



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Regulación de la sintasa de óxido nítrico
endotelial (eNOS) por las proteínas de choque
térmico, Hsp90 α y Hsp90 β : su implicación en
un proceso de isquemia/reperfusión renal”**

TESIS:

**Que para Obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

M. en C. Carlo César Cortés González

Tutor:

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval

México, D.F.

Mayo 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

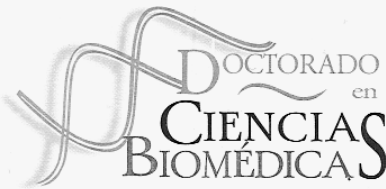


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PDCB/grad/064/Jur/2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 271ª del 17 de noviembre del 2010, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ**, con número de cuenta 506020377, con la tesis titulada **“REGULACIÓN DE LA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL (eNOS) POR LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO, Hsp90 α Y Hsp90 β : SU IMPLICACIÓN EN UN PROCESO DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN RENAL”**, dirigida por la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval.

Presidente:	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Vocal:	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Vocal:	Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Vocal:	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
Secretario:	Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval

Atentamente
“Por mi raza hablará el espíritu”
Ciudad Universitaria a 18 de noviembre del 2010

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
RESPONSABLE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

c.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutora Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval
Coordinación de PDCB

FMM/RCC/aap

Teléfonos: 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: pdcb@servidor.unam.mx

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. La presente tesis estuvo bajo la tutoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval. México, Distrito Federal. Periodo: Febrero 2006 - Marzo 2011.

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

Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por todas las facilidades otorgadas.

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval con el número de registro 48483 y por la UNAM-DGAPA IN22806-3.

Durante la realización de mis estudios de doctorado recibí una beca otorgada por el CONACyT con el número de registro 173651. Así mismo, recibí el nombramiento por 3 años como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III, otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores - CONACYT con N° de expediente 74975269.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por darme vida y salud, y nunca dejarme perder la esperanza durante todos estos años de vida.

A Karla: Por estar siempre a mi lado, aún cuando eso representara no verme. Por los sacrificios que involucro el estar conmigo 10 años, los 365 días de cada uno y las 24 horas del día, aunque ello significara muchos días verme únicamente en las horas de dormir. Por valorar y hacerme valorar mis logros, y apoyarme de mil maneras en mis tareas diarias, aún cuando esto significase no dormir hasta lograrlo. Por hacerme sentir los momentos difíciles, más fáciles. Por brindarme momentos maravillosos de nuestras vidas y crecer juntos. Sin tu apoyo incondicional, nuestro presente logro, no hubiera sido posible.

A mis Padres *Thelma e Ignacio:* Por creer en mí y apoyarme en mis estudios. Por caminar siempre a mi lado y enseñarme a perseverar y alcanzar mis sueños. Por darme las herramientas necesarias para enfrentar la vida con madurez, inteligencia, valor y sobre todo, con amor. Por haber hecho de mí la persona que ahora soy y mantener su fe en mí.

A mis hermanos *Liliana, Miriam, Patricia y Marco,* y a mis respectivos cuñados *Yeri, Ricardo, Fernando y Ángel:* Por cuidarme y mostrarme que no importan las adversidades, sé que siempre estarán ahí. Por darme las palabras de aliento cuando las necesité. Por confiar en mí y hacerme sentir la persona más feliz del mundo.

A mi amiga y tutora Dra. *Norma Bobadilla:* Por confiar en mí y permitir integrarme a su equipo de trabajo excepcional, durante estos cinco años. Por su paciencia y tiempo invertido en mi preparación profesional e intelectual, en el laboratorio y fuera de él. Tiempo durante el cual, orgullosamente obtuve valiosas enseñanzas, consejos y una amistad incondicional. Aprendiendo a ser paciente, ético, perseverante, tanto en la ciencia como en la vida misma. Por ser mi inspiración y mejor guía durante este largo, pero maravilloso camino.

Al Dr. **Gerardo Gamba**: Por sus conocimientos compartidos, paciencia, ayuda incomparable y confianza depositada en mí. Por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, permitiéndome alcanzar uno de mis más grandes sueños. Por sus sabios consejos y palabras de aliento, ayudándome a ver y corregir mis errores.

Con mucho cariño y con especial agradecimiento, a mis amigos **Katy, Carolina, Jazmín, Chelo, Marcos, Tino, Pepe, Pedro y Rafa**: Por su valiosa e incomparable amistad incondicional. Por sus consejos, apoyo, paciencia, comprensión y confianza depositada en mí. Por las horas de estudio y diversión compartidas. Por aguantar mis innumerables quejas, para las que siempre tenían una solución.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de la Dra. Norma Bobadilla, **Victoria, Joyce, Rosalba, Roxana, Juan Manuel**, y especialmente a **Jonatán y Mark**: Por haber contribuido de una u otra manera a mi crecimiento profesional y personal durante estos cinco años. Por los momentos compartidos de felicidad y frustración dentro y fuera del laboratorio, y que juntos crecimos aprendiendo de ellos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio del Dr. Gerardo Gamba, **Karla, Norma, Diana, María Castañeda, María Chávez, Silvia, Paola, Paty, Erika, Constanza, Rocío, Adriana, Luz, Ze Sergio y Juan Pablo**: Por permitirme sentir y disfrutar lo que es ser un chico Gamba, aún cuando me consideren chico Bobadilla. Por sus enseñanzas en el laboratorio, por las largas horas de trabajo, por los momentos felices y tristes compartidos, y demostrarme que puedo contar con ustedes.

A mis amigos estudiantes de Medicina, **Yvett, Erika, Juan Manuel**: Por las experiencias compartidas y hacerme pasar muchos momentos inolvidables dentro y fuera del laboratorio. Por su valiosa amistad incondicional. Por haberme permitido ser parte de sus vidas. Por las largas horas de trabajo y diversión compartidas. Y de manera especial a Yvett, por su valiosa colaboración en el artículo Nephron Exp Nephrol.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Bioquímica del INCMNSZ, **Carmita, Irma, Araceli, Gloria, José Luis, José Esparza, Ámbar, César, Omar**, y en especial a la Dra. **Ibarra y al Dr. Zentella**: Por su amistad incondicional y haber permitido integrarme de una u otra manera a su equipo de trabajo durante estos últimos cuatro

años y contribuir de manera importante en mi crecimiento profesional y personal. Por todos sus conocimientos compartidos y el apoyo técnico que me brindaron, así como su valiosa colaboración en el artículo Cell Physiol Biochem.

*A mi Comité Tutoral, Dr. **Rogelio Hernández** y Dr. **Luis A. Herrera**:* Por sus valiosas observaciones y críticas durante la realización de mi proyecto doctoral, lo que permitió que la realización de esta tesis fuera todo un éxito.

*Al Dr. **Ricardo Correa** y al Dr. **Luis Morales**:* Por hacerme sentir parte importante del Departamento de Nefrología del INCMNSZ. Por sus sabios consejos, enseñanzas y apoyo incondicional, tanto en el Laboratorio como participando en cursos y congresos de nefrología durante estos cinco años.

*A las secretarias del Departamento de Nefrología **Nayeli, Verónica y Josefina**:* Por su amistad y apoyo incondicional durante estos cinco años. Por hacerme pasar momentos inolvidables en el trabajo y ayudarme en todos los trámites administrativos durante mis estudios de doctorado.

*A mis compañeros del laboratorio de análisis clínicos del Depto. de Nefrología, **Mónica, Silvia, Leonor, Quím. Bertha, Laurita, José y Felipe**:* Por su amistad, asesoría y apoyo técnico incondicional. Por los momentos de felicidad compartidos.

*A mis amigos del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del Depto. de Infectómica del Cinvestav-IPN **Lidia, Amelia, Dra. Talamás, Dra. Lorena y Enrique**:* Por su amistad, por creer en mí, y por apoyarme en todo momento a conseguir mis metas profesionales y personales.

Unidad de Fisiología Molecular – UNAM

Chicos Bobadilla



Chicos Gamba



Mi más sincero agradecimiento a cada uno de ustedes

por permitirme ser parte de su vida.

César

ÍNDICE

	Nº Página
Abreviaturas	1
Índice de figuras	3
Resumen	6
I. INTRODUCCIÓN	9
Las Proteínas de Choque Térmico (Hsp's).	11
Las Proteínas de Choque Térmico de 90 kDa (Hsp90).	13
Hsp90 (Hsp90 α y Hsp90 β) y sus proteínas cliente.	17
Mecanismo de inducción o sobre-expresión de las Hsp90 dentro de la célula.	19
Hsp90 en la fisiología vascular.	21
Hsp90 en la fisiología renal.	25
Hsp90 en la fisiopatología renal	28
Antecedentes directos	30
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
Hipótesis	33
Objetivo general y particulares	34
III. MATERIAL Y MÉTODOS	35
Clonación de los genes Hsp90 α y Hsp90 β de rata.	36
Animales de estudio.	36
Isquemia/reperfusión (I/R) renal.	37
Obtención del tejido renal transfectado.	36
Transfección <i>in vitro</i> de los genes de Hsp90 α y de Hsp90 β .	36
Transfección de RNA de interferencia para Hsp90 α (siRNA-Hsp90 α) y Hsp90 β (siRNA-Hsp90 β) en células HEK-293.	38
Transfección intra-renal del plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α en la rata.	38
Estudios moleculares	
Extracción de RNA total y RT-PCR en tiempo real.	39
Análisis de Western Blot.	40
Determinación del estado de fosforilación de la sintasa de	

<i>óxido nítrico endotelial.</i>	40
<i>Análisis de la conformación monómero/dímero de Hsp90.</i>	41
<i>Estudios de co-inmunoprecipitación (IP).</i>	41
Estudios bioquímicos	
<i>Detección y medición de nitritos en células HEK-293.</i>	42
<i>Cuantificación de nitritos y nitratos en orina y en lisados celulares.</i>	42
<i>Detección de anión superóxido ($\cdot O^2$) en células HEK-293.</i>	43
<i>Niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células HEK-293.</i>	43
<i>Peróxido de hidrógeno) urinario (H_2O_2U).</i>	44
<i>Lipoperoxidación en tejido renal.</i>	44
<i>Creatinina sérica y urinaria</i>	45
Estudios fisiológicos	
<i>Flujo sanguíneo renal (FSR) y Presión arterial media (PAM).</i>	46
Análisis estadístico	46
IV. RESULTADOS	47
V. DISCUSIÓN	87
VI. BIBLIOGRAFÍA	95
VII. ARTÍCULOS	106

Abreviaturas

<i>Hsp</i>	Proteínas de choque térmico, a nivel de proteína (Heat shock protein).
<i>HSP</i>	Proteínas de choque térmico, a nivel de genes (Heat shock protein).
Hsp90	Proteínas de choque térmico de 90 kDa.
Hsp72	Proteínas de choque térmico de 72 kDa, isoforma inducible de la familia de proteínas Hsp70.
<i>HSF1</i>	Factor de transcripción de choque térmico (por sus siglas en inglés, Heat Shock Transcription Factor).
<i>HSE</i>	Elemento de respuesta a estrés térmico (Heat shock element).
<i>NAG</i>	N-acetil-beta-glucosaminidasa (NAG), enzima lisosómica que se excreta por la orina y se segrega a nivel de los tubulos proximales renales. Actualmente es utilizado como biomarcador de daño renal, tanto por lesion glomerular como tubular.
<i>NOS</i>	Sintasa de óxido nítrico (sus siglas en inglés, Nitric Oxide Synthase), enzima responsable de transformar la L-arginina en óxido nítrico (\bullet NO) en una catálisis orgánica de oxidorreducción.
<i>eNOS</i>	Isoforma endotelial de la sintasa de óxido nítrico o NOS3 (por sus siglas en inglés, endotelial Nitric Oxide Synthase).
<i>ROS</i>	Especies reactivas del oxígeno (por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species).
<i>RNS</i>	Especies reactivas del nitrógeno (por sus siglas en inglés, Reactive Nitrogen Species).
\bulletNO	Óxido nítrico (por sus siglas en inglés, Nitric oxide)

NO_2^-/NO_3^-	Nitritos y Nitratos, metabolitos estables de La síntesis de $\bullet NO$.
$\bullet O^{2-}$	Anión superoxido
<i>Akt</i>	Proteína cinasa B/Akt, enzimas que constituyen una familia de proteínas serina/treonina cinasas.
<i>siRNA</i>	ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA).
<i>HEK-293</i>	Células embrionarias de riñón humano (por sus siglas en inglés, human embryonic kidney 293).

Índice de Figuras

Figura	Nº Página
Tabla 1. <i>Clasificación y Propiedades de las Proteínas de choque térmico.</i>	12
1. Principales funciones celulares de las Hsp.	13
2. Abundancia relativa del estado conformacional de Hsp90 α y de Hsp90 β en células eucariontes.	15
3. Estructura general de la subfamilia de las Hsp90 α y Hsp90 β .	16
4. Estructura química de los inhibidores de Hsp90.	16
5. Interacción del dominio medio de Hsp90 con sus proteínas cliente.	18
6. Mecanismo de inducción o sobre-expresión de las Hsp90 dentro de la célula.	20
7. Modelo propuesto para la generación de $\bullet\text{NO}$ y de $\bullet\text{O}^2$ por catálisis de las sintasas de óxido nítrico.	22
8. Significado fisiológico vascular de la Hsp90 y las vías que regula para el mantenimiento del tono vascular y la angiogénesis.	24
9. Participación de Hsp90 en procesos celulares que regulan la fisiología renal.	29
10. Representación esquemática de la técnica de transfección in vivo de Hsp90 α vía la arteria renal en la rata.	39
11. Mecanismo de detección de nitratos y nitritos (metabolitos estables de la síntesis de óxido nítrico) empleando el reactivo de Griess.	42
12. Amplificación del gen de Hsp90 α a partir de RNA total de riñón de rata.	48
13. Clonación de Hsp90 α dentro del vector de expresión pcDNA3.1	49
14. Secuencia de Hsp90 α obtenida y clonada dentro del vector de expresión pcDNA3.1.	50

15. Análisis de restricción enzimática del plásmido pcDNA3.1/NT-GFP/Hsp90 α .	22
16. Microscopía de epifluorescencia invertida de células HEK-293 transfectadas.	52
17. Niveles de proteína Hsp90 α en células HEK-293 transfectadas con diferentes cantidades de constructo de Hsp90 α , curva dosis-tiempo de expresión de Hsp90 α y efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α sobre los niveles de proteína de Hsp90 β .	53
18. Clonación de Hsp90 β de rata dentro del vector de expresión pcDNA3.1.	55
19. Alineamiento en el programa Blast de la secuencia obtenida por la secuenciación automática del gen de Hsp90 β clonado en pcDNA3.1.	56
20. Niveles de proteína Hsp90 β en células HEK-293 transfectadas con diferentes cantidades de constructo de Hsp90 β .	57
21. Expresión de proteína eNOS, Hsp90 α , Hsp90 β y β -actina en células HEK-293 intactas.	68
22. Efectos de la transfección de pcDNA3.1/Hsp90 α o de pcDNA3.1/Hsp90 β sobre la producción de *NO en células HEK-293.	59
23. Curvas dosis-silenciamiento y tiempo-silenciamiento en células HEK-293 transfectadas con siRNA-Hsp90 α o de siRNA-Hsp90 β .	60
24. Análisis de co-inmunoprecipitación de eNOS con Hsp90 α o Hsp90 β de células HEK-293 transfectadas con Hsp90 α o con Hsp90 β , respectivamente.	61
25. Efectos de la transfección de pcDNA3.1-Hsp90 α y de pcDNA3.1-Hsp90 β sobre la vía eNOS/*NO.	63
26. Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α y Hsp90 β sobre el estrés oxidante en células HEK-293.	54
27. Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α o Hsp90 β sobre la conformación monómero/dímero.	66
28. Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α o Hsp90 β sobre la conformación monómero/dímero de eNOS.	67

29. Transfección intra-renal vía la arteria renal izquierda del plásmido pcDNA/NT-GFP.	70
30. Niveles de RNA mensajero de los genes Hsp90 α y de Hsp90 β en tejido renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o vehículo, como control.	71
31. Niveles de proteína de Hsp90 α y de Hsp90 β en tejido renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o vehículo, como control.	72
32. Parámetros fisiológicos y marcadores de daño renal obtenidos 48h posteriores a la realización de la transfección intra-renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o vehículo (Veh), como control.	74
33. Niveles de proteína de Hsp90 α y de Hsp90 β en tejido renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α , con vehículo como control y sometidas a isquemia renal de 30 min y reperusión de 24h, comparado con el grupo que únicamente sufrió el daño por I/R.	75
34. Parámetros fisiológicos y marcadores de daño renal en ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α , con vehículo como control y sometidas a isquemia a I/R renal, comparado con el grupo que únicamente sufrió el daño por I/R.	77
35. Efecto de la transfección intra-renal de pcDNA3.1/Hsp90 α sobre el estrés oxidativo, ante el daño renal inducido por I/R.	79
36. Correlación entre la producción de *NO y la interacción de eNOS y Hsp90 α post-I/R renal en ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α .	80
37. Efecto de la transfección de pcDNA3.1/Hsp90 α sobre los niveles de proteína de eNOS y su estado de activación por fosforilación, ante el daño inducido por I/R renal.	82
38. Influencia de la transfección pcDNA3.1/Hsp90 α sobre los niveles de la proteína cinasa Akt/PKB y su estado de activación por fosforilación, ante el daño renal inducido por I/R.	84
39. Efecto de la transfección pcDNA3.1/Hsp90 α sobre los niveles de la proteína de choque térmico de 72 (isoforma inducible de Hsp70), ante el daño renal inducido por I/R.	85

RESÚMEN

La subfamilia de las proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) ha sido reconocida como un modulador de la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Esta subfamilia está integrada por dos isoformas citosólicas conocidas como Hsp90 α y Hsp90 β . Sin embargo, el papel específico de cada isoforma de Hsp90 en la producción de óxido nítrico/anión superóxido ($\bullet\text{NO}/\bullet\text{O}^{-2}$) por eNOS no se ha establecido todavía.

El presente estudio se diseñó para evaluar los efectos de la sobre-expresión de Hsp90 α o de Hsp90 β en la vía eNOS/ $\bullet\text{NO}$. Para ello, los genes de Hsp90 α y de Hsp90 β de rata se clonaron en el vector de expresión pcDNA3.1(+). Una vez obtenidos los plásmidos pc-Hsp90 α y pc-Hsp90 β , se realizaron transfecciones *in vitro* e *in vivo*.

Para los experimentos *in vitro* se realizaron transfecciones en células embrionarias de riñón humano (HEK-293) de ambas isoformas de Hsp90. Para los experimentos *in vivo*, se realizaron transfecciones intra-renales vía la arteria renal de la rata, utilizando el plásmido pc-Hsp90 α . Ambas transfecciones fueron estandarizadas utilizando un sistema de transferencia del gen mediada por liposomas catiónicos.

Una vez corroborada la transfección de Hsp90 α y de Hsp90 β , se determinaron sus efectos en la vía de señalización para la síntesis de $\bullet\text{NO}$ (NO_2/NO_3) mediante estudios de western blot de eNOS; así como, del estado de fosforilación de sus residuos Ser1177 y Tre495. También se estudió el estado de fosforilación del residuo Ser473 en la proteína cinasa B/Akt, la interacción de Hsp90 α y de Hsp90 β con eNOS, la relación dímero/monómero de Hsp90 y la generación de $\bullet\text{O}^{-2}$.

Como era de esperar, los niveles de proteína de Hsp90 α y de Hsp90 β fueron significativamente superiores después de la transfección correspondiente, tanto en las células HEK-293 como en el riñón transfectado con respecto a los grupos control. La

sobre-expresión de Hsp90 α indujo un aumento significativo en los niveles de NO₂/NO₃, un efecto que se asoció con aumento de la fosforilación de la Ser 1177 de eNOS, comprobado tanto en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. La activación de Akt/PKB por la fosforilación de la Ser473, así como la dimerización de Hsp90 α aumentaron significativamente en las células que se transfectaron con pc-Hsp90 α . De forma contraria, la transfección de pc-Hsp90 β redujo significativamente la generación de $\cdot\text{O}^{-2}$ y el aumento NO₂/NO₃, con respecto a los grupos de células transfectadas con pc-Hsp90 α y las controles. Lo anterior se asoció con un aumento en la fosforilación de la Tre495 de eNOS, reducción de la fosforilación de Akt/PKB, y una cantidad mayor de la conformación monomérica de Hsp90 β .

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* corroboran y apoyan fuertemente los resultados obtenidos *in vitro*. La sobre-expresión de Hsp90 α obtenida mediante transfección intra-renal de pc-Hsp90 α produjo un aumento significativo en los niveles de NO₂/NO₃ urinarios y una disminución en los niveles de H₂O₂ urinario, efecto que se relaciono con un aumento en la fosforilación activante de eNOS (Ser1177). Lo anterior, explica en parte los efectos renoprotectores observados a nivel de la fisiología vascular renal en los animales que se sometieron a daño renal por isquemia de 30 min y reperusión de 24h o 48h post-transfección. En este caso, el grupo de animales que fueron transfectados con el plásmido pc-Hsp90 α mostró renoprotección al prevenir la caída del flujo sanguíneo renal de forma independiente de la presión arterial.

En las determinaciones bioquímicas, el aumento en los niveles de NAG y proteinuria se previno por la transfección de Hsp90 α , efecto que se asoció con una prevención en la peroxidación de lípidos medida por ensayos de lipoperoxidación en el tejido renal, con respecto a los animales control.

De forma interesante y para ayudar a explicar aún más la vía de señalización que podría apoyar los efectos observados, los ensayos de inmunoprecipitación mostraron una

mayor interacción entre Hsp90 α y eNOS en los animales que sobre-expresan Hsp90 α con respecto a los grupos control, explicando en parte el aumento en la producción de óxido nítrico.

Reuniendo los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se demuestra por vez primera que Hsp90 α y Hsp90 β modulan diferencialmente la generación de $\cdot\text{NO}$ y de $\cdot\text{O}^{-2}$ por eNOS, promoviendo cambios en el estado de fosforilación, tanto de la eNOS como de la proteína cinasa B/Akt; y de esta manera, lograr pre-establecer un ambiente de citoprotección a nivel vascular renal al promover la vía de señalización para la síntesis de óxido nítrico vía eNOS (p-eNOS/Hsp90 α /p-Akt).

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción:

Existen diferentes condiciones y factores externos que pueden desequilibrar la homeostasis celular como lo son: cambios en la temperatura, osmolaridad, pH, entre otros. De tal forma que, cada célula está constantemente expuesta a diversas condiciones de estrés que se acentúan durante procesos fisiopatológicos. Ante estas condiciones, las células desarrollan un mecanismo evolutivo para detectar, monitorear y responder a cambios extremos del medio ambiente con el fin de mantener la homeostasis celular ^(47, 20, 21, 59). Este mecanismo se basa en la función “chaperona” que poseen algunas proteínas, el cuál determinó el dogma central de la biología celular durante muchos años. Lo anterior fue apoyado con los experimentos realizados por Christian Anfinsen, quien mantuvo la hipótesis de que el plegamiento de proteínas y su montaje en complejos macromoleculares eran procesos espontáneos que no requerían ser asistidos ⁽¹⁾.

Fue a través del estudio de la respuesta de choque térmico, que la generalidad de la función de chaperona surgió. La historia moderna de la respuesta celular al choque térmico se inició con la observación de Ritossa, en donde un aumento transitorio de la temperatura activó la expresión de un pequeño grupo de genes en la *Drosophila*. En los siguientes años, se demostró que esta respuesta se conserva desde las bacterias hasta los mamíferos, denominándoseles a estas moléculas, proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en ingles: Heat shock proteins) ⁽⁶²⁾.

Aunque el papel desempeñado por las proteínas de choque térmico como chaperonas moleculares en proteínas de ensamble y desensamble pasó a segundo plano, no fue hasta que Hurlley y Helenius demostraron su participación en los procesos generales de control de calidad de las proteínas ⁽²⁷⁾ que volvieron a recuperar importancia en la biología celular. Estos autores encontraron que las chaperonas no son únicamente “plegadoras”, sino que también previenen la entrada de proteínas mal plegadas y

cooperan con los sistemas proteolíticos para eliminar las proteínas mal plegadas de forma estable.

A partir de este momento se abrió un campo nuevo de estudio para la caracterización de las proteínas de choque térmico y de los procesos celulares en los que intervienen. A este respecto, bastaría realizar un bosquejo en la literatura existente para demostrar que nuestro conocimiento acerca de estas proteínas está creciendo de forma exponencial, demostrando lo mucho que falta aún por conocer acerca de ellas. El proceso, denominado plegamiento de proteínas mediado por chaperonas, ha sido el eje de estudio de varias investigaciones en el que participan básicamente 3 elementos: 1) la chaperona molecular (ej. Proteínas de choque térmico), 2) co-chaperonas, y 3) la proteína cliente.

Las Proteínas de Choque Térmico (Hsp's).

Las proteínas de choque térmico (Hsp's) o proteínas de estrés, están presentes en todos los organismos y en todas las células de estos ⁽⁴²⁾, manteniéndose altamente conservadas entre especies. Las Hsp's, también conocidas como chaperonas moleculares, juegan un papel crucial en el plegamiento/desplegamiento de proteínas, ensamblaje de complejos multi-proteicos, transporte, clasificación correcta de proteínas en compartimentos subcelulares, control y señalización del ciclo celular, y en la protección de las células contra innumerables condiciones de estrés. Recientemente, las Hsp's han sido implicadas en la presentación de antígenos participando como chaperonas en la transferencia de péptidos antigénicos a las moléculas clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad ⁽⁴⁰⁾. También se ha descrito que las Hsp's extracelulares pueden estimular células presentadoras de antígenos profesionales del sistema inmune, como los macrófagos y células dendríticas ⁽⁴¹⁾.

Las proteínas de choque térmico pertenecen a una familia multigénica con un peso molecular que varía entre los 10 y los 150 kDa. Se han clasificado de acuerdo a su peso molecular en 6 subfamilias: Hsp's pequeñas o de bajo peso molecular (Hsps, 18-30 kDa), Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 y Hsp's de alto peso molecular (>100 kDa) ^(61, 74). La Tabla 1 resume la clasificación y las principales propiedades de las proteínas de choque térmico.

Subfamilia	Isoformas	Estado	Localización	Función
Hsp		Conformacional	Intracelular	
HSPs pequeñas	Ubiquitina, Hsp10, Hsp20-30kDa	Dímeros, Hexámeros, Hexadecámeros, Esferas de 24 unidades	Citosol, Núcleo, Mitocondria	Degradación de proteínas, Tolerancia al estrés oxidativo co-factor de Hsp60
Hsp40	Hsp40, Hsp47	Dímeros y Complejos proteicos	Citosol, Núcleo, Retículo endoplásmico	Co-chaperona de Hsp72, Plegamiento de proteínas
Hsp60	Hsp60	Tetrámeros y Anillos de multímeros	Citosol, Mitocondria	Plegamiento de proteínas
Hsp70	Hsp72, Hsc73, mtHsp70	Monómeros y Heterodímeros con otras Hsp	Citosol, Núcleo, Mitocondria, Retículo endoplásmico	Termotolerancia, Plegamiento de proteínas, Transporte de proteínas a mitocondria
Hsp90	Hsp90a, Hsp90b, TRAP-1, Grp94, Hsp90N	Monómeros, Dímeros, homodímeros y Oligómeros	Citosol, Mitocondria, Retículo endoplásmico, Núcleo	Interacción con receptores de hormonas esteroideas
Hsp100	Hsp104-110, ORP150	Dímeros y Anillos de multímeros	Citosol, Núcleo, Retículo endoplásmico	Termotolerancia, tolerancia isquémica

Tabla 1. **Clasificación y Propiedades de las Proteínas de choque térmico.**

La Figura 1, hace referencia a diferentes funciones celulares que son reguladas por complejos multi-chaperona dentro de la célula, pudiéndose llevar a cabo, tanto en condiciones fisiológicas como de estrés celular. En este evento, la expresión de algunas subfamilias de Hsp aumenta con el fin de asistir la activación, reparación o degradación proteica.

