su masa molecular la cual varía de los 10 a los 150 KDa y se encuentran desde bacterias hasta mamíferos^{4,5}. Algunas de estas proteínas se expresan constitutivamente y otras son inducibles. La tabla 1 muestra la clasificación de las familias descritas en eucariontes así como su localización y expresión⁶.

Tabla1. Clasificación de las proteínas de choque térmico en eucariontes

Familia	Nombre	Localización	Expresión
Small Hsps	Hsp10	Mitocondria	Constitutiva
	α A cristalina	Citoplasma y núcleo	Constitutiva
	α B cristalina	Citoplasma	Constitutiva
	Hsp27	Translocación nuclear	Constitutiva e inducible por calor
Hsp 40	Hsp32	Citoplasma	Inducible
	Hsp40	Citoplasma núcleo	Constitutiva
	Hsp47	Retículo endoplasmico	Constitutiva
Hsp 60	Hsp58	Retículo endoplasmico	Constitutiva
	Hsp60	Mitocondria	Constitutiva
Hsp 70	TRiC	Citosol	Constitutiva
	Hsc70	Citoplasma	Constitutiva
	Hsp72	Translocación nuclear	Inducible
	Hsp75	Mitocondria	Constitutiva
	Grp 78	Retículo endoplasmico	Constitutiva
Hsp 90	TRAP		
	Hsp 90 α	Citoplasma	Constitutiva/ Inducible
	Hsp 90 β	Citoplasma	Constitutiva
	Grp94	Retículo endoplasmico	Constitutiva
Hsp110	Hsp104	Citoplasma	Constitutiva
	Hsp110	Citoplasma núcleo	Constitutiva
	Grp 170	Retículo endoplasmico	Constitutiva

En condiciones fisiológicas las Hsp están involucradas en el transporte la maduración, plegamiento, regulación alostérica de proteínas y en el transporte de proteínas hacia sus compartimentos celulares^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14}. La mayoría de las proteínas de choque térmico se inducen bajo condiciones de estrés celular, ya sea por hipertermia, o hipotermia. También se conoce que estas proteínas pueden inducirse mediante procesos como hipoxia, isquemia, inflamación y por la presencia de metales pesados como zinc, hierro, cadmio, mercurio y arsénico^{9, 15} así como por intoxicación con fármacos o por la exposición a radiación ionizante^{8,}

15, 16, 17, 18, 19, 20

Proteínas de bajo peso molecular o “Small” Hsp’s

De manera general las small Hsp’s están involucradas en la polimerización y despolimerización de la actina y la tubulina, así como también parecen contribuir a la activación de la vía de las cinasas MAPK, que a su vez fosforilan a Hsp25/27 lo cual evita la formación de multímeros y por lo tanto desensamblan el complejo de chaperonas que se ha asociado como protección a los efectos de los diferentes tipos de estrés ^{3, 8}.

Hsp40 y Hsp60

Hsp40 y Hsp60 forman parte del complejo citosólico de chaperonas que ayudan a la reparación de proteínas parcialmente dañadas, además de participar en los mecanismos de adaptación a estrés osmótico en las células renales ^{3, 8}.

Hsp70

Otro grupo de Hsps son las de 70 KDa, de las cuales actualmente se conocen tres isoformas Hsp70c, Hsp72 y Hsp73, esta última conocida como la isoforma inducible. Esta subfamilia es una de las mejor caracterizadas en el tejido renal, pues han sido identificadas en células renales en condiciones normales y después de diferentes procesos adversos como la hipoxia, la isquemia-reperfusión y en patologías como la hipertensión; Hsp72 fue asociada con procesos citoprotectores posteriores a isquemia reperfundida e incluso en la reparación del epitelio tubular dañado. Otra función fisiológica de las Hsp70 es su interacción con las proteínas que son blanco de degradación e incluso con proteínas de la familia Bcl2 (linfoma de células B-2) antiapoptóticas.^{21, 22}.

Se ha descrito que Hsp70 puede proteger a las células nerviosas y cardíacas cuando hay aumento de la temperatura, también en fibroblastos de

ratón la sobre-expresión de Hsp70 confiere termotolerancia ²⁰. Otra de las funciones descritas en rata sobre Hsp70 es que puede reducir el grado de isquemia fría al que se somete el corazón durante el trasplante es decir el tiempo que el órgano permanece fuera del organismo sin que halla flujo sanguíneo. ^{23, 24 25}

Recientemente, se demostró que la preinducción de Hsp70 por un proceso de isquemia-reperfusión, confirió protección renal a un segundo episodio de isquemia, lo que sugiere que esta proteína juega un papel citoprotector durante el fenómeno de isquemia-reperfusión³.

Hsp's de 100 a 150 KDa

También existe evidencia de que la inducción de Hsp27 y Hsp110 en cardiomiocitos aislados de rata, confiere protección después de un aumento de temperatura o un proceso de isquemia reperfusion ⁸. Las proteínas de la subfamilia de 110KDa están involucradas en el mantenimiento o la regulación de la osmolaridad renal. Se ha descrito en ratón que Hsp94 y Hsp110 se localizan en la medula interna específicamente en los túbulos colectores. En procesos como la deshidratación es decir que hay un aumento en la osmolaridad renal, se observó que hay sobreexpresión de Hsp94 y Hsp110 en ese segmento de la nefrona. Al parecer estas proteínas juegan un papel protector durante el estrés osmótico de la medula renal ⁸.

C. Proteínas de choque térmico 90

La subfamilia de Hsp de 90 KDa está compuesta por dos proteínas codificadas por dos genes diferentes, conocidas como Hsp90 α y Hsp90 β , en humano o hsp84 y hsp86 en ratón^{26, 27, 28}. Ambos genes son multicopia y se ha identificado en diferentes cromosomas; Hsp90 α está ubicado en los cromosomas 1, 3, 4, 11 y 14 con un tamaño de 7393 pb, generando un transcrito de 2912 pb que traduce una proteína de 733 aminoácidos. Hsp90 β está codificada en los cromosomas 4, 6, 10, 13, 14 y 15 con un tamaño de 8210 pb, un RNAm de 2567 pb que produce una proteína de 726 aminoácidos.^{29, 30}

Las Hsp90 constituyen cerca del 1% de la proteína soluble en la célula, se ha reportado que las dos proteínas son constitutivas, sin embargo, Hsp90 α es conocida también como la isoforma inducible^{31, 32}.

Recientemente se han identificado proteínas homólogas a esta sub-familia que forman parte de ella, aunque hay controversia pues algunos autores sugieren que podrían ser clasificadas en la familia de 70 Kda. Estas proteínas se conocen como TRAP y Gp94 en la mitocondria y el retículo endoplasmico, además de la proteína Hsp90N que se localiza en tumores pancreáticos malignos con un peso aproximado de 75 KDa, se ha asociado con la transducción de señales promitogénicas vía RAF-1 en procesos neoplásicos y es sobreexpresada en células de carcinomas pancreáticos^{33, 34}. Estas proteínas están altamente conservadas ya que se encuentran presentes desde arqueas hasta mamíferos superiores y se cree que proceden de un ancestro común que evolucionó hace 500 millones de años.⁵

Regulación Transcripcional

Las secuencias de Hsp90 α y β de humano y ratón son 96 % homólogas, mientras que entre ambas isoformas hay 86 % de homología. Ambas proteínas son citosolicas y a diferencia de otras Hsp's eucarióticas presentan intrones. Se conoce que el primer exon de las Hsp90s no se traduce comenzando la transcripción a partir del segundo exón, por lo que se ha propuesto que estas proteínas son reguladas de forma diferente al resto de Hsp's^{35, 36, 37}. Las Hsp eucarióticas en general son *cis* reguladas, a través de elementos de respuesta de choque térmico (HSE) localizados en las regiones reguladoras de estos genes³⁸.

Los genes de ambas proteínas son diferentes en la región 5' no transcrita y en el tamaño de los intrones, lo que sugiere que cada una es regulada de forma distinta.³¹ En células Jurkat (células T en leucemia) se demostró que Hsp90 α es altamente regulada por al menos 3 secuencias HSE con el siguiente motivo, 'nGAAn' localizadas en la región 5' y que son de vital importancia para la expresión constitutiva e inducible de la proteína. En cambio Hsp90 β es regulada de manera diferente, pues los elementos de respuesta a estrés térmico se localizan en dos regiones diferentes; uno en la región 5' no transcrita y es necesario para la expresión constitutiva del gen, mientras que el otro está localizado en el primer intrón y es esencial para la transcripción del gen de manera inducible, ya que se sabe que dos de ellos funcionan como potenciadores de la transcripción en condiciones celulares adversas^{36, 37}.

Ambas Hsp90 son reguladas por el factor de transcripción de choque térmico 1 HSF-1. En condiciones normales HSF-1 se localiza en el citoplasma

unido a diferentes chaperonas incluyendo la Hsp90 en estado inactivo, cuando se produce estrés celular ya sea físico o químico, HSF-1 es liberado del complejo y se transloca al núcleo donde se forma un trímero activo y que se une a los HSE, activando la transcripción de los genes de choque térmico ^{35, 37, 39, 40}

Estructura Tridimensional

La estructura cristalina del extremo amino terminal de Hsp90 de levadura y de humano, está constituida por 8 hojas beta plegadas antiparalelas y nueve alfa hélices que forman una estructura de sándwich α/β (Fig. 2). Se observó que ambas proteínas tienen un sitio de unión de ATP en este extremo, dando una estructura tridimensional inusual y similar a la DNA girasa y la proteína MutL reparadora del DNA que requiere ATP para formar una unión o anclaje al DNA. ^{32, 41.}

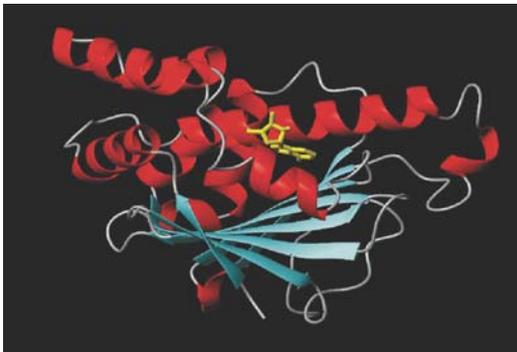


Figura 2 Estructura tridimensional de Hsp90 de *Saccharomices cerevisiae*. En amarillo se muestra la molécula de ATP unida a ella. Hsp90 está conservada evolutivamente desde bacterias hasta mamíferos y el dominio ATPasa solo difiere de sus homologas de diferentes especies en la manera más laxa o compacta de unión al ATP o sus inhibidores como la geldanamicina y el radicicol.

La estructura proteica de ambas isoformas revela la presencia de cuatro dominios bien caracterizados, el primero es el amino terminal donde se localiza el sitio de unión de ATP, también conocido como dominio ATPasa, donde el ATP es hidrolizado mediante diferentes ciclos de asociación y disociación entre Hsp90 y sus proteínas cliente.

La actividad de Hsp90 puede ser regulada por la unión con algunas cochaperonas, las cuales promueven la interconversión de ATP a ADP y de esta forma regulan la unión con sus proteínas clientes específicas^{10, 12, 41}. Las proteínas cliente son todas aquellas proteínas con las que Hsp90 interactúa y puede modificar, estabilizar o incluso aumentar su actividad.

El segundo dominio es llamado “cargado”, ya que, es una región de 30 aminoácidos aproximadamente con carga negativa del cual se desconoce su función específica. El tercer dominio es el llamado “dominio medio” en donde se unen proteínas y cinasas como Akt y por último el dominio carboxilo terminal que se requiere para la dimerización (Fig. 2) la cual es una unión flexible y producto de cambios en las condiciones fisiológicas como el aumento de temperatura y el estrés químico entre otros³¹. Existen diversos estudios que muestran que ambas proteínas pueden formar dímeros; generalmente homodímeros, aunque la isoforma β puede encontrarse en forma de monómero Fig. 3.^{31, 32, 42}.

Estudios bioquímicos recientes de Hsp90 muestran que en el extremo carboxilo hay un segundo sitio de unión a ATP, que es sensible a novomicina y cis-platino; aparentemente para que este sitio sea activo es necesaria la interacción con el dominio medio, es decir es necesario que adopte una

conformación adecuada para que el sitio de unión a ATP quede expuesto y se una. Sin embargo, hay muy poca evidencia sobre las condiciones para que este sitio adquiera actividad. Estos autores sugieren que este sitio estará disponible solo si antes; el sitio ubicado en el extremo amino se encuentra ocupado ya sea por ATP o por sus inhibidores. Sin embargo, la función de este sitio es aun desconocida, algunos autores sugieren que ambos sitios podrían funcionar de forma cooperativa.^{42, 43}

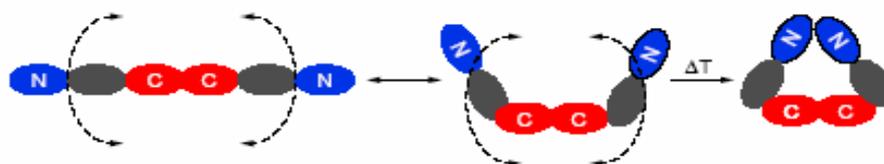


Fig. 3. Dimerización de Hsp90. Representa la formación de dímeros por la unión del extremo carboxilo, además del cambio de conformación o plegamiento de ambas isoformas cuando hay un aumento de temperatura. N amino terminal, C carboxilo terminal.

Hsp90 y sus proteínas cliente.

Como se mencionó anteriormente, las Hsp's 90 participan en el transporte y plegamiento de otras proteínas. Las funciones específicas de Hsp90 no se conocen con exactitud, pero se ha descrito que interactúan con más de 100 proteínas cliente. Para que esta interacción se lleve a cabo es necesario primero la interacción de otras cochaperonas como Hip, Hop, Hsp40 e inmunofilinas entre otras para estabilizar a Hsp90 y así facilitar su interacción con proteínas G y factores de transcripción, como el factor de choque térmico 1 HSF-1, el factor inducible de hipoxia 1 HIF-1, así como los factores de transcripción, receptores de hormonas esteroideas GRF entre otros^{44, 45}.

Hsp90 interviene y media diferentes procesos celulares como el ciclo celular, respuesta inmune, estrés celular, apoptosis, cáncer, reestructuración del

citoesqueleto, regulación del tono vascular; lo que sin duda hace complejo su estudio. La tabla 2 muestra las proteínas cliente de Hsp90.^{31, 46, 47}

Tabla 2 Proteínas Cliente de Hsp90

Chaperonas	Factores de Transcripción
Aha1 Cdc37 (p50CS-incluyendo p23 relativos SGT1, RAR1, Siah-1-proteína de interacción (SIP) Hsp70 Dna J humana p23 (=Sba1) Proteínas con motivos TPR incluyendo Hop (=Sti1), FKBP52 (FKBP51, cyclofilinas-40 (Cpr6 and Cpr7), PP5, Tom70, XAP-2 (AIP=ARA9), Cns1 homóloga a la de Drosophila Dpit47, CHIP, UNC-45 (=She4), Tpr2 (=mDj11=CCRP), CRN S100A1 Sse1	Receptor 12(S)-HETE Todos los receptores esteroides de vertebrados(GR, MR, ER, PR, AR) CAR v-erbA citoplasmática PPAR α (PPAR β) PXR Hap1 HSF-1 Mal63 p53 Todos los miembros del los receptores de dioxina PAS Sim HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α Stat3 (También en complejos con caveolina-1)
Cinasas	
Akt/PKB Aurora B Bcr- Abl Casein cinasa II α subunidad catalítica Cdk4, Cdk6, Cdk9 Chk1 c-Mos Cinasa con dominio de muerte RIP Cinasas eEF-2 Cinasas eIF2- α HRI, Gcn2, Perk, PKR ErbB2 (Receptor mutante de EGF) Flt3 GRK2 Cinasas de I κ B α , β , γ , ϵ Receptor de insulina tipo 1 KSR Lkb1	MEK MEKK1 and MEKK3 Mik1 MLK3 MOK, MAK, MRK NIK PDK1 Pim-1 Pik1 pp60v-src, c-src src tirosin cinasas relacionadas a yes y fps, fes, fgr, y lck Raf-1, B-Raf, Ste11 RET/PTC1 TAK1 TBK1 trkB VEGFR2 Wee1, Swe1

Interacciones de Hsp90 con más de sus 100 proteínas cliente. Picard home page 2004

D. Hsp90 en el riñón

Una de las principales funciones del riñón es la regulación de sodio y agua, por lo que una disminución en la concentración de sodio en el riñón o un aumento en la excreción de potasio propicia la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), que conduce a aumento en la concentración de angiotensina II y desencadena una cascada de transducción de señales mediada por los

receptores de angiotensina AT1. Este receptor está acoplado a proteínas Gq heterotriméricas, estas activan a la fosfolipasa C que hidroliza al fosfatidil inositol 3 fosfato formando diacil glicerol e inositol trifosfato (IP3) que actúan como segundos mensajeros. La producción de IP3 desencadena la liberación de Ca^{2+} intracelular del retículo endoplasmico. Se cree que el aumento en la concentración de Ca^{2+} favorece la liberación de aldosterona ².

La aldosterona es una hormona esteroidea, conocida como mineralocorticoide, que es secretada por las células de la zona glomerulosa en las glándulas suprarrenales. Es una de los mayores reguladores de la concentración de Na^+ en el organismo, pues está encargada de mediar la reabsorción de sodio y secreción de potasio en el riñón. Por su naturaleza hidrofóbica la aldosterona difunde libremente a través de la membrana y se une a sus receptores intracelulares localizados en las células epiteliales de los túbulos distales y colectores. Su receptor está unido a diferentes proteínas incluyendo Hsp90.

En 1990 Matsubara y col ⁴⁸.; desarrollaron un anticuerpo dirigido hacia Hsp90 de cerebro de bovino y observaron que es altamente específico para células nerviosas, pero además mostraron que este anticuerpo era capaz de reconocer a Hsp90 en tejidos de otras especies.

Este grupo realizó estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en el tejido renal de rata en condiciones normales y describió la presencia de Hsp90 en el citoplasma de las células de los túbulos proximales y distales de la corteza renal y este fue uno de los primeros trabajos que mostró la presencia de Hsp90 en el tejido renal ⁴⁸

La función renal más conocida hasta el momento de Hsp90 es su unión y estabilización de receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, en donde además actúan Hsp70, Hip (p48), Hop (p56) y Hsp40 formando un complejo con Hsp90, que se traduce en un aumento de la afinidad por la hormona esteroidea. Una vez que la hormona se une a su receptor, Hsp90 y cochaperonas ayudan a translocar el complejo hormona-receptor al núcleo donde es liberado y activa la transcripción de genes lo cual potencia la reabsorción de Na^+ y agua en las células epiteliales renales del túbulo distal y colector.^{49, 50} Hay evidencia que muestra que el complejo Hsp90 y cochaperonas puede activar la transcripción de otros genes, como el de la calcineurina. Por lo tanto, Hsp90 regula los efectos de la aldosterona en el riñón.^{51, 52}

Se conoce también que las Hsp90's se asocian a las sintasas de óxido nítrico neuronal, endotelial e inducible (nNOS, eNOS e iNOS, respectivamente), lo que produce que estas enzimas sean más activas y por lo tanto que aumente su producción de óxido nítrico (ON), el cual posee propiedades vasoactivas que contribuyen de forma importante en la regulación del tono vascular renal. Se ha descrito que Hsp90 potencia la fosforilación de eNOS en células endoteliales de bovino, lo que se traduce en un aumento de la producción de ON^{53, 54, 55,56}.

Recientemente, Ortiz y col⁵⁷., mostraron en asas de Henle profundidas y aisladas que el ON producido por eNOS resulta en una reducción de la reabsorción de Na^+ y Cl^- por la inhibición del cotransportador de $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ (CSB). Es importante recordar que en este segmento de la nefrona se reabsorbe del 20 al 25% de sodio filtrado y además es impermeable al agua, lo que mantiene una adecuada tonicidad en la medula renal, por lo que cambios mínimos en el fluido

tubular se verán reflejados en la excreción y reabsorción de sodio. En otro estudio realizado por el mismo grupo en las mismas condiciones, observaron que un aumento en el fluido luminal en el asa de Henle produce un aumento significativo de la actividad de eNOS conduciendo a una mayor liberación de ON y favoreciendo la migración de eNOS desde el citoplasma y la membrana basolateral, hacia la membrana apical, además mostraron que esta migración siempre esta acompañada por Hsp90. También observaron que cuando no hay flujo luminal el patrón de localización de ambas proteínas es difuso en toda la célula. Por otro lado, debido a la interacción entre Hsp90 y eNOS incubaron las asas de Henle con geldanamicina, un inhibidor específico de Hsp90, y no observaron translocación de Hsp90-eNOS. Esto sugiere que Hsp90 es necesaria para la translocación de eNOS y que la interacción de estas proteínas podría contribuir a la reabsorción de sodio en el asa de Henle.^{57, 58}.

E. Hsp 90 en condiciones fisiopatológicas renales

En cuanto a condiciones fisiopatológicas se ha encontrado que la intoxicación con metales pesados como mercurio, zinc, cobalto, fierro y arsénico, producen aumento de la expresión de Hsp90 en el tejido renal.

Fukuda y col ⁵⁹., estudiaron el efecto de la administración intraperitoneal de nitrilotriacetato férrico (Fe-NTA) en ratones produciendo daño oxidante e incremento la incidencia de adenocarcinoma renal. Estos autores observaron que una sola dosis de Fe-NTA es capaz de incrementar de manera significativa la expresión de Hsp90 en células tubulares renales y que si se prolonga su administración por varios días, de igual forma permanece la sobreexpresión de

Hsp90 en el tejido renal, por lo que concluyeron que la presencia de Hsp90 podría conferir resistencia hacia el daño oxidante.

Somiji y col ⁶⁰., analizaron el efecto del cloruro de cadmio (CdCl₂) y arsenito de sodio (NaAsO₂) en cultivos primarios de células de túbulo proximal humanas, las cuales fueron aisladas de biopsias de pacientes que padecían carcinoma renal. Estas células fueron incubadas con diferentes dosis de CdCl₂ y no observaron cambios en la expresión de ambas isoformas, sin embargo cuando las células fueron expuestas (NaAsO₂) a mayor temperatura hasta 42.5°C, observaron un aumento significativo en la expresión de Hsp90 α y Hsp90 β , tanto en los niveles de RNAm como en la proteína.

Otro modelo en el cual se ha estudiado la expresión de Hsp90 es durante la administración de fármacos nefrotóxicos. Se ha demostrado que la administración gentamicina en la rata durante 14 días, produce aumento en la concentración de creatinina y urea plasmática, además de propiciar aumento en la expresión de Hsp90 en el segmento S3 del túbulo proximal. Esto fue comprobado mediante análisis de inmunohistoquímica, de microscopia de luz y electrónica, donde se observó que hay acumulación de Hsp90 en los lisosomas de las células epiteliales del túbulo proximal después de 36 horas de la administración de la gentamicina. Así mismo se evaluó la presencia de Hsp90 durante 21 días y se comprobó que hay una expresión máxima a los 12 días post administración de los fármacos nefrotóxicos y esta tiende a disminuir durante el periodo de recuperación

El cis-platino actualmente es utilizado en la práctica clínica como un medio de contraste ¹⁹. A pesar de ser útil se sabe que este fármaco es altamente tóxico ya que se ha reportado en ratas que una dosis única de 5 mg/Kg produce insuficiencia renal aguda. También se ha caracterizado que este fármaco produce cambios morfológicos de la arquitectura renal, como dilatación del segmento S3 del túbulo proximal. En este trabajo se demostró la inducción de Hsp90 en el asa de Henle y en la membrana apical del túbulo proximal después de 24 horas de la administración de cis-platino. Así mismo se comprobó la presencia de Hsp90 en los días 5 y 7 posteriores a la administración en las células que se regeneran.

Morita y col.,^{61, 62} demostraron mediante Western blot e inmunohistoquímica en la rata la presencia de Hsp73 y Hsp90 después de 60 minutos de isquemia unilateral renal con 12 horas, 2, 3, 7 y 28 días de reperfusión. Se observó un abrupto incremento en la expresión de Hsp73 y Hsp90 después de 3 y 12 horas de reperfusión, estas proteínas fueron localizadas en el túbulo proximal y en células de asa de Henle. Aunado a esto, observaron la presencia Hsp90 después de 3, 7 y 28 días de reperfusión y comprobaron que esta persiste en las regiones de regeneración celular. Estos autores proponen que además de que Hsp90 se expresa de manera constitutiva esta puede sobreexpresarse cuando hay daño tubular en etapas degenerativas y regenerativas lo que le confiere un papel protector en ambos casos.

Poco se conoce del papel de Hsp90 en condiciones fisiopatológicas, en humanos se ha reportado un caso único, en el cual un paciente padecía insuficiencia renal aguda con oliguria aunado a una severa hipertensión. A este sujeto se le tomo una biopsia renal, a partir de la cual se realizaron estudios de

histológicos e inmunohistoquímica que revelaron la sobreexpresión de Hsp90 en el citoplasma de las células del segmento S3 del túbulo proximal en una etapa de recuperación y regeneración túbular.¹⁷

Considerando lo anterior, todos estos estudios apuntan a que la sobreexpresión de Hsp90 puede estar involucrada en procesos de reparación celular o protección bajo diferentes condiciones de estrés¹⁹.

Sin embargo, cuando iniciamos este proyecto no se conocía si ambas isoformas se expresaban en el riñón y cual era su patrón de expresión y localización a lo largo de la nefrona y debido a que existe evidencia de que Hsp32, Hsp25 además de Hsp70 son reguladas por Angiotensina II en este proyecto decidimos evaluar si la activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) modula la expresión de ambas isoformas.

III. Justificación

Las proteínas de choque térmico de 90KDa (Hsp90 α y Hsp90 β) constituyen una subfamilia de proteínas muy abundantes, pues integran del 1 al 2% de las proteína soluble total y se expresan de manera ubicua en la mayoría de los organismos, asimismo se ha descrito que participan en muchos procesos fisiológicos algunos de los cuales son de vital importancia para la fisiología renal. Sin embargo, aun no se sabe si ambas isoformas se expresan en el tejido renal y cual es su función. Por lo tanto, es necesario conocer si las dos isoformas se expresan en el riñón y saber si están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis renal o los mecanismos que regulan su expresión. Otro aspecto importante a considerar es si las Hsp90 podrían ser parte del mecanismo por el cual se presentó un efecto protector hacia algún tipo de enfermedades renales crónico degenerativas como la diabetes e hipertensión.

IV. Hipótesis

1. Si Hsp90 es una molécula que se expresa en condiciones normales en el tejido renal y comprende del 1 al 2% de la proteína soluble total, entonces Hsp90 α y Hsp90 β podrían expresarse y localizarse en el tejido renal.
2. Si ambas isoformas se localizan en el tejido renal su expresión podría modificarse durante la dieta baja en sodio DBS donde está activado el sistema renina angiotensina aldosterona.

V. Objetivos

1. Caracterizar la expresión y localización de Hsp90 α y Hsp90 β en el tejido renal en condiciones normales.
2. Caracterizar la expresión y localización de Hsp90 α y Hsp90 β durante la activación del sistema renina angiotensina aldosterona con dieta baja en sodio (DBS).

Métodos

VI. Métodos

A. Animales de estudio

Se incluyeron 32 ratas de la cepa Wistar, especie *Rattus norvegicus* macho de 250-300g de peso, expuestas a periodos de luz/oscuridad de 12 por 12 h, en condiciones constantes de temperatura y humedad relativa de 18-19°C y 65% respectivamente. Las ratas fueron divididas en 2 grupos diferentes:

1. Grupo control (N) que consistió de 16 ratas normales que se mantuvieron con dieta estándar conteniendo 0.4% de sodio y libre acceso de agua.
 - a) Seis ratas se utilizaron para extraer RNA de riñón
 - b) Seis ratas se utilizaron para extraer proteínas totales de corteza y medula renal
 - c) Cuatro ratas fueron empleadas para estudios de inmunohistoquímica
2. El grupo experimental consistió en 16 ratas que fueron alimentadas con dieta baja en sodio DBS por 21 días la cual contiene 0.02% de Na⁺ y acceso libre a agua
 - a) Seis ratas fueron utilizadas para extraer RNA total de riñón
 - b) Seis ratas se utilizaron para extraer proteínas totales de corteza y medula renal
 - c) Cuatro ratas se emplearon para estudios de inmunohistoquímica en corteza y medula renal

Al finalizar el experimento, todos los animales se colocaron en jaulas metabólicas durante 24 h para determinación de creatinina urinaria, excreción urinaria de Na⁺, osmolaridad y proteinuria. Antes del sacrificio las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico vía intraperitoneal 30 mg/Kg y se tomaron muestras de sangre mediante punción de la aorta para determinar los niveles séricos de creatinina y aldosterona. Posteriormente, se extrajeron ambos riñones y se separaron en corteza y médula microscópicamente. Ambas regiones del riñón, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

B. Estudios Bioquímicos

Aldosterona en suero.

Para determinar si el sistema renina angiotensina aldosterona se encontraba activado durante la restricción de sodio (DBS) se determinaron niveles plasmáticos de aldosterona mediante radioinmunoanálisis (RIA) con un estuche comercial (Dia Sorin S.p A Italy). Este es un método de competencia, en el cual se emplea aldosterona purificada y marcada con yodo¹²⁵ (I¹²⁵) y aldosterona no marcada presente en las muestras de estudio. Se utilizan tubos que tienen adherido un número limitado de anticuerpo contra aldosterona marcada; posteriormente las muestras se incubarán en las mismas condiciones, se realizan lavados para retirar el exceso y la concentración de aldosterona marcada con I¹²⁵ unida al anticuerpo fijo es inversamente proporcional a la concentración de aldosterona no marcada presente en las muestras.

Primero se realizó una curva patrón con los estándares de concentraciones conocidas de aldosterona que variaron desde 0, 100, 250, 500 y 1000 pg/mL, se

incubaban 200 µl de cada punto de la curva o con cada muestra y se adicionaron 500 µl de trazador, las muestras se agitaron e incubaron durante 18 a 22 h a temperatura ambiente, una vez transcurrido este tiempo se retiró la mezcla de incubación y se midió la radiactividad de los tubos en un contador gamma contra I¹²⁵. Se calculó la concentración de aldosterona presente en los estándares con la siguiente fórmula. Restando el valor de fondo.

$$B/Bo\% = \frac{\text{C P M de calibrador o muestra}}{\text{C P M del calibrador cero}} \times 100$$

La concentración de cada muestra se calculó interpolando en la curva patrón y se expresó en pg/ml o ng/ml.