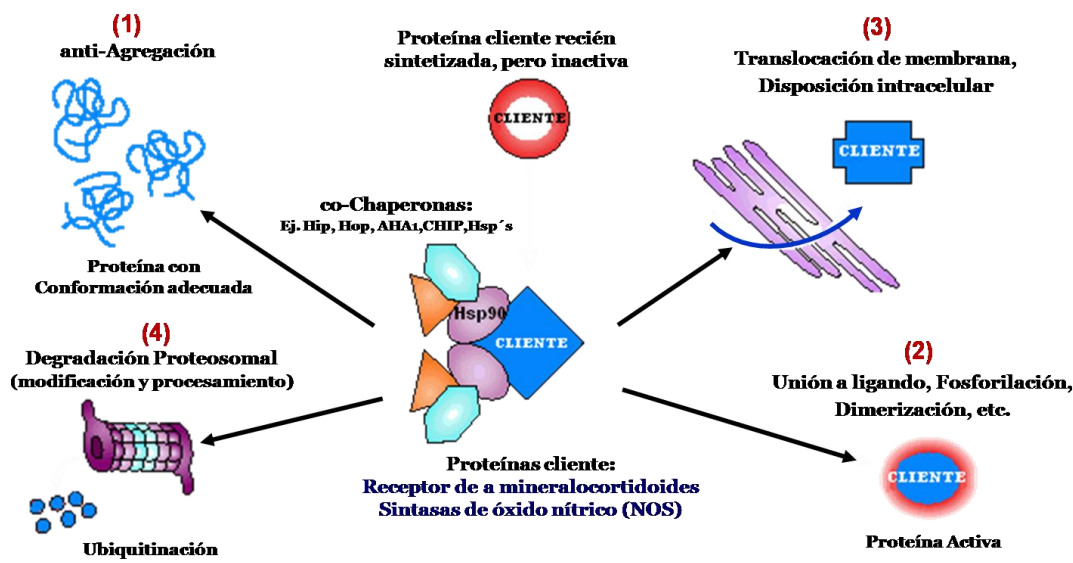


Figura 1. Principales funciones celulares de las Hsp. En conjunto con otras co-chaperonas forman un complejo molecular chaperónico el cual es capaz por un lado, de prevenir la agregación inter-proteína, brindando la conformación adecuada de su proteína cliente; puede favorecer la unión a ligando, fosforilación o dimerización de dicha proteína; así como de favorecer la translocación de membrana, disponiéndola intracelularmente. Cuando estos procesos fallan, la Hsp90 también es capaz de favorecer la degradación vía proteosoma-ubiquitina de su proteína cliente.

Las Proteínas de Choque Térmico de 90 kDa (Hsp90)

Una de las subfamilias de las Hsp's mas abundantes son las proteínas de choque térmico de 90 kDa, objeto de nuestro estudio. Las Hsp90 comprenden del 1 al 2% de la proteína citosólica total y su expresión puede ser inducida hasta un 15% en condiciones de estrés celular. Hasta el momento, se han descrito 5 isoformas de Hsp90: la Grp94, la Hsp90N, la TRAP1, la Hsp90 α y la Hsp90 β , que se diferencian básicamente por su localización intracelular. La Hsp90 α y la Hsp90 β se encuentran en el citosol, a diferencia de las otras isoformas que se encuentran asociadas a organelos. Estas dos isoformas comprenden el 80% de ésta subfamilia y son las encargadas de modular la mayoría de sus acciones intracelulares ^(42, 85).

La Hsp90 α y la Hsp90 β mantienen hasta un 85% de identidad a nivel de proteína. En condiciones fisiológicas, la proporción de Hsp90 α es menor en comparación con Hsp90 β , ya que mientras la primera constituye el 40% de, la segunda conforma el 60% ⁽²⁶⁾. Ambas isoformas pueden encontrarse en forma monomérica, dimérica o heterodimérica. La Figura 2, muestra la abundancia relativa del estado conformacional de la Hsp90 α y de la Hsp90 β , en condiciones fisiológicas dentro de una célula eucarionte. Otra diferencia entre estas dos proteínas es que la Hsp90 α se encuentra en mayor proporción en forma dimérica, mientras que la Hsp90 β principalmente en forma monomérica. Cabe resaltar que la conformación dimérica de Hsp90 es la forma más funcional ⁽⁵⁰⁾.

El gen para Hsp90 α consta de 10 exones que codifican para un transcrito de 5.3 Kb, lo que da lugar a una proteína de 733 aminoácidos con un peso molecular de 86 kDa. A pesar de que el gen de Hsp90 β consta de 11 exones y el transcrito es de 6.8Kb, la proteína resultante es más pequeña, formada por 726 aminoácidos con un peso molecular de 84kDa ⁽¹⁹⁾. Los genes que codifican para estas proteínas se localizan en distintos cromosomas dentro del genoma. El primer exón en ambas isoformas no se traduce, pero aún se desconoce la razón de esta omisión en la transcripción. Se ha observado que la región promotora juega un papel importante en las diferencias de expresión de cada una de las isoformas, por lo que se ha propuesto que son reguladas de manera diferente.

Lo anterior se apoya por el hecho de que Hsp90 α contiene 5 elementos de respuesta a estrés térmico (HSE) en la región promotora, mientras que Hsp90 β solo contiene dos, lo que podría explicar porque Hsp90 α es conocida como la isoforma inducible ^(71, 93).

La Figura 3 muestra la estructura general de la Hsp90 α y de la Hsp90 β , en donde se aprecia que es similar para ambas isoformas y que está compuesta principalmente por un dominio carboxilo terminal (C-terminal), un dominio medio, un dominio de carga y un dominio amino terminal (N-terminal). El dominio C-terminal, junto con el dominio medio,

son importantes para la dimerización de Hsp90, siendo el estado dimérico crítico para su activación. En el dominio de carga abundan aminoácidos con carga negativa (de ahí su nombre) y hasta la fecha no se conoce su función. El dominio medio es el responsable de la actividad de chaperona de las Hsp90, debido a que está implicado en la unión a diversas proteínas. Finalmente, el dominio N-terminal es el encargado de la unión e hidrólisis de ATP y es el sitio de unión a algunos fármacos como la geldanamicina (GA) y el radicicol (RA) que inhiben la actividad de chaperona de las Hsp90 ^(58, 83, 84, 55). La estructura de ambos inhibidores de Hsp90 se muestra en la Figura 4. En ella se muestran las constantes de inhibición (K_i) con las que se unen a Hsp90. Para determinar las constantes de afinidad, la Hsp90 de levadura fue transformada y purificada mediante cromatografía de afinidad en *E. coli*.

	Monómero	Dímero (α - α , β - β)	Heterodímero (α - β)
Hsp90 α	↑	↑↑↑	↑↑
Hsp90 β	↑↑↑	↑	↑↑

Figura 2. Abundancia relativa del estado conformacional de Hsp90 α y de Hsp90 β en células eucariontes. Se puede observar que Hsp90 α se encuentra mayormente formando homodímeros y en menor proporción en su conformación monomérica. Efecto contrario al encontrado en Hsp90 β .

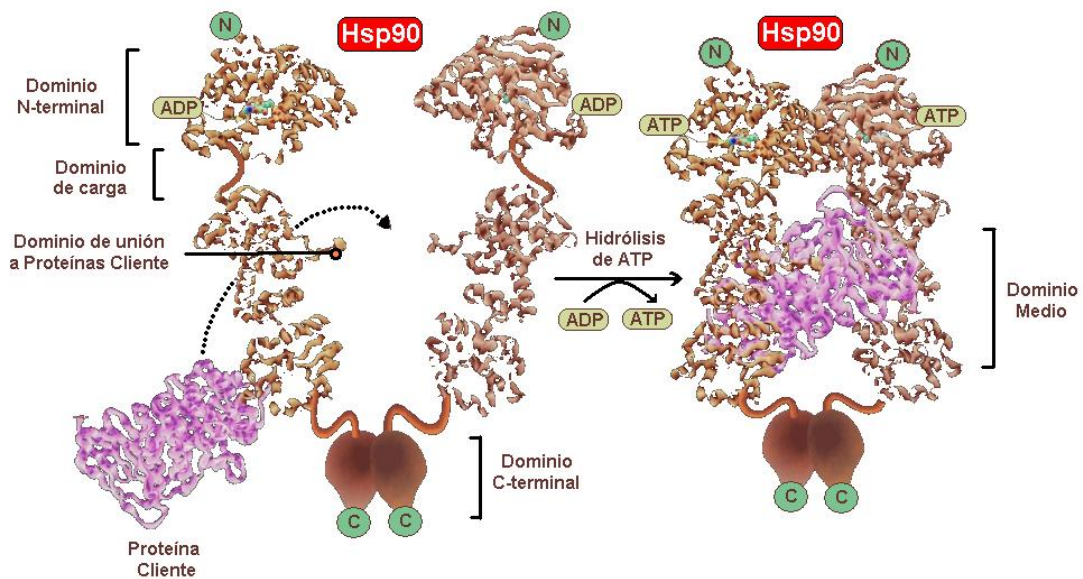


Figura 3. Estructura general de la subfamilia de las Hsp90 α y Hsp90 β . (Modificada del sitio de la página web: www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.f.a.107.b3/content/access.htm).

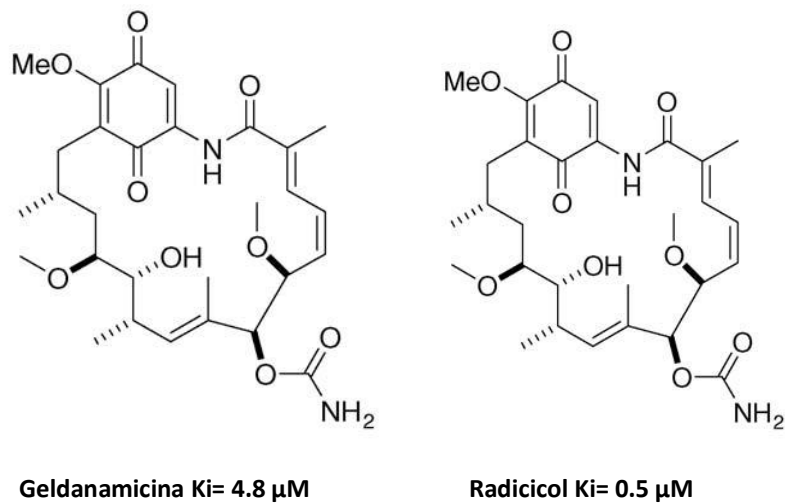


Figura 4. Estructura química de los Inhibidores de Hsp90. Geldanamicina (GA) y Radicol (RA), indicando la afinidad determinada por la K_i de cada uno de los inhibidores, por el sitio de unión a ATP de Hsp90.

Hsp90 (Hsp90 α y Hsp90 β) y sus proteínas cliente.

La función celular mas estudiada y conocida de las Hsp90 es que actúan como moduladoras alostéricas de varias proteínas denominadas “proteínas cliente de Hsp90”, lo que les confiere su función como chaperonas moleculares.

En la última década, la lista de proteínas cliente de Hsp90 ha aumentado sustancialmente y en ella se encuentran (http://www.picard.ch/downloads/Hsp90_interactors): factores transcripcionales ^(89, 94), proteínas cinasas ^(13, 15, 49) y proteínas que participan en la regulación transcripcional y trasduccional de señales, tales como el receptor de hormonas esteroideas ^(14, 56) y las sintasas de oxido nítrico ^(23, 6, 8, 91). Tomando en consideración lo anterior, es de esperarse que las funciones que desempeña Hsp90 dentro de una célula sean tan diversas e importantes, como de la proteína cliente de la que regulan. En la Figura 5 (modificada de Shames DS y Minna JD, 2008) se representa la estructura de Hsp90 mostrando unas de tantas de las funciones específicas que desempeñan, siendo dependientes de su interacción con sus proteínas cliente y el dominio medio de Hsp90. Efectos que han demostrado ser desregulados mediante la inhibición de la hidrólisis de ATP utilizando inhibidores del sitio de unión a ATP en el dominio amino NH₂ de las Hsp90.

Con respecto a la interacción Hsp90-proteína cliente, recientemente se describió que la Hsp90 α también puede prolongar la vida media de sus proteínas cliente, a través de estabilizar y prevenir la degradación proteosomal de las proteínas a las que se une ⁽⁴⁵⁾.

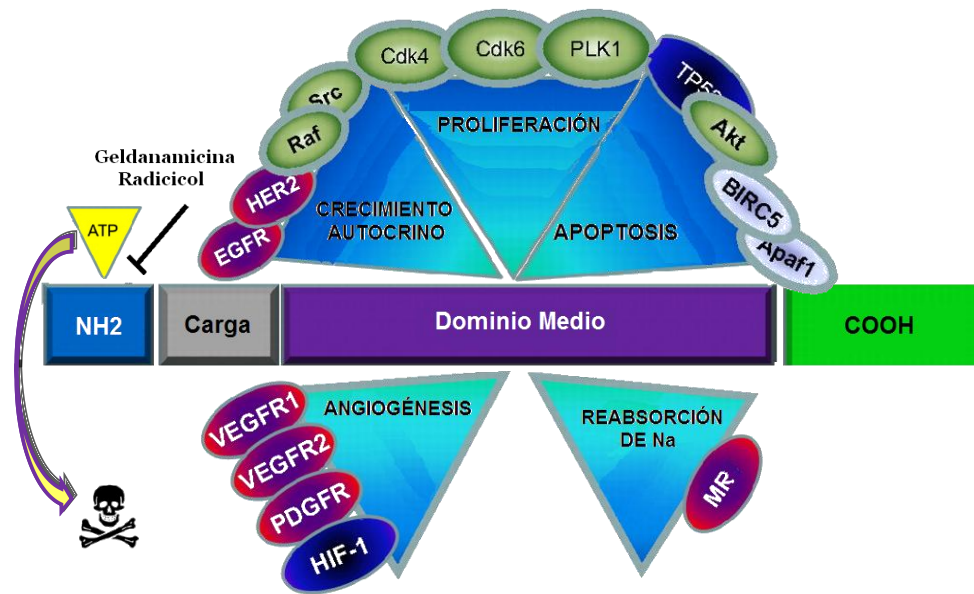


Figura 5. Interacción del dominio medio de Hsp90 con sus proteínas cliente. Funciones celulares reguladas por la interacción del dominio medio de Hsp90 con algunas de sus proteínas cliente.

Dentro de las principales funciones celulares de las proteínas de choque térmico se encuentran:

1. Asistir en el plegamiento de proteínas inmaduras, lo que proporciona la conformación adecuada y evita la agregación proteica.
2. Favorecer la translocación de sus proteínas cliente a organelos o a las membranas celulares y nucleares.
3. Activar a las proteínas cliente a través de facilitar su fosforilación y/o dimerización.
4. Degradar proteínas dañadas irreversiblemente mediante ubiquitinación ⁽⁹²⁾.
5. Mediar procesos anti-apoptóticos, a través de inhibir algunas vías que llevan a la muerte celular programada, como lo es la inhibición de la activación de caspasa 3 y 9, así como de inhibir al activador de la caspasa derivado de la mitocondria conocido como SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase-direct IAP binding protein with low pI) ⁽²⁸⁾.

6. Participar en el desarrollo y diferenciación celular, mediante la regulación del ciclo celular ⁽⁶⁴⁾.

Mecanismo de inducción o sobre-expresión de las Hsp90 dentro de la célula.

En condiciones normales, la inducción de las Hsp90 se inicia con la liberación del factor de respuesta a estrés térmico (HSF1), que comúnmente se encuentra asociado a Hsp90 en el citosol. Una vez liberado, el HSF1 se trimeriza y se transloca al núcleo en donde se une a elementos de respuesta a estrés térmico (HSE), dando lugar a: 1) la activación de la transcripción de proteínas de choque térmico, 2) la aparición de nuevos mensajeros de Hsp90, y 3) el subsecuente aumento en la expresión de estas proteínas ⁽⁷³⁾. La Figura 6, ilustra un modelo general de los mecanismos de regulación para la inducción o sobre-expresión de las Hsp's dentro de la célula. Así mismo, se indican algunas de las señales de estrés por las cuales la expresión de las Hsp's es inducida.

A su vez, las Hsp90 son reguladas por proteínas cinasas y/o fosfatasas ^(61,76). A este respecto, se conoce que Hsp90 β contiene cinco sitios potenciales de fosforilación por la proteína cinasa PKA, mientras que Hsp90 α solo contiene tres. Así mismo, se ha reportado que Hsp90 es regulada de forma positiva por la proteína fosfatasa PP1, la cual favorece la maduración de sus proteínas cliente, previniendo la hiperfosforilación de Hsp90 ⁽⁸²⁾.

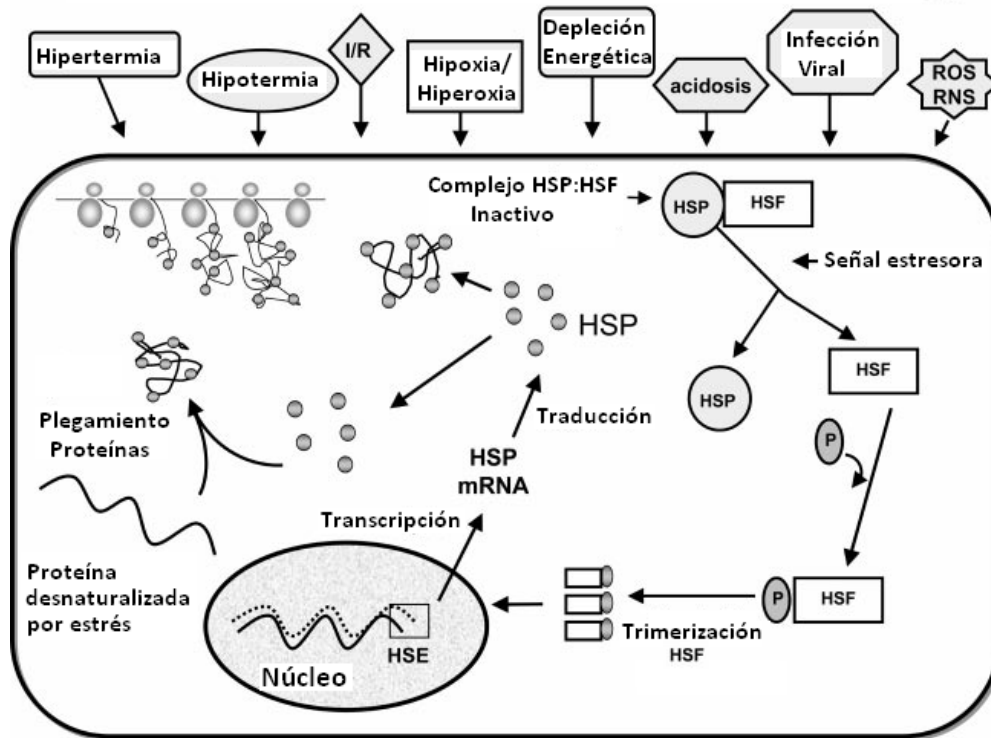


Figura 6. Mecanismo de inducción o sobre-expresión de las Hsp90 dentro de la célula. Las proteínas de choque térmico presentes en el citosol se encuentran unidos a su factor de estrés térmico (HSF, por sus siglas en inglés), de esta manera se mantienen en un estado inactivo. Una amplia gama de estímulos fisiológicos ("señal estresora") se cree que activa a las HSP, haciendo que estas se separen del HSF. El HSF es fosforilado (P) y trimerizado para internalizarse al núcleo y unirse a los elementos de respuesta a estrés térmico (HSE) en la región promotora de los genes Hsp. El mRNA de las Hsp's es entonces transcrito para salir del núcleo al citosol, donde las Hsp's se sintetizan de *ново*. Los mecanismos propuestos de protección celular que induce a las HSP incluyendo su función como chaperones moleculares para ayudar en el plegamiento y el traslado de proteínas recién sintetizadas proteínas en la célula, así como la reparación y replegado de proteínas dañadas. Por ejemplo: isquemia-reperfusión (I/R); especies reactivas del oxígeno, ROS; y especies reactivas de nitrógeno, RNS. (Modificado de Kregel K, 2002).

Hsp90 en la fisiología vascular.

En 1998, Garcia-Cardena y cols. ⁽²³⁾ mostraron por primera vez que Hsp90 es capaz de interactuar con la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). La trascendencia de este hallazgo en la fisiología vascular se demostró por el hecho de que esta interacción activa a eNOS, lo que produce un aumento en la generación de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), que es un compuesto vasodilatador que regula el tono vascular y la presión arterial. En este estudio también se demostró que el desacople entre eNOS y Hsp90, inducido por un inhibidor selectivo de Hsp90, produjo vasoconstricción en los anillos de aorta aislados, lo que se asoció con una reducción de los niveles de GMPc, el segundo mensajero de óxido nítrico. Años más tarde, Pritchard y cols. ⁽⁵⁷⁾ confirmaron que el desacople entre eNOS y Hsp90 reducía la síntesis de $\cdot\text{NO}$, pero además demostraron que eNOS en ausencia de Hsp90 era capaz de sintetizar al anión superóxido ($\cdot\text{O}^{2-}$). El impacto de la activación de eNOS por Hsp90 en condiciones fisiopatológicas fue documentado por Kupatt y cols. ⁽³⁷⁾ quienes reportaron que la sobre-expresión de Hsp90 mediante transfección “*in vivo*” reduce el daño cardiovascular inducido por isquemia/reperfusión cardiaca. La inducción de la expresión de Hsp90 en los cardiomiocitos promovió una mayor asociación de eNOS a Hsp90, aumentó la fosforilación activante de eNOS por Akt (Ser1177) y redujo la desactivación por fosforilación de eNOS (Tre497), por lo que la protección conferida resultó en un aumento en la formación de $\cdot\text{NO}$.

Investigaciones de la última década han establecido que la generación de $\cdot\text{O}^{2-}$ es una característica común de todas las isoformas de las NOS. Sin embargo, cada isoforma de las NOS posee características distintivas respecto al sitio de la enzima responsable para la formación de $\cdot\text{O}^{2-}$ y los mecanismos que controlan dicha producción.

⁽⁸⁷⁾.

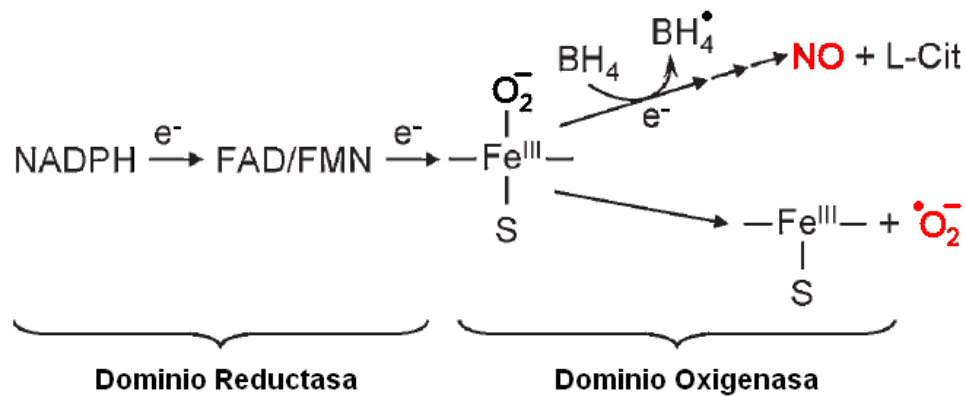


Figura 7. Modelo propuesto para la generación de NO y de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por catálisis de las sintasas de óxido nítrico. Las letras en rojo hacen referencia a las especies reactivas: del oxígeno ($\text{O}_2^{\bullet-}$, ROS) y del nitrógeno (NO , RNS) generadas por las NOS; durante la transferencia de electrones del dominio de reductasa de un monómero de la NOS al dominio de oxigenasa del otro monómero de la NOS.

Con respecto a la isoforma endotelial de eNOS, estudios recientes apoyan la idea de que el efecto dual de eNOS en la generación de NO y de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la fisiología vascular es regulado por Hsp90 ⁽⁵⁷⁾. Tomando como base estos estudios, se ha logrado proponer un modelo para la generación de NO y de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mediante catálisis de las sintasas de óxido nítrico, el cual se muestra en la Figura 7.

Otra evidencia que muestra la participación de Hsp90 en la regulación de la actividad de eNOS se ha observado durante la angiogénesis. Durante este proceso, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) ejerce sus efectos angiogénicos a través de la activación de eNOS. En esta vía, se ha documentado que el VEGF induce la asociación temprana de Ca^{2+} con la calmodulina, lo que promueve la liberación de eNOS de la caveolina I, la cual mantiene a eNOS unida a la membrana en un estado inactivo. El complejo Ca^{2+} /calmodulina también promueve la asociación entre eNOS y Hsp90, donde

finalmente Hsp90 recluta a la proteína cinasa B/Akt para mediar la activación de eNOS, a través de su fosforilación en el residuo de la serina 1177 con la consecuente mayor síntesis de •NO⁽¹¹⁾.

Lo anterior establece una secuencia crítica temporal en la vía de la angiogénesis mediada por •NO, en donde la señalización por VEGF activa la vía eNOS-Hsp90-Akt. En apoyo a esto, Sun y cols.⁽⁷⁸⁾ reportaron que Hsp90 no solo activa la fosforilación de eNOS vía Akt, sino que también regula la transcripción génica y la estabilidad de eNOS.

Estudios recientes han mostrado que las estatinas poseen acciones protectoras adicionales a su propiedad hipocolesterolemizante. En este contexto y de forma interesante, se ha demostrado que las estatinas regulan en forma indirecta la activación de Hsp90, aumentando su fosforilación en los residuos de tirosina⁽¹¹⁾, lo que promueve una mayor síntesis de •NO y neovascularización mediada por eNOS y Akt⁽¹²⁾.

El efecto de Hsp90 en la vía de eNOS/•NO no solo radica en la activación de esta enzima, sino también se ha demostrado que Hsp90 estabiliza a la guanilato ciclasa soluble (GCs) que es una proteína clave en la señalización de •NO. Lo anterior se demostró bajo condiciones de citotoxicidad por grandes cantidades de •NO, donde el daño endotelial se asoció con una reducción en la estabilidad de la GCs por Hsp90⁽²⁾.

La relevancia del desacople entre eNOS y Hsp90 se ha también documentado en la diabetes mellitus, enfermedad que se caracteriza por una deficiencia en la biodisponibilidad de •NO. Estudios recientes *in vitro* e *in vivo* demostraron que concentraciones elevadas de glucosa en el medio del cultivo celular y en un modelo de diabetes tipo I en la rata, inducen la fosforilación de Hsp90 α en la treonina 89 por la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc, lo cual produce su translocación hacia el exterior de las células endoteliales reduciendo la actividad de eNOS, y por lo tanto, la producción de •NO.

Este fenómeno es revertido cuando se previene la translocación de Hsp90, lo cual se consiguió por un cambio en la treonina 89 por alanina de la Hsp90 α , evitando así que PKA pueda fosforilar a Hsp90 y transportarla a la membrana ⁽³⁹⁾.

Lo anterior sugiere que Hsp90 puede ser un nuevo blanco terapéutico para prevenir el daño endotelial observado en diversas enfermedades en las cuales se requiera aumentar la producción de $\cdot\text{NO}$ o bien, prevenir o favorecer la formación de vasos sanguíneos *de novo* (neoangiogenesis). Los efectos de Hsp90 en la fisiología vascular se resumen en la Figura 8.