Depuración de creatinina

Este es un parámetro muy aproximado para evaluar la filtración glomerular es decir la función renal. La concentración de creatinina se determinó en la orina de 24 h y en la muestra de suero tomada antes del sacrificio. Los niveles de creatinina se determinarán por medio de un analizador de creatinina II de Beckman, en el cual se lleva a cabo una reacción calorimétrica entre ácido pícrico e hidróxido de sodio. La depuración de creatinina se calculó con la siguiente fórmula.

$$\text{Ccr} = \frac{\text{Flujo urinario} \times [\text{Ucr}]}{[\text{Pcr}]}$$

Donde:

Ccr: Depuración de creatinina.

Ucr: Concentración urinaria de creatinina.

Pcr: Concentración plasmática de creatinina.

$$\text{Flujo urinario} = V_{\text{Final}}/24\text{h}$$

Electrolitos

El sodio (Na^+) urinario se determinó en la orina de 24 h mediante el potencial de ión selectivo en un analizador de electrolitos NOVA 4.

Fracción Excretada de Sodio (FE_{Na})

Con la concentración de sodio en orina y en plasma y la concentración de creatinina en orina y plasma, se determinó la fracción excretada de sodio utilizando la siguiente formula:

$$\text{FE}_{\text{Na}}(\%) = \frac{\text{UNa} \times \text{Pcr}}{\text{PNa} \times \text{Ucr}} \times 100$$

Donde:

UNa: Concentración de sodio en orina.

Pcr: Concentración creatinina plasmática.

PNa: Concentración plasmática de sodio.

Ucr: Concentración de creatinina en orina

Osmolaridad.

La osmolaridad fue determinada en las orinas con un micro osmoméetro (Advanced Instruments Inc. 3300) determinando la disminución del punto de congelación de cada una de las muestras. Esta disminución se debe a la concentración de sales presente en cada muestra. Conforme aumenta la concentración de sales, disminuye de manera significativa el punto de congelación del agua. Las orinas fueron descongeladas y se agitaron por 30 s, se dejaron sedimentar por unos minutos, posteriormente, se tomo una alícuota de 20 μ l y se colocó en el micro osmoméetro para su análisis.

La concentración de proteínas presentes en la orina se determinó mediante una técnica turbidimétrica, para lo cual se realizaron diluciones de la orina 1:20 en un volumen final de 1 ml. Las muestras se agitaron y dividieron en dos partes iguales de 500 μ l cada una, posteriormente a una serie de tubos se les agregaron 125 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y al resto se le agregaron 125 μ l de solución salina estos sirvieron como blanco reactivo. Se preparó una curva de albúmina con concentraciones de 100 a 500 μ g/ml mediante diluciones seriadas. Se tomaron 500 μ l de cada concentración y se les adicionaron 125 μ l de TCA al 10 %, todos los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar por 15 min. Se determinó la absorbancia de proteínas en un espectrofotómetro a 420 nm y se calculó la concentración de cada una de las muestras tomando como referencia la curva de concentración conocida. Ambas pruebas se realizaron por duplicado.

C. Expresión de Hsp90

Extracción de RNA total

Para evaluar la expresión de Hsp90 α y Hsp90 β y GADPH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) se extrajo el RNA total de la corteza y medula renal, por homogeneización en tiocianato de guanidina y ultra centrifugación a través de un gradiente de cloruro de cesio^{63, 64, 65} Una vez aislado el RNA, se determinó la concentración mediante espectrofotometría a 260nm y mediante un gel de agarosa al 1% se verificó la integridad del mismo. Se trataron 50 μ g de RNA de todas las muestras con 2.5 μ l DNAasa (InvitroGen) libre de RNAasas para evitar una posible contaminación con DNA genómico. Una vez más se determinó la concentración final de RNA total por espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 nm con un espectrofotómetro Beckman DU640 y se verificó la integridad del RNA en un gel de agarosa-formaldehído al 1% mediante tinción en bromuro de etidio bajo una lámpara de luz ultravioleta (Ver Apéndice I).

Transcripción reversa (RT)

La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de 2.5 μ g de RNA total de corteza o médula tratadas previamente con DNAasa. El RNA se ajustó a un volumen de 11 μ l con agua grado biología molecular y incubó a 65° C durante 10 min para linearizar las moléculas de RNA. Se agregaron 9 μ l de una mezcla que contenía 200U unidades de transcriptasa reversa (MMLV Invitrogen), 100 pmol de hexámeros, 0.5 mM de cada nucleótido (dNTP) y 1x de solución amortiguadora para RT. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 h y al finalizar se expuso a 95°C

por 5 min para desnaturalizar la enzima y la reacción se llevó a un volumen final de 40 μ l^{64, 65}.

Se obtuvieron los iniciadores específicos para Hsp90 α y Hsp90 β , así como GADPH como gen control⁶⁶.

Hsp90 α

Sentido: 5' ACA AGC ACA TAT GCG TTG ACA ACA 3'

Antisentido: 5' TTC AGT TAC AGC AGC ACT GGT ATC 3'

Tm= 68 °C y el producto de pcr esperado fue de 320pb

Hsp90 β

Sentido: 5' ACC AGC ACCTAC GGC TGG ACA GCC 3'

Antisentido: 5'GAT CTC ATC AGG AAC TGC AGC ATT 3'

Tm= 75 °C y el producto de pcr esperado fue de 318pb

GADPH

Sentido: 5' GTA GCC ATA TTC ATT GTC ATA 3'

Antisentido: 3' AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA 5'

Tm= 58 °C y el producto de pcr esperado fue de 517pb

Para verificar la amplificación de Hsp90 se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5 %. Se consiguió una sola banda de 320pb para Hsp90 α y 318 pb para Hsp90 β ambas bandas se purificarón mediante un estuche comercial QIAquick (Qiagen, Hilden Germany) y los productos fuerón secuenciados automáticamente (Ver apéndice I).

RT-PCR semicuantitativa

Para realizar la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de manera rutinaria se realizaron cinéticas de amplificación para cada par de iniciadores en la corteza y medula renal en donde se emplearon 40 μl de una mezcla de RT de diferentes muestras en presencia de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP e iniciadores correspondientes el volumen final de 200 μl el cual fue dividido en diferentes tubos de 20 μl cada uno, posteriormente se amplificó cada punto a un cierto número de ciclos y finalmente los productos de PCR se corrieron en un gel de acrilamida al 5%, los gels fueron teñidos con bromuro de etidio y se observaron bajo luz ultravioleta, se cortaron las bandas, se diluyeron en líquido de centelleo y se determinaron las CPM (cuentas por minuto) en un contador de centelleo líquido. El número de ciclos ideal para cada gen se determinó graficando las CPM con el número de ciclos en una escala logarítmica y el ciclo óptimo se determinó a la mitad de la fase exponencial.

Una vez determinada la fase exponencial de cada par de iniciadores se realizaron las reacciones de PCR correspondientes en un volumen final de 20 μl en donde se emplearon 4 μl de la reacción de la TR con solución amortiguadora para PCR 1X, Mg^{2+} , 0.1 mM de cada dNTP, 0.2 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP, 10 μM de los iniciadores de Hsp90 α Hsp90 β y GADPH como gen control 1x de *Taq* DNA polimerasa (InvitroGen) agua grado biología molecular. El programa de amplificación para todos los genes fue el siguiente: 5 min a 94 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C 5 min de extensión a 72 °C en un termociclador (T

personal Biometra). Los productos de la reacción se separaron en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 5% y su presencia se detectó mediante tinción en bromuro de etidio bajo luz ultravioleta las bandas se cortaron y se diluyeron con líquido de centelleo y la incorporación de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP se determinó con un contador de centelleo líquido. La expresión se representa como la relación de las CPM del gen problema entre el gen control (Ver apéndice II).

D. Extracción de proteínas y análisis de Western blot

Las proteínas fueron homogenizadas usando 6 diferentes cortezas y medulas de los grupos control y DBS en 4 volúmenes de solución amortiguadora de lisis (225 mM manitol, 75 mM de sacarosa, 0.1 mM de EDTA, 0.5 mM de MOPS, 5 mM de benzamidina y 5 mM de DTT), los homogenados fueron centrifugados a 4000 rpm por 4 min, se retiraron los restos celulares y en sobrenadante se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (BIO-RAD). Se sometieron a electroforesis 50 μg de proteínas totales en un gel SDS-PAGE al 7.5%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PDVF (Amersham), después las membranas fueron bloqueadas por 30 min en TBS-t (amortiguador de TRIS - salino) suplementado con 5% de leche descremada y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario anti-Hsp90 por 30 min a 37 °C a una dilución de 1:1000. Al final de esta incubación las membranas fueron lavadas durante 60 min en TBS-t posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario IgG conjugado a HRP a una dilución 1:80000 durante 30 min a 37 °C y lavadas nuevamente por 60 min. Las proteínas fueron detectadas

mediante un estuche comercial de quimioluminiscencia (Amersham) por autorradiografía, y las bandas fueron digitalizadas para su análisis densitométrico (Ver apéndice III).

E. Inmunohistoquímica.

Cuatro ratas del grupo control y DBS fueron cateterizadas en ambas arterias femorales, en una se registró la tensión arterial media (TAM) y por la otra se perfundió con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7.4 hasta que se retiró toda la sangre, posteriormente, se perfundió con una solución de formaldehído al 10 % hasta la fijación total del tejido; después se retiraron ambos riñones y se realizaron cortes macroscópicos los cuales fueron embebidos en parafina para su posterior utilización.

Una vez que se insertaron en parafina se realizaron cortes de 3 μm de ancho de cada riñón, se procedió a realizar las inmunohistoquímicas correspondientes para Hsp90 α y Hsp90 β y el cotransportador de Na⁺K⁺2Cl⁻. La recuperación del antígeno se hizo deparafinizando los cortes calentando a 55°C por 3 min y los tejidos fueron hidratados en xilol durante 20 minutos y en etanol al 90%, 80% y 70% durante 10 min cada uno y finalmente en solución amortiguadora de fosfatos. Después de hidratados los cortes se calentaron en un horno de microondas durante 5 min en una solución amortiguadora de citrato 10mM a pH 6.0. Después se lavaron y cubrieron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 min, transcurrido este tiempo se incubaron con los anticuerpos para Hsp90 α , Hsp90 β y Na⁺K⁺2Cl durante 30 min, y posteriormente fueron lavados con PBS 3

veces y se incubó el anticuerpo secundario acoplado a biotina durante 30 min, la tinción final se completo adicionando 3.3-diaminobenzidina y fueron contrateñidas con hematoxilina de Meyer. Las muestras fueron analizadas con microscopía de luz y digitalizadas para su análisis (ver apéndice IV).

F. Análisis Estadístico.

La significancia estadística fue definida como una prueba de dos colas $p < 0.05$ y los resultados son expresados como el promedio \pm el error estándar del promedio. La expresión de Hsp90 se muestra como la relación de los productos de PCR entre Hsp90 sobre GADPH. Las diferencias entre los grupos fueron analizados por una prueba de t-student no pareada.

Resultados

VII Resultados

Para conocer si Hsp90 α y Hsp90 β se expresan en el tejido renal, se incluyó un grupo de ratas Wistar macho de 300g de peso que fueron alimentadas con dieta estándar para rata y tuvieron acceso libre de agua. Los animales fueron sacrificados para realizar los estudios moleculares y fisiológicos.

A. Extracción de RNA total

Se extrajo el RNA total de la corteza y medula renal. El RNA total fue purificado y tratado con DNAasa se cuantificó y se comprobó su integridad mediante espectrofotometría de luz ultravioleta y geles de agarosa en condiciones desnaturizantes teñidos con bromuro de etidio. En la Fig.1 se muestra un gel de agarosa con el RNA extraído de la corteza renal, de las ratas alimentadas con dieta estándar o con dieta baja en sodio. El gel de agarosa y la lectura de 260 y 280 nm mostraron que el RNA se encontraba en óptimas condiciones pues se distinguen claramente los RNAs ribosomales 28 y 18S.

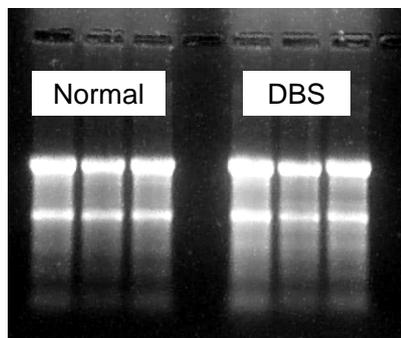


Fig. 1. Gel de agarosa – formaldehído representativo del RNA extraído de corteza de ratas del grupo N y del grupo DBS.

Una vez que se comprobó la integridad del RNA, se amplificaron fragmentos de Hsp90 α y Hsp90 β de la corteza y medula renal a partir del RNA total utilizando iniciadores específicos cuya secuencia ha sido descrita en materiales y métodos, se generaron productos de PCR de 320 y 318 pb respectivamente, posteriormente fueron secuenciados para comprobar que se trataba de los RNAs de las proteínas de interés. Las secuencias parciales de rata fueron registradas en la base de datos del Gene Bank con el número de acceso AY027778 y AY027779.

B. Cinéticas de amplificación

Una vez que se logró amplificar un fragmento cada isoforma de Hsp90 en el tejido renal se realizaron cinéticas de amplificación para determinar el número de ciclos adecuado para el análisis de la expresión génica de Hsp90.

En la Fig. 2. Observamos las cinéticas de amplificación para la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH) empleado como gen control tanto en corteza como en medula renal y elegimos 18 ciclos para amplificar de manera rutinaria este gen ya que se localiza a la mitad de la fase exponencial ³³. También se muestran las cinéticas de amplificación de Hsp90 α y β en la corteza y médula renal en donde se observan claramente dos fases exponencial y meseta. Para evaluar la expresión de cada gen se escogió el número de ciclos que se encontraba a la mitad de la fase exponencial. En el caso de Hsp90 α la fase exponencial se encontró entre 15 y 24 ciclos, por lo que elegimos 20 ciclos para amplificarla en la corteza y en la medula renal. Mientras que para Hsp90 β , se

eligieron 21 ciclos en la corteza y 22 para la medula renal., el cual se amplificó de manera rutinaria a 18 ciclos.

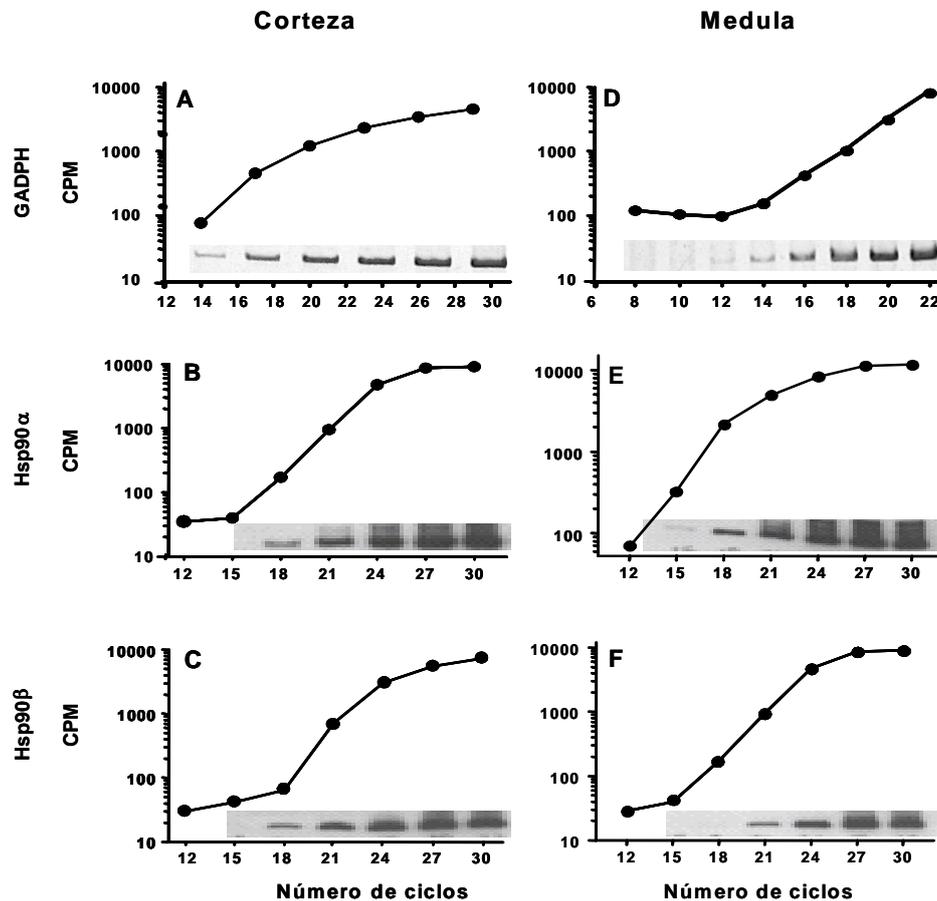


Fig 2. A, B y C representan las cinéticas de amplificación de GADPH, Hsp90 α y Hsp90 β en corteza respectivamente, mientras que D, E y F representan las cinéticas de amplificación medula renal de los diferentes genes. Las bandas de la parte inferior de cada gráfica representan los productos de PCR en cada uno de los diferentes ciclos de amplificación.

C. Expresión de Hsp90 en condiciones normales

Una vez determinadas las cinéticas de amplificación, se estimaron los niveles de RNAm de ambos genes mediante RT-PCR semicuantitativa y los resultados se expresaron como la relación de la expresión de cada isoforma sobre la expresión del gen control, en corteza y medula renal de 6 ratas diferentes de cada grupo.

El análisis mostró que Hsp90 α es más abundante en la medula renal que en la corteza (1.21 ± 0.06 y 0.93 ± 0.04 respectivamente $p < 0.001$) como se aprecia en la Fig. 3A. Mientras que los niveles de RNAm de Hsp90 β en medula y corteza no fueron diferentes (0.71 ± 0.05 y 0.75 ± 0.05 respectivamente) Fig. 3B.

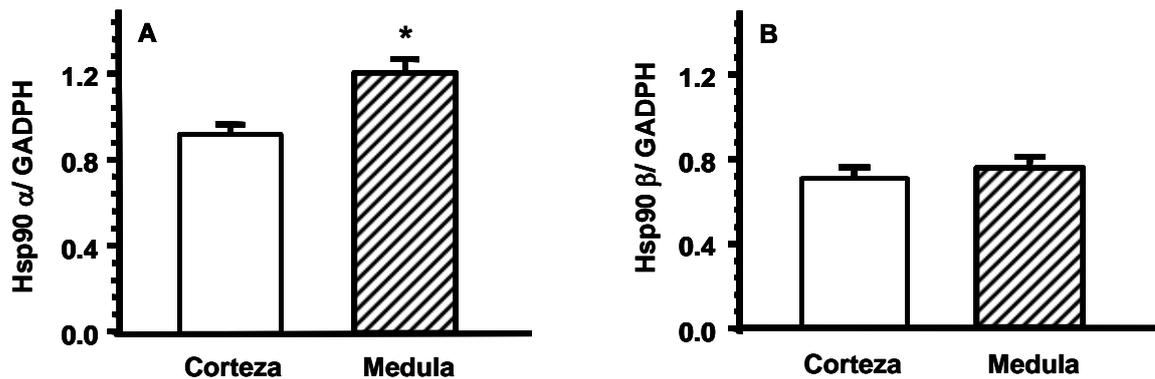


Fig. 3. Niveles de RNAm de Hsp90 α y Hsp90 β en corteza y medula renal. A) Hsp90 α es significativamente más abundante en la medula (barra a rayas) con respecto a la corteza (barra blanca). B) Niveles de RNAm de Hsp90 β en ambas regiones no presentan diferencias significativas. El* representa un valor $p < 0.005$ vs. corteza

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de los niveles de RNAm, fueron corroborados evaluando la cantidad de proteína a través de un análisis de Western blot usando un anticuerpo contra Hsp90, la cantidad de Hsp90 fue significativamente mayor en la medula con respecto a la corteza. La Fig. 4A muestra las bandas de Hsp90 en la corteza y medula renal en dos homogenados diferentes de proteínas totales obtenidas de 6 ratas cada uno, mientras que la Fig. 6B, muestra el análisis densitométrico de ambas bandas en la corteza y medula renal, en donde se aprecia mayor cantidad de proteína en la medula que en la corteza renal.

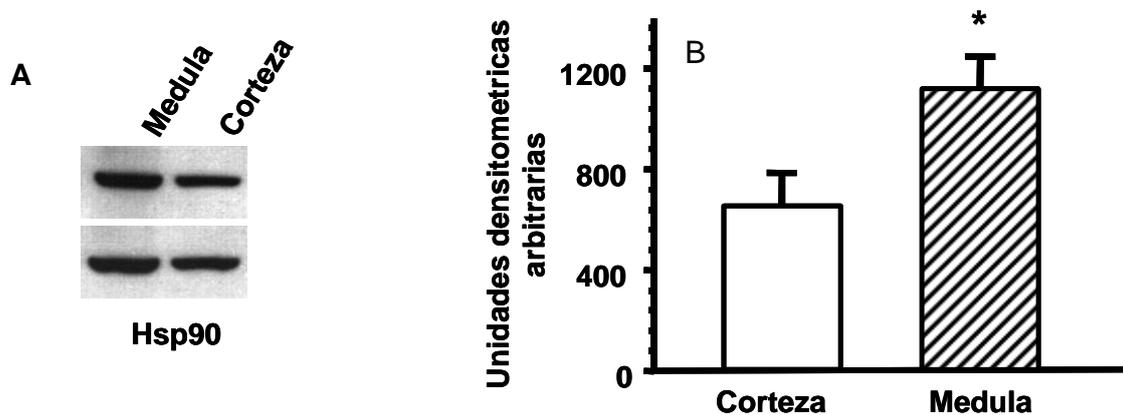


Fig. 4. Análisis de Western blot. A) muestra la expresión de Hsp90 en corteza y medula de dos diferentes homogenados de proteínas totales de seis diferentes ratas. B) muestra el análisis densitométrico del western blot en corteza y medula renal. $p < 0.05$ vs. corteza.

D. Inmunolocalización de Hsp90 α y Hsp90 β en condiciones normales

Para evaluar en que regiones de la nefrona se localizaba Hsp90 α y Hsp90 β , se realizó un análisis de inmunohistoquímica para cada isoforma en cortes histológicos de riñón. Las Figs 5 y 6 muestran imágenes digitalizadas representativas de la inmunohistoquímica de un corte histológico desde la corteza hasta la parte más interna de la medula renal que es la punta de la papila. Las Figs. 5A y 5D representan controles negativos en la corteza renal. La figura 5B y 5C se muestra que ambas proteínas se localizan en los glomérulos, específicamente en las asas capilares (*), en las células mesangiales (flecha corta) y en la cápsula de Bowman (flecha larga). En los túbulos corticales las proteínas se localizaron en el citoplasma (*) y en el borde en cepillo de las células de los túbulos proximales (membrana apical), los cuales presentan una fuerte inmunotinción indicada con flechas, mientras que no observamos inmunotinción en la membrana basolateral Fig. 5E y 5F. En los túbulos distales, observamos mayor inmunotinción en la membrana apical comparado con el citoplasma, a diferencia

de los túbulos colectores corticales donde ambas isoformas presentaron una distribución citoplasmática

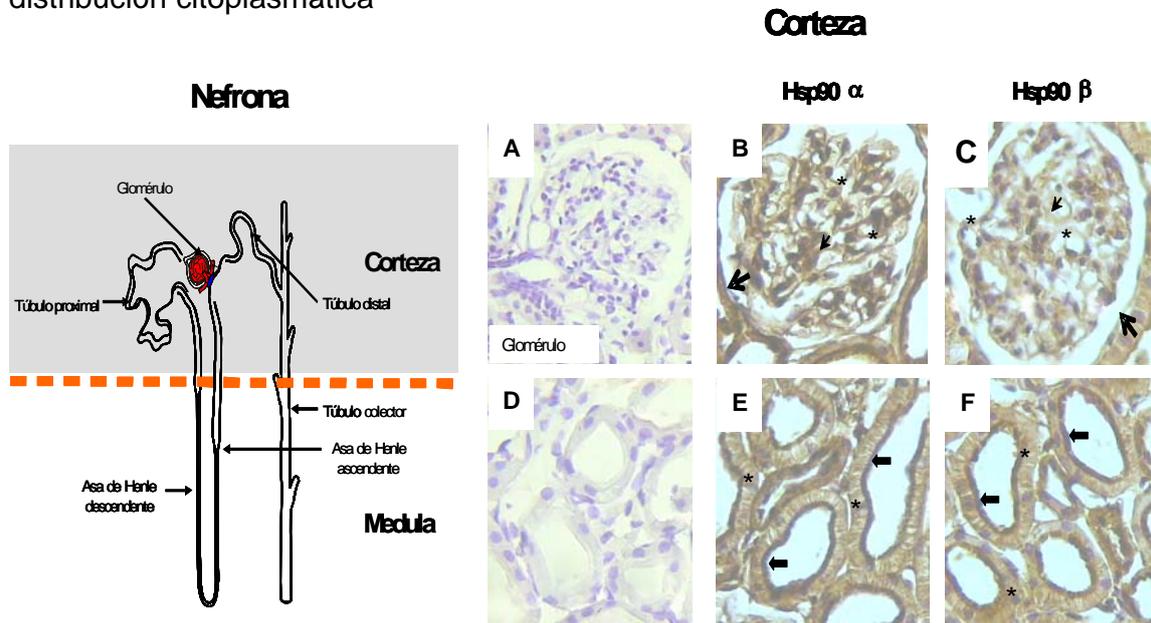


Fig. 5. Inmunohistoquímicas de Hsp90 α y Hsp90 β en la corteza renal. A y D son tinciones negativas para cada isoforma. B y C muestran inmunotinción en los capilares glomerulares, en las asas capilares (*), células mesangiales (flecha corta). Las flechas grandes muestran la tinción en la cápsula de Bowman. E-F muestran la tinción en el citoplasma de las células tubulares (*) y en el borde en cepillo de las células de los túbulos proximales (flechas).Ampliación 200X.

En la medula renal externa, se encontró a Hsp90 α y Hsp90 β en el citoplasma de las células del asa de Henle, Fig. 6B y 6C. Cabe mencionar que la tinción de este segmento de la nefrona fue más intensa con respecto a la corteza renal. Finalmente en la medula interna y en la punta de la papila, Hsp90 se inmunolocalizó en la membrana basolateral Fig. 6E y 6F. La Fig. 6H y 6I muestra la inmunolocalización de Hsp90 α y Hsp90 β en la pelvis renal y se observa que estas proteínas se localizan en los túbulos colectores (**), en la punta de la papila (*) y en las células de la matriz extracelular (flecha). Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas en el patrón de localización para cada isoforma

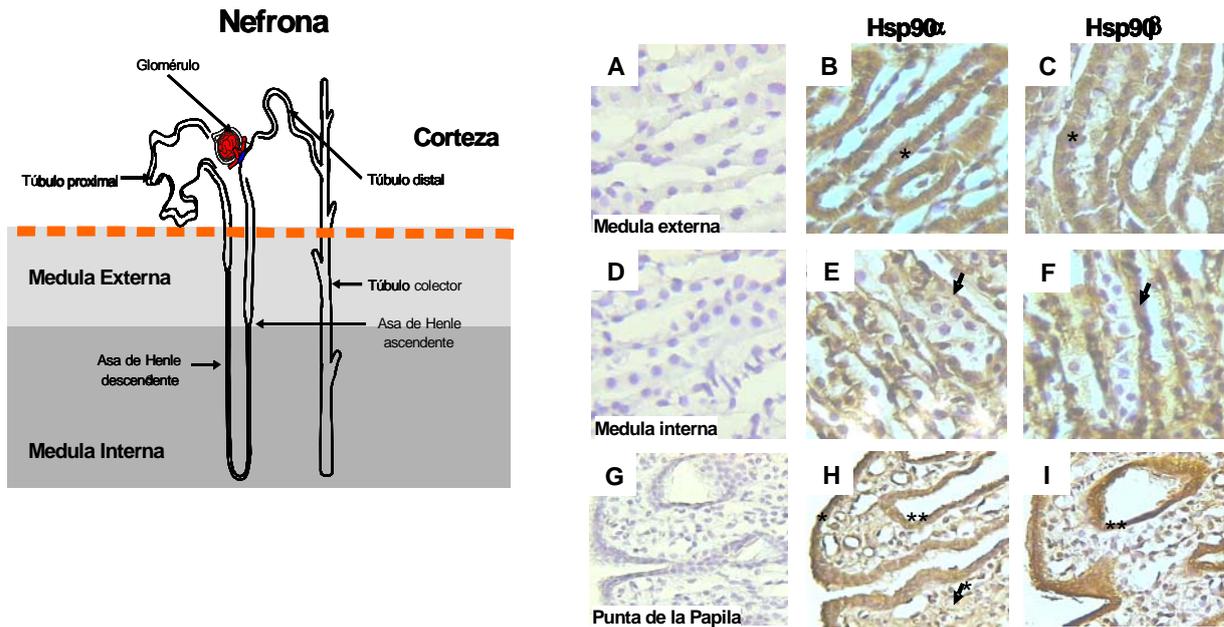


Fig 6. La Inmunohistoquímica de la medula externa B-D muestra que Hsp90 α y Hsp90 β se localizan en el citoplasma de las células tubulares, en contraste en la medula interna la localización fue en la membrana basolateral E-F (flechas); se observa que la tinción es más fuerte en la medula con respecto a la corteza. Finalmente, la pelvis renal mostró una intensa tinción en la punta de la papila (*) en los túbulos colectores medulares (**), en la células de la matriz extracelular y células intersticiales y estas últimas no se detectaron en Hsp90 β . A D y G son controles negativos de tinción. Ampliación 200X

E. Resultados Fisiológicos

Como mencionamos en los métodos la restricción de sodio es una maniobra metodológica para activar al sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). En este estudio se alimentaron ratas normales con dieta baja en sodio (DBS) durante 21 días. Al finalizar el periodo experimental, se recolectó la orina de 24 h, para lo cual los animales fueron colocados en jaulas metabólicas y posteriormente se tomaron muestras de sangre para realizar pruebas fisiológicas y bioquímicas en los dos grupos de estudio y corroborar así la activación del sistema renina angiotensina aldosterona. En la tabla 1, se reportan los valores de peso, depuración de creatinina, excreción urinaria de sodio, fracción excretada de sodio, osmolaridad urinaria y niveles plasmáticos de aldosterona.