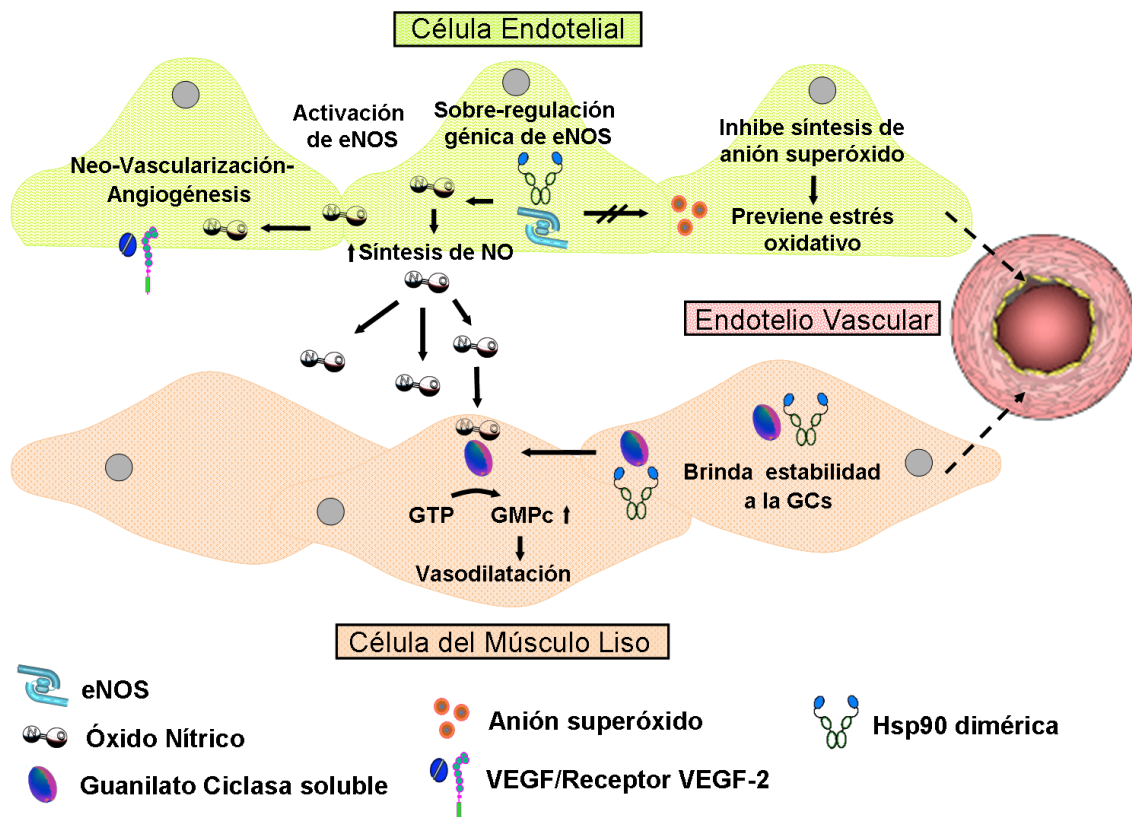


Figura 8. Significado fisiológico vascular de la Hsp90 y las vías que regula para el mantenimiento del tono vascular y la angiogenesis.

Hsp90 en la fisiología renal.

A pesar de la implicación de las proteínas de choque térmico de 90 kDa en múltiples procesos celulares, poco se conoce del papel que juegan en la fisiología y fisiopatología renal.

En 1990, Matsubara y cols. ⁽⁴⁷⁾ desarrollaron un anticuerpo dirigido contra Hsp90 de la rata y observaron la presencia de inmuno-tinción en el citoplasma de las células de los túbulos proximales y distales de la corteza renal. Sin embargo, se desconocía cual isoforma de Hsp90 se expresaba en el riñón y menos aún el patrón de expresión de cada isoforma. En un trabajo previo de nuestro laboratorio caracterizamos la expresión y localización de la Hsp90 α y de la Hsp90 β en la nefrona ⁽⁶⁰⁾. Primero nos dimos a la tarea de evaluar la expresión de cada isoforma y encontramos que los niveles de RNAm y de proteína fueron mas abundantes en la médula renal que en la corteza. El análisis de inmunohistoquímica mostró que la Hsp90 α y la Hsp90 β se localizaban desde el glomérulo hasta la punta de la papila y que el patrón de expresión fue muy similar entre ambas isoformas. Específicamente, observamos que en la corteza, la Hsp90 α y la 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 una importante inmunotinción en la membrana apical.

La presencia de Hsp90 en el borde en cepillo del túbulo proximal no parece ser exclusiva de la subfamilia de Hsp90, ya que en dos trabajos anteriores al nuestro, Aufrich y cols. ⁽³⁾ y Schober y cols. ⁽⁶⁶⁾, observaron el mismo patrón de localización para la Hsp25, que fue su presencia en el glomérulo y en menor proporción en la vasculatura con una fuerte inmuno-tinción en la membrana apical de las células del túbulo proximal y una ligera inmuno-tinción en el citoplasma y núcleo de este epitelio.

En este estudio también observamos que en la médula externa, la Hsp90 α y la Hsp90 β están localizadas en el citoplasma de las células del asa ascendente gruesa de henle, mientras que en la médula 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 ⁽⁶⁰⁾.

La distribución y la expresión específica de la Hsp90 α y de la Hsp90 β observada a lo largo de la nefrona, sugieren que estas proteínas podrían estar involucradas en la regulación de la filtración glomerular, así como en la reabsorción y la secreción tubular, funciones características de la nefrona.

Dentro de las funciones de Hsp90 en la fisiología renal, la más conocida es su participación en la estabilización, activación y translocación del receptor de mineralocorticoide, a través de formar un hetero-complejo con Hsp70, Hip (p48), Hop (p56) y Hsp40. Una vez que la aldosterona se une al complejo receptor a mineralocorticoide/Hsp90/co-chaperonas, el complejo hormona/receptor es translocado 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 lo son: el canal epitelial de sodio (ENaC), el cotransportador de sodio-cloro (NCC), el canal de potasio (ROMK) y la bomba Na-K ATPasa ^(31, 46, 69), con lo que la aldosterona ejerce su acción clásica que es promover la reabsorción de sodio y la excreción de potasio.

Además del papel de Hsp90 en la reabsorción de sodio en el túbulo distal y colector, Ortiz y cols. ⁽⁵⁴⁾ mostraron que esta proteína también está implicada en regular la actividad del cotransportador de Na⁺K⁺:2Cl⁻ en el asa de Henle. Estos autores observaron que cuando eNOS está en el citoplasma de estas células epiteliales, el \cdot NO producido por esta isoforma inhibe al cotransportador, pero cuando eNOS se transloca a la membrana basolateral y no produce \cdot NO, esto activa al cotransportador. Interesantemente, también demostraron que Hsp90 es la responsable de transportar a eNOS, ya que cuando

incubaron las asas de Henle aisladas y perfundidas con geldanamicina se evitó que eNOS fuera trasladada a la membrana basolateral y por lo tanto la actividad del cotransportador se redujo ⁽³²⁾. Estos resultados sugieren que Hsp90 participa también en la reabsorción de sodio en el asa de Henle.

Otra función recientemente descrita de Hsp90 es su participación en la adaptación a la hiperosmolaridad. La osmolaridad de la médula renal es de 4 a 5 veces mayor que la encontrada en la corteza y en otros tejidos y está continuamente expuesta a cambios en la concentración de osmolitos que son finamente sensados por una proteína conocida como TonEBP (Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein), la cual pertenece a la familia de factores nucleares NFAT (por sus siglas en inglés: Nuclear Factor of Activated T cell). TonEBP protege a las células epiteliales del estrés hiperosmótico activando la transcripción de genes como: el cotransportador Na⁺/mio-inositol, el cotransportador Na⁺/Cl⁻/betaina, Na⁺/Cl⁻/taurina y Aldosa reductasa. A este respecto, Chen y cols. ⁽¹⁶⁾ utilizando células embrionarias de riñón humano (HEK-293) transfectadas con TonEBP, mostraron por co-inmunoprecipitación que este factor forma un complejo con proteínas de estrés, dentro de las cuales destacan primordialmente la Hsp90 α y la Hsp90 β . En condiciones de hiperosmolaridad, la inhibición de Hsp90 por geldanamicina disminuyó tanto la expresión de TonEBP, como su actividad transcripcional. Estos resultados sugieren que en la médula renal, la citoprotección necesaria frente al estrés producido por hiperosmolaridad, es mediada por Hsp90.

Los estudios realizados hasta el momento sobre el papel fisiológico de Hsp90 son muy escasos y menos aún se conoce el papel específico de Hsp90 α y de Hsp90 β . De forma general podemos resumir que Hsp90 participa en la regulación de la reabsorción de sodio y en reducir el estrés osmótico en la médula renal. Así mismo, estudios muy recientes de nuestro laboratorio sugieren que Hsp90 está implicada también en el mantenimiento de la función renal. Considerando que el *NO producido por eNOS en el endotelio de los capilares glomerulares regula el tono vascular renal y la filtración glomerular, hemos

observado que la inhibición de Hsp90 produce vasoconstricción renal y disminución de la filtración glomerular, lo que se asocia con una reducción en la producción de NO , lo que a su vez resultó en cambios en la fosforilación y en la dimerización de eNOS ⁽⁵⁹⁾.

Hsp90 en la fisiopatología renal

En cuanto a condiciones fisiopatológicas renales, se ha encontrado que la intoxicación con metales pesados como mercurio, zinc, cobalto, hierro y arsénico, así como fármacos nefrotóxicos, como Gentamicina y Cisplatino producen un aumento de la expresión de Hsp90 en los túbulos renales, principalmente en el segmento S3 del túbulo proximal ⁽¹⁰⁾. Aunado a esto, Morita y col. ⁽⁵²⁾ demostraron mediante Western blot e inmunohistoquímica, un aumento en la expresión de la Hsp73 y la Hsp90 después de 60 min de isquemia renal unilateral en la rata.

En otro estudio, se observó que la inducción de estas proteínas, durante el daño renal por isquemia/reperfusión se localizó en el túbulo proximal y en células de asa de henle, comprobando que el aumento de estas proteínas persiste en la regiones de regeneración celular ⁽⁸¹⁾. De manera similar, Komatsuda y cols. ⁽³³⁾ reportaron un caso clínico de un paciente con insuficiencia renal aguda, oliguria e hipertensión severa, en donde 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 tubular.

En la fisiopatología de la isquemia renal, el daño tubular observado se asocia con una pérdida de la polaridad de la membrana celular de las células del epitelio tubular. A este respecto Bidmon y cols ⁽⁹⁾, usando el modelo de isquemia bilateral en la rata, mostraron mediante análisis de Western blot que la bomba de sodio potasio ATPasa se relocaliza de la membrana basolateral al citoplasma y que es indispensable la presencia de Hsp90 para trasladar y estabilizar a la bomba del citoplasma hacia la membrana basolateral y con ello nuevamente restaurar la polaridad de la membrana celular.

La evidencia descrita hasta el momento muestra que Hsp90 participa en diversas funciones en el tejido renal, dentro de las que destacan: 1) regular la reabsorción de sodio, a través de estabilizar y activar al receptor a mineralocorticoides y regular la actividad del cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+:\text{2Cl}^-$; 2) mantener el gradiente electroquímico, al estabilizar a la bomba de sodio potasio ATPasa; 3) regular la producción de *NO mediante la interacción con eNOS y favorecer su activación por la proteína cinasa B/Akt; 4) sin menospreciar su principal función de chaperona que consiste en estabilizar o aumentar la actividad de diversa proteínas que parecen conservar la homeostasis renal, como se muestra en la Figura 9.

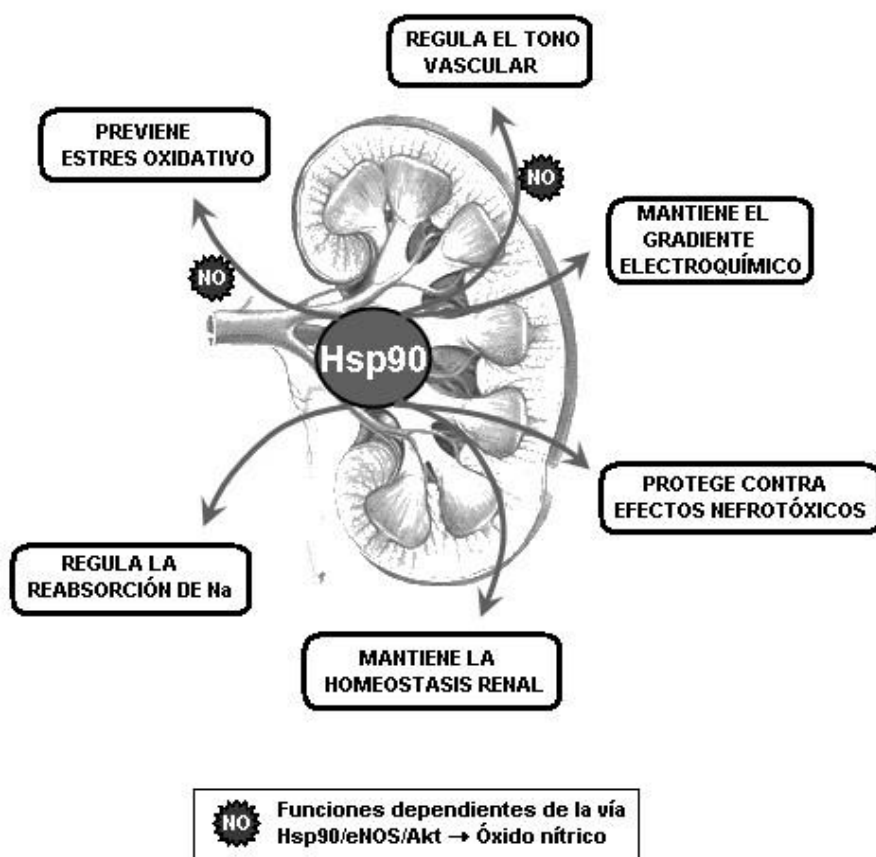


Figura 9. Participación de Hsp90 en procesos celulares que regulan la fisiología renal.

Sin embargo, se requieren más estudios que permitan dilucidar la función individual de Hsp90 α y de Hsp90 β en diversas vías de señalización, no solo en la fisiología renal, sino también en diversas condiciones fisiopatológicas, que hasta ahora no han sido exploradas.

Antecedentes directos

En un estudio reciente de nuestro laboratorio, se encontró que Hsp90 α y Hsp90 β se expresan en forma muy abundante en todo el tejido renal de la rata, siendo mayor su expresión en la médula renal que en la corteza renal. Mediante inmunohistoquímica, también observamos que se encuentran localizadas en la mayoría de las estructuras de la nefrona, pero no se observó diferencia en el patrón de localización de cada isoforma ⁽⁶⁰⁾.

Actualmente existen algunos inhibidores de Hsp90 como geldanamicina, radicicol y 17-AAG que se acoplan al sitio de unión a ATP ubicado en el extremo amino terminal (NH₂t) de Hsp90, siendo el mismo sitio donde interactúan la mayoría de sus proteínas cliente ^(58, 83, 84, 55).

Un estudio reciente de nuestro laboratorio mostró que la inhibición de Hsp90 con radicicol reduce la filtración glomerular y la excreción de sodio en ratas normales, efectos muy probablemente mediados por menor producción de •NO ⁽⁵⁹⁾. Esta evidencia apoya fuertemente que Hsp90 participa en la regulación de la hemodinámica renal, sin embargo se requiere estudiar a fondo los mecanismos responsables de este efecto.

Así también, se conoce que la isquemia renal aguda, induce alteraciones en la expresión de muchos genes, interrumpiendo numerosos procesos metabólicos. Algunas de estas respuestas moleculares han sido denominadas “maladaptative” debido a que estas exacerban el daño tubular inducido por isquemia, entre las que se encuentra alteraciones en la actividad de la NOS ⁽²⁴⁾. En consecuencia, cuando el daño es intenso o

sostenido, se puede conducir a la muerte de algunas células; siendo este fenómeno observado preferentemente en el segmento S3 del túbulo proximal ^(7, 48).

Por lo tanto, el modelo de isquemia/reperfusión es un modelo útil que nos puede permitir estudiar el papel que juega Hsp90 en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Debido a que se han reportado diferencias funcionales entre Hsp90 α y Hsp90 β , que parecen ser dependientes del grado de interacción con las proteínas clientes en torno a su ambiente celular, la sobre-expresión o silenciamiento de forma individual de cada isoforma tendrá un efecto distinto sobre la vía de señalización para la síntesis de óxido nítrico en estudios *in vitro*.

La sobre-expresión de Hsp90 α por transfección *in vivo* favorecerá la vía de señalización para la síntesis de óxido nítrico. Mientras que el silenciamiento de Hsp90 α mediante RNAs de interferencia producirá el efecto contrario

Objetivo General:

Estudiar el papel de las proteínas de choque térmico, Hsp90 α y Hsp90 β , en la regulación de la vía de señalización de la la sintasa de óxido nítrico endotelial y su habilidad para producir óxido nítrico.

Objetivos Particulares:

1. Clonar los genes de Hsp90 α y de Hsp90 β de la rata.
2. Mediante ensayos de transfección, evaluar si la sobre-expresión de Hsp90 α ó Hsp90 β modifica la producción de *NO vía eNOS en células HEK-293.
3. Mediante la utilización de RNAs de interferencias (siRNA), silenciar los genes de Hsp90 α y/ó de Hsp90 β en células HEK-293 y evaluar si el silenciamiento modifica la producción de *NO en células HEK-293.
4. Estudiar el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α mediante transfección intrarenal, sobre la función renal normal.
5. Estudiar el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α mediante transfección intrarenal, sobre la función renal ante un daño inducido por isquemia/reperfusión.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS.

Clonación de los genes Hsp90 α y Hsp90 β de rata.

A partir de RNA total extraído del tejido de médula renal de rata Wistar macho, se obtuvo el DNA complementario (DNAc) por una reacción de RT-PCR. La integridad del RNA aislado se examinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la concentración se determinó mediante la absorbancia de luz UV a 260 nm. Una vez obtenido el DNAc se montó una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos sentido y antisentido diseñados para amplificar cada isoforma de Hsp90. Los oligonucleótidos sentido para Hsp90 α y Hsp90 β fueron 5' AAGGAAAAAGCGGCCGCTCGTCAAGAAAGGAAATGCCTGAGGAA 3' y 5' AAAGCGGCCGCTGCCAAGATGCCTGAGGAA 3'; respectivamente. Mientras que los oligonucleótidos antisentido fueron: 5' CTAGTCTAGAGAGCCTTTAATCCACTTCCTAGTCTAG ATTCTGGTTCC 3' y 5' CTAGTCTAGATTCTGG TGAAGCCTAGTCTACTTC 3', respectivamente. En los oligonucleótidos sentido, un sitio de restricción *NotI* fue incluido en la secuencia, mientras que en los oligonucleótidos antisentido, un sitio de restricción *XbaI* fue introducido. Se clonaron los fragmentos amplificados de 2260 pb para Hsp90 α y 2220 pb para Hsp90 β dentro de los vectores de expresión pcDNA3.1 (+) o pcDNA3.1/NT-GFP (GFP, Proteína Verde Fluorescente por sus siglas en inglés) (Invitrogen) con ayuda de los sitios de restricción *NotI* y *XbaI*. La identidad y orientación de los genes dentro del vector se confirmaron por secuenciación automática y análisis de restricción enzimática.

Animales de estudio.

Se incluyeron 32 ratas Wistar macho de entre 250-300 g y se dividieron en 4 grupos de 8 ratas cada uno. Los grupos de ratas se organizaron de la siguiente manera: 1) ratas operadas falsamente (Sham); 2) ratas sham que recibieron lipofectamina 2000 por la arterial renal, 3) ratas que se sometieron a isquemia bilateral de 30 min y reperfusión de 24h; y 4) ratas transfectadas con el pc-Hsp90 α vía la arteria renal 48 horas antes de inducir I/R.

Isquemia/reperfusión (I/R) renal.

Los animales se anestesiaron empleando pentobarbital sódico a una dosis de 30 mg/kg de peso por vía intraperitoneal. Una vez anestesiado el animal se colocó en una mesa para cirugía termoregulada a 37 °C conectada a un termómetro rectal durante toda la cirugía. Para producir el daño por I/R se realizó una incisión media en el abdomen y se disecó la arteria renal en ambos riñones, a las cuales se le colocó un clip en cada arteria por 30 min (tiempo de isquemia) para impedir el flujo sanguíneo. Se retiraron los clips y se comprobó la reperfusión por cambio de coloración del tejido renal. Inmediatamente después, los animales se suturaron y se esperó a que se recuperaran de la anestesia para finalmente mantenerlos en observación en jaulas metabólicas durante 24 h (tiempo de reperfusión).

Obtención del tejido renal transfectado.

Una vez que se cumplió el tiempo post-transfección (3 días), se extrajeron ambos riñones del animal y se separan macroscópicamente en corteza y médula renal, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Transfección “in vitro” de los genes de Hsp90 α y de Hsp90 β .

Con la finalidad de comprobar la expresión de los genes de Hsp90 α y de Hsp90 β dentro de los vectores de expresión pcDNA3.1 y pcDNA3.1/NT-GFP se realizó una transfección mediada por lípidos catiónicos *in vitro* utilizando como vehículo Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*). Para los experimentos se utilizaron células embrionarias de riñón humano (HEK-293, por sus siglas en inglés, Human Embryonic Kidney), utilizándose 1 o 4 μ g de pcHsp90 α o pcHsp90 β respectivamente, más 4 μ l del reactivo *Plus Reagent* (*Invitrogen*), con el fin de optimizar la formación de complejo DNA-liposomas. Las transfecciones se realizaron en placas para cultivo de 6 pozos ó en su defecto, con el fin de obtener una mayor cantidad de células transfectadas, los experimentos se realizaron en placas de 90 mm. Se realizó una curva tiempo-eficiencia de transfección, para optimizar el tiempo de transfección que fue de 48 h. Posteriormente,

las células se lavaron una vez con PBS y se colectaron por tripsinización, procediendo a la extracción de RNA y de proteínas totales, mediante el reactivo Trizol (*Invitrogen*) o en búfer de lisis ELB, respectivamente.

Transfección de RNA de interferencia para Hsp90 α (siRNA-Hsp90 α) y Hsp90 β (siRNA-Hsp90 β) en células HEK-293.

El siRNA correspondiente a la secuencia blanco para el gen de Hsp90 α de rata (número Cat. 4390818, siRNA-Hsp90 α) o para el gen de Hsp90 β de rata (Número Cat. AM16831, siRNA-Hsp90 β) se adquirieron de Ambion Inc. (Austin, TX). En todos los experimentos se incluyó un siRNA que sirvió como control negativo (Cat. Número AM4613). En las placas para cultivo, se sembraron células HEK-293 en proliferación (con el 70-90% de confluencia) y se transfectaron con 100 nM de siRNA-Hsp90 α o siRNA Hsp90 β . Después de 24 horas de la transfección, se realizó un análisis de Western blot para examinar el silenciamiento de las proteínas blanco y se cuantificaron los niveles de óxido nítrico producidos en cada grupo de células.

Transfección intra-renal del plásmido pcDNA3.1/ Hsp90 α en la rata.

La transfección *in vivo* se realizó vía la arteria renal del riñón izquierdo de la rata utilizando el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o su siRNA específico (20-30 μ g) y lipofectamina 2000 como vehículo. A los 2 días post-transfección, los animales se sometieron, isquemia bilateral de 20 min con un periodo de reperusión de 24 h, a excepción de los grupos control. En cada grupo de animales experimentales se incluyó un grupo de ratas que se utilizaron para realizar estudios histológicos de cada riñón, transfectado y control. Una representación esquemática de como se efectuó la transfección *in vivo* de Hsp90 α vía la arteria renal en la rata se muestra en la Figura 10.

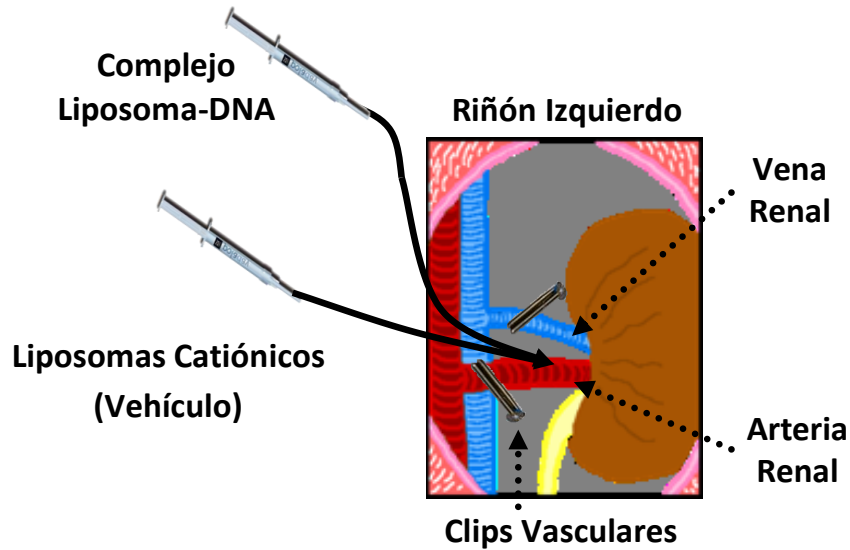


Figura 10. Representación esquemática de la técnica empleada para la transfección *in vivo* de Hsp90 α vía la arteria renal en la rata. Posterior al disecamiento, tanto de la arteria como de la vena renal del riñón izquierdo de la rata, se obstruyó la circulación sanguínea con el empleo de clips vasculares, por un máximo de 1.5 min. Lo anterior permitió 3 eventos: 1) la liberación del complejo liposomas-DNA o vehículo dentro de la arteria renal, empleando una jeringa de insulina, 2) se brindó el tiempo necesario para que la herida realizada en la arteria cicatrizara, y 3) se brindó el tiempo necesario para que la mayoría del complejo liberado fuera transfectado en las células del tejido renal. Al término de éste proceso, se retiraron los clips y el flujo sanguíneo fue restaurado.

ESTUDIOS MOLECULARES.

Extracción de RNA total y RT-PCR en tiempo real.

El RNA total se extrajo de cada muestra (células HEK-293 para los experimentos *in vitro* o corteza y médula de cada riñón, para los experimentos *in vivo*) empleando el reactivo Trizol (*Invitrogen*). La pureza e integridad del RNA total extraído se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa (TR), para luego someter el DNAc obtenido a análisis por PCR en tiempo real para eNOS, Hsp90 α y Hsp90 β , y empleando el gen 18S eucarionte (pre-designed assay reagent

Applied by ABU, external run) como gen control, así como para corregir las variaciones en la carga de DNAC y/ó la eficiencia en la reacción de amplificación. La cuantificación relativa de la expresión génica de Hsp90 α y Hsp90 β se llevó a cabo usando el método comparativo de CT.

Análisis de Western Blot.

Las proteínas se extrajeron por homogenización (células o corteza y médula renal) en 4 volúmenes de buffer de lisis (búfer ELB, 50mM HEPES, 250mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, 10 mM NaF, 50 mM BGP, 1 mM Na₂VO₃ e inhibidores de proteasas (Roche, No. Cat. 11 873 580 001). Los homogenados se centrifugaron a 15000 g por 20 min., se obtuvo el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

La electroforesis en geles de acrilamida se realizó empleando 25 o 50 μ g de proteínas en geles desnaturalizantes al 8.5%. Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ, USA) y bloqueándola en búfer de lavado (TBS-Tween) con 5% de albúmina. Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos para Hsp90 α , Hsp90 β , así como β -actina como proteína control. Las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia por autorradiografía de las bandas y se cuantificaron por análisis densitométrico.

Determinación del estado de fosforilación de la sintasa de óxido nítrico endotelial.

El estado de fosforilación de eNOS se determinó mediante ensayos de WB empleando fosfo-anticuerpos (pAb) específicos para los residuos de Serina 1179 (Ser1179, fosforilación activante) y Treonina 497 (Tre497, fosforilación inactivante). Los anticuerpos pAb-eNOS-Tre497 y pAb-eNOS-Ser1179 (Cell Signaling) se emplearon a una dilución 1:500 en TBS-Tween con 5% de albúmina.

Análisis de la conformación monómero/dímero de Hsp90.

La conformación de Hsp90, se estudió por análisis de WB empleando proteínas extraídas en condiciones no-desnaturalizantes y utilizando buffer Laemli, sin β -mercaptoetanol y sin calentamiento previo al corrimiento electroforético. La electroforesis se realizó en geles de acrilamida sin SDS al 7.5% y a 4°C. Una vez terminado el corrimiento electroforético, los geles se transfirieron a una membrana de di-fluoruro de polivinilo (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ, USA) para realizar el WB empleando anticuerpos para Hsp90 α y Hsp90 β , descrito previamente.