Tabla 1. Cambios fisiológicos inducidos por restricción de sodio con DBS

Grupo	Peso corporal (g)	Depuración de creatinina ml/min	UNaV (meq/24h)	FENA (%)	UOsm (mM)	Aldosterona (pg/ml)
Normal (N) n=16	281.0 ± 11.7	1.73±0.12	0.61 ± 0.130	0.236 ± 0.05	622.0 ± 87.1	97.6 ± 25.7
Dieta Baja en sodio (DBS) n=16	299.4 ± 4.1	1.49±0.01	0.03 ± 0.002*	0.005 ±0.002*	257.7 ± 47.2*	1592.5 ± 268*

*p<0.05 Vs N

En donde podemos observar que no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre el grupo N y DBS (281.0 ± 11.7 vs 299.4 ± 4.1g). Al analizar la excreción urinaria de sodio (UNaV) se observó una disminución significativa en el grupo alimentando con dieta baja en sodio con respecto al grupo de animales alimentados con dieta normal (0.61 ± 0.130 vs 0.03 ± 0.002 meq/24h) equivalente a un descenso del 97%. Resultados similares se obtuvieron con la fracción excretada de sodio FENa⁺, el grupo DBS presentó niveles equivalentes a solo el 2.1% del grupo control. Como era de esperarse la osmolaridad urinaria (UOSm) del grupo DBS cayó en un 59% con respecto al grupo N.

Para comprobar la activación del SRAA mediante la restricción de sodio en la dieta se determinaron los niveles plasmáticos de aldosterona en los que observamos que el grupo DBS presentó niveles 15 veces mayores de aldosterona con respecto al grupo alimentado con dieta normal. En conclusión, estos parámetros comprueban que los animales alimentados con dieta baja en sodio presentaron disminución en la excreción renal de sodio, debido a una

compensación fisiológica para conservar el sodio en el organismo, mediante la activación del SRAA.

F. Expresión de Hsp90 α y Hsp90 β durante la DBS

Debido a que existe suficiente evidencia que muestra de manera clara que Hsp90 interactúa con el receptor de mineralocorticoide, favoreciendo su estabilidad e incrementando la afinidad por la hormona. Y debido a que se ha reportado que la angiotensina II regula la expresión de otras proteínas de choque térmico de menor peso molecular²³. Decidimos evaluar la expresión y localización de Hsp90 α y Hsp90 β en riñón de animales en los que se activó el SRAA con dieta baja en sodio.

Se determinaron los niveles de RNAm de Hsp90 α y Hsp90 β en la corteza y medula renal de manera individual en cada uno de los animales del grupo.

Las Figs 7A y 7B muestran los niveles de RNAm de Hsp90 α y Hsp90 β en la corteza renal de las ratas alimentadas con dieta normal y animales alimentados con DBS. Encontramos que los niveles de RNAm de Hsp90 α en corteza aumentaron en aproximadamente un 50% en el grupo con restricción de sodio con respecto al grupo control (2.6 ± 0.2 vs. 1.7 ± 0.1 $p = 0.0005$ respectivamente). De igual forma los niveles de Hsp90 β en la corteza aumentaron en un 30% en el grupo DBS comparado con las ratas alimentadas con dieta normal N (2.06 ± 0.2 vs. 1.6 ± 0.1 $p = 0.017$ respectivamente).

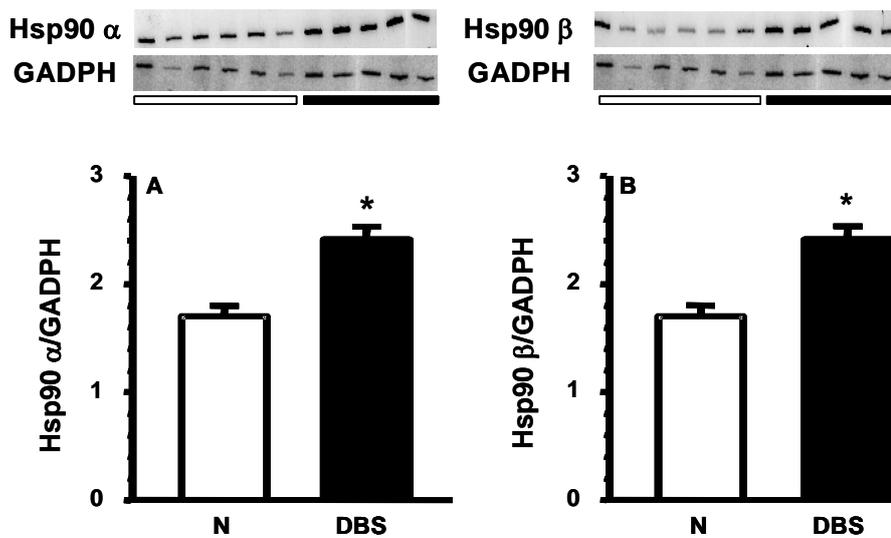


Fig 7. Efecto de la DBS sobre la expresión de Hsp90 en la corteza renal. A y B representan los niveles de RNAm como la relación de Hsp90/GADPH y se observa que los niveles de RNAm de Hsp90 α y Hsp90 β durante DBS barras negras (n=5) son significativamente mayores con respecto al grupo N barras blancas (n=6), en la parte superior de la figura se muestran las autorradiografías de los productos de PCR de ambos mensajeros. * $p > 0.05$ vs. N.

De igual forma se determinaron los niveles de RNAm de ambas proteínas en la medula renal para el grupo N y DBS. En la Fig 8A se muestran los niveles de RNAm de Hsp90 α y en la Fig. 8B de Hsp90 β . No observamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ni Hsp90 en la medula renal.

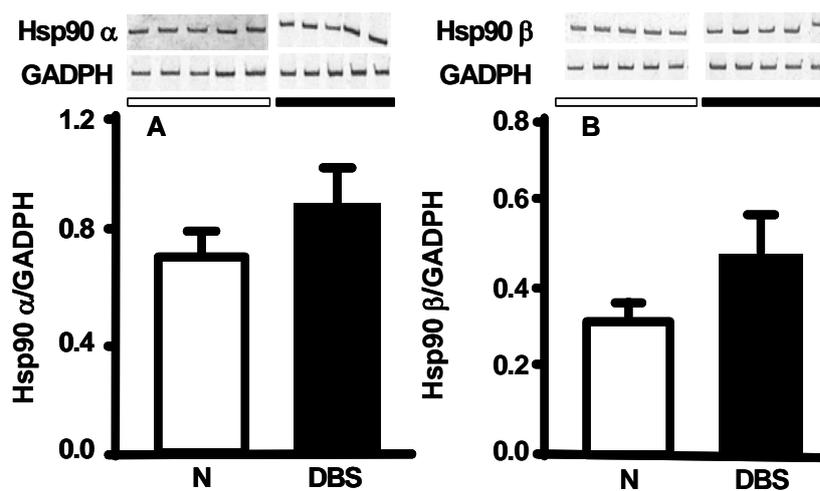


Fig. 8. Efecto de la DBS sobre la expresión de Hsp90 en la medula renal. A y B representan los niveles de RNAm como la relación de Hsp90/GADPH y se observa que los niveles de RNAm de Hsp90 α y Hsp90 β durante DBS (n=6) no presentan cambios significativos con respecto a N (n=5).

G. Análisis de Western blot para Hsp90 en la corteza y medula renal

Para corroborar la sobreexpresión de Hsp90 en la corteza durante la dieta baja en sodio realizamos un análisis de Western blot. La Fig. 9A muestra que la proteína sigue, el mismo patrón que el RNA, es decir, hay un aumento significativo en la cantidad de proteína en la corteza renal del grupo DBS con respecto al grupo control. Lo anterior fue comprobado al realizar el análisis densitométrico de las bandas (78.4 ± 1.2 UA vs. 31.1 ± 3.5 UA; $p < 0.005$, respectivamente).

También fue realizado el análisis de Western blot para la medula renal y al igual que con los niveles de RNAm, el análisis densitométrico de ambas bandas no reveló cambios en los niveles de proteína en el grupo DBS con respecto al normal ($92.5.1 \pm 4.1$ UA vs. 100.5 ± 7.3 UA), Fig. 9B.

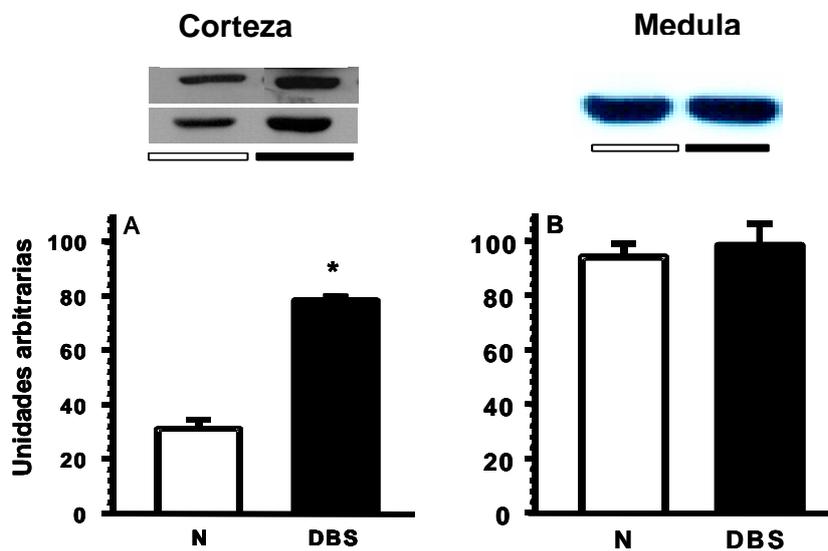


Fig. 9. Análisis de western blot. A y B representa el análisis densitométrico de Hsp90 en la corteza y medula renal respectivamente, en la parte superior se muestran las autorradiografías del análisis de cada uno de los grupos de estudio y se observa que en la corteza los niveles de Hsp90 son significativamente mayores durante la DBS (n=6) con respecto a N (n=6). Mientras que no se observan cambios significativos en la medula renal. * $p < 0.05$ vs. N.

H. Inmunohistoquímicas durante la DBS

En los cortes histológicos se realizó inmunohistoquímica para cada una de las isoformas de Hsp90. Las Figs. 10A y 10B muestran imágenes digitalizadas de las inmunohistoquímicas de la corteza de los animales del grupo de DBS; en los glomérulos se observa una fuerte inmunotinción en las asas capilares (flecha corta), en las células mesangiales (*) y en la cápsula de Bowman (flecha grande), comparada con los animales alimentados con dieta normal. En otra región de la corteza Fig. 10 C y 10 D se observa una fuerte inmunotinción de Hsp90 α y Hsp90 β en el citoplasma de las células tubulares (*) y se observó una inmunotinción más intensa en el borde en cepillo de los túbulos proximales (flecha) con respecto a los animales alimentados con dieta normal. De igual forma se observó un aumento significativo en la tinción de los túbulos proximales.

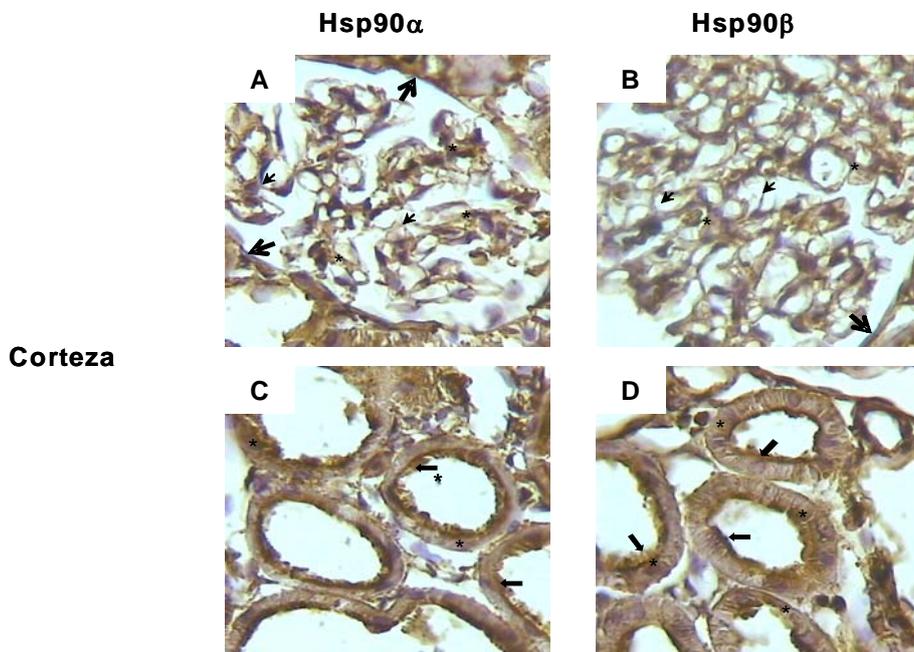


Fig 10. Inmunohistoquímicas de Hsp90 α y Hsp90 β durante la DBS. En A y B se observa un glomérulo en donde hay una fuerte inmunotinción en las asas capilares (flecha corta), células mesangiales (*) y cápsula de Bowman (flecha larga).C y D muestran túbulos proximales donde hay un aumento significativo de la tinción en el citoplasma (*) y en el borde en cepillo (flecha) con respecto al grupo Normal.

La Fig. 11 A y 11 B representa una microfotografía de la medula externa y como se puede apreciar de manera clara no hay cambios significativos en el patrón de tinción entre una y otra isoforma. De manera semejante se realizó el mismo procedimiento en la medula interna y se observa que Hsp90 α y Hsp90 β se localizan en la membrana basolateral de las células tubulares y no hay cambios en el grado de tinción en los túbulos colectores y en la porción delgada del asa de Henle Fig. 11 C y 11D, además de las células intersticiales e incluso en la punta de la papila (datos no mostrados).

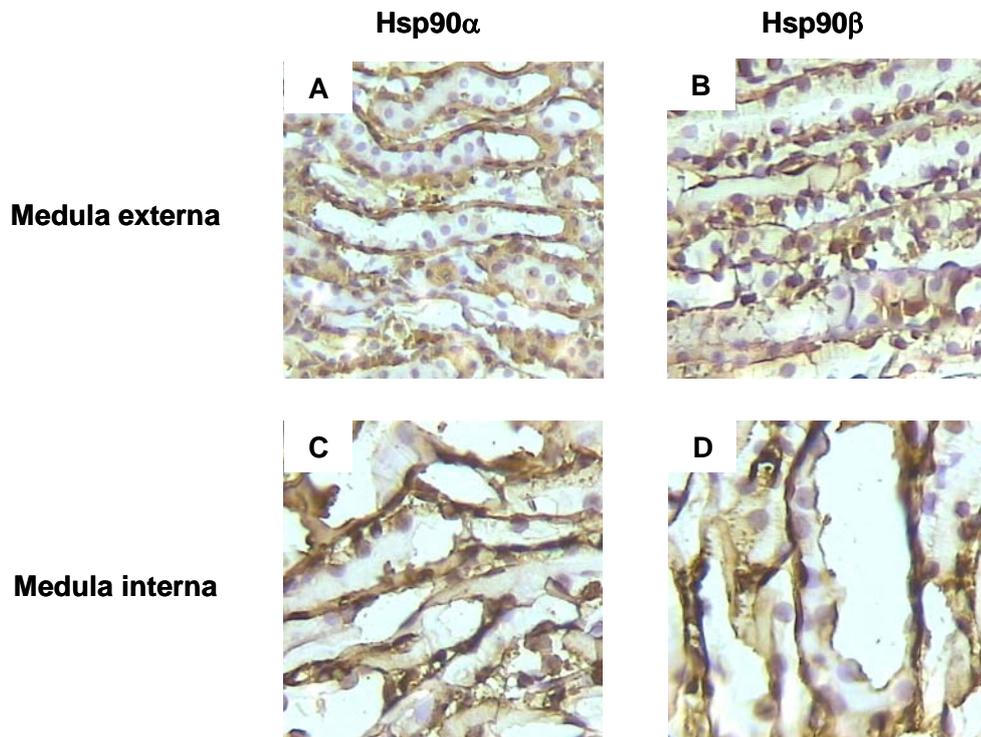


Fig 11. Muestra las inmunohistoquímicas de la medula externa (A y B) e interna (C y D) durante DBS. No se observan cambios en la tinción en ninguna de las estructuras de esta región de la nefrona con respecto al grupo normal.

Si bien no se observaron cambios en la inmunotinción de Hsp90 α ni en la de Hsp90 β en la medula externa, si hubo un hallazgo interesante en esta región, ya que observamos relocalización de Hsp90 α y Hsp90 β en las células del asa

ascendente de Henle. En condiciones normales ambas proteínas se localizan en el citoplasma Fig. 12 A y 12 B mientras que en las ratas con ingesta restringida de sodio Hsp90 α y Hsp90 β se relocalizaron hacia la membrana basolateral de las células del asa de Henle Fig. 12 C y 12 D.

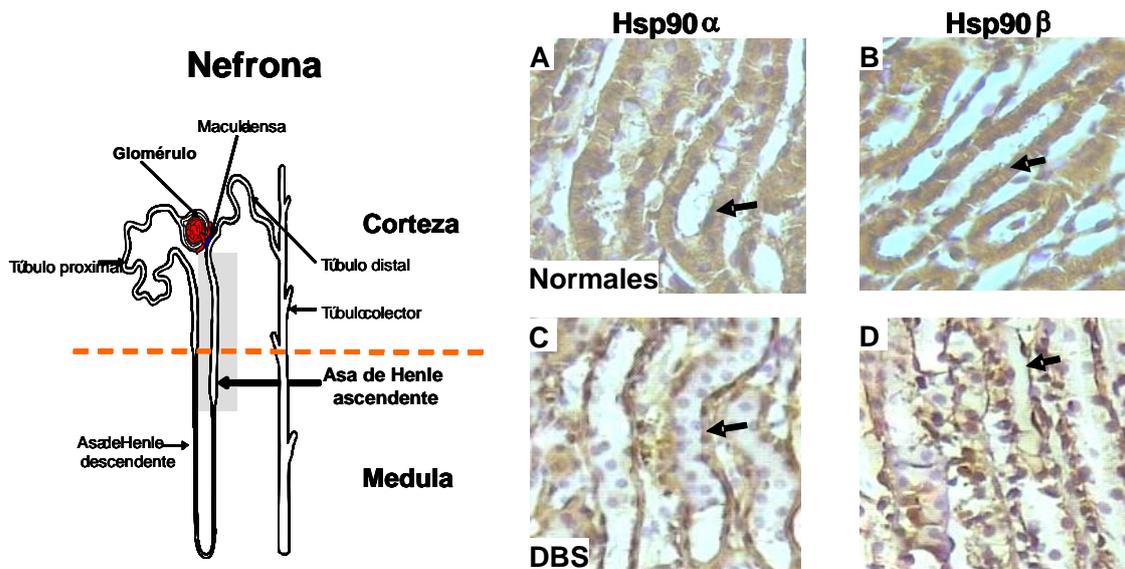


Fig. 12.- Inmunohistoquímica de la medula externa. A y B muestran Hsp90 α y Hsp90 β en las asas de Henle localizadas en el citoplasma indicado con flechas. C- D muestran a Hsp90 α y Hsp90 β durante la DBS localizadas en la membrana basolateral indicada por flechas.

Para comprobar la relocalización de Hsp90 α y Hsp90 β del citoplasma de las asas de Henle a la membrana basolateral, se realizaron cortes histológicos seriados de 3 μ m del grupo de animales alimentados con dieta baja en sodio. El primer corte se realizó inmunohistoquímica para el cotransportador Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ (CSB). El CSB es una proteína que se expresa únicamente en la membrana apical de las células del asa de Henle, por lo que decidimos emplearlo como marcador de estas células y diferenciar la membrana apical en el asa de Henle. La Fig. 13A muestra la inmunohistoquímica del cotransportador CSB ubicado en la membrana

apical señalado con flechas, mientras que la Fig. 13B muestra el siguiente corte al cual se realizó inmunohistoquímica para Hsp90 α y se observa que Hsp90 α se ubica en la membrana basolateral de las células del asa de Henle (flechas). Comprobando de esta forma la relocalización de ambas isoformas en este segmento de la nefrona.

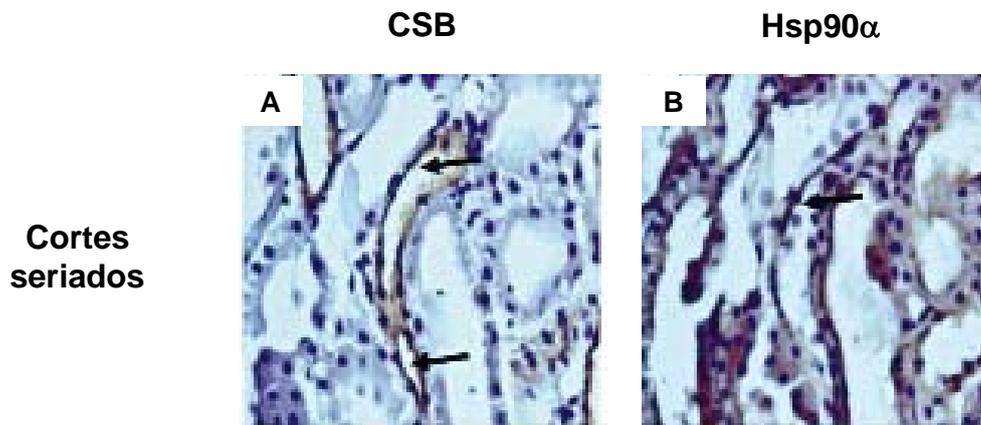


Fig. 13.- Inmunohistoquímica de cortes seriados de la medula externa. A muestra inmunohistoquímica de CSB localizado en la membrana apical de asa Henle indicado con flechas. B muestra la inmunohistoquímica de Hsp90 α en el siguiente corte y se observa en la membrana basolateral indicada por flechas.

Discusión

VIII. Discusión

La familia de proteínas de choque térmico está conformada por varios miembros clasificados de acuerdo a su masa molecular que varía de 10 a 150 KDa y se encuentran desde bacterias hasta mamíferos. Algunas de estas proteínas se expresan constitutivamente y otras son inducibles ⁵.

Específicamente, la subfamilia de Hsp de 90 KDa está compuesta por dos proteínas codificadas por dos genes diferentes, conocidos como HSP90 α y HSP90 β en el humano o hsp84 y hsp86 en el ratón ^{26, 27, 28}. Ambos genes son multicopia y se ha identificado en diferentes cromosomas; HSP90 α está ubicado en los cromosomas 1, 3, 4, 11 y 14, siendo este último el identificado como funcional. Su tamaño es de 7393 pb generando un transcrito de 2912 pb que traduce una proteína de 733 aminoácidos. Mientras que HSP90 β se encuentra en los cromosomas 4, 6, 10, 13, 14 y 15. El ubicado en el cromosoma 6 es funcional y tiene un tamaño de 8210 pb y un RNAm de 2567 pb que traduce una proteína de 726 aminoácidos.

Las Hsp90 se expresan de manera ubicua y en forma abundante constituyendo cerca del 1 al 2% de la proteína celular. Las dos proteínas son constitutivas, sin embargo, Hsp90 α es conocida también como la isoforma inducible ^{31, 32}. Ambas proteínas: Hsp90 α y Hsp90 β son citosólicas y a diferencia de otras Hsp's eucarióticas, los genes que codifican para cada Hsp presentan intrones ^{35, 36}.

Se conoce que estas proteínas tienen funciones vitales como lo es el plegamiento y estabilización de proteínas, así como la degradación de proteínas

dañadas en forma irreversible por procesos de estrés celular. En años recientes se ha reportado que Hsp90 forma complejos con más de 100 proteínas diferentes, a las que se les ha denominado proteínas cliente y en algunos casos se ha demostrado que esta interacción promueve cambios conformacionales que regulan la actividad de sus proteínas cliente. A pesar de la abundancia de Hsp90 y de sus múltiples interacciones con diversas proteínas, poco se conoce de su papel en la fisiología renal. Matsubara y col. en 1990 desarrollaron un anticuerpo dirigido hacia Hsp90 y observaron inmunotinción en el citoplasma de las células de los túbulos proximales y distales de la corteza renal ⁴⁸. Sin embargo, se desconocía el patrón de expresión de cada isoforma en el riñón. Por lo tanto, en este trabajo caracterizamos la expresión y localización Hsp90 α y Hsp90 β en la nefrona.

Observamos que Hsp90 α y Hsp90 β se expresan en el riñón. Determinamos los niveles de RNAm y proteína la expresión de ambas isoformas fue más abundante en la medula que en la corteza renal. El análisis de inmunohistoquímica mostró que Hsp90 α y Hsp90 β se localizaron desde el glomérulo hasta la punta de la papila y que el patrón de expresión fue muy similar Fig. 1, Pag. 3. Específicamente observamos que en la corteza Hsp90 α y Hsp90 β se localizan en los capilares glomerulares, en las células mesangiales y en la cápsula de Bowman. También se detectó la presencia de ambas proteínas en el citoplasma de células epiteliales de los túbulos proximales y distales; con importante inmunotinción en la membrana apical (Fig 5). La presencia de Hsp90 en el borde en cepillo del túbulo proximal no parece ser exclusiva de la familia de proteínas de choque térmico ya que en dos trabajos anteriores al nuestro, Aufrich y col ⁶⁷ y

Schober y col ⁶⁸ observaron el mismo patrón de localización para Hsp25, como presencia en el glomérulo y en menor proporción en la vasculatura con fuerte inmunotinción en la membrana apical de las células del túbulo proximal y una ligera inmunotinción en el citoplasma y núcleo.

En este estudio también observamos que en la medula externa Hsp90 α y Hsp90 β están localizadas en el citoplasma de las células del asa gruesa ascendente de Henle, mientras que en la medula interna estas proteínas se localizaron principalmente en la membrana basolateral de las células del asa delgada de Henle, en los túbulos colectores y en la pelvis renal ver Fig. 6.

Poco se conoce del papel fisiológico que desempeñan estas proteínas en cada segmento de la nefrona. Pero, se ha descrito que una de las principales funciones de Hsp90 en el riñón en condiciones normales es la estabilización del receptor de mineralocorticoide, a través de formar un heterocomplejo con Hsp70, Hip (p48), Hop (p56) y Hsp40. La aldosterona tiene un papel fundamental en la reabsorción de sodio en el tejido renal. Una vez que esta se une al complejo receptor mineralocorticoide-Hsp90-cochaperonas, la hormona/receptor es translocada al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a aldosterona, lo que a su vez activa la transcripción de diversos genes que responden a esta hormona como el canal epitelial de sodio (ENaC), la bomba Na-K ATPasa y el cotransportador de sodio cloro (NCC) ^{50, 69, 70}.

La abundancia de Hsp90 en diversos órganos al igual que en el riñón deja en claro que estas proteínas están involucradas en diversas funciones celulares entre las que destaca la interacción con las sintasas de oxido nítrico (NO)

específicamente con la isoforma endotelial (eNOS) ⁵³. Esta acción fue mostrada por García Cardaña y col ⁷¹; en lisados de células endoteliales de bovino en los cuales observaron mediante estudios de coimmunoprecipitación, la interacción de ambas proteínas. Así mismo, ellos mostraron que en las células endoteliales de cordón umbilical de humano y en células endoteliales de pulmón de bovino, hay un aumento de la producción de los niveles de GMPc cuando hay interacción de Hsp90-eNOS y que este aumento es revertido cuando son incubadas con geldanamicina, inhibidor de Hsp90, en otras palabras la interacción entre Hsp90-eNOS en condiciones normales se traduce en aumento de la biodisponibilidad de NO. Otro hallazgo de este grupo fue que la interacción de estas dos proteínas está involucrada en regulación del tono vascular, pues observaron en anillos de aorta precontraídos con epinefrina que la relajación a acetilcolina dada por la liberación de NO, se bloquea en presencia de geldanamicina ^{71,72}.

Por otro lado Pritchard y col ⁷³; estudiaron el efecto del bloqueo de Hsp90 en células endoteliales de bovino y observaron que el desacoplamiento o pérdida de la interacción de Hsp90-eNOS favoreció que la eNOS incrementara la producción de radicales superóxido y disminuyera la producción de NO favoreciendo el estrés celular. ^{53, 54}

Estos trabajos muestran que eNOS tiene un papel dual en la fisiología vascular efecto que es regulado por Hsp90. Es por esto que Hsp90 puede jugar un papel preponderante en la hemodinámica glomerular. Sin embargo se requieren más estudios para esclarecer el papel de Hsp90 en el tejido renal.

Hsp90 ha sido mejor caracterizada en condiciones fisiopatológicas renales. Se ha descrito que la intoxicación con metales pesados como mercurio, zinc,

cobalto, fierro y arsénico, así como fármacos nefrotóxicos, como gentamicina y cis-platino producen aumento de la expresión de Hsp90 en la corteza renal, principalmente en el segmento S3 del túbulo proximal^{6, 8}. Aunado a esto, Morita y col.⁶¹ demostraron mediante Western blot e inmunohistoquímica, la sobrerregulación de Hsp73 y Hsp90 después de 60 min de isquemia renal unilateral en la rata. Observando que la inducción de estas proteínas fue localizada en el túbulo proximal y en células de asa de Henle y comprobaron que el aumento de estas proteínas persiste en las regiones de regeneración celular⁶².

En un caso clínico único de un paciente con insuficiencia renal aguda con oliguria e hipertensión severa, la biopsia renal reveló un aumento en la expresión de Hsp90 en el citoplasma de las células del segmento S3 del túbulo proximal en la etapa de recuperación y regeneración túbular¹⁷.

Otra de las funciones Hsp90 en el tejido renal en condiciones fisiopatológicas fue mostrado por Bidmon y col^{74, 75}; quienes observaron en un modelo de isquemia renal en la rata en el que se producen cambios fisiológicos importantes y la pérdida de la polaridad de la membrana celular de las células del epitelio tubular, que la bomba de sodio potasio ATPasa pierde su localización, es decir esta proteína que normalmente se encuentra en la fracción del citoesqueleto después de la isquemia se observa en la fracción soluble. Una vez que coincubieron ambas fracciones observaron que Hsp90 transloca y estabiliza a la bomba de Na⁺ K⁺ ATPasa del citoplasma hacia la membrana basolateral y con ello se restaura la polaridad de la membrana celular.