Estudios de co-inmunoprecipitación (IP).

48h pos-transfección, las células cultivadas y transfectadas con pcDNA/Hsp90 α , pcDNA/Hsp90 β o grupos controles se colectaron y lisaron empleando buffer ELB. La proteína eNOS se inmunoprecipitó utilizando un kit de inmunoprecipitación con proteína G (Sigma Aldrich, Inc. de St. Louis, MO). Cada inmunoprecipitación se optimizó empleando de 3 a 5 μ g de anticuerpo anti-eNOS (BD Transduction Laboratories™, No. Cat. 610297) y 1 mg de proteína total.

Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron por calentamiento con buffer Laemmli. Posteriormente, se efectuó su electroforesis en geles SDS-PAGE al 8.5% y transferidas a membranas de PVDF. La membrana se bloqueó con albúmina al 5% (BioRad) en TBS-Tween (0,1%) y ensayadas con anticuerpo anti-eNOS, Hsp90 α y Hsp90 β (Abcam Inc., Cambridge, MA; No. Cat. ab74248 y ab80159, respectivamente). Posteriormente, las membranas se sometieron a un lavado conocido como stripping y se volvió a realizar el Western blot ahora con el anticuerpo anti-Hsp90 β (dilución 1:5000, Abcam Inc., Cambridge, MA) y anticuerpo anti-eNOS (dilución 1:500) con la finalidad de demostrar la misma cantidad de eNOS inmunoprecipitada en todas las muestras.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.

Detección y medición de nitritos en células HEK-293.

Las células HEK-293 transfectadas con pcDNA/Hsp90 α o pcDNA/Hsp90 β se colectaron y lisaron en buffer de lisis (ya descrito para los análisis de Western blot). El lisado final obtenido se utilizó para detectar y cuantificar los nitratos y nitritos (NO₃/NO₂) empleando el ensayo colorimétrico para la detección de óxido nítrico (No.Cat. NB98, Oxford Biomedical Research).

Cuantificación de nitritos y nitratos en orina y en lisados celulares.

La excreción urinaria de los metabolitos estables de la síntesis de óxido nítrico (NO₂/NO₃, nitritos y nitratos) se determinó por la conversión de nitratos a nitritos usando la enzima *Nitrato Reductasa*. Los nitritos totales se detectaron a una absorbancia de 540 nm, expresándose la cantidad total de óxido nítrico en las muestras como NO₂/NO₃ urinarios en μ M/ μ g de proteína. En la Figura 11 se representa el mecanismo de detección de nitratos y nitritos empleando el reactivo de Griess ⁽²⁸⁾.

Para la determinación en muestras de orina se partió de una dilución 1:4 en agua destilada de cada muestra de orina final colectada en jaulas metabólicas durante la reperusión de 24h de cada grupo de animales. La técnica empleada en la cuantificación es la descrita por el ensayo comercial colorimétrico.



Figura 11. Mecanismo de detección de nitratos y nitritos (metabolitos estables de la síntesis de óxido nítrico) empleando el reactivo de Griess.

Detección de anión superóxido (O^{2-}) en células HEK-293.

Para la determinación de los niveles intracelulares de O^{2-} cada grupo de células fueron teñidas con hidroetidina (polysciences, Inc). La detección se basó en la permeabilidad de la hidroetidina para entrar a la célula y en presencia de anión superóxido es deshidrogenada a bromuro de etidio, el cual se intercala en el DNA de la célula y emite fluorescencia de color rojo cuando se excita a 535 nm; esta fluorescencia puede ser detectada y cuantificada por medio de citometría de flujo.

Para la detección de superóxido se preparó la solución de tñido disolviendo 7 mg de hidroetidina en 1 ml de N,N-dimetilacetamida (*Sigma*). La solución de trabajo (14 mg/ml) se obtuvo añadiendo 20 μl de la solución de tñido a 10 ml de PBS. Esta solución fue filtrada utilizando una membrana de 0.22 μm de poro (*Millipore*). A las 48 h de transfección se removió el medio de cultivo de las células y se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos pH=7.4. Posteriormente se añadió 1 ml de la solución de tñido y las células se incubaron por 15 min protegidas de la luz. Al final de la incubación se removió la solución de tñido y las células se lavaron nuevamente con PBS por tres veces. Las células se recuperaron y se resuspendieron en PBS, manteniéndose en frío para ser analizadas en el citómetro de flujo. La información se capturó de 10,000 células de cada grupo de transfección en un citómetro FACScan (Becton Dickinson) empleando una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 610 nm. Los datos se analizaron con el programa CellQuest.

Niveles de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) en células HEK-293.

La cantidad de peróxido de hidrógeno se determinó en lisados celulares de cada grupo de transfección utilizando el estuche comercial Amplex red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (*Invitrogen*), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

La determinación se basa en que en la presencia de peroxidasa, el reactivo Amplex Red reacciona con el H_2O_2 produciendo un producto de oxidación rojo fluorescente; la resurfina, la cual es cuantificada por espectrofotometría.

Para la determinación se mezclaron 50 μ l de lisado celular y 50 μ l del reactivo del estuche comercial, las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente protegidos de la luz. La absorbancia obtenida a 560 nm fue extrapolada con la curva estándar para determinar la concentración. La cantidad de H_2O_2 detectada se expresó en μ moles/ μ g de proteína.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Urinario.

Con la finalidad de estudiar si la transfección de pcDNA/Hsp90 α indujo cambios en la producción de anión superóxido, se determinó la concentración de peróxido de hidrógeno en la orina, tanto de los animales transfectados como de los controles, empleando el estuche comercial Amplex red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Assay Kit (*Invitrogen*).

El ensayo se realizó empleando una curva estándar de peróxido de hidrógeno de 1 a 10 μ M. Las muestras fueron diluidas en búfer de trabajo 1X y se colocaron 50 μ l de cada solución estándar o muestra en una placa de ELISA. Posteriormente, se agregaron 50 μ l de la solución Amplex Red/HRP conjugado y las muestras se incubaron durante 30 min protegidas de la luz. Finalmente, la placa fue leída a 560 nm y la concentración de H_2O_2 fue determinada por interpolación de los datos con la curva patrón obtenida de los estándares. Los resultados se expresaron como nmol/ml de H_2O_2 .

Lipoperoxidación en tejido renal.

El nivel de lipoperoxidación se evaluó en homogenados de riñón mediante la técnica de TBARS en todos los grupos de animales. Esta técnica se basa en la cuantificación de la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico (malondialdehído), los

cuales son productos del ataque nucleofílico sobre los ácidos grasos poli-insaturados de las membranas celulares, ocasionado por la formación de radicales libres dentro de la célula. Para la determinación se peso 0.1 g de corteza renal y se homogenizó en agua destilada, consecutivamente se colocaron 150 μ l del homogenado en un tubo y se les adicionó 350 μ l de Tris-HCl 150 mM, pH=7.4. Las muestras se agitaron e incubaron a 37°C por 30 minutos adicionándoseles 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375% p/v en ácido tricloroacético (TCA) al 15%, en seguida las muestras se incubaron 45 minutos a 95°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se leyó por espectrofotometría a una densidad óptica de 532nm. Simultáneamente, se determinó la concentración de proteínas en una dilución 1:10 del homogenado por el método de Bradford, con una curva de referencia de 100 a 1000 mg/ml.

Finalmente, el nivel de lipoperoxidación se calculó por la siguiente fórmula: $C = A / \epsilon l$ donde: A= Absorbancia de la muestra, ϵ = coeficiente de extinción del malondialdehido ($1.56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y l= longitud de la celda (1cm para Shimadzu UV-1203) y se corrigió por la concentración de proteína de cada muestra, se expresa en nmoles de malondialdehido sobre mg de proteína (nmoles MDA/mg proteína).

Creatinina sérica y urinaria.

Los niveles de creatinina se determinaron tanto en suero como en orina mediante la técnica de reacción de punto final con ácido pícrico e hidróxido de sodio en un analizador de creatinina II de Beckman. Los resultados obtenidos fueron utilizados para calcular la depuración de creatinina según la fórmula $U \times V / P$. En donde U, es la concentración urinarias de creatinina; V, es el volumen urinario; y P, es la concentración de creatinina plasmática. La depuración de creatinina constituye un índice confiable de la filtración glomerular.

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS.

Los parámetros fisiológicos medidos en cada grupo de animales fueron: la presión arterial media (PAM) y el flujo sanguíneo renal (FSR).

Flujo sanguíneo renal (FSR) y Presión arterial media (PAM).

Para la determinación de la presión arterial media, se cateterizó una de las arterias femorales de la rata y con el uso de un polígrafo de Grass se monitoreo la PAM durante todo el experimento. Una vez cateterizado, al animal se le realizó una incisión media en el abdomen y se disecó cuidadosamente la arteria renal izquierda para colocar una sonda de ultrasonido (Transonic System Flujometer). De esta manera, se registró de forma continua el FSR durante 30 min, hasta alcanzar un valor de FSR estable. Durante la determinación, se mantuvo la presión arterial media estable y al animal completamente anestesiado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En los estudios en los cuales se comparan más de dos grupos, los resultados se analizaron por ANOVA de una vía y las diferencias entre cada grupo en estudio se determinaron con la prueba de Bonferroni. Cuando solo se compararon 2 grupos, los datos se analizaron por una prueba t de Student. La diferencia se consideró significativa cuando el valor de p fue menor a 0.05. Los datos se presentan como el promedio +/- el error estándar. Para la representación gráfica de los datos se utilizó el programa Sigma Plot 10.0.

IV. RESULTADOS

Con la finalidad de conocer el papel regulatorio de las proteínas de choque térmico de 90 kDa, Hsp90 α y Hsp90 β , en la vía de señalización para la síntesis de \cdot NO vía eNOS/Akt, se clonó el gen que codifica para la proteína Hsp90 α que se amplificó a partir de cDNA de riñón de rata utilizando oligonucleótidos específicos, tal como se detalla en metodología. Después de la purificación adecuada del producto de PCR de \approx 2,260 pb (Figura 12), el producto se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1(+), a través del sitio de multi-clonación y utilizando los sitios de restricción *Xba*I y *Not*I.

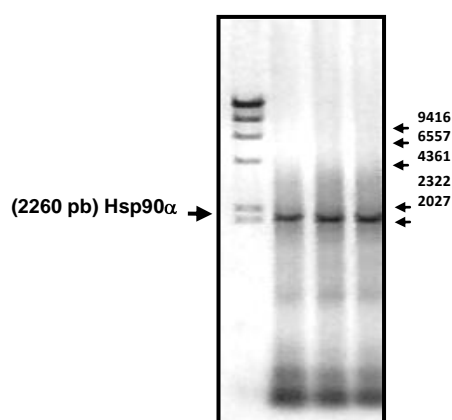


Figura 12. Amplificación del gen de Hsp90 α a partir de RNA total de riñón de rata. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Carril 1, marcador de tamaño en pares de bases (Lambda DNA *Hind*III); y carriles 2-4, producto de PCR amplificado de aproximadamente 2260 pb correspondiente a la secuencia de Hsp90 α .

La clonación del gen Hsp90 α dentro del vector pcDNA3.1(+) se verificó mediante un análisis de restricción con las enzimas *Xba*I y *Not*I, obteniendo dos fragmentos con los tamaños esperados. Una banda de mayor tamaño correspondiente al vector pcDNA3.1 (5428 pb) y una banda de menor tamaño correspondiente al gen de Hsp90 α clonado (2260 pb), como se muestra en la fotografía del gel de agarosa de la Figura 13.

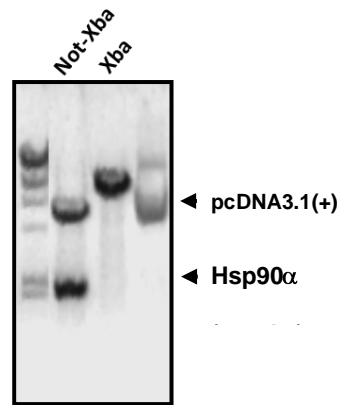


Figura 13. Clonación de Hsp90 α dentro del vector de expresión pcDNA3.1. Análisis de restricción enzimática del plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α . Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, mostrando la liberación de dos fragmentos del plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α sometido a doble restricción enzimática (*Xba*I y *Not*I): un inserto de menor tamaño correspondiente a Hsp90 α y un inserto de mayor tamaño correspondiente al vector de expresión pcDNA3.1.

La caracterización e identificación del gen de Hsp90 α se realizó mediante el empleo de oligonucleótidos sentido y antisentido que comprendían secuencias internas alternadas de aproximadamente cada 400 pb. Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR usando cada par de oligonucleótidos diseñados, con lo que se obtuvieron cinco fragmentos que abarcaron las bases correspondientes: 0-450 pb, 400-850 pb, 800-1250 pb, 1200-1650 pb, 1600-2000 pb y 1900-2250 pb.

La Figura 14, muestra la secuencia final obtenida para el gen de Hsp90 α clonado. Las letras negritas y subrayadas hacen referencia a la secuencia de nucleótidos correspondientes al codón de inicio y de paro de la traducción para la proteína de Hsp90 α , al inicio y al final de la secuencia, respectivamente.

```

agttgcttcagtggtcccgggtgctggttagtcacggttcggtgctgctcattctgccaagatgctgaggaa
accagacccaagaccaaccaatggaggaagagggtcgaaacctttgcctttcaggcagaaattgcc
agttaatgtccttgatcatcaacactttctactcgaacaaagagatctttctgagggagctcatttccaa
ctcctcagacgctctggataagatcagatacagagagcttgaccgaccctagtaaactggactcggggaag
gagctgcacattaatctcattcccacaagcaagaccgaaccctcactattgtggatactggcattggaa
tgaccaaggctgacttgatcaataaccttggcactattgccaagtgcaggcaccaaaccttcatggaggc
tttgaggctggtgcagatatctctatgattggccagtttgggtgttgggtttttactctgctgatttgggt
gctgagaaagtgactgtcatccaagcataatgatgacgagcagtagcctgggagtcctcagctggag
gatccttactgtgaggacagacacaggtgaaccaatgggtcgtggaacaaagggttatcttgcattctaaa
agaagaccaaactgagtatgggaggaaaggagaataaaagaaattgtgaagaaacattctcagtttatt
ggctacccattactctctttgtggagaaggaacgtgacaaggaagtgcagtgatgatgaggctgaagaaa
aggaagagaaagaggaagagaaagaaaaagaagaaaggagctgatgacaagcctgaaatagaagatgt
tgggtctgatgaagaagaagaagagaagaggatgggtgacaagaagaaaaagaagataaaggaaaag
tacattgatcaagaagaactcaacaaaacaaagccgatctggaccagaaatcctgatgacattacgaatg
aagaatacggagagttctacaagagcttaaccaacgactgggaagaacatttggcagtaaaagcatttttc
tgttgaaggacaattagaattccgggctcttctttttgtcccagacgcgctccttttgatctatttgaa
aacagaaagaaaaagaacaacatcaagttgtatgttcgcagagtttttatcatggataactgtgaggagt
taatccccgagtatctgaatttcatcagaggggtgggtgattctgaggatctccctctaaatatttcccg
tgaaatgctgcaacaaagcaaaattctgaaagttatcaggaagaatttgggtcaagaaatgcctagaacta
ttactgaactggctgaagataaagagaactcaaaaagttttatgagcagttctcaaaaaatataaagc
ttggaattcatgaagactctcaaaatcggaagaagcttccagagctgttgagatacacacatctgcttc
tggggatgagatgggttctctgaaggactactgcaccagaatgaaggaaaaccagaagcacatctatttt
atcacaggtgagaccaaggaccaggttgtaactcagccttgggtggaacgtctccgaaagcatggcttag
aagtaatctatatgattgagccattgatgagttattgtgtgcaacagctgaaggaatttggggcaagac
cttgggtgctcagttaccaagaaggactggaacttccagaagatgaagaggaaaagaagaaacaggaagag
aaaaagacaaaatttgagaacctctgcaaaattatgaaggatatttttagagaaaagggttgaaaagggtgg
ttgtgtcaaaccgattgggtgacatccccatgctgtattgtcacaagcacatatggctggacagcaaacat
ggagagaatcatgaaagctcaagccctcagagacaactcaacaatgggttacatggcagcaaaagaacac
ctggagataaacctgatcactccattattgaaaccttaaggcaaaaggcagaggctgacaagaatgaca
agtctgtgaaagatctgggtcatcttctgtgtacgaaacagcactcctgtcttccggcttcagctctggaaga
tccccagaccatgctaacaggatctacaggatgatcaagcttgggtctaggtattgatgaggatgatcct
actgtggatgataaccagtgctgctgtaactgaagaaatgccaccctggaaggagatgatgacacatcac
gcatggaagaagtagactaggttccaccagaactatgtgt

```

Figura 14. Secuencia de Hsp90α obtenida y clonada dentro del vector de expresión pcDNA3.1. El codón de inicio y de paro de la traducción se señala con letras subrayadas, y los oligonucleótidos sentido y antisentido para amplificar y aislar el gen de Hsp90α a partir de RNA total de riñón de rata se señalan con letras sombreadas en gris.

La identidad del gen de Hsp90α clonado, se comprobó al alinear la secuencia, resultando tener el 100% de identidad con un RNAm de 2795 pb, correspondiente a la especie *Rattus norvegicus*, que codifica para la proteína de choque térmico de 86 kDa (Hsp86), con No. de acceso en Pubmed *AJ428213*.

De forma similar, el gen de Hsp90 α también se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1/NT-GFP, que contiene fusionado en su extremo amino terminal el gen que codifica para la proteína verde fluorescente, en los sitios *Xba*I y *Not*I del sitio de multiclonación del vector. El plásmido que se obtuvo de esta clonación fue el pcDNA3.1/NT-GFP/Hsp90 α con un tamaño aproximado de 8500 pb. La clonación fue corroborada mediante restricción enzimática y realizando una electroforesis de los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1%. En la Figura 15, se muestra la electroforesis de los productos obtenidos en gel de agarosa, mostrando el marcador de tamaño, el plásmido que contiene el inserto de Hsp90 α sin digerir, el plásmido digerido con la enzima *Xba*I y la liberación del inserto con las enzimas *Xba*I y *Not*I, respectivamente.

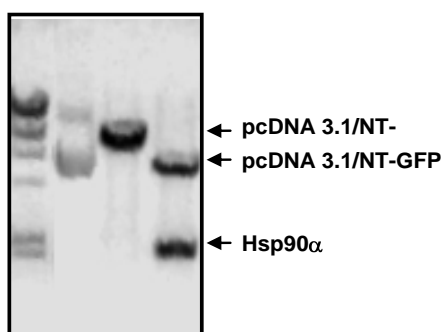


Figura 15. Análisis de restricción enzimática del plásmido pcDNA3.1/NT-GFP/Hsp90 α . Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio comprobando la clonación del inserto de Hsp90 α dentro del vector pcDNA3.1/NT-GFP.

Con la finalidad de determinar la eficiencia de transfección mediante microscopia de epifluorescencia invertida (MEI), se transfectaron células HEK-293 con el plásmido pcDNA3.1/NT-GFP-Hsp90 α . Como se muestra en la Figura 16, las células HEK-293 fueron capaces de expresar de forma eficiente a la proteína Hsp90 α fusionada a la GFP obteniendo una eficiencia de transfección del 80%.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para los estudios de transfección *in vitro* se emplearon diferentes concentraciones del plásmido pcDNA 3.1/Hsp90 α para transfectar células HEK-293.

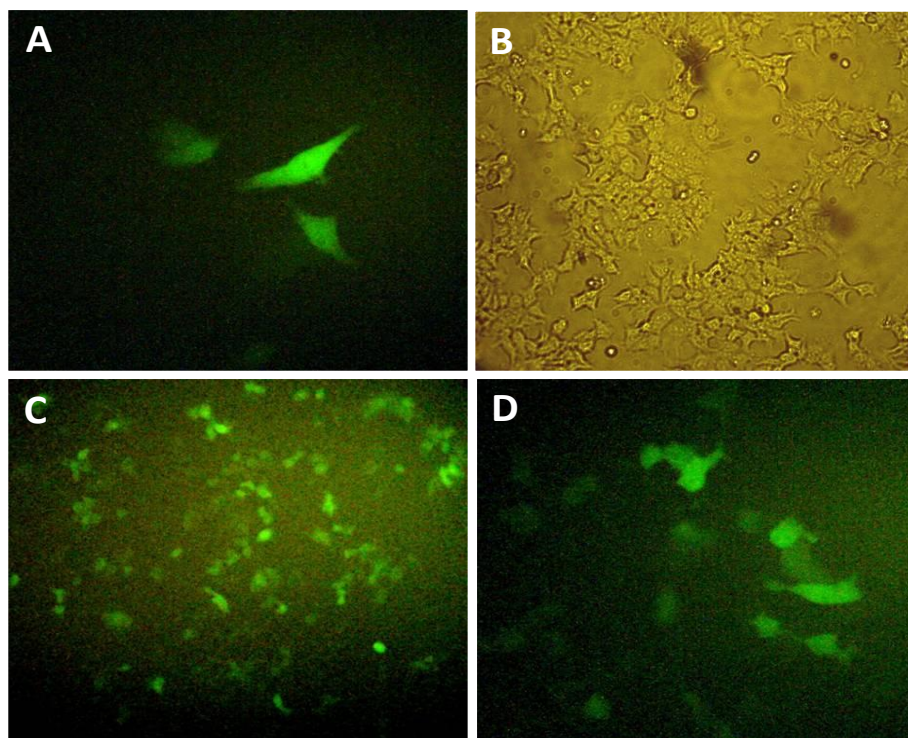


Figura 16. Microscopia de epifluorescencia invertida de células HEK-293 transfectadas. Células HEK-293 transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1/NT-GFP (A y B), y pcDNA3.1/NT-GFP/Hsp90 α (C y D). Magnificación 100X (B y C) y 400X (A y D).

El panel superior de la Figura 17A muestra los resultados obtenidos en el análisis por Western blot para Hsp90 α y β -actina. Se detectaron dos bandas para Hsp90 α , la banda superior corresponde a la Hsp90 α endógena humana (hHsp90 α) que se expresa normalmente en las células HEK-293, y la banda inferior corresponde a la Hsp90 α de rata transfectada (rHsp90 α). La banda correspondiente a rHsp90 α fue detectada en las células que fueron transfectadas con el pcDNA 3.1/Hsp90 α , sin observarse cambios en la

expresión de la Hsp90 α endógena, obteniéndose la mayor sobre-expresión con 1 μ g de pcDNA3.1/Hsp90 α .

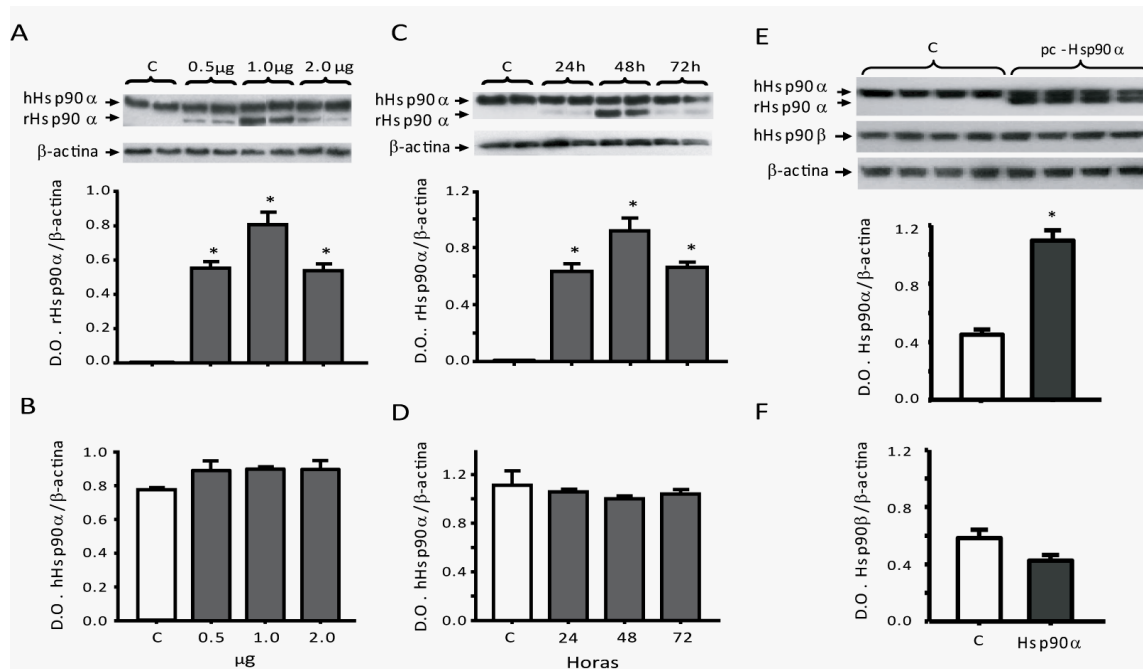


Figura 17. Niveles de proteína Hsp90 α en células HEK-293 transfectadas con diferentes cantidades de constructo de Hsp90 α (barras de color gris), comparado con células HEK-293 tratadas con liposomas (barras blancas), figuras A y B. Curva dosis-tiempo de expresión de Hsp90 α (C y D). Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α sobre los niveles de proteína de Hsp90 β (E y F). * p < 0.05 vs. células transfectadas con pcDNA3.1.

Como se muestra en la Figura 17B, también se probaron diferentes tiempos después de la transfección para determinar las mejores condiciones para sobre-expresar rHsp90 α . Como se muestra en la Figura 17C, la mayor expresión de rHsp90 α se obtuvo después de 48 h (Figura 17D). Otros grupos diferentes de células se transfectaron con las condiciones óptimas y posteriormente los niveles de proteína Hsp90 α y Hsp90 β se detectaron por análisis de Western blot. Como era de esperarse, la transfección con pcDNA3.1/Hsp90 α aumentó los niveles de proteína de rHsp90 α , como se muestra en la

Figura 17E, sin alterar los niveles de expresión de Hsp90 β , como se representa en la Figura 17F. Estos resultados muestran que los anticuerpos empleados para Hsp90 α y Hsp90 β fueron específicos para detectar cada isoforma de Hsp90.

Empleando la misma estrategia de clonación para Hsp90 α dentro del vector de expresión pcDNA3.1, el gen de Hsp90 β se amplificó a partir de cDNA de riñón de rata utilizando oligonucleótidos específicos, tal y como se detalla en metodología. El producto de PCR obtenido de \approx 2220 pb se purificó y se clonó en pcDNA3.1 (+) utilizando los sitios de restricción de las enzimas *NotI* y *XbaI*. Para corroborar la clonación de Hsp90 β dentro del vector pcDNA se realizó un análisis de restricción con las enzimas *XbaI* y *NotI*, *XbaI*, *SacI*, *EcoRI*, *KpnI*, y *MfeI*. Como se muestra la Figura 18, cuando el vector se digirió con *XbaI* y *NotI*, se obtuvieron dos fragmentos, donde la banda de mayor tamaño es la correspondiente al vector pcDNA3.1 y la de menor tamaño a Hsp90 β . Con las enzimas restantes, se obtuvo el tamaño de los fragmentos esperados y que corresponden con la secuencia de Hsp90 β . A este respecto, cabe mencionar que no se obtuvo el tamaño de los fragmentos obtenidos en Hsp90 β cuando Hsp90 α se digirió con las mismas enzimas, obteniéndose un análisis de restricción específico para Hsp90 β .

La secuencia para Hsp90 β se corroboró también por secuenciación automática, la cuál reveló un 100% de identidad con la secuencia de la rata reportada para Hsp90 β en el GeneBank (No. de acceso: DQ022068.2) como se aprecia en la Figura 19.