Estos estudios realizados en condiciones fisiopatológicas renales muestran que la inducción de Hsp90 parece regular procesos de regeneración del tejido

renal. Aunado esto con la intensa expresión de ambas isoformas a lo largo de la nefrona mostrado en este trabajo, además de la capacidad de Hsp90 de interactuar con más de 100 proteínas cliente, nos hace suponer que ambas proteínas están involucradas en varios procesos fisiológicos renales y pueden jugar un papel preponderante en condiciones fisiopatológicas.

Con el fin de conocer más acerca de la regulación de Hsp90 en el tejido renal, otro de los objetivos de este estudio fue caracterizar la expresión y localización de Hsp90 α y Hsp90 β en el riñón durante la activación del sistema renina angiotensina aldosterona que se indujo por la restricción de sodio en la dieta. De manera particular, observamos que la dieta baja en sodio aumentó los niveles de RNAm de Hsp90 α y Hsp90 β en la corteza renal efecto que se corroboró también a nivel de la proteína. En apoyo a este resultado, Aizawa e Ishizaka y col^{76, 77}.; observaron que la infusión de angiotensina II mediante bombas miniosmóticas durante 7 días a roedores, produjo aumento de la presión arterial por la activación del sistema renina angiotensina aldosterona, lo que se asoció con un aumento en la expresión de Hsp70, Hsp25 y Hsp32 o hemoxigenasa HO-1 en la corteza renal. Nuestro estudio y éste previamente reportado sugieren que la expresión de estas proteínas podría ser regulada por la elevación de angiotensina II o aldosterona.

Los trabajos descritos previamente donde se muestra un aumento en la expresión de Hsp90 son bajo condiciones de algún tipo de daño renal, por lo que es probable que estas proteínas desempeñen un papel citoprotector al igual que otras chaperonas o que estén encargadas de la regeneración celular posterior al

daño. Sin embargo, la dieta baja en sodio no es un modelo de daño renal, solo es una estrategia experimental para activar el sistema renina angiotensina aldosterona favoreciendo la reabsorción de sodio. Sin duda serán necesarios diversos experimentos que ayuden a esclarecer si la angiotensina o aldosterona regulan la expresión de Hsp90 en la corteza renal.

Por otro lado no observamos cambios en los niveles de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en la medula renal. Actualmente hay pocos trabajos que muestren cambios en la expresión de genes de choque térmico en esta región del riñón; en roedores se ha reportado un incremento significativo en la expresión de Hsp25, Hsp72, Hsp94 y Hsp110 en respuesta a un aumento en la osmolaridad, propiciada por deshidratación^{78, 79}. Estos autores sugieren que el hecho de que la medula renal esté sometida a diversos fenómenos como hipoxia y cambios en la osmolaridad la hacen resistente a cambios en la expresión de diversos genes, pues se ha descrito que en ambientes hipo-osmóticos, la medula renal es capaz de sintetizar osmolitos orgánicos que compensan los cambios en la osmolaridad. Sin embargo estos autores también proponen que esta compensación solo puede ser regulada a largo plazo y de manera adaptativa, pero será ineficiente para cambios repentinos que sucedan en la medula renal.^{6, 79}

Como mencionemos anteriormente Hsp90 participa en la regulación de la reabsorción de sodio por al menos dos mecanismos: Uno a través de las acciones de la aldosterona en el túbulo distal y colector y el otro por el cotransportador Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ presente en el asa de Henle como lo muestran los estudios de Ortiz y col⁵⁸; quienes observaron que el NO producido por eNOS inhibe al cotransportador

de $\text{Na}^+\text{K}^+:\text{2Cl}^-$ en asas de Henle aisladas y profundidas ⁵⁷. En estudios posteriores, estos autores observaron que cuando eNOS está en el citoplasma, el NO producido por esta isoforma, inhibe al cotransportador, pero cuando eNOS se relocaliza en la membrana basolateral y no produce NO, esto activa al cotransportador. Interesantemente, observaron que Hsp90 es la responsable de translocar a eNOS, ya que cuando incubaron las asas de Henle con geldanamicina (inhibidor de Hsp90) se evitó la translocación de eNOS a la membrana basolateral ^{58, 80} estos resultados muestran que Hsp90 es una pieza importante para regular la actividad del cotransportador $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{2Cl}^-$ (CSB 1) ⁸³. En nuestro trabajo una de las observaciones más importantes fue que la dieta baja en sodio activó al máximo la reabsorción de sodio y produjo relocalización de Hsp90 α y Hsp90 β del citoplasma hacia la membrana basolateral en asa gruesa de Henle, esto sugiere que Hsp90 podría estar involucrada en la regulación de la reabsorción de sodio en este segmento de la nefrona ver Fig.12.

Es claro que Hsp90 tiene diversas funciones entre las cuales se encuentran la de regular la reabsorción de sodio, el mantener el gradiente electroquímico al estabilizar a la bomba de sodio potasio ATPasa e incluso regular la producción de NO mediante la interacción con eNOS, sin menospreciar su principal función de chaperona que consiste en estabilizar o aumentar la actividad de otras proteínas que conservan la homeostasis renal. Sin embargo, serán necesarios muchos más estudios que permitan dilucidar la función de Hsp90 en el tejido renal en condiciones normales como en condiciones fisiopatológicas que hasta ahora no han sido exploradas.

Conclusión

IX. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran de manera clara que las proteínas de choque térmico de 90 KDa se expresan a lo largo del tejido renal en condiciones normales, y que la expresión es más abundante en la medula renal con respecto a la corteza.

Podemos decir que la alimentación con DBS produjo sobreexpresión de Hsp90 en la corteza renal y que en la medula externa hay relocalización de estas proteínas en el asa gruesa de Henle desde el citoplasma hacia la membrana basolateral que podría estar involucrada con la reabsorción de sodio en esta sección de la nefrona.

Referencias

Referencias

1. Guyton C Hall J E. Tratado de Fisiología medica. Ed 9, ED Interamericana Mac Graw Hill. Pp 343-348.1999
2. Boron, W. F. Medical Physiology. Ed Saunders Cap 34, 2005
3. Jaattela Marjja. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med*, 31: 261-271. 1999
4. Craig E. A, Gambill B. D, Nelson R. John. Heat Shock Proteins: Molecular Chaperones of Proteins Biogenesis. *Microb Rev*; 402-4014.1993
5. Gupta RS. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol*; (6):10. 1995
6. Ivor J. Benjamin D. Stress (Heat Shock) Proteins. *Cir Res*, 83: 117-1332. 1998.
7. Beck F. X, Neuhofer W, Muller E. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles and regulation. *Am J Renal Physiol*; 279 F203-F215, 2000
8. Borkan C. S, Gullans R. S. Molecular chaperones in the kidney. *Annu Rev Physiol*, 64: 503-27. 2002
9. Muller E, Neuhofer W, Ohno A, Rucker S, Thurau K, Beck FX. Heat shock proteins HSP25, HSP60, HSP72, HSP73 in iso-osmotic cortex and hyperosmotic medulla of rat kidney. *Pflugers Arch*, 431; 608–617.0031-6768, 1996.
10. Panaretou B, Prodromou C, Roe M, O'Brien R, Ladbury J, Peral L. H. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO J*; 17(16), 4829-4836. 1998.
11. Bose S. weiki T, Bugi H, Buchner J. Chaperone function of Hsp90-Associated protein. *Science*, 274:1715-1717.1996.
12. Sullivan William, Stenegard Briget, Caucutt George, Bartha Bence, Mc Mahon Nancy, S.Alnemri Emad, Litwack Gerald and Toft David. Nucleotides

- and Two Functional States of hsp90. *The Journal of Biological Chemistry* , 72, (12). 8007-8012. 1997.
13. Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P. Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the Arabidopsis AtHsp90-1 gene. *Plant Physiol*, 129(3):1138-49, 2002.
 14. Martin A. Turman, Daniel A. Kahn, Scott L. Rosenfeld and Carlton M. Bates. Characterization of Human Proximal Tubular Cells after Hypoxic Preconditioning: Constitutive and Hypoxia- Induced Expression of Heat Shock Proteins HSP70 (A,B, γ C), HSC70, and HSP90. *Bioch Mol Med*, 60. 49- 58. 1997.
 15. Burel C., Mezger V., Pinto M., Rallu M., Trigon S, Morange M. Mamalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*, (48), 629-634.1992.
 16. Li-jun Chen, Xing-Wen Su, Peng-Xin QIU, Yi-Jun Huang, Guang-Mei Yan. Thermal preconditioning protected cerebellar granule neurons of rats modulating HSP70 expression. *Acta Pharmacol Sin*, 25, (4): 458-461.2004.
 17. Komatzuda Atsushi, Wakui Hideki, Imai Irokazu, Hideaki Itoh and Miura Akira. Expression of Heat Shock Protein within regenerative tubular cells in patient with acute oliguric renal failure due to malignant hypertension. *Renal Failure*, 21 (1) 113-117. 1999.
 18. Ohtani H, Wakui H, Komatsuda A, Satoh F, Miura A. B., Itoh H, Tashima Y. Induction and intracellular localization of 90 KDa Heat Shock Protein in rat kidneys with acute gentamicin nephropathy. *Lab Inves*, 72: 2 161-165. 1995.
 19. Satoh K, Wakui H, Komatsuda A, Nakamoto Y, Miura AB, Itoh H, Tashima Y. Induction and altered localization of 90-kDa heat-shock protein in rat kidneys with cisplatin-induced acute renal failure. *Ren Fail*, .16 (3):313-23,1994.
 20. Luc H. Snoeckx, Richard N. et-al. Heat Shock Proteins and cardiovascular *Pathophysiology*. *Physiol Rev*, 81 (4): 1461-1497, 2001
 21. Richter C, Buchner J. Hsp90: Chaperoning Signal Transduction. *J Cell Physiol*, 188(3):281-90, 2001

22. Nollen A. and Morimoto R. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing "heat shock" proteins. *J Cell Sci*, 115, 2809-2816. 2002.
23. Park K. M, Byun J, Kramers C, Kim J, Bonventre J. Inducible nitric oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem*, 278; 27256-27266. 2003.
24. Pocley A. G Muthana M. Heat shock proteins and allograft rejection. *Contrib Nephrol*, 48: 122-34. 2005
25. Jayakumar V. J, Suzuki K, Sammut I. A, Ryszard T. Smolenski, M. K, Latif N, Abunasra H, Murtuza B, Amrani M, Yacoub M. H. Heat Shock Protein 70 Gene Transfection Protects Mitochondrial and Ventricular Function Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Circ*, 104: 303-307. 2001
26. Moore S. K, Kozak C. Murine 86 and 84 KDa Heat Shock Proteins, cDNA Sequences, Chromosome Assignments, and Evolutionary Origins. *J Biol Chem*, 264 (10) 5343-5351, . 1989
27. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, and Yahara I. Analysis of native forms compositions of the mouse 90KDa heat shock protein, Hsp90. *J Biol Chem*, 266; 10099-10103. 1999.
28. Rebbe NF, Ware J, Bertina RM, Modrich P, Stafford DW: Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDa heat-shock protein family. *Gene*, 53:235-245, 1987
29. Hikey E, Brandon S, Smale G, Lloyd D, Weber L. A. Sequence and Regulation of gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 2615-2626. 1989.
30. Rebbe N. F., Williams S., Hickman, J Ley T, Stafford D. W and Hickman S. Nucleotide Sequence and Regulation of a Human 90-KDa Heat Shock Protein Gene. *J Biol Chem*, 264,(25). 15006-15011. 1989.
31. Sreedhar A.S, Kalmar E, Csemerlr P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562 2004.
32. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding . *TIBS*, 24, 136-141, 1999

33. Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, Toft DO. The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *J Biol Chem*, 275(5):3305-12. 2000.
34. Gramatikakis N, Vultur A, Ramana C. V, Siganou A, Schweinfest C.W. and Leda R. The role of Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem*, 8312-8320 2002
35. Ulrich S. J., Moore S. K., Appella E. Transcriptional and translational analysis of the murine 84-and 86- KDa heat shock proteins. *J Biol Chem*, 264, (12), 6810-6816, 1989.
36. Shu-Ling, Zhang Jun Yu, Xiao Kuan Cheng Li Ding, Feng Yang, Yu-Fei Shen. Regulation of human Hsp90 α gene expression. *FEBS Letters*, 444: 130-135. 1999
37. Yu-Fei Shen, Ju-hong Liu, Xiao-zhe Wang, Xiao-kuan Cheng, Yan-lin Wang, Ning-hua Wu. Essential role of the first intron in the transcription of hsp90 β gene. *FEBS letters*, 413, 92-98, 1997.
38. Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N. Multiple components of the Hsp90 chaperone complex function and regulation of HSF-1 in vivo. *Mol and Cell Biol*, 19(13), 8033-8041.1999.
39. Yanhong S, Mosser Dick D, Morimoto R. Molecular chaperones as HSF-1 specific transcriptional repressors. *Genes Dev*, 12:654-666.1998
40. Shi Y Mosser DD, Morimoto R. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*, 12(5):654-66. 1998
41. Prodromou C, Roe S.M, Piper PW and Pearl L.H. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat Struct Biol.*; 4 (6):477-82. 1997
42. Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D. Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov Today*, 9 (20):881-8. 2004
43. Owen BA, Sullivan WP, Felts SJ, Toft D.O. Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus. *J Biol Chem*, 2002 ; 277(9):7086-91

44. Caplan A. J, Jackson S, and Smith David. Hsp90 reaches new heights. *EMBO reports*, 4(2), 126-130. 2003
45. Couette B, Jalaguier S, Hellal-Levy C, Lupo B, Fagart J, Auzou G, Rafestin-Oblin ME. Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 1998;12:855–863
46. Rafestin-Oblin ME, Lombes M, Couette B, Baulieu EE. Differences between aldosterone and its antagonists in binding kinetics and ligand-induced hsp90 release from mineralocorticosteroid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, (3-8):815-21. 1992
47. Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci*, Oct;59(10):1640- 8,2002
48. Matsubara O, Kasuga T, Marumo F, Itoh H and Tashima Y, Localization of 90-KDa heat shock protein in the kidney. *Kidney Int*, 38: 830-834. 1990.
49. Jo H, Yang EK, Lee WJ, Park KY, Kim HJ, Park JS. Gene expression of central and peripheral renin-angiotensin system components upon dietary sodium intake in rats. *Regul Pept*, 67:115–121.0167, 1996.
50. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Inv*, 104:R19–R23.0021-9738,1999.
51. Tumlin J. A., Lea J. P., Swanson C. E., Someren J. S. Aldosterone and dexametasone stimulate calcineurin activity through a transcriptions-independent mechanism involving steroid-associated heat shok proteins. *J Clin Inv*, 99: 1217- 1223. 1997
52. Freeman B. C, And Yamamoto K. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones, *Science*. 296; 2232-2235. 2002
53. Garcia Cardeña, G.; Fan, R.; Shah, V.; Sorrentino, R.; Cirino, G.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W. C. Dynamic activation the endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 392 (6678):821-4., 1998.
54. Papapetropoulos A, Fulton D Lin MI, Fonatana J, Mc Cabe TJ, Zoellner S, Garcia –Cardeña G, Zho Z, Gratton JP, and Sessa W. Vanadate Is a Potent Activator of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Evidence for the Role of the