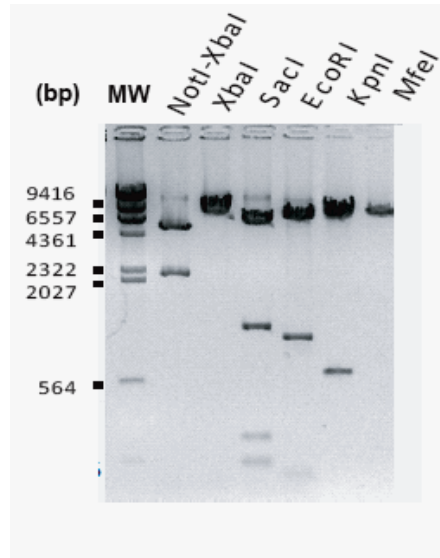


Figura 18. Clonación de Hsp90 β de rata dentro del vector de expresión pcDNA3.1. Análisis de restricción enzimática del plásmido pcDNA3.1/Hsp90 β . Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, mostrando la liberación de dos fragmentos del plásmido pcDNA3.1/Hsp90 β : un inserto de menor tamaño correspondiente a Hsp90 β y un inserto de mayor tamaño correspondiente al vector de expresión pcDNA3.1.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la sobre-expresión de Hsp90 β , las células HEK-293 fueron transfectadas con el plásmido utilizando diferentes concentraciones. Como se muestra en la Figura 20A, la máxima sobre-expresión se logró cuando las células fueron transfectadas con 6 μ g de pcDNA3.1/Hsp90 β . En este caso, solo se detectó una banda correspondiente tanto a la secuencia de Hsp90 β endógena humana, como a la secuencia de rata transfectada. El mejor tiempo para obtener la máxima sobre-expresión de Hsp90 β con 6 μ g de plásmido fue a las 48 h después de la transfección, como se detalla en la Figura 20B).

Grupos independientes de células fueron transfectadas con las condiciones óptimas y los niveles de proteína Hsp90 α y Hsp90 β fueron detectados por análisis de Western blot.

```

CTCGTCAAGATGCCTGAGGAAGTGCACCATGGAGAGGAAGAGGTGGAGACCTTCGCCTTTCAGGCAGAAATG
CCCAGCTGATGTTCCCTCATCATCAACACTTTCTACTCAAACAAGAGATTTTCCTCCGGGAGTTGATCTCTAA
TGCTTCTGATGCCTGGACAAGATTCCGGTATGAGAGCCTGACTGACCCTTCCAAGTTGGACAGCGGGAAGAG
CTGAAGATTGACATCATCCCCAACCTCAGGAACGCACGCTGACTTTGGTGGACACAGGCATTGGCATGACCA
AGGCTGACCTCATAAATAACTTGGGAACCATTGCTAAGTCTGGTACAAAGGCGTTCATGGAGGCTCTCCAGGC
TGGTGCAGACATCTCCATGATTGGGCAGTTTGGTGTGGCTTCTACTCTGCCTACCTGGTGGCAGAGAAAGTG
GTTGTGATCACGAAGCACACGATGATGAGCAGTATGCCTGGGAGTCTTCTGCTGGTGGATCCTTCACTGTCC
GTGCAGACCACGGTGAGCCCATTTGGCCGGGGTACCAAAGTGATCCTTACCTCAAAGAAGACCAGACAGAGTA
CTTAGAGGAGAGGAGGGTCAAGGAGGTGGTGAAGAAACACTCACAGTTCATAGGCTACCCCATCACCCCTCTAT
CTGGAGAAGGAACCGCAGAAAGGAGATCAGTGATGATGAGGCAGAGGAAGAGAAAAGGGGAGAAGGAGGAGGAAG
ATAAGGAGGATGAGGAGAAGCCTAAGATTGAGGATGTGGGATCTGATGAGGAGGATGACAGCGGCAAGATAA
GAAAAAGAAAACAAGAAGATCAAGGAGAAGTACATTGACCAGGAAGAGCTGAATAAGACGAAGCCCATCTGG
ACCAGAAATCCTGATGACATCACTCAAGAGGAATATGGTGAATCTACAAGAGCCTACCAATGACTGGGAAG
ACCATTGGCAGTCAAGCACTTCTCTGTAGAAGGGCAGTTGGAATTCAGGGCATTGCTCTTCATTCCTCCGGCG
AGCTCCCTTTGACCTCTTTGAGAACAGAAGAAGAACAACATCAAATTTGATGTCCGTCGTGTGTTTCATC
ATGGACAGCTGTGATGAGCTGATACCTGAGTACCTCAACTTCATCCGTGGTGTGGTTGATTCCGAGGACCTGC
CTCTGAACATCTCCCGAGAAATGCTCCAGCAGAGCAAGTCTGAAAGTCAATCCGCAAAAACATTTGTGAAGAA
GTGCCTTGAGCTCTTCTCTGAGTTGGCTGAAGACAAGAGAACTACAAGAAATTTATGAGGCATTCTCTAAG
AATTTAAAGCTTGAATCCATGAGGATTCACTAACCGTCGCCGCTCTCTGAGCTCCTTCGCTACCATACCT
CTCAGTCTGGAGATGAGATGACTTCCCTGTGAGTATGTGTCTCGCATGAAGGAGACACAGAAGTCCATCTA
CTATATCACTGGTGAGAGCAAAGAGCAGGTGGCAACTCTGCCTTCGTGGAGCGTGTGCGGAACCGGGCTTT
GAGGTGGTATACATGACTGAGCCATTGATGAGTACTGCGTACAGCAGCTCAAGGAGTTCGATGGCAAGAGCC
TGGTCTCCGTGACCAAGGAGGGCTGGAGCTACCAGAGGATGAGGAAGAGAAGAAAAAATGGAGGAGAGCAA
GGCAAAGTTTGAGAACTCTGCAAGCTCATGAAGGAGATCTTGACAAGAAGGTTGAAAAAGTGACTATCTCC
AATAGGCTTGTGCTTCCCCCTGCTGCATTGTGACCAGCACCTACGGCTGGACAGCCAACATGGAACGGATTA
TGAAGGCCAGGCACTGCGGGACAACCTGCACAATGGGCTACATGATGGCCAAGAAAACACCTAGAGATCAACCC
TGACCACCCCATTTGTGGAGACTCTGCGGCAGAGGCTGAGGCAGACAAAAACGACAAAGCTGTCAAAGACCTG
GTGGTGTGCTGTTTGAGACTGCTGCTCTCCTCTGGCTTCTCACTTGAGGACCCCCAAACCCACTCCAACC
GCATCTACCGCATGATTAACTAGGCCTGGGCATTGATGAAGATGAGGTCACTGCAGAAGAGCCAGTGCTGC
TGTTCCCGATGAGATCCCCCACTGGAGGGTGTGAGGATGCCTCTCGCATGGAAAGAAGTGGATTAAAGG

```

Figura 19. Alineamiento en el programa Blast de la secuencia obtenida por la secuenciación automática del gen de Hsp90β clonado en pcDNA3.1. La secuencia obtenida alineó al 100% con la secuencia reportada en el GeneBank para Hsp84 de rata. El codón de inicio y de paro de la traducción es señalada con letras subrayadas, y las bases incluidas en los oligonucleótidos sentido y antisentido diseñados para amplificar y aislar el gen de Hsp90β a partir de RNA total de riñón de rata se muestra con letras sombreadas en gris.

Como era de esperarse, la transfección de pcDNA3.1/Hsp90β incrementó los niveles de Hsp90β por ≈ 2 veces, sin modificar los niveles de proteína para Hsp90α, como se muestra en las Figuras 20C y 20D, respectivamente. Estos resultados muestran que la transfección con Hsp90α ó con Hsp90β producen una sobre-expresión específica del gen transfectado.

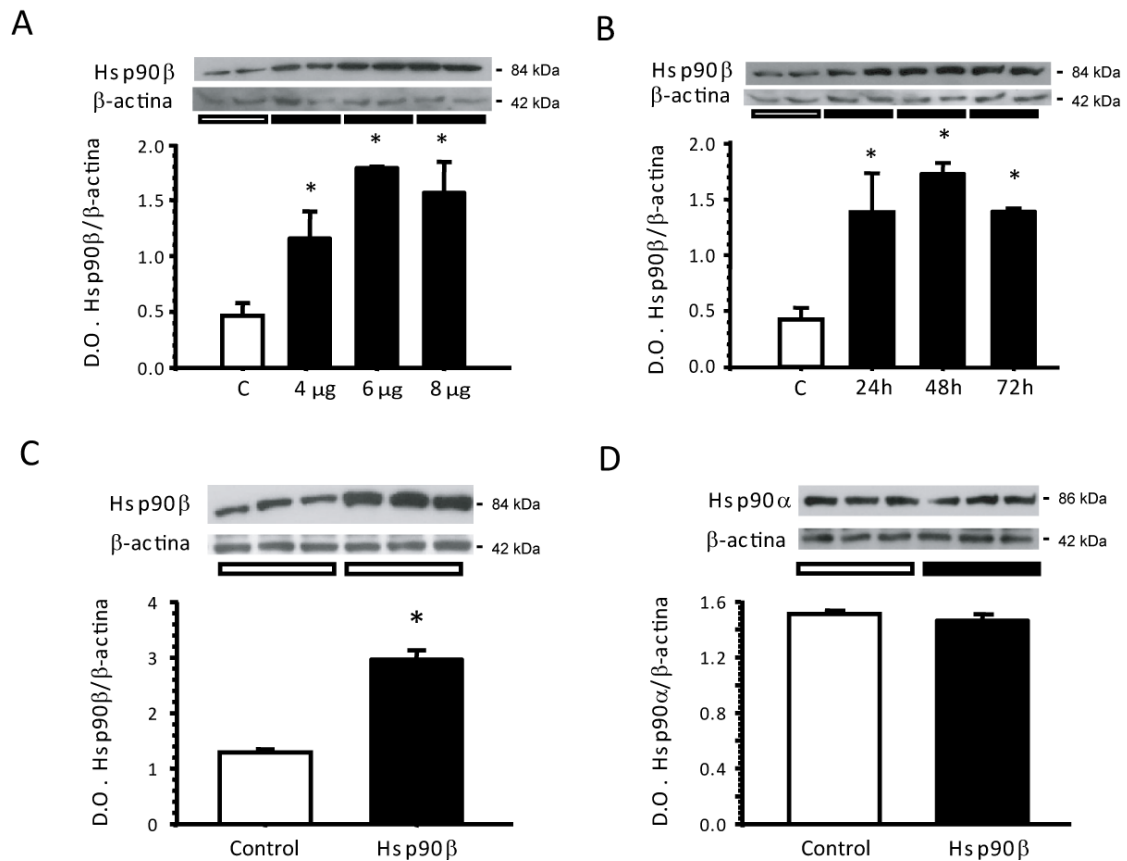


Figura 20. A) Niveles de proteína Hsp90β en células HEK-293 transfectadas con diferentes cantidades de constructo de Hsp90β (barras de color negro) en comparación con las células HEK-293 tratadas con liposomas (barras blancas). *p < 0.05 vs células transfectadas con pcDNA3.1.

Tomando en consideración que estudios recientes demuestran que Hsp90 regula la actividad de eNOS⁽²³⁾, decidimos estudiar el papel específico de la sobre-expresión de Hsp90α y de Hsp90β en la producción de óxido nítrico.

Cómo una primera aproximación, evaluamos los niveles de la proteína de eNOS en células HEK-293 sin transfectar. Como se muestra en la Figura 21, las células HEK-293 utilizadas en nuestro estudio expresan de forma constitutiva eNOS.

Este hallazgo se confirmó por la medición de niveles NO_2/NO_3 en estas células. La Figura 22 muestra los cambios porcentuales en los niveles de NO_2/NO_3 en los grupos de células transfectadas con Hsp90 α o Hsp90 β , comparándolo con las células que fueron transfectadas con el vector pcDNA3.1 vacío.

La sobre-expresión de Hsp90 α produjo un aumento significativo en los metabolitos del $\dot{\text{N}}\text{O}$ (de 0.29 ± 0.01 y 0.61 ± 0.03 mM/mg de proteína) representando un aumento del 113.3%. De forma interesante, la sobre-expresión de Hsp90 β produjo un efecto opuesto, en el cuál, los niveles de NO_2/NO_3 se redujeron significativamente en las células HEK-293 transfectadas (0.13 ± 0.01 mM/mg de proteína).

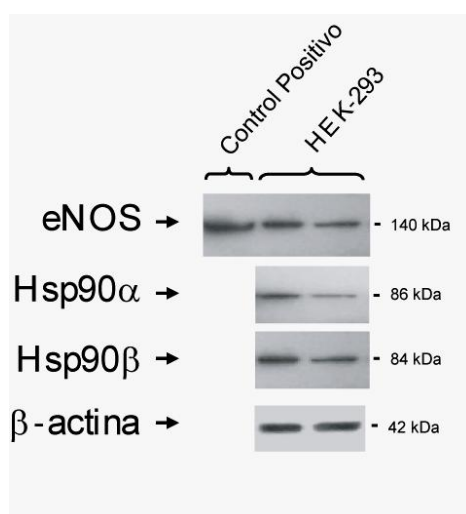


Figura 21. Expresión de proteína eNOS, Hsp90 α , Hsp90 β y β -actina en células HEK-293 intactas.

La especificidad de los efectos observados se estudió mediante el silenciamiento en la expresión de Hsp90 α y Hsp90 β endógena con el uso de siRNAs específicos para estas proteínas. Células HEK-293 fueron transfectadas con el correspondiente siRNA/Hsp90 α o siRNA/Hsp90 β y se evaluó la expresión de Hsp90 α y Hsp90 β , a 24 h, 48 h y 72 h después de la transfección del siRNA respectivo. Con el fin de establecer las mejores condiciones

de transfección, los experimentos se diseñaron 48 h post-transfección, como se puede observar en la Figura 23.

Cuando los niveles NO_2/NO_3 se evaluaron, se observó que la transfección con siRNA/Hsp90 α produjo una reducción significativa en los metabolitos estables de la síntesis de $\dot{\text{N}}\text{O}$ de aproximadamente un 36.5%, como se muestra en la Figura 22. Por el contrario, la transfección de siRNA/Hsp90 β se asoció con un aumento significativo en los niveles de NO_2/NO_3 , en un 74.7%.

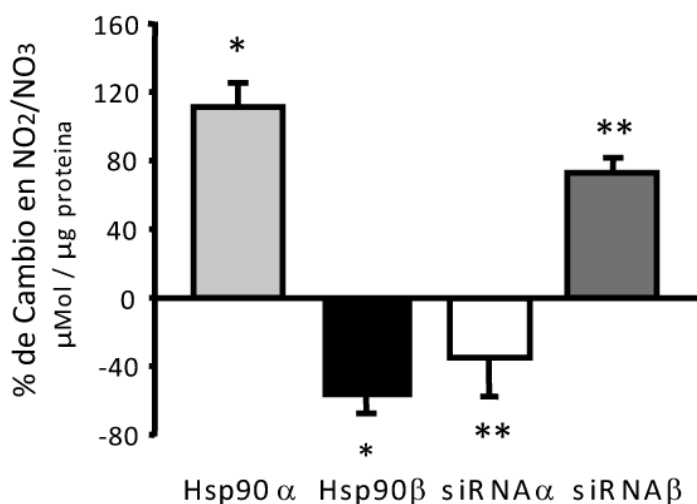


Figura 22. Efectos de la transfección de pcDNA3.1/Hsp90 α o de pcDNA3.1/Hsp90 β sobre la producción de NO en células HEK-293. Porcentaje de cambio en los niveles de NO_2/NO_3 en lisados de células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α (barra gris claro), pcDNA3.1/Hsp90 β (barra negra), siRNA-Hsp90 α (barra blanca) y siRNA-Hsp90 β (barra gris oscuro). * $p < 0.05$ vs células transfectadas con liposomas. ** $p < 0.05$ vs células transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α o con pcDNA3.1/Hsp90 β .

Estos datos sugieren fuertemente que Hsp90 α y Hsp90 β tienen un papel diferencial en la regulación de la actividad de eNOS. Por esta razón decidimos estudiar hasta donde esta diferencia es propiciada por un cambio en la interacción de Hsp90 α o Hsp90 β con eNOS.

Como se muestra en la Figura 24, este no fue el caso, el Western blot de la inmunoprecipitación reveló que eNOS es capaz de interactuar con ambas proteínas, Hsp90 α y Hsp90 β , sugiriendo que la reducción de la actividad de eNOS por Hsp90 β no fue resultado de la incapacidad de esta chaperona para asociarse con eNOS.

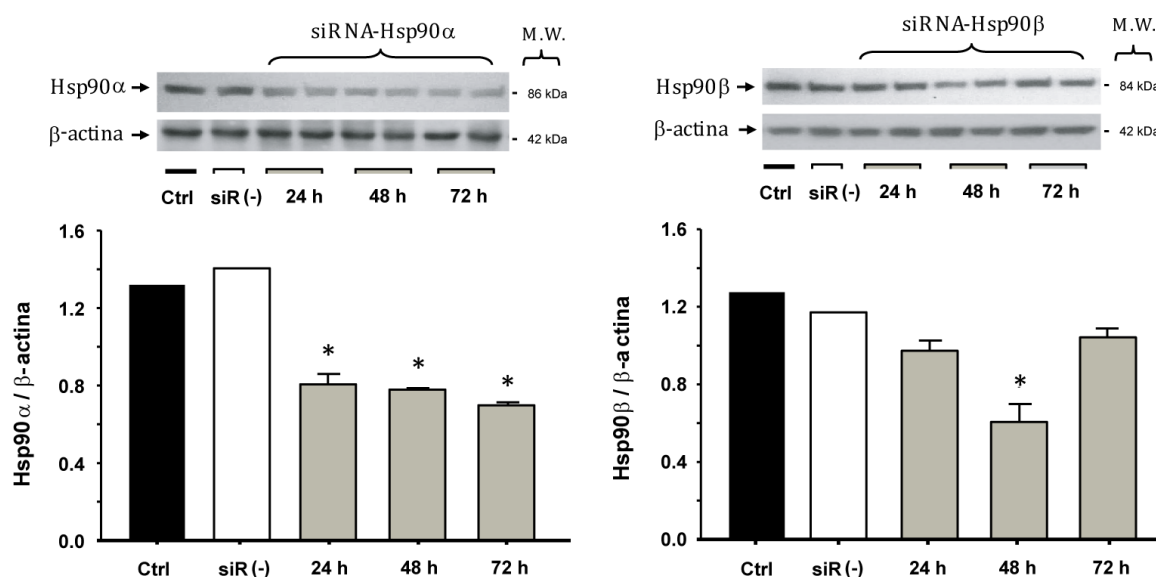


Figura 23. Curvas dosis-silenciamiento y tiempo-silenciamiento en células HEK-293 transfectadas con siRNA-Hsp90 α o de siRNA-Hsp90 β . Niveles de proteína Hsp90 α (izquierda) o de Hsp90 β (derecha) en células control transfectadas únicamente con pcDNA3.1 (barras negras), células transfectadas con un siRNA negativo como control (barra blanca) y células transfectadas con siRNA-Hsp90 α , lado izquierdo o siRNA-Hsp90 β , lado derecho (barras grises).

Como un segundo acercamiento, evaluamos si este efecto diferencial sobre la producción de $\cdot\text{NO}$ inducida por la sobre-expresión de Hsp90 α o de Hsp90 β fue mediada por cambios en la expresión de eNOS y/o de su fosforilación, para lo cual evaluamos los niveles de proteína de eNOS y la fosforilación de sus residuos Ser-1177 y Tre-497 en las células HEK-293 transfectadas mediante Western blot utilizando los anticuerpos correspondientes. Los niveles de proteína de eNOS en los cultivos de células HEK-293 no se modificaron, ni por la transfección de Hsp90 α , ni por la transfección de Hsp90 β , como puede observarse en la parte superior de la Figura 25A con su correspondiente análisis densitométrico. Sin embargo, observamos un aumento significativo de la señal de detección inmune del anticuerpo para el residuo Ser-1177 fosforilado de eNOS en las células que sobre-expresaron Hsp90 α , este efecto que no se observó cuando las células se transfectaron con Hsp90 β (Figura 25B). La relación promedio de eNOS fosforilada en el residuo Ser-1177/ β -actina en células transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α fue de 0.83 ± 0.08 , en comparación con 0.32 ± 0.04 y 0.36 ± 0.05 para pc-Hsp90 β y para pcDNA3.1, respectivamente.

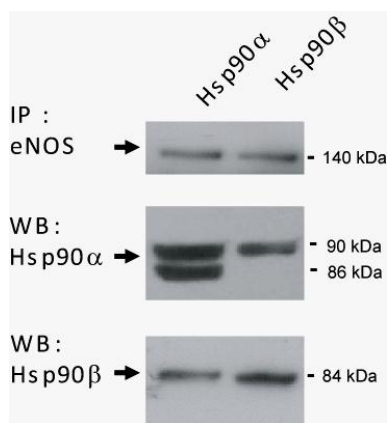


Figura 24. Análisis de co-inmunoprecipitación de eNOS con Hsp90 α o Hsp90 β de células HEK-293 transfectadas con Hsp90 α o con Hsp90 β , respectivamente.

De manera interesante, la transfección de pcDNA3.1/Hsp90 β aumentó significativamente la fosforilación del residuo inactivante de eNOS (Tre-495), como se puede apreciar en la Figura 25C. Mientras que la relación promedio de eNOS/ β -actina fosforilado en el residuo Tre495/ β -actina en células transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 β y pcDNA3.1 fue de 0.86 ± 0.1 , comparado con 0.50 ± 0.05 y 0.55 ± 0.09 en células transfectadas únicamente con liposomas y Hsp90 α , respectivamente.

Debido a que se ha reportado que Hsp90 juega un papel importante en la activación de p-Akt/PKB ^(84,55) y debido a que esta cinasa es responsable de fosforilar el residuo de Ser1177 en eNOS ^(23,6,78), decidimos evaluar el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α o de Hsp90 β sobre la activación de Akt/PKB. Como se muestra en la Figura 25D, la transfección de Hsp90 α o de Hsp90 β , no modificó los niveles de proteína de Akt/PKB. Sin embargo, la sobre-expresión de Hsp90 α se asoció con un aumento significativo en la activación por fosforilación de Akt/PKB, mientras que con la sobre-expresión de Hsp90 β se observó un efecto contrario, es decir, Hsp90 β indujo una reducción significativa en la cantidad de Akt/PKB fosforilada, como se detalla en la Figura 25D.

Con la finalidad de confirmar que Hsp90 β induce un aumento en el estrés oxidativo, realizamos la tinción de hidroetidina (HE) para detectar la generación de anión superóxido intracelular mediante el análisis por citometría de flujo.

Por otra parte, se ha demostrado previamente que eNOS es capaz de generar anión superóxido cuando se fosforila en el residuo de Tre-497 ^(76,57), por lo que decidimos evaluar el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α o de Hsp90 β sobre el estado de estrés oxidativo celular mediante la medición de los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en los cultivos de células HEK-293. La Figura 26 muestra los niveles de H₂O₂ en los lisados celulares, expresados como nmol/ μ g de proteína. Los niveles de H₂O₂ se incrementaron dos veces cuando Hsp90 β se sobre-expresó, efecto que no se observó cuando las células fueron transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α .

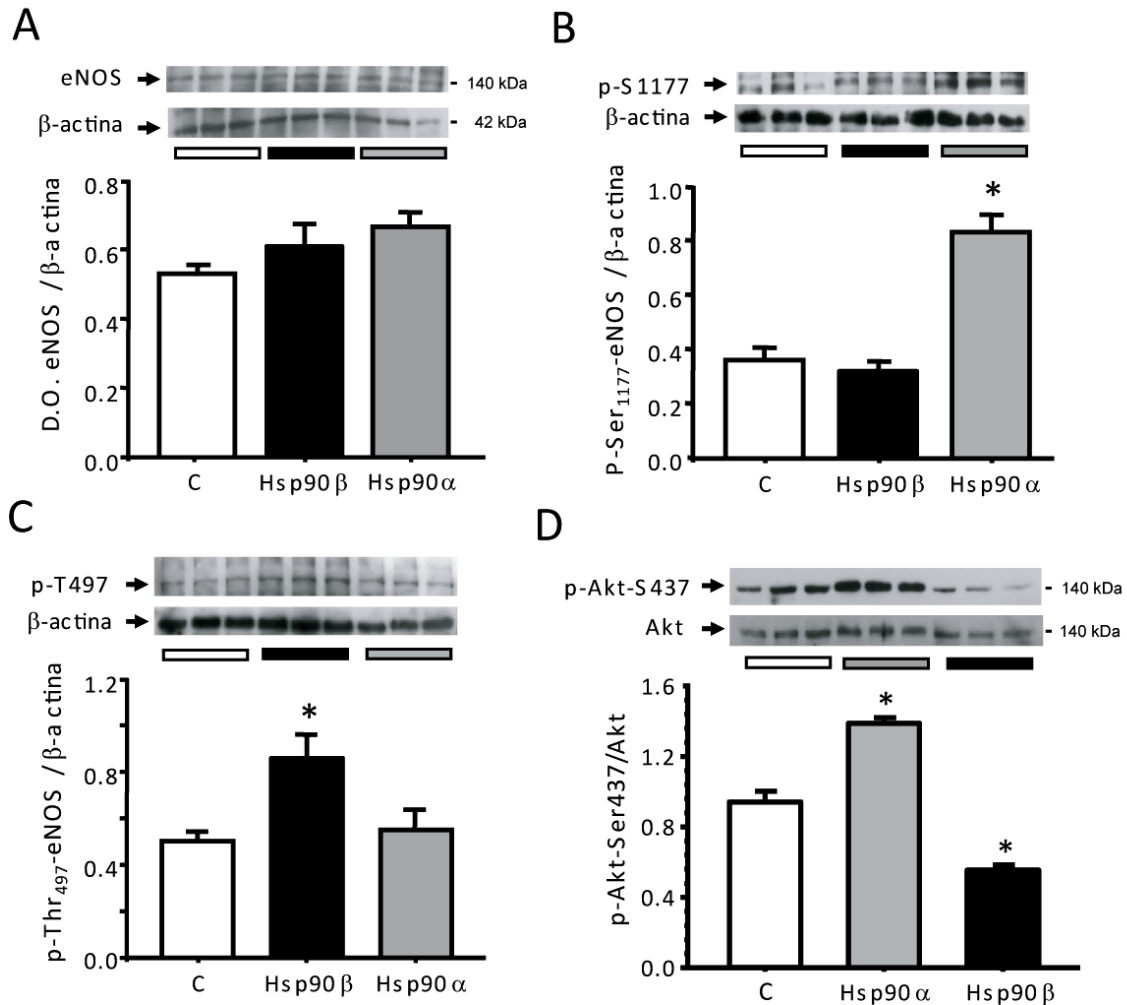


Figura 25. Efecto de la transfección de pcDNA3.1-Hsp90 α y de pcDNA3.1-Hsp90 β sobre la vía eNOS/NO. A) Expresión de eNOS detectada por Western blot en células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1, pcDNA3.1-Hsp90 α o pcDNA3.1-Hsp90 β ; B) Fosforilación activante de eNOS en el residuo Ser1177; C) Fosforilación del residuo inactivante de eNOS en la Tre-495; y D) Niveles de expresión de Akt y de su fosforilación activante en el residuo Ser437, determinado por Western blot utilizando fosfo-anticuerpos específicos en los grupos estudiados de células HEK-293. * $p < 0.05$ vs células transfectadas con liposomas. ** $p < 0.05$ vs vs células transfectadas con pcDNA3.1-Hsp90 α o con pcDNA3.1-Hsp90 β .

La Figura 26B muestra los histogramas representativos de cada grupo de células transfectadas; y la Figura 26C y 26D muestran el porcentaje de células teñidas y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (IFM), respectivamente.