- Serine/Threonine Kinase Akt and the 90-kDa Heat Shock Protein. *Mol Pharmacol*, 65:407–415, 2004.
55. Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem*, 274(3):1472-8. 1999
56. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem*, 275(29):22268-72. 2000
57. Ortiz P. A, Hong NJ, Garvin JL. NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter activity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281:F819–F825, 2001
58. Ortiz P. A., Hong N. J, and Garvin J. L. Luminal Flow Induces eNOS Activation and Translocation in the Rat Thick Ascending Limb II: Role of PI3 Kinase and Hsp90. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(2):F281-8. 2004
59. Fukuda A, Osawa T, Oda H, Tanaca T, Uchida K. Oxidative Stress Response in Iron-Induced Acute Nephrototoxicity enhanced Expression of Heat Shock Protein 90. *Biochem Biophys Res Commun*, 219, 76-81 1996.
60. Somiji S, Annn Sens M, Garrett SH, Gurel V. Expression of Hsp 90 in the human kidney and in proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 133(2-3):241-54. 2002
61. Morita H, Wakui H, Komatsuda A Miura A, Tashima Y. Induction the Heat Shock proteins Hsp73 and Hsp90 in Rat Kidney after Ischemia. *Ren Fail*, 17(4).405- 419 1995.
62. Wakui H, Komatsuda A, Miura A. Heat-shock proteins in animal models for acute renal failure. *Ren Fail*, 17 (6), 641-649. 1995.
63. Sambrook J, Russell D. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, NY. Laboratory Molecular cloning a Laboratory Cold Spring Harbor Press p 7-7.15, 1989

64. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, and Herrera-Acosta J: Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol*, 274:F791-F798, 1998
65. Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, Gonzalez MA, Uribe N, Garcia-Torres R, Lopez-Casillas F, Gamba G, Bobadilla NA. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int*, 63: 43-52. 2003
66. Rocco MV, Neilson EG, Hoyer JR, Ziyadeh FN. Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 262:F679–F686.0363-6127 1992.
67. Aufricht C, Ardito T, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, Van Why SK. Heat-shock protein 25 induction and redistribution during actin reorganization after renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 274:F215–F222.0363-6127. 1998
68. Schober A, Burger-Kentischer A, Muller E, Beck FX. Effect of ischemia on localization of heat shock protein 25 in kidney. *Kidney Int Suppl*, 67:S174–S176.0085-2538, 1998
69. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci*, 95:14552–14557; 1998.
70. Mount DB, Baekgaard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, Gamba G, Hebert SC. Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol Renal Physiol*, 276:F347–F358, 1999.
71. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation the endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 392 (6678):821-4., 1998.
72. Shah V, Wiest R, García-Cardena G, Cadelina G, Groszmann RJ, Sessa WC. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to

- vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol*, 277: G463–G468, 1999.
73. Pritchard KA Jr, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 25; 276(21):17621-4. 2001
74. Bidmon B, Endemnn M, Muller T, Arbeiter K and Chritiph Aufricht. Heat Sock Protein- 70 repairs proximal tubular structure after renal ischemia. *Kidney Int*, 58, 2400- 2407. 2000
75. Bidmon B, Endemnn M, Muller T, Arbeiter K. HSP-25 and HSP-90 stabilize Na, K- ATPase in cytoskeletal fractions of ischemic rat renal cortex. *Kidney Int*, 62(5):1620-7. 2002
76. Aizawa T, Ishizaka N, Mori I, Taguchi J, Yazaki Y, Nagai R, Ohno M. Heme oxygenase-1 Is Upregulated in the Kidney of angiotensin II induced Hypertensive Rats. *Hypertension*, 35: 800-8006. 2000
77. Ishizaka N, Aizawua T, Ohno M, Usui Si S Mori I, Tang SS, Ingelfinger JR, Kimura S, Nagai R. Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensina II. *Hypertension*, 39(1):122-8. 2002
78. Santos BC, Chevaile A, Kojima R, Gullans SR. Caracterization of Hsp110/ SSE gene family response to hiperosmolality and other stresses. *Am J Physiol. Renal Physiol*, 274 F 1054-F61. 1998.
79. Rauchman MI, Pullman J, Gullans SR. Iducction the molecular chaperones by hyperosmotic stress in mouse inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol. Renal Physiol*, 273, F9-F17. 1997
80. Ortiz P. A, Hong Nancy J and. Garvin Jeffrey L. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F274–F280, 2004

Apéndices

Transferir el sobrenadante a un tubo de ultra centrifuga en el que previamente se colocaron 4 ml de CsCl.y ultracentrifugar a 29,000 rpm durante 18 horas a 18 °C.

Segundo Día

Vaciar el sobrenadante con cuidado y cortar el tubo para obtener hasta una ¼ parte que contiene el pellet. Lavar el pellet con 300 µl de agua BM para eliminar basura. Resuspender el precipitado con 600 µl de agua BM (hacerlo con 300 µl x 2 veces). Mezclar bien con la pipeta, transferirlo a un tubo ependorff etiquetado y luego agitar. Dejar resuspendiendo mínimo 1 hora agitando cada 10 min

Tomar 20 µl de RNA + 480 µl de agua para espectrofotometría.

Separar los 600 µl en dos tubos de 1.5 ml (300 µl por tubo) y precipitarlos con 0.1 volumen (30 µl) de acetato de Na⁺ a pH 5.2 y con 3 volúmenes (990 µl) de EtOH al 100%.

Guardar a –20 °C durante 24 Hr.

Tercer Día

Centrifugar 20 min a 12,000 a 4 °C, quitar el sobrenadante y lavar con EtOH al 70% (500 µl), centrifugar nuevamente durante 5 min a 12,000 a 4 °C.

Retirar el Etanol y centrifugar 30 seg a 12,000 a 4 °C y secar en el Speed Vac por 2 min.

Resuspender en 100-300 µl de agua BM.

Guardar a –80 °C.

Tomar 2 µl de RNA + 498 µl de agua para espectrofotometría. Correr un gel de agarosa al 1% formaldehído para corroborar la calidad del RNA.

Gel de agarosa para RNA

Agarosa	0.4g
Agua destilada	34ml
MOPS 10 X	4.0ml
Agregar agua desionizada hasta 40 ml	

Calentar en el horno de microondas por 30 segundos hasta que se disuelva la agarosa, dejar enfriar y cuando este a 50°C agregar el formaldehído y agitar ligeramente

Formaldehído	2.0ml
--------------	-------

Solución de carga para RNA 1 muestra

Formamida	5µl
Mops 10X	1µl
Formaldehído	2µl
Colorante RNA	1 µl
Bromuro de etídio	0.16µl

Amortiguador de corrida MOPS 10X

MOPS 0.2M	41.86g
Acetato de Sodio 0.082M	6.80g
EDTA 0.5 M	20.0ml

Aforar a 1L ajustar el pH a 7.0 con NaOH 10N

Una vez que se han preparado todas las soluciones, calcular el volumen necesario para cargar 2.5µg de RNA total y agregar 8 µl de la solución de carga de RNA, calentar por 10 min a 65°C y cargar las muestras en el gel de agarosa, correr con amortiguador MOPS 1X a 60 V por 80 min.

Tratamiento con DNAasa

Calcular el volumen necesario para obtener 100µg de RNA total colocarlo en un tubo en hielo, agregar la décima parte del volumen de la solución amortiguadora de la DNAasa 10X y 2 µl de DNAasa, agitar levemente y dejar incubar durante 15 min. Agregar el mismo volumen que solución amortiguadora de la DNAasa 10X pero ahora de EDTA, agitar y calentar 10 min a 65°C. Leer nuevamente para determinar la concentración y congelar a -80°C hasta que se requiera.

Apéndice II. Soluciones para geles de DNA

Soluciones Para geles de Acrilamida /Bis-acrilamida

EDTA 0.5 M

EDTA	37.2g
NaOH	3.95g
Agua destilada hasta	200 ml
Ajustar el pH 8.0 con NaOH 10N	

Amortiguador Tris – EDTA para geles de acrilamida bisacrilamida (TBE 5X)

TRIS	54g
Ácido Borico	27.5g
EDTA 0.5 M pH 8	20ml
Llevar a 1 L y pH 8.0 con agua destilada	

Apéndice III. Western Blot

Soluciones para extraer proteínas

EDTA

EDTA 3.72 g
Aforar a 100 ml con agua desionizada

MOPS

MOPS 10.47g
Aforar a 100 ml con agua desionizada, guardar a 4°C.

Amortiguador de Manitol Sacarosa EDTA (MSE).

Manitol 225 mM 2.05 g
Sacarosa 75 mM 1.28 g
EDTA pH 7.0 0.1 mM 0.5 ml
MOPS pH 7.0 5 mM 5 ml
Llevar a 50 ml con agua desionizada hasta 50 ml

Benzamidina

Benzamidina 0.156g
Aforar a 10 ml con agua desionizada guardar a 4°C

DTT

DTT 0.771g
Aforar a 10 ml con agua desionizada, guardar a 4°C.

Amortiguador de Homogenizado

MSE 9.43 ml
Benzamidina 470µl
DTT 100µl
Volumen final 10 ml

Pesar 1g del tejido congelado y homogenizar 4 veces con 4 ml del buffer de homogenizado con intervalos de 30 seg posteriormente centrifugar a 6000 rpm durante 4 min a 4°C. separar el sobrenadante y se conservarlo ya que esta es la porción que contiene a las proteínas del tejido.

Una vez extraídas las proteínas es necesario conocer la concentración y se determinan con un estuche comercial BIO-RAD.

Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry. Curva estándar de albúmina fracción V

Pesar 1.47mg de albúmina y aforar a 1ml con solución salina, a partir de esta solución se realizarán diluciones para obtener concentraciones de 0.28, 0.580, 0.79, y 1.221y 1.47 μ g/ml

Se deberán hacer diluciones 1:15 y para ello se tomarán 3 μ l del homogenizado de proteínas y agregarles 42 μ l de solución salina.

Una vez que se han realizado las diluciones se tomarán 10 μ l de cada muestra y los estándares en tubos ependorff y se les agrega 50 μ l de la solución A y 400 μ l de la solución B.

También es necesario preparar un blanco, con 10 μ l de solución salina y los reactivos A y B. Incubar por 15 min a temperatura ambiente

Agitar y leer muestras a 750 nm. Las lecturas obtenidas, deben multiplicarse por el factor de dilución.

Soluciones para Gel SDS-PAGE

Acrilamida / Bisacrilamida 29:1

Acrilamida 30% 14.5g

Bisacrilamida 0.5g

Agua desionizada hasta 50 ml.

TRIS 1.5 M

TRIS 1.5 M

Ajustar el pH a 8.8 y aforar a 250 ml con agua destilada.

TRIS 1.0 M

TRIS 1.0 M

Ajustar el pH a 6.8 y aforar a 250 ml con agua destilada.

SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio 10g

Ajustar 100 ml con agua destilada.

APS 10%

Persulfato de amonio 10% 0.1g

Ajustar 1 ml con agua destilada

Gel de separación 7.5 % de poliacrilamida.

agua destilada 5.05 ml

Acrilamida/Bisacrilamida 2.25 ml

Tris 1.5 M pH 8.8 2.5 ml

SDS 10% 100 μ l

APS 100 μ l

Temed 6 μ l

Gel de Concentración

Agua destilada	2.08 ml
Acrilamida/Bisacrilamida	600 μ l
Tris 1.5 M pH 8.8	500 μ l
SDS 10%	40 μ l
APS	40 μ l
Temed	6 μ l

Se prepara primero el de separación hasta 5 cm de alto se deja polimerizar y después se hace el de concentración y se coloca el peine

Amortiguador de Carga para 50 ml

SDS 6%	3g
Glicerol 15%	6 ml
Tris 150mM	0.91g
Azul de bromofenol 0.3%	0.15g
B mercapto etanol 2%	1 ml

Amortiguador de Corrida para W Blot 5X

TRIS	15.1 g
Glicina	94.0 g
SDS 10%	50 ml
Agua	Hasta 1 L

pH 8.3 se puede almacenar a temperatura ambiente

Una vez que se cálculo el volumen necesario para 50 μ g de proteínas se completa hasta 10 μ l con solución salina y se agregan 10 μ l de amortiguador de carga, las muestras se calientan a 95°C por 5 minutos y se carga en el gel 20 μ l de esta solución se corre en buffer de corrida de W blot 1X a 50 V mientras pasa el gel de concentración y a100 V en el gel de separación.

Amortiguador de Transferencia 10X

Glicina 190 mM	144.0g
Tris Base 25mM	30.0g
SDS 0.1 %	10.0g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH entre 8 - 8.5 aforar a 1L

NOTA: Para preparar el 1X tomar

100ml del buffer 10X

200ml de Metanol

Aforar a 1L con agua destilada

Una vez que ha corrido el gel cortar membrana PVDF al tamaño del gel así como papel filtro del mismo tamaño.

Sumergir las membranas en metanol 15 segundos

En agua destilada 5 minutos

En buffer de transferencia **1X** 15 minutos, también sumergir los geles en esta solución

Cuando haya pasado este tiempo preparar los sándwiches para la transferencia colocando del polo negativo a positivo. Fibra, Papel, Gel, Membrana, Papel y Fibra) colocarlo en la caja y transferir por 140 minutos en buffer de transferencia IX a 100 V cuidando que no se descongele el bloque de hielo o que se caliente el Buffer de transferencia.

Cuando haya pasado este tiempo poner a secar la membrana teñir y desteñir el gel para observar si la transferencia fue completa.

Solución de Teñido 100 ml

Metanol	45 ml
Agua destilada	45 ml
Ácido acético	10 ml
Azul de coomasie	0.25g

Solución de Desteñido 1L

Metanol	450ml
Agua destilada	450ml
Ácido acético	100ml

Solución de bloqueo y anticuerpos.

Pesar 5g de leche descremada en 100 ml de solución de lavado 1X.0

Western Blot.

Mojar la membrana 10'' en metanol

Lavar agua destilada 5 minutos

Mojar la membrana 10 segundos en metanol

Lavar agua destilada 5 minutos

Agregar la solución de bloqueo a la membrana y dejar durante 1 hora con agitación fuerte.

Lavar con TBS-t dos veces cada 5 minutos agitación

Incubar anticuerpo primario anti-Hsp90 1:1000 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) por 30 minutos a 37°C.

Lavar con TBS-t tres veces cada 10 minutos durante 30 min.

Incubar anticuerpo secundario 1:80000 1 hora a temperatura ambiente con agitación

Lavar con TBS-t seis veces cada 10 minutos

Secar ligeramente y revelar

Preparar 1 ml solución A +25 µl solución B del estuche ECL-PLUS (Amersham).

Apéndice IV. Soluciones para Inmunohistoquímica

Solución de formol al 10%v/v

Formaldehído	10ml
Solución de fosfatos	90ml

Amortiguador de Citrato para Inmunohistoquímica

Citrato de sodio 10mM	2.5807g
-----------------------	---------

Ajustar el pH a 6.0 y aforar a 1L con agua desionizada