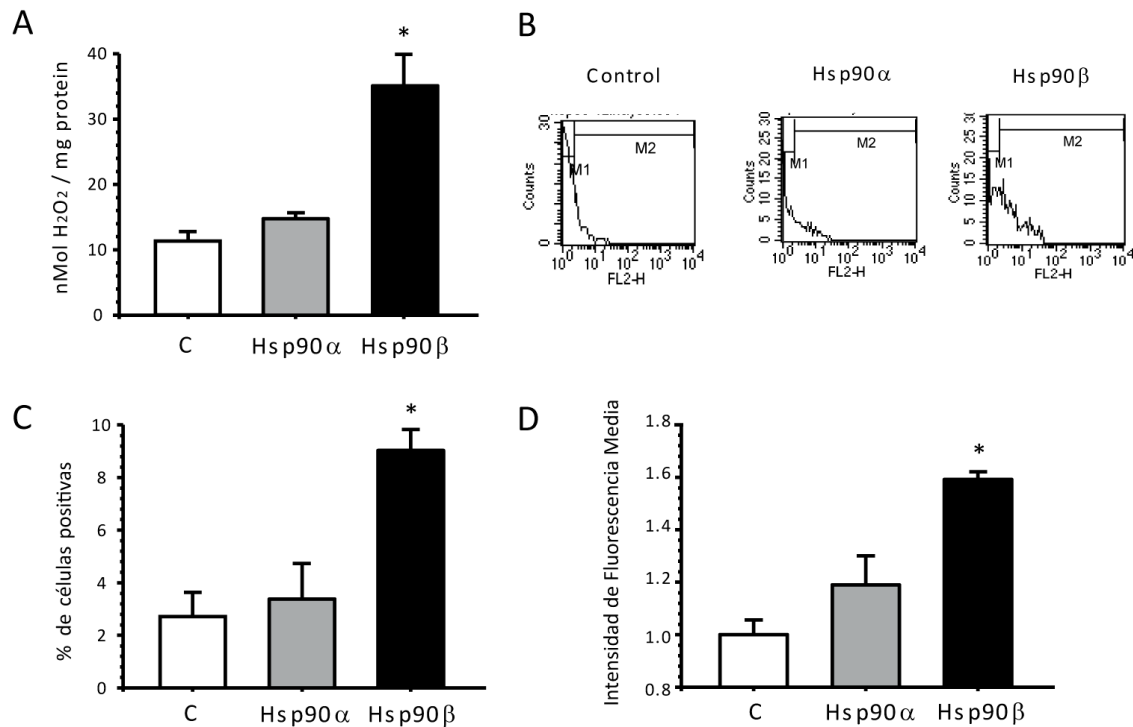


Figura 26. Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α y Hsp90 β sobre el estrés oxidativo en células HEK-293. A) Niveles de peróxido de hidrógeno en lisados de células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1 (barras blancas), pcDNA3.1-Hsp90 α (barras de color gris) y con pcDNA3.1-Hsp90 β (barras de color negro). B) La tinción de hidroetidina fue evaluada como una medida de la producción de anión superóxido y cuantificada por citometría de flujo. El histograma representativo de los tres grupos de células HEK-293 transfectadas muestra una mayor tinción de HE en el grupo que fue transfectado con pcDNA3.1-Hsp90 β . C) Porcentaje de células HEK-293 positivas para la tinción de HE; y D) Intensidad media de fluorescencia (IFM). * P < 0.05 vs células transfectadas con el vector.

La tinción HE confirmó que la sobre-expresión de Hsp90 β indujo una mayor generación de anión superóxido, tal y como lo demuestra el aumento en el porcentaje de células positivas para la tinción de HE (de 2.7 ± 0.9 a $9.0 \pm 0.8\%$, $p = 0.002$) y por la medición de IFM (de 1 ± 0.06 a 1.6 ± 0.03 UA, $p = 0.002$). Este efecto no se observó cuando las células fueron transfectadas con Hsp90 α . Estos resultados sugieren fuertemente que la sobre-expresión de Hsp90 β induce un aumento en la generación del anión superóxido en lugar de óxido nítrico.

Debido a que ha sido demostrado que la conformación dimérica de Hsp90 es necesaria para la interacción y activación de sus proteínas cliente, evaluamos el coeficiente monómero/dímero en células HEK-293 transfectadas con Hsp90 α o Hsp90 β . Los ensayos de Western blot se muestran en las Figuras 27A y 27B, bajo condiciones electroforéticas no desnaturalizantes de proteínas extraídas de células transfectadas con Hsp90 α o Hsp90 β , respectivamente. Como es posible apreciar la mayor parte de la proteína de Hsp90 α se encontró en su conformación dimérica (Figura 27A), en cambio, Hsp90 β principalmente se encuentra en su conformación monomérica, como se muestra en la Figura 27B. Lo anterior se confirmó con el coeficiente monómero/dímero. La sobre-expresión de Hsp90 α , indujo una mayor cantidad de la conformación dimérica de esta proteína.

De forma contraria, cuando se sobre-expresó Hsp90 β , la mayor parte de la proteína de Hsp90 β se encontró en su conformación monomérica; (Figura 27B). A este respecto, se ha reportado previamente que la conformación dimérica de eNOS es necesaria para una adecuada producción de $\cdot\text{NO}$ ^(87, 76, 86), con lo que decidimos evaluar si la sobre-expresión de Hsp90 α o de Hsp90 β modifica la conformación dímero/monómero de eNOS.

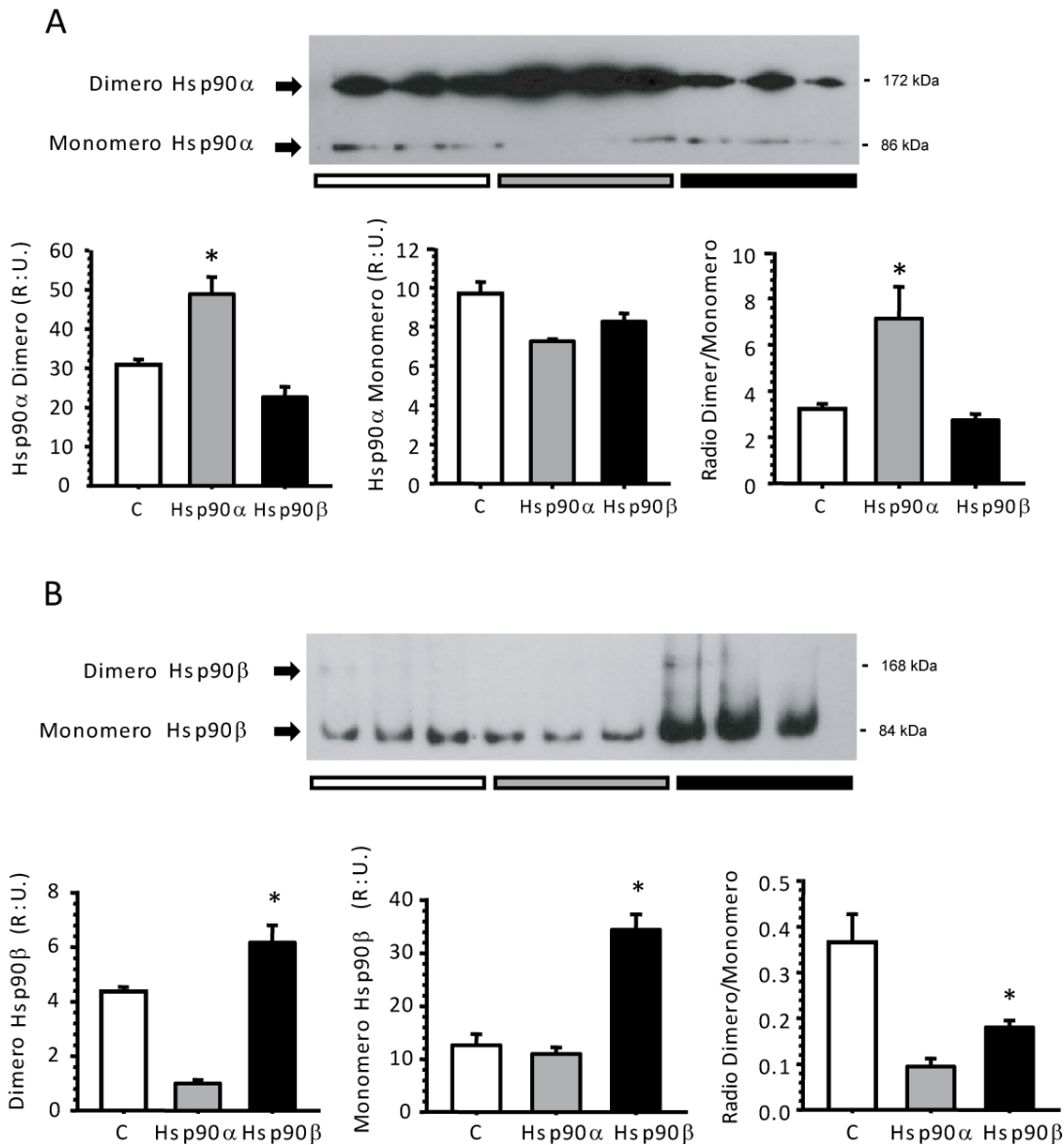


Figura 27. Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α o Hsp90 β sobre la conformación monómero/dímero. Análisis de Western blot para Hsp90 α (panel A) y para Hsp90 β (panel B) a partir de extractos proteicos no desnaturalizados de células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1 (barras blancas), pcDNA3.1-Hsp90 α (barras grises), o pcDNA3.1-Hsp90 β (barras negras). En cada análisis, se incluyó la representación gráfica de los dímeros, monómeros y la relación dímero/monómero para Hsp90 α (panel A) y de Hsp90 β (panel B) * $p < 0.05$ en comparación con las células transfectadas con pcDNA3.1.

El panel superior de la Figura 28 muestra los resultados obtenidos por el análisis de Western blot de eNOS en condiciones no desnaturalizantes de células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1, pcDNA3.1/Hsp90 α y pcDNA3.1/Hsp90 β , respectivamente.

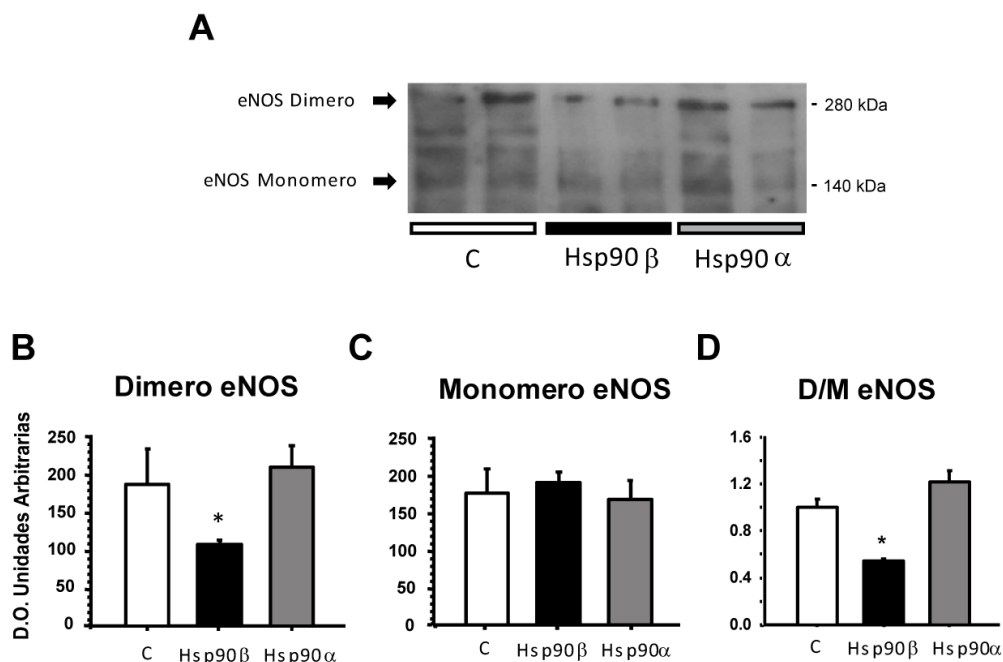


Figura 28. Efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α o Hsp90 β sobre la conformación monómero/dímero de eNOS. A) Imagen representativa del análisis por Western blot de proteínas totales extraídas de células HEK-293 transfectadas con pcDNA3.1 (barras blancas), con pcDNA3.1-Hsp90 α (barras grises), y pcDNA3.1-Hsp90 β (barras negras). Se detectaron dos bandas: una de 280 kDa y otra de 140 kDa, correspondientes a la conformación dimérica y monomérica de eNOS, respectivamente. B) y C) Análisis densitométrico de la conformación dimérica y monomérica de eNOS, respectivamente; y D) Relación dímero/monómero de eNOS (D/M). Los resultados reportados aquí fueron el resultado de 2 experimentos. * $p < 0.05$ vs células transfectadas con pcDNA3.1.

El panel inferior de la Figura 28 muestra el análisis densitométrico de las bandas del dímero y monómero de eNOS, junto con la proporción resultante de la relación dímero/monómero. La reducción en la síntesis de NO inducida por la sobre-expresión de Hsp90 β se asoció con una disminución significativa en la conformación dimérica de eNOS, con la concomitante reducción de la relación dímero/monómero de eNOS. Efecto que no se observó en células transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α . Es decir, la transfección de Hsp90 β redujo la cantidad de eNOS activa (conformación dimérica).

Hasta el momento, estos resultados muestran de una forma fina y clara, evidencia sustentable del efecto positivo de Hsp90 α sobre la vía de señalización para la síntesis de óxido nítrico vía eNOS. Este efecto pareció ser mediado por el aumento en la fosforilación de la proteína B/AKT y con el concomitante aumento de la fosforilación de eNOS en el residuo de Ser-1177. Interesantemente, encontramos que la sobre-expresión de Hsp90 β indujo el efecto contrario, es decir, AKT no se activó por esta chaperona y se propició la fosforilación de eNOS en la Tre-497, lo que conllevó a que eNOS generara el anión superóxido en lugar de óxido nítrico.

Para cubrir nuestro siguiente objetivo, nos enfocamos a diseñar y validar una estrategia experimental para transfectar Hsp90 α *in vivo*. Para ello, empleamos como modelo animal ratas Wistar macho a las cuales se les practicó una técnica de transfección intra-renal vía la arteria renal izquierda (como se detalla en material y métodos).

Con la finalidad de validar nuestra técnica de transfección *in vivo*, empleamos como grupo control ratas que recibieron únicamente los liposomas por la arteria renal (Veh) y otro grupo de ratas a las que se les transfectaron los liposomas con 10, 20 o 30 μg del plásmido pcDNA3.1/NT-GFP. Las transfecciones se realizaron utilizando distintas concentraciones del plásmido con el fin de evaluar la óptima sobre-expresión a diferentes tiempos post-transfección.

Haciendo uso de la microscopia confocal de epifluorescencia (MCE) comprobamos que la transfección y expresión hubieran sido efectivas, midiendo la presencia de la proteína verde fluorescente (GFP) en tejido renal. Las imágenes tomadas a diferentes tiempos y en distintas regiones del riñón son mostradas en la Figura 29.

En el panel de la izquierda se muestran imágenes de cortes histológicos de corteza, médula externa y médula interna de riñón de ratas a las cuales se les transfectó únicamente vehículo (40x). En el panel de la derecha de la Figura 29, se muestra una imagen representativa correspondiente a las mismas regiones histológicas del riñón de una rata transfectada con 30 μ g del plásmido pcDNA3.1/NT-GFP, en donde se aprecia la expresión de la GFP en todas las porciones del riñón, siendo más intensa la señal de fluorescencia a nivel de glomérulo y disminuyendo de forma gradual conforme nos movemos hacia la membrana interna.

Una vez que validamos y caracterizamos la técnica de transfección intra-renal vía la arteria renal, dirigimos la estrategia para lograr sobre-expresar a la proteína Hsp90 α de forma tejido específico. Se transfectó el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α en 3 grupos de animales que fueron sacrificados a 24, 48 y 72h post-transfección, respectivamente. Se determinaron los niveles de RNAm y de proteína, de Hsp90 α y de Hsp90 β , en los lisados de tejido renal de cada grupo de animales. Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real para el RNAm de Hsp90 α y de Hsp90 β a las 48h post-transfección se muestran en la Figura 30, la corteza renal en el panel superior y la médula en el inferior. Como se puede apreciar, las ratas transfectadas con el pcDNA3.1/Hsp90 α presentaron un aumento de tres veces en la cantidad de RNAm de Hsp90 α en corteza renal y de de 2 veces en la médula renal. Es importante resaltar que los niveles de RNAm de Hsp90 β no se modificaron por la transfección del plásmido vacío.

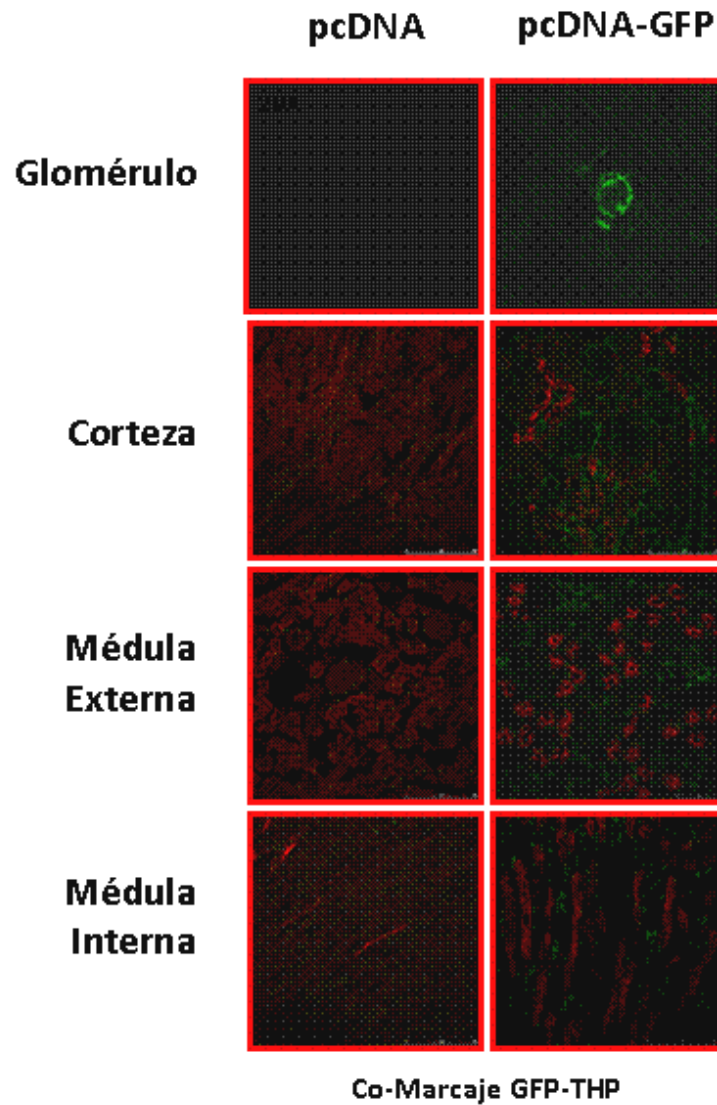


Figura 29. Transfección intra-renal vía la arteria renal izquierda del plásmido pcDNA/NT-GFP. Imágenes correspondientes al co-marcaje de la proteína verde fluorescente (GFP) con THP (Proteína de Tamm-Horsfalí, glucoproteína de membrana, abundante en el segmento proximal del asa de Henle, color rojo) tomadas a 40X. Las imágenes se muestran en orden descendente, porción de la corteza externa señalando un glomérulo, corteza renal externa, médula renal externa y médula renal interna de riñón de ratas a las cuales se les transfectó únicamente vehículo (*Panel izquierdo*); o ratas que fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/NT-GFP (*panel derecho*).

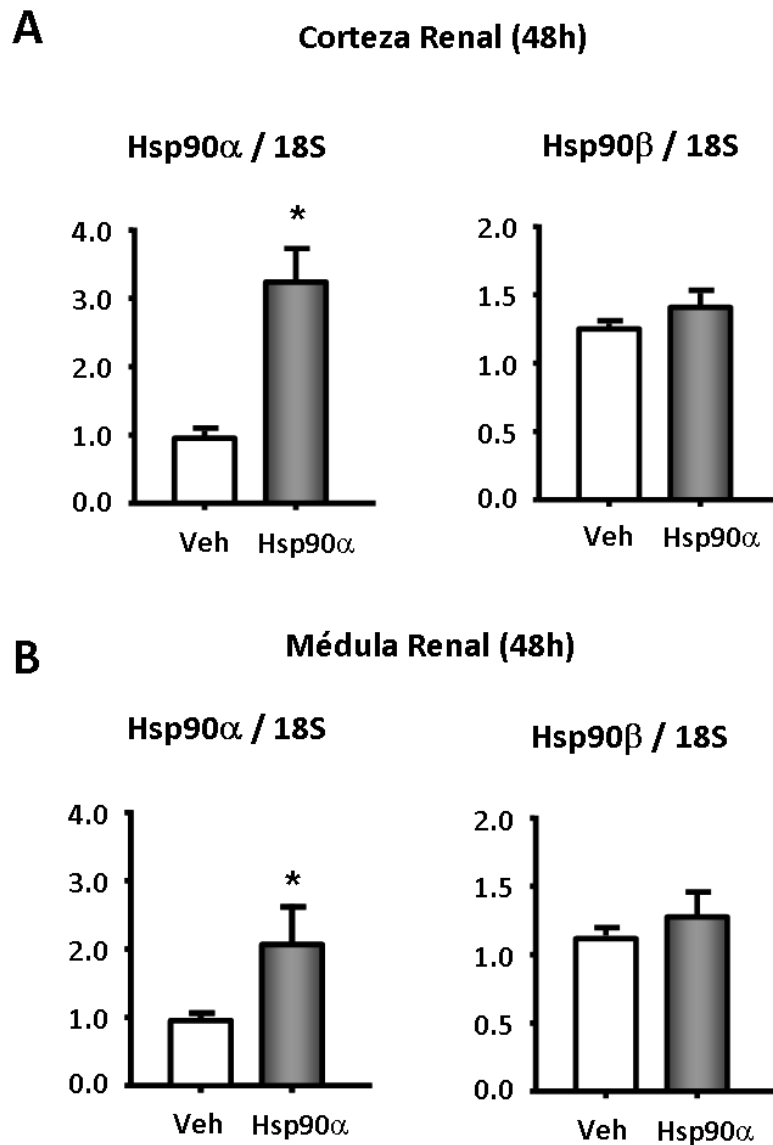


Figura 30. Niveles de RNA mensajero de los genes Hsp90 α y de Hsp90 β en tejido renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o vehículo, como control. RT-PCR en tiempo real para los genes Hsp90 α (A) y Hsp90 β (B), utilizando homogenados del riñón izquierdo de ambos grupos de ratas transfectadas. El gen 18S se utilizó como gen control. * $p < 0.05$ vs vehículo. Imágenes representativas obtenidas con resultados equivalentes en todos los lisados de cada grupo de animales.

Los niveles de proteína de Hsp90 α y de Hsp90 β obtenidos mediante la curva-sobre-expresión post-transfección intra-renal del plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α se muestran en la Figura 31.

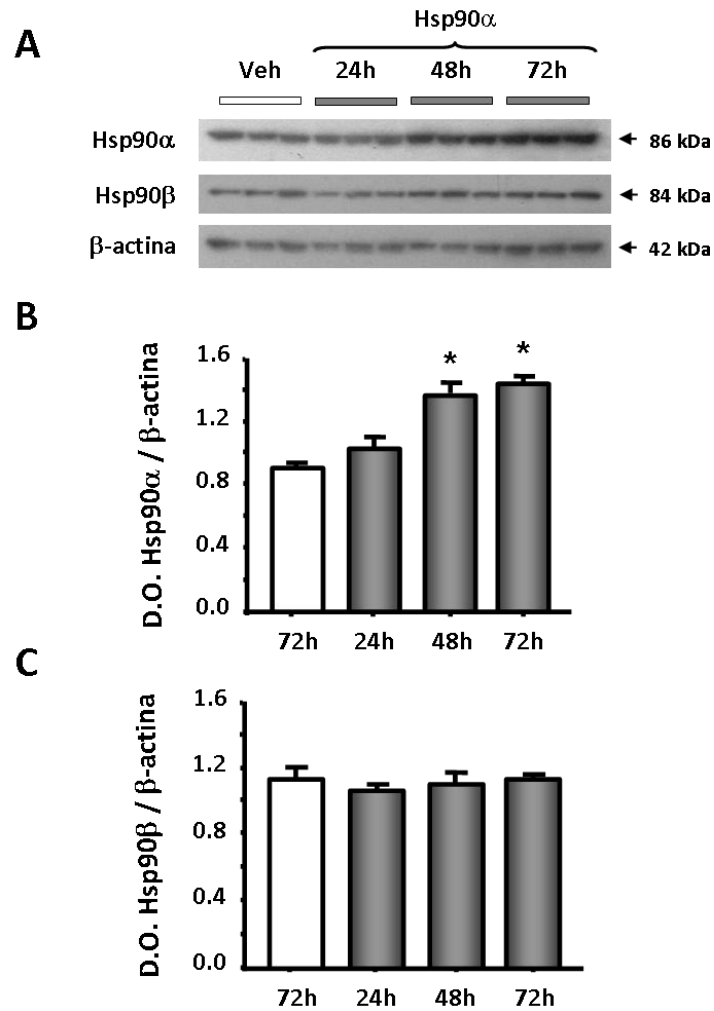


Figura 31. Niveles de proteína de Hsp90 α y de Hsp90 β en tejido renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o vehículo, como control. Análisis de Western blots de Hsp90 α y de Hsp90 β (A), con su respectivo análisis densitométrico: Hsp90 α / β -actina (B) y Hsp90 α / β -actina (C); utilizando homogenados del riñón izquierdo de ambos grupos de ratas transfectadas. Los niveles de proteína β -actina fueron utilizados como control de carga en todos los geles SDS-PAGE. * $p < 0.05$ vs grupo control de 72h y grupo de 24h post- transfección.

La autoradiografía del análisis de Western blot de los experimentos se muestra en el panel A de la Figura 31 y junto con el respectivo análisis densitométrico para Hsp90 α y Hsp90 β . La transfección indujo un incremento significativo de un poco menos de dos veces en los niveles de proteína de Hsp90 α con respecto al grupo control, después de 72h de la transfección. La sobre-expresión de Hsp90 α , obtenida tanto a nivel de RNAm como a nivel de proteína en tejido renal de las ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α no modificó los niveles de proteína de Hsp90 β (Figura 31C).

Con la finalidad de conocer el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α en la fisiología renal, llevamos a cabo la medición de parámetros fisiológicos 48h posteriores a la realización de la transfección intra-renal con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α y se compararon con el grupo control (Figura 32). Considerando los resultados obtenidos a nivel de PAM, FSR, depuración de creatinina, proteinuria y NAG, se puede argumentar que los animales transfectados con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α manifiestan una función renal “normal” o no alterada tras la manipulación practicada para la sobre-expresión de Hsp90 α , con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos con la sobre-expresión de Hsp90 α mediante transfección intra-renal de pcDNA3.1/Hsp90 α , refuerzan los estudios previos obtenidos en nuestro laboratorio en donde la inhibición aguda de Hsp90 con radicicol es necesaria para mantener una producción de \bullet NO en condiciones fisiológicas⁽⁵⁹⁾.

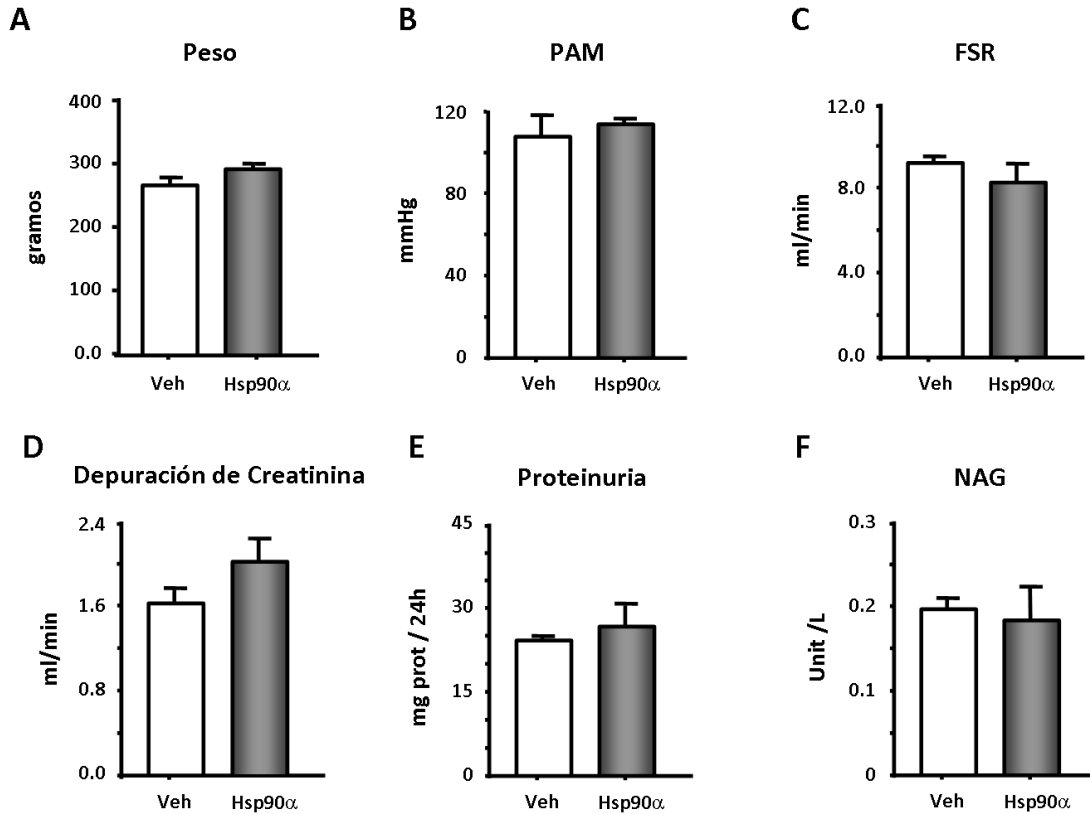


Figura 32. Parámetros fisiológicos y marcadores de daño renal obtenidos 48h posteriores a la realización de la transfección intra-renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α o vehículo (Veh), como control. A) Peso en gramos de los animales, B) Presión Arterial media (TAM), Flujo sanguíneo renal (FSR), D) Depuración de creatinina, E) Proteinuria, y F) N- acetil-D-glucosamina (NAG). Barras blancas (Veh) y barras grises (Hsp90 α).

En base a estos antecedentes junto con los resultados obtenidos de la transfección intra-renal de pcDNA3.1/Hsp90 α *in vivo* en condiciones fisiológicas, decidimos estudiar el papel de la sobre-expresión de Hsp90 α mediante transfección intra-renal ante un fenómeno de daño renal por isquemia-reperfusión.

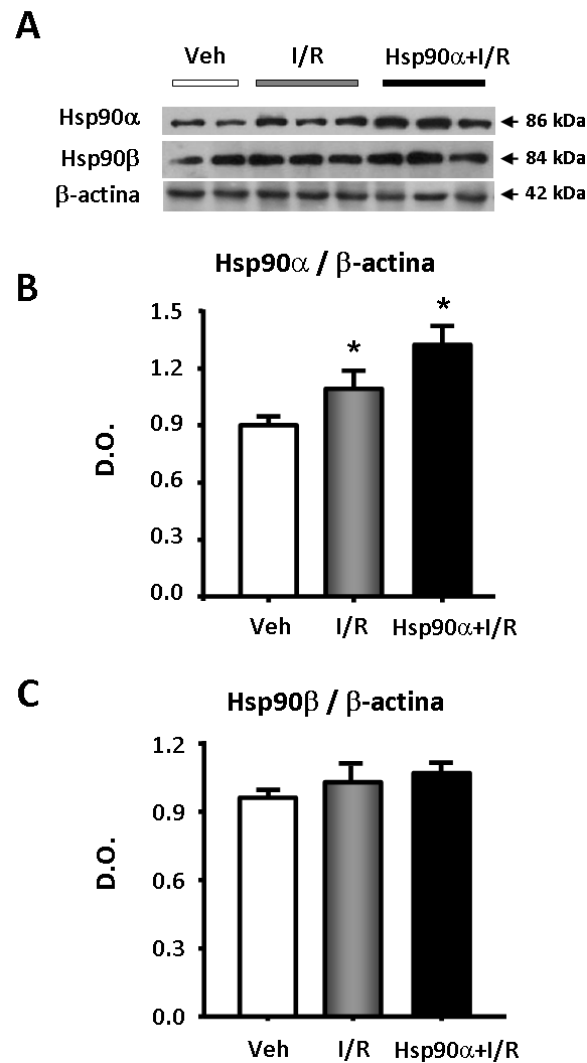


Figura 33. Niveles de proteína de Hsp90α y de Hsp90β en tejido renal de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90α (barras negras), con vehículo como control (barras blancas) y sometidas a isquemia renal de 30 min y perfusión de 24h, comparado con el grupo que únicamente sufrió el daño por I/R (barras grises). Análisis de Western blots de Hsp90α y de Hsp90β (A), con su respectivo análisis densitométrico: Hsp90α/β-actina (B) y Hsp90β/β-actina (C); utilizando homogenados del riñón izquierdo de cada grupo de ratas y sometidas a I/R 48h post-transfección. Los niveles de proteína β-actina fueron utilizados como control de carga en todos los geles SDS-PAGE. * $p < 0.05$ vs todos los grupos. Imágenes representativas obtenidas con resultados equivalentes en todos los lisados de cada grupo de animales.

En la Figura 33 se muestran los niveles de proteína de Hsp90 α y de Hsp90 β en el grupo control, las ratas sometidas a I/R y las ratas que se transfectaron con pcDNA3.1/Hsp90 α , 48 horas antes de inducir daño renal por I/R.

Como se puede apreciar, el grupo de ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α y en el grupo sometido a I/R 48 h post-transfección con reperusión de 24h, mostró un incremento significativo en los niveles de proteína Hsp90 α con respecto a los otros dos grupos. Efecto que no modificó los niveles de proteína de Hsp90 β .

Continuando con nuestro siguiente objetivo, determinamos el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α en la fisiopatología renal inducida por la I/R. En la Figura 34 podemos observar que la transfección de pcDNA3.1/Hsp90 α previno la caída del FSR (panel C) ante el daño renal por I/R, siendo este efecto independiente de la PAM (panel B).

La caída de la función renal inducida por I/R se determinó por la depuración de creatinina, en donde, de forma interesante, la transfección de Hsp90 α previno la disfunción renal (Figura 34D). Este efecto renoprotector se asoció con una disminución del daño renal a nivel tubular, determinado de forma indirecta mediante la determinación de proteinuria y de NAG, como marcadores de daño tubular (Figuras 34E y 34F respectivamente).

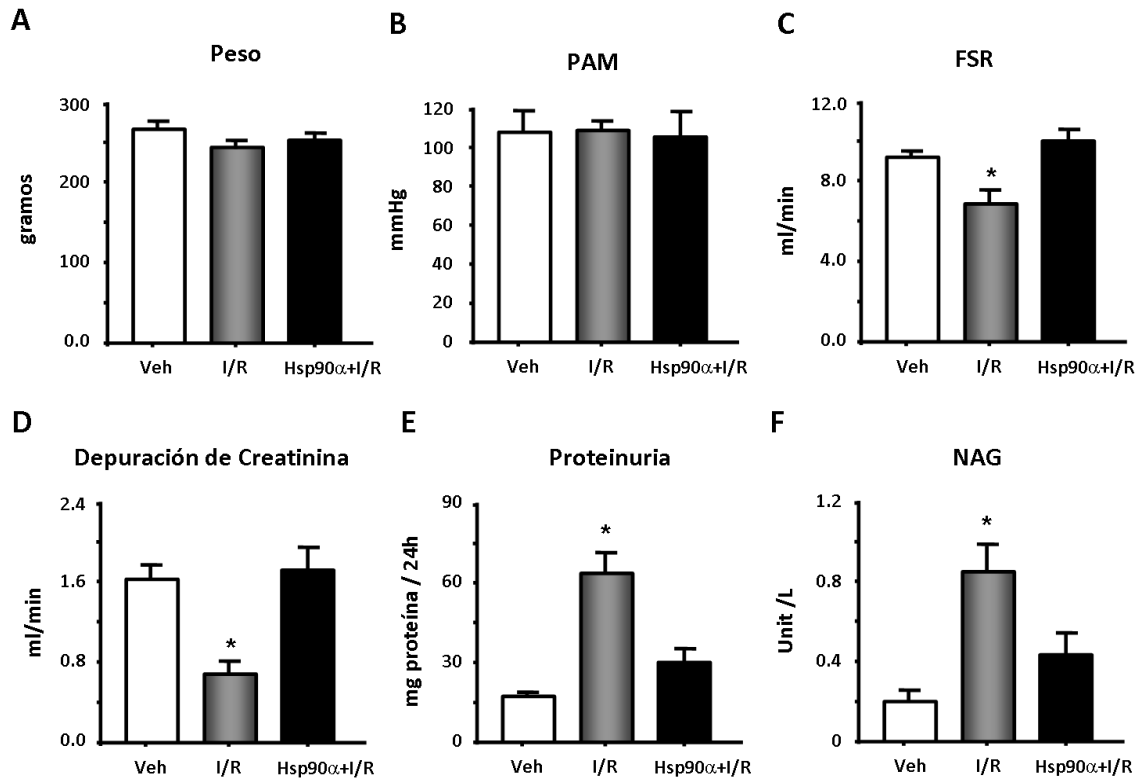


Figura 34. Parámetros fisiológicos y marcadores de daño renal en ratas transfectadas con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90α (barras negras), con vehículo como control (barras blancas) y sometidas a isquemia a I/R renal, comparado con el grupo que únicamente sufrió el daño por I/R (barras grises). A) Peso en gramos de los animales, B) Presión Arterial media (TAM), Flujo sanguíneo renal (FSR), D) Depuración de creatinina, E) Proteinuria, y F) N-Acetilglucosaminidasa (NAG). Barras blancas (Veh) y barras grises (Hsp90α). * $p < 0.05$ vs los demás grupos.

Bajo un escenario de daño vascular como lo es la isquemia-reperfusión, se ha descrito que eNOS resulta participar como una “sintasa de óxido nítrico disfuncional” mediado por su incapacidad de producir $\cdot\text{NO}$ y favorecer la del anión superóxido^(48, 80, 68). Sin embargo, se desconoce el papel específico de cada isoforma de Hsp90, Hsp90α y de Hsp90β, en la regulación de la vía eNOS para producir $\cdot\text{NO}$.

La determinación de los niveles de lipoperoxidación en tejido y la producción de peróxido de hidrógeno en orina se utilizaron como marcadores indirectos del estrés oxidativo en estos animales. La Figura 35 muestra los resultados obtenidos de estas determinaciones. La transfección intra-renal de pcDNA3.1/Hsp90 α previno el estrés oxidante, es decir los niveles de H₂O₂ urinario y de la lipoperoxidación en tejido renal fueron similares al grupo control.

Siguiendo en esta misma línea de investigación determinamos los niveles de *NO producidos en el tejido renal de estos animales, mediante la medición de los nitritos y nitratos, como metabolitos estables de la síntesis de *NO presentes en la orina (Figura 36, panel A). Los resultados obtenidos reflejan que de forma contraria a lo obtenido con los marcadores de estrés oxidativo, los animales transfectados con pcDNA3.1/Hsp90 α exhiben un aumento en los niveles de *NO comparados con el grupo I/R.

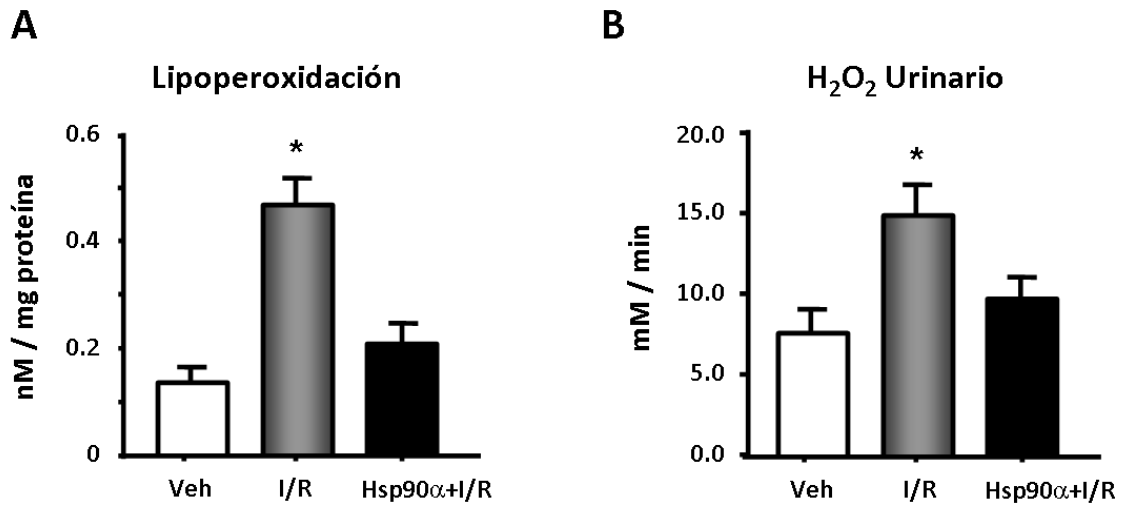


Figura 35. Efecto de la transfección intra-renal de pcDNA3.1/Hsp90 α sobre el estrés oxidativo, ante el daño renal inducido por I/R. Niveles de lipoperoxidación en tejido renal (A) y de peróxido de hidrógeno en orina (B), obtenido en ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α (barras negras), comparado con el grupo de ratas sometidas a I/R (barras grises) o grupo control (Veh). * $p < 0.05$ vs todos los grupos. Estos experimentos fueron conducidos por duplicado obteniéndose tres mediciones independientes.

Es bien conocido, que la interacción entre eNOS y Hsp90 es un paso crítico para que la sintasa produzca $\cdot\text{NO}$, a la vez que previene la producción de anión superóxido. Tomando en cuenta estos antecedentes decidimos medir mediante ensayos de co-inmuprecipitación la interacción existente entre eNOS y Hsp90 α en el tejido renal de cada grupo de animales. Inicialmente determinamos los niveles de nitritos y nitratos urinarios del grupo de ratas sometidas a I/R, así como las transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α y sometidas a I/R, comparándolos con los del grupo control. Los resultados obtenidos de esta determinación se muestran graficados en la Figura 36A.

La Figura 36B, representa un análisis de representativo de co-inmunoprecipitación de eNOS y Hsp90 α en los lisados de tejido renal de cada grupo de animales. Este análisis reveló que la interacción entre eNOS/Hsp90 α fue favorecida en los grupos de animales que fueron transfectados con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α y sometidos a I/R, comparado con los otros dos grupos.

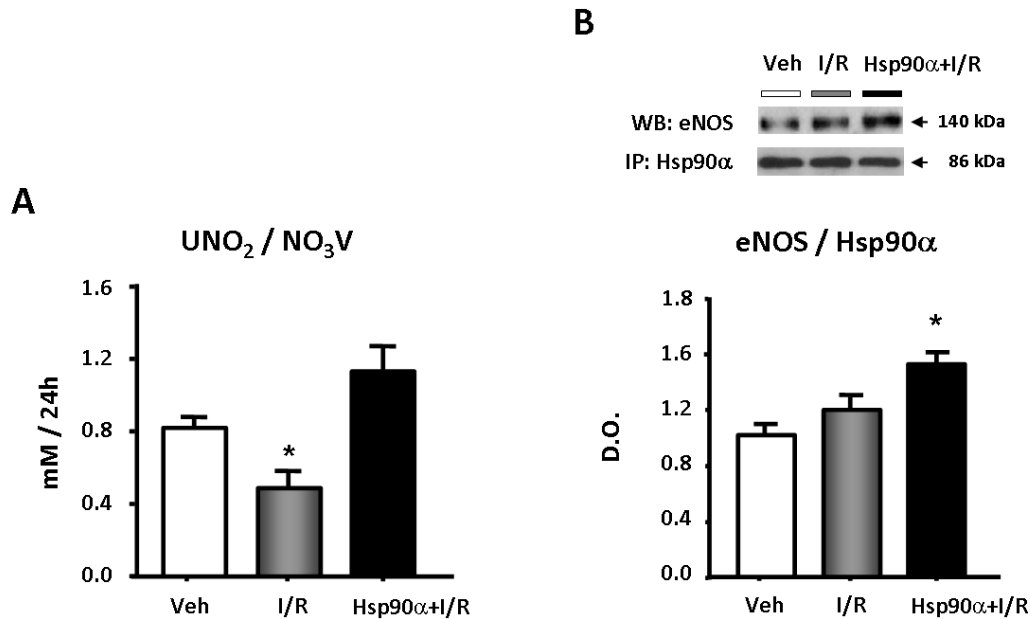


Figura 36. Correlación entre la producción de NO y la interacción de eNOS y Hsp90 α post-I/R renal en ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α . A) Niveles de Nitritos y Nitratos urinarios de ratas control y transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α , sometidas a I/R. B) Análisis de western blot para eNOS y Hsp90 α de ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-Hsp90 α , estudiado en lisados obtenidos de tejido renal de cada grupo de animales. * p<0.05 vs todos los grupos. Imágenes representativas de 3 experimentos con resultados similares.

Estos resultados en conjunto demuestran que el aumento de *NO observado en el grupo de animales Hsp90 α +I/R fue favorecido gracias a que la sobre-expresión muy probablemente aumento la interacción de Hsp90 α con eNOS, previniendo de esta manera

el estrés oxidativo y brindando un escenario favorable para mantener una buena integridad vascular ante el daño por I/R.

También evaluamos el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 α , sobre la cantidad de eNOS presente en el tejido renal, así como su estado de fosforilación. La Figura 37 muestra la autoradiografía del análisis de Western blot, y su análisis densitométrico representativo para eNOS total, eNOS fosforilada en el residuo de Ser-1177 (p-eNOS_{Ser1177}), y eNOS fosforilada en el residuo de Tre-497 (p-eNOS_{Tre1177}), estudiadas en lisados obtenidos de tejido renal de cada grupo de animales. Los animales que se transfectaron con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α presentaron un aumento la fosforilación de eNOS en la Ser-1177, reportada como fosforilación activante para la producción de *NO. De forma contraria, los niveles de proteína de eNOS total, así como la fosforilación del residuo de Tre-497 de eNOS, no presentaron cambios significativos en ninguno de los grupos de animales estudiados.

Es bien conocido, que la regulación por fosforilación de la actividad de eNOS para producir *NO es dependiente de su interacción con la proteína cinasa serina/treonina B (PKB, conocida también como Akt). A este respecto, se conoce que la actividad de Akt es también afectada por su unión a Hsp90, en donde, se ha reportado que Hsp90 estabiliza a Akt y previene su inactivación por desfosforilación ⁽⁶⁵⁾. Tomando en cuenta estos antecedentes, decidimos estudiar la participación de la proteína cinasa Akt en la actividad observada de eNOS para producir *NO.

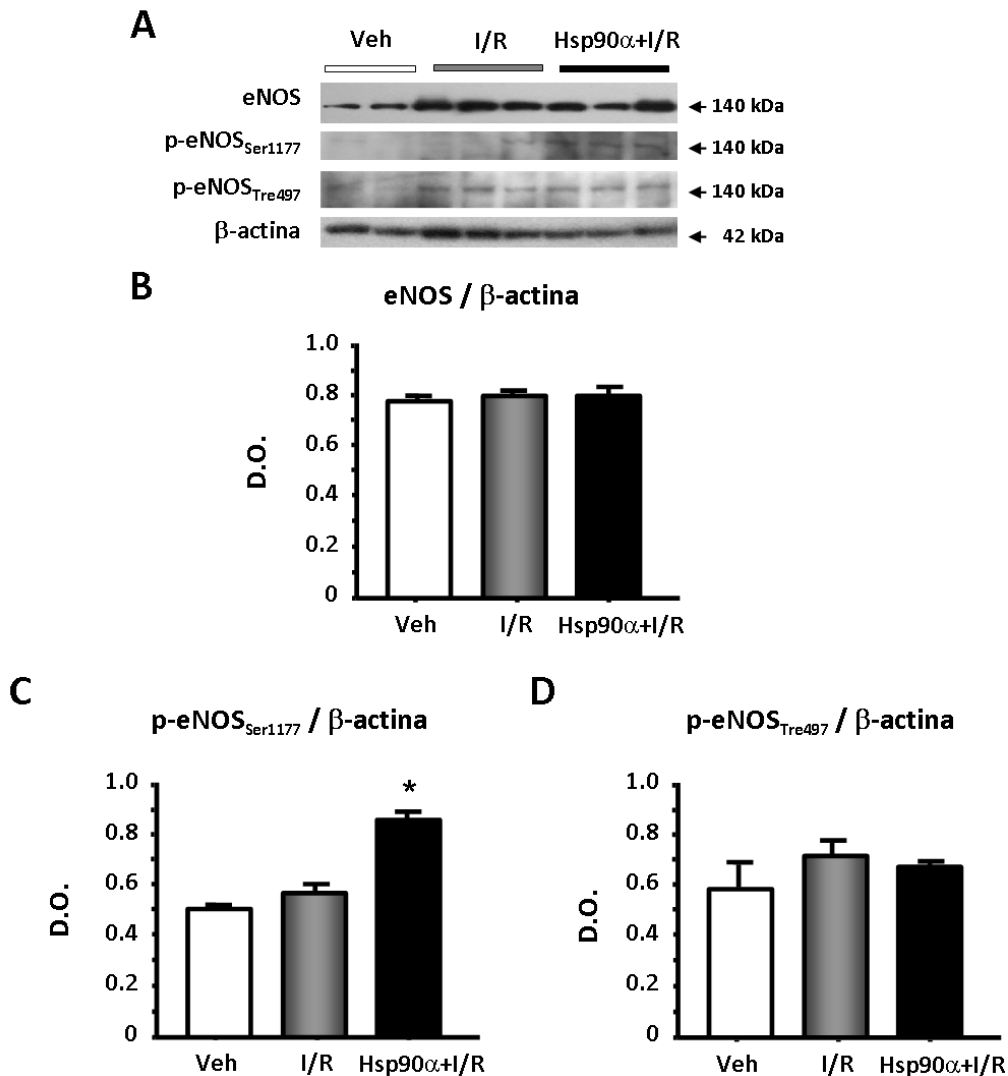


Figura 37. Efecto de la transfección de pcDNA3.1/Hsp90 α sobre los niveles de proteína de eNOS y su estado de activación por fosforilación, ante el daño inducido por I/R renal. A) Análisis de Western blot para eNOS total, eNOS fosforilada en el residuo de serina 1177 (p-eNOS_{Ser1177}) y eNOS fosforilada en el residuo de treonina 497 (p-eNOS_{Tre1177}), estudiado en lisados obtenidos de tejido renal de cada grupo de animales: Veh, ratas control; I/R, ratas sometidas únicamente a I/R y Hsp90 α +I/R, ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α y sometidas a I/R. B, C y D) Análisis densitométrico del Western blot para eNOS, p-eNOS_{Ser1177} y p-eNOS_{Tre1177}, respectivamente. * $p < 0.05$ vs grupo Veh e I/R. Imágenes representativas obtenidas con resultados equivalentes en todos los lisados de cada grupo de animales.

En la Figura 38, se muestra un análisis de Western blot representativo para Akt total y Akt fosforilada en el residuo Ser473 (p-Akt_{Ser473}). El grupo de animales que fue transfectado con el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α presentó un aumento en la cantidad de proteína p-Akt_{Ser473} con respecto a los otros grupos, efecto que no modificó la cantidad de proteína Akt total.

Por último y tomando en cuenta que estudios muy recientes de nuestro laboratorio han propuesto que la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp72) funciona como un marcador temprano de daño renal agudo ⁽⁷⁾, decidimos evaluar si la renoprotección inducida por la sobre-expresión de Hsp90 α se asocia a una disminución de este biomarcador de daño renal agudo.

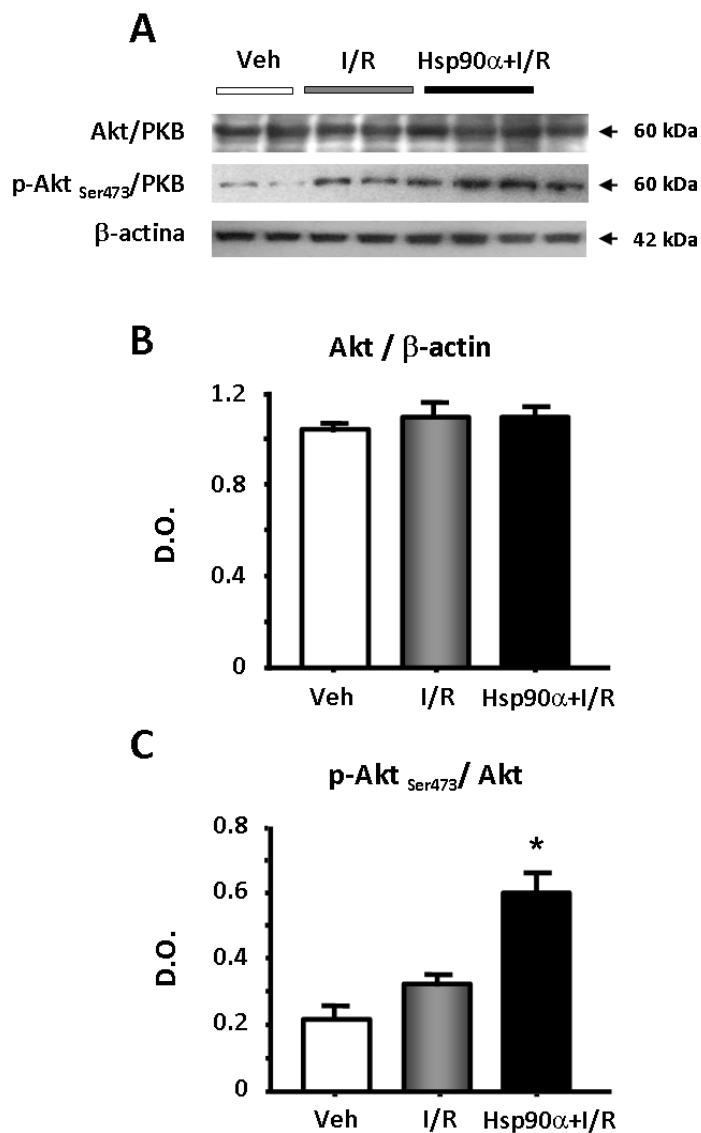


Figura 38. Influencia de la transfección pcDNA3.1/Hsp90 α sobre los niveles de la proteína cinasa Akt/PKB y su estado de activación por fosforilación, ante el daño renal inducido por I/R. A) Análisis de Western blot para Akt/PKB total, Akt fosforilada en el residuo de serina 473 (p-Akt_{Ser473}), estudiado en lisados obtenidos de tejido renal de cada grupo de animales: Veh, ratas control; I/R, ratas sometidas únicamente a I/R y Hsp90 α +I/R, ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α y sometidas a I/R. Análisis densitométrico del western blot para Akt/PKB total, ajustado con los niveles de la proteína β -actina (B), y C) p- Akt_{Ser473}, ajustado a los niveles de proteína Akt total. * $p < 0.05$ vs grupo Veh e I/R. Imagen representativa obtenida con resultados equivalentes en 3 experimentos medidos de forma independiente.

La Figura 39 muestra los niveles de proteína de Hsp72 en cada grupo de animales. Como hemos reportado previamente ⁽⁷⁾, el daño renal por I/R se reflejó en un aumento significativo de los niveles de la proteína Hsp72, efecto que fue parcialmente prevenido cuando los animales fueron transfectados con Hsp90 α .

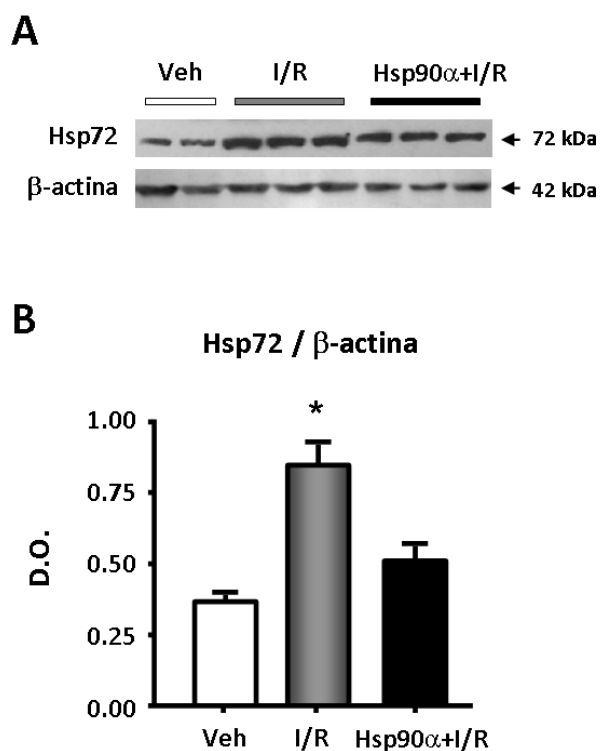


Figura 39. Efecto de la transfección pcDNA3.1/Hsp90 α sobre los niveles de la proteína de choque térmico de 72 (isoforma inducible de Hsp70), ante el daño renal inducido por I/R. A) Análisis de Western blot para Hsp72 estudiado en lisados obtenidos de tejido renal de cada grupo de animales: Veh, ratas control; I/R, ratas sometidas únicamente a I/R y Hsp90 α +I/R, ratas transfectadas con pcDNA3.1/Hsp90 α y sometidas a I/R. Análisis densitométrico del western blot para Hsp72, ajustado con los niveles de la proteína β -actina (B). *p<0.05 vs todos los grupos. Imagen representativa obtenida con resultados equivalentes en 3 experimentos medidos de forma independiente.

Nuestros resultados indican que la sobre-expresión de Hsp90 α obtenida al transfectar el plásmido pcDNA3.1/Hsp90 α previamente al daño renal por I/R, resultó en una renoprotección mediada por prevenir el estrés oxidativo y favorecer la producción de \bullet NO, vía eNOS/Akt, vía de señalización en la cual la isoforma Hsp90 α demostró ser un protagonista clave.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio demostramos por vez primera que Hsp90 α y Hsp90 β modulan diferencialmente la generación de $\cdot\text{NO}$ y de $\cdot\text{O}^{-2}$ por la sintasa de óxido nítrico endotelial. Evento que se asoció con cambios en el estado de fosforilación, tanto de la eNOS como de la proteína cinasa B/Akt.

Exactamente el cómo Hsp90 interactúa con la eNOS para modular su actividad enzimática, sigue siendo actualmente motivo de estudio. No obstante, chaperonas moleculares están involucradas en el cambio de la conformación de eNOS. En este escenario, Hsp90 parece tener un efecto positivo sobre el estado conformacional de eNOS que favorece la producción de $\cdot\text{NO}$, mientras que su ausencia permite que la enzima adopte una conformación diferente que favorece la generación de $\cdot\text{O}^{-2}$. En esta misma vía, la capacidad de eNOS para generar tanto $\cdot\text{NO}$ y $\cdot\text{O}^{-2}$ le permite modular una amplia gama de actividades celulares. De hecho, la eNOS ha demostrado ser capaz por si sola de generar $\cdot\text{NO}$, y $\cdot\text{O}^{-2}$ (22).

Es atractivo especular que la capacidad de la eNOS para generar radicales vasoactivos con opuestas propiedades fisiológicas puede actualmente ser una ventaja para entender los mecanismos que median la vasorelajación y la vasoconstricción con la finalidad de ser integrados en un único punto de control. Dicha capacidad proporciona ventajas únicas en la regulación de las funciones del endotelio en respuesta a estímulos fisiológicos y fisiopatológicos, en donde de forma interesante para nuestro estudio, Hsp90 parece guiar dicha capacidad de la eNOS. En este enfoque, nuestros resultados obtenidos mediante co-inmunoprecipitación sugieren que la interacción Hsp90 α /eNOS, previene un estado “disfuncional” de la eNOS, estado conformacional monomérico del cual se sugiere ser favorable para la síntesis de anión superóxido, a la vez que disminuye la producción de óxido nítrico.

Evidencias recientes apoyan la idea de que las consecuencias más importantes de favorecer el desacople de la eNOS puede ser el deterioro de vasodilatación dependiente

de endotelio, siendo este efecto una marca distintiva de la disfunción endotelial observada en fenómenos de daño renal como la isquemia-reperfusión ^(34,38).

Los estudios reportados actualmente sobre el papel fisiológico de Hsp90 son muy escasos, y menos aún, el papel específico de Hsp90 α y de Hsp90 β . Como una primera aproximación a este respecto, estudios muy recientes de nuestro laboratorio sugieren que Hsp90 está implicada en el mantenimiento de la función renal ⁽⁵⁹⁾. En este estudio observamos que la inhibición de Hsp90 produce vasoconstricción renal y disminución de la filtración glomerular, lo que se asoció con una reducción en la producción de *NO, reflejándose en cambios en el estado de fosforilación y en la dimerización de eNOS. Lo anterior sugiere que el *NO producido por eNOS en el endotelio de los capilares glomerulares regula el tono vascular renal y la filtración glomerular.

En la actualidad, no existe una técnica o herramienta de transferencia génica *in vivo* estandarizada para dirigir la expresión del transgén de manera tejido específico. A este respecto, las técnicas que existen actualmente se basan en la utilización de vectores lentivirales ⁽³¹⁾, los cuales son capaces, de activar por sí solos la transcripción génica con bases inmunológicas, aunque esta sea disminuida comparada con otros vectores; por lo que, su empleo futuro en el área clínica se encuentra muy limitado ^(43,44).

Tomando estos antecedentes, en el presente estudio llevamos a cabo el montaje y la estandarización de una técnica de transferencia génica basada en liposomas catiónicos y empleando vectores plasmídicos, tanto para los estudios *in vitro* como para los estudios *in vivo*. Para estos estudios, empleamos como control de transfección el plásmido pcDNA3.1/NT-GFP, con el fin de estandarizar tanto la cantidad de transgén como el tiempo óptimo de transfección. Las Figuras 6 y 9, muestran los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*; y las Figuras 19, 20 y 23, muestran lo obtenido en los estudios *in vivo*. Empleando la técnica de transfección *in vivo* logramos sobre-expresar de manera tejido específico a Hsp90 α , efecto que de manera importante e interesante se logró sin alterar

las cantidades tanto de RNAm como de proteína de Hsp90 β , Figuras 19 y 20, respectivamente.

Así mismo, el presente estudio demuestra que la sobre-expresión de Hsp90 α obtenida mediante transfección *in vitro* e *in vivo* (Figura 6 y 20, respectivamente) pre-estableció, en términos de la producción de $\cdot\text{NO}$, un ambiente “protector” a fin de brindar un ambiente antioxidante potencial, que se reflejó al disminuir algunos de los daños substanciales asociados al daño celular por isquemia/reperfusión, determinados por NO_2/NO_3 , lipoperoxidación, y H_2O_2 (Figura 15, 25 y 26A, respectivamente).

A diferencia de otras familias de proteínas de choque térmico, el papel que desempeñan las Hsp90 como chaperonas moleculares es un campo que ha crecido considerablemente en la última década. Sin embargo, muchos de estos estudios se han enfocado al conocimiento de las Hsp90 como una subfamilia, siendo muy limitados los estudios que consideran la participación individual de cada miembro de la subfamilia.

Como una primera aproximación para abordar el estudio específico de isoforma de Hsp90 α y de Hsp90 β en la regulación de la actividad catalítica de eNOS en la generación de $\cdot\text{NO}$ o $\cdot\text{O}^{-2}$ se consideraron, entre otros argumentos, las siguientes observaciones obtenidas de la literatura: 1) Las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β constituyen los miembros mayoritarios de la subfamilia de las Hsp90, abarcando el 90% de ella. 2) Las secuencias de nucleótidos de Hsp90 α y de Hsp90 β son mucho menos parecidas en comparación con las secuencias de sus productos proteicos. 3) Una diferencia importante desde el aspecto conformacional es que Hsp90 α dimeriza fácilmente, mientras que Hsp90 β lo hace con mucho menos eficiencia. 4) Hsp90 es primordialmente un dímero constitutivo (monómeros $\alpha\alpha$ o monómeros $\beta\beta$). Sin embargo, los monómeros (α o β), los heterodímeros ($\alpha\beta$) y los oligómeros de ambas isoformas también existen. Finalmente, 5) El potencial de dimerización de Hsp90 reside principalmente en los 190 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína ^(19, 25, 75).

Resumiendo lo anterior, podemos decir que existen ciertas áreas en las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos que difieren entre las isoformas de Hsp90 α y de Hsp90 β que plantea la posibilidad de que existan funciones específicas de isoforma, tales como la unión diferencial a sus proteínas cliente.

Al respecto de los puntos 3, 4 y 5 anteriores, otros autores confirmaron que la secuencia de aminoácidos presentes entre la parte final del dominio medio y el inicio del dominio carboxi-terminal (MC) de la proteína Hsp90 α determina la estabilidad de la conformación dimérica de ésta isoforma ⁽³²⁾. De forma más específica, el defecto que causa que Hsp90 β no pueda dimerizarse con la misma facilidad que Hsp90 α , se debe a la sustitución de tan solo 2 residuos de aminoácidos presentes en el dominio MC de Hsp90 α que difieren del MC de Hsp90 β .

Estudios previos han demostrado de manera clara que Hsp90 regula positivamente la actividad de eNOS. En estos estudios se demostró por primera vez que Hsp90 atenúa la producción de superóxido por eNOS, a la vez que favorece la producción de $\bullet\text{NO}$ ^(23, 72). Sin embargo, en estos estudios como en muchos otros, la isoforma de Hsp90 que se utilizó no es especificada y de ser mencionada, el anticuerpo que se utilizó para los estudios de co-inmunoprecipitación como de Western blot no discrimina cada isoforma de Hsp90. Experimentalmente, estos estudios no nos permiten determinar el papel específico de cada isoforma de Hsp90, ya que no permiten de manera específica diferenciar el papel que existe entre Hsp90 α y Hsp90 β .

Considerando las observaciones anteriores, los resultados obtenidos en los estudios de transfección en células HEK-293, en el cual comparamos la abundancia relativa dímero/monómero de cada isoforma de Hsp90 (Figura 16) y su interacción con eNOS (Figura 13), apoyan fuertemente la idea de que pueda existir una unión diferencial de cada isoforma dependiente de su estabilidad conformacional, tanto con ella misma como con la sintasa de óxido nítrico endotelial (Figura 17).

Los resultados anteriores, se acompañaron de una actividad diferencial, y de forma interesante opuesta, entre Hsp90 α y de Hsp90 β con respecto a la producción de radicales vasoactivos. Mientras que por un lado Hsp90 α favoreció la producción de \bullet NO, previniendo la generación de \bullet O⁻²; Hsp90 β , favoreció un ambiente oxidante, al promover la producción de \bullet O⁻² y disminuir la síntesis de \bullet NO (Figuras 11 y 15).

En conjunto, los estudios enfocados a definir los mecanismos moleculares por los cuales Hsp90 regula la actividad de eNOS se pueden resumir fundamentalmente en tres mecanismos: 1) Hsp90 coordina la estabilidad de la conformación activa de la eNOS y previene la conformación disfuncional de la eNOS, 2) Hsp90 sirve de proteína adaptadora para la formación dinámica del heterocomplejo proteico para la actividad funcional de la eNOS, incluyendo a la proteína cinasa B/Akt, y 3) Hsp90 promueve la degradación vía proteosoma de la eNOS, en caso de fallar alguno de los 2 primeros mecanismos de activación ^(29, 30, 41, 65, 70, 71, 72).

El grupo de investigación del Dr. William C. Sessa ha descrito de manera clara que para que eNOS sea capaz de producir \bullet NO de forma eficiente se requiere del acoplamiento correcto de la L-arginina con eNOS, proceso que es relacionado con la fosforilación del residuo Tre497, en coordinación con la unión entre eNOS y Hsp90. A este respecto, numerosos estudios han surgido enfocados a explicar el mecanismo mediante el cual Hsp90 regula la capacidad de la eNOS para producir en ciertas condiciones \bullet NO y en otras \bullet O⁻² ^(36, 66, 81).

El grupo de investigación de la Dra. Vásquez-Vivar, describe en el 2006 que la generación de \bullet O⁻² por eNOS no es dependiente de la fosforilación del residuo de Ser1177 ni de la distribución dimero/monómero de eNOS ⁽⁸²⁾. De forma interesante, dichos eventos de eNOS se han descrito ser cruciales para la producción de \bullet NO por eNOS ^(66, 81). Los resultados obtenidos *in vivo* reflejan que la transfección de Hsp90 α , previo al insulto por I/R renal, favoreció un estado de activación de eNOS mediado por un aumento en la

fosforilación del residuo de Ser1179, promoviendo la generación de $\bullet\text{NO}$ y previniendo a su vez la producción de $\bullet\text{O}^{-2}$ (Figura 27). En apoyo a este resultado, los estudios *in vitro* demuestran que la sobre-expresión de Hsp90 α aumenta la relación dímero/monómero de eNOS lo que a su vez se tradujo a una mayor producción de $\bullet\text{NO}$ en células HEK-293 (Figura 17). De manera interesante, dicho efecto fue contrario al que se obtuvo cuando se sobre-expresa Hsp90 β .

El mecanismo por el cual Hsp90 favorece la fosforilación del residuo de Ser1179 de eNOS y de esta manera genera $\bullet\text{NO}$ es basado en la capacidad de la Hsp90 para funcionar como una proteína adaptadora entre la eNOS y la proteína Akt, cinasa responsable de fosforilar dicho residuo. Los resultados obtenidos mediante el análisis de Western blot de eNOS utilizando fosfo-anticuerpos para Akt y para Akt total (Figura 14, para estudios *in vitro* y Figura 28, para estudios *in vivo*) proveen evidencia para suponer que la capacidad de Hsp90 α para favorecer la producción de $\bullet\text{NO}$ por eNOS es mediada en gran medida por la activación de Akt, escenario contrario al observado cuando se transfecta Hsp90 β . Con estos resultados, Hsp90 α y Hsp90 β exhiben trabajar de manera opuesta en la forma de mediar la activación de eNOS para generar óxido nítrico o anión superóxido, respectivamente.

En la práctica clínica, es bien conocido que la disminución del flujo sanguíneo renal es determinante en la iniciación y ampliación de la fisiopatología de la insuficiencia renal aguda ⁽⁷⁵⁾. Un evento asociado a esta fisiopatología es el hecho de que el tono vascular se encuentra afectado por una reducción de $\bullet\text{NO}$ derivado de la eNOS. En efecto, la disminución de la función de eNOS es una de las características de la disfunción endotelial asociada con insuficiencia renal aguda ⁽⁷³⁾. En este sentido, el aumento de la actividad de la eNOS inducida por pre-acondicionamiento isquémico protege a los riñones de I/R ⁽⁷⁴⁾. En conjunto, estos estudios revelan un papel importante en la actividad de eNOS como proteína protectora contra el daño inducido por I/R renal.

En el presente estudio, como era de esperarse, observamos una reducción significativa en la cantidad de NO₂/NO₃ urinarios en los animales sometidos a isquemia de 30 min y reperusión de 24 h. De forma interesante, la transfección de Hsp90α fue capaz de prevenir esta caída de •NO, sugiriendo que la transfección de Hsp90α preestableció una actividad de la eNOS, que favoreció a su vez, una eficiente generación de •NO asociándose como un mecanismo renoprotector ante el daño inducido (Figura 26A).

Hallazgos recientes de nuestro laboratorio proponen a la Hsp72 como un biomarcador sensible y temprano del daño renal inducido en ratas sometidas a isquemia/reperusión ⁽⁶³⁾. Sustentándonos en estos hallazgos, en el presente trabajo encontramos que los animales sometidos a I/R exhibieron niveles elevados en los niveles de proteína de Hsp72 en el tejido renal, reflejando de manera indirecta el grado de daño generado en este grupo de animales. De manera sorprendente, a los animales a los que se les transfectó Hsp90α y que fueron sometidos a I/R, exhibieron niveles muy similares a los del grupo sham, indicando que el daño renal producido en estos animales fue mucho menor comparado con los del grupo de animales sometidos a I/R.

Actualmente se realizan estudios histológicos, empleando la tinción de PAS, HE y TUNEL, que ayudarán a explicar en mas detalle el mecanismo por el cual los animales transfectados con Hsp90α y sometidos a I/R, preconditionan un ambiente renoprotector.

Finalmente, un aspecto importante a considerar de este trabajo es que las diferencias de Hsp90 dependientes de isoforma (Hsp90α o Hsp90β) nos advierten de la necesidad de estudiar las funciones de Hsp90 de manera independiente para cada una de las isoformas. Nuestros hallazgos, en conjunto con los conocimientos que existen en la literatura hasta este momento, señalan que la intervención farmacológica y la necesidad del desarrollo de inhibidores específicos de isoforma para Hsp90 serán motivo de estudio en el futuro.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Anfinsen CB, 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*; Jul 20, 181(96):223-30.
2. Antonova G, Lichtenbeld H, Xia T, 2007. Functional significance of hsp90 complexes with NOS and sGC in endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc*; 37:19-35.
3. Aufricht C, Ardito T, Thulin G, 1998. Heat-shock protein 25 induction and redistribution during actin reorganization after renal ischemia. *Am J Physiol*; 274:F215-F222.
4. Averna M, Stifanese R, De Tullio R, Salamino F, Pontremoli S and Melloni E, 2008. In vivo degradation of nitric oxide synthase (NOS) and heat shock protein 90 (HSP90) by calpain is modulated by the formation of a NOS-HSP90 heterocomplex. *FEBS J*; 275(10):2501-11.
5. Bagatell R, Whitesell L, 2004. Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Mol Cancer Ther*; 3:1021-1030.
6. Balligand JL, 2002. Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling: following the lead(er)? *Circ Res*; 90:838-841.
7. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Cortés-González C, Ojeda-Cervantes M, Gamba G, Morales-Buenrostro LE, Bobadilla NA, 2011. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury. *EMBO Mol Med*; Jan 3(1):5-20.
8. Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, 1999. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system *in vivo*. *J Biol Chem*; 274:1472-1478.
9. Bidmon B, Endemann M, Muller T, 2002. HSP-25 and HSP-90 stabilize Na, K-ATPase in cytoskeletal fractions of ischemic rat renal cortex. *Kidney Int*; 62:1620-1627.

10. Borkan SC, Gullans SR, 2002. Molecular chaperones in the kidney. *Annu Rev Physiol*; 64:503-527.
11. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, 2001. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide- mediated effects of statins. *Circ Res*; 89:866-873.
12. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, 2001. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺- dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem*; 276:32663-32669.
13. Buchner J, 1999. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*; 24:136-141.
14. Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, 1991. Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J Biol Chem*; 266:5834-5841.
15. Caplan AJ. 1999. Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol*; 9:262-268.
16. Chen Y, Schnetz MP, Irarrazabal CE, 2007. Proteomic identification of proteins associated with the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP: functional effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol Renal Physiol*; 292: F981-F992.
17. Cortes-González C, Barrera-Chimal J, Ibarra-Sánchez M, Gilbert M, Gamba G, Zentella A, Flores ME, Bobadilla NA, 2010. Opposite effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells. *Cell Physiol Biochem*; 26(4-5): 657-68.
18. Cortés-González CC, Ramírez-González V, Ariza AC, Bobadilla NA, 2008. Functional significance of heat shock protein 90. *Rev Invest Clin*; 60(4):311-20.

19. Csermely P, Schnaider T, Soti C, 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*; 79:129-168.
20. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z and Nardai, G, 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther*; 79, 129-168.
21. Csermely P, Soti C, Blatch GL, 2007. Chaperones as parts of cellular networks. *Adv Exp Med Biol.*; 594:55-63.
22. Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR and Thorin E, 2007. Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatatory H₂O₂ production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc. Res*; 73, 73–81.
23. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*; 392:821-824.
24. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E, 2004. NO bioavailability, endothelial dysfunction, and acute renal failure: new insights into pathophysiology. *Semin Nephrol*; 24: 316–323.
25. Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Siganou A, Schweinfest CW, Watson DK and Raptis L, 2002. The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem*; 277, 8312-8320.
26. Gupta RS, 1995. 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*; 12:1063-1073.
27. Hurtley SM, Helenius A, 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*; 5:277-307.

28. Jiang B, Xiao W, Shi Y, 2005. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress Chaperones*; 10:252-262.
29. Karl Stangl and Verena Stangl, 2010. The ubiquitin-proteasome pathway and endothelial (dys) function. *Cardiovascular Research*; 85, 281–290.
30. Kim GH, Masilamani S, Turner R, 1998. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:14552-14557.
31. Kim M, Won Park S, Kim M, WC Chen S, Gerthoffer WT, D D'Agati W and Thomas Lee H, 2010. Selective Renal Over-Expression of Human Heat Shock Protein 27 Reduces Renal Ischemia–Reperfusion Injury in Mice. *Am J Physiol Renal Physiol*; May 19.
32. Kobayakawa T, Yamada S, Mizuno A, Nemoto TK, 2008. Substitution of only two residues of human Hsp90 alpha causes impeded dimerization of Hsp90 beta. *Cell Stress Chaperones*; 13(1): 97-104.
33. Komatsuda A, Wakuil H, Imai H, 1999. Expression of 90-kDa heat shock protein within regenerative tubular cells in a patient with acute oliguric renal failure due to malignant hypertension. *Ren Fail*; 21:113-117.
34. Konduri GG, Ou J, Shi Y, Pritchard KA Jr, 2003. Decreased association of HSP90 impairs endothelial nitric oxide synthase in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285:H204–H211.
35. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, and Zhi-Yuan Yu, 2003. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*; 285: F178–F190.
36. Kregel KC, 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*; May;92(5):2177-86.

37. Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, 2004. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24:1435-1441.
38. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG, 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*; 111: 1201–1209.
39. Lei H, Venkatakrisnan A, Yu S, 2007. Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem*; 282:9364-9371.
40. Li Z, Dai J, Zheng H, Liu B, Caudill M, 2002. An integrated view of the roles and mechanisms of heat shock protein gp96-peptide complex in eliciting immune response. *Front Biosci*; Mar 1, 7:d731-51.
41. Li Z, Menoret A, Srivastava P, 2002. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol*; Feb;14(1):45-51.
42. Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*; 22:631-677.
43. Lipkowitz M, Hanss B, Tulchin N, Wilson N, Langer J, Ross M, Kurt-man G, Klotman P, Klotman M, 1999. Transduction of renal cells in vitro and in vivo by adeno-associated virus gene therapy vectors. *J Am Soc Nephrol*; 10:1908-15.
44. Liu MA, 2010. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity*; Oct 29, 33(4):504-15.
45. Lu C, Chen D, Zhang Z, 2007. Heat Shock Protein 90 regulates the stability of c-Jun in HEK293 Cells. *Mol Cells*; 24:210-214.
46. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, 1999. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*; 104:R19-R23.

47. Matsubara O, Kasuga T, Marumo F, 1990. Localization of 90-kDa heat shock protein in the kidney. *Kidney Int*; 38:830-834.
48. Maxwell AJ, 2002. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide*; Mar 6(2):101-24.
49. Mayer MP, Bukau B, 1999. Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr Biol*; 9:R322-R325.
50. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, 1991. Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J Biol Chem*; 266:10099-10103.
51. Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*; 12:3788-3796.
52. Morita K, Wakui H, Komatsuda A, 1995. Induction of heat-shock proteins HSP73 and HSP90 in rat kidneys after ischemia. *Ren Fail*; 17:405-419.
53. Neckers L, 2007. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci*; 32:517-530.
54. Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL, 2004. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*; 287:F274-F280.
55. Ou J, Fontana JT, Ou Z, 2004. Heat shock protein 90 and tyrosine kinase regulate eNOS NO[•] generation but not NO[•] bioactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 286:H561-H569.
56. Pratt WB, Toft DO, 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med*; 228:111-133.

57. Pritchard KA, Jr., Ackerman AW, Gross ER, 2001. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*; 276:17621-17624.
58. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*; 90:65-75.
59. Ramirez V, Mejía-Vilet JM, Blanco JA, Gamba G, Bobadilla NA, 2007. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition reduces glomerular filtration rate (GFR) and sodium excretion. *The FASEB J*; 20 [4]-A760.
60. Ramirez V, Uribe N, Garcia-Torres R, Bobadilla NA, 2004. Upregulation and intrarenal redistribution of heat shock proteins 90alpha and 90beta by low-sodium diet in the rat. *Cell Stress Chaperones*; 9:198-206.
61. Richter K, Buchner J, 2001. Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*; 188:281-290.
62. Ritossa FA, 1962. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*; 18:571-573.
63. Sangster TA, Bahrami A, Wilczek A, 2007. Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS ONE*; 2: e648.
64. Sangster TA, Queitsch C, Lindquist S, 2003. Hsp90 and chromatin: where is the link? *Cell Cycle*; 2:166-168.
65. Sato S, Fujita N, Tsuruo T, 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci, USA*; Sep 26, 97(20):10832-7.
66. Schober A, Burger-Kentischer A, Muller E, 1998. Effect of ischemia on localization of heat shock protein 25 in kidney. *Kidney Int Suppl*; 67:S174-S176.

67. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A, 2004. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest*; 114: 5–14.
68. Seal JB, Gewertz BL, 2005. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg*; Jul, 19(4):572-84.
69. Seok JH, Hong JH, Jeon JR, 1999. Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit mRNA in the renal cortex of rat. *Biochem Mol Biol Int*; 47:251-254.
70. Shames DS, Minna JD, 2008. IP6K2 is a client for HSP90 and a target for cancer therapeutics development. *Proc Natl Acad Sci USA*; Feb 5, 105(5):1389-90. Epub 2008 Jan 29.
71. Shen Y, Liu J, Wang X, 1997. Essential role of the first intron in the transcription of hsp90beta gene. *FEBS Lett*; 413:92-98.
72. Song Y, Cardounel AJ, Zweier JL, Xia Y, 2002. Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heat shock protein 90: implications in NOS regulation. *Biochemistry*; 41: 10616 –10622.
73. Soti C, Pal C, Papp B et al. 2005. Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr Opin Cell Biol*,; 17:210-215.
74. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*; 562:11-15.
75. Subbarao Sreedhar A, Kalmar E, Csermely P, Shen YF, 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*; 562: 11-15.
76. Sud N, Sharma S, Wiseman DA, 2007. Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by Hsp90. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293:L1444-L1453.

77. Sud N, Sharma S, Wiseman DA, Harmon C, Kumar S, Venema RC, Fineman JR, Black SM, 2007. Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293: L1444–L1453.
78. Sun J, Liao JK, 2004. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24:2238-2244.
79. Tsutsumi S, Neckers L, 2007. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci*; 98:1536-1539.
80. Verhaar MC, Westerweel PE, van Zonneveld AJ and Rabelink TJ, 2004. Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart*; May, 90(5):494-5.
81. Wakui H, Komatsuda A, Miura AB, 1995. Heat-shock proteins in animal models for acute renal failure. *Ren Fail*; 17:641-649.
82. Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, 2006. The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J*; 25:367-376.
83. Waza M, Adachi H, Katsuno M et al. 2005. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med.*; 11:1088-1095.
84. Wei Q, Xia Y, 2005. Roles of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function by heat shock protein 90. *J Biol Chem*;280:18081-18086.
85. Welch WJ, 1991. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr Opin Cell Biol*; 3:1033-1038.
86. Whitsett J, Martásek P, Zhao H, Schauer WD, Hatakeyama K, Kalyanaraman B, Vásquez-Vivar J, 2006. Endothelial cell superoxide anion radical generation is not dependent on endothelial nitric oxide synthase–serine 1179 phosphorylation and

- endothelial nitric oxide synthase dimer/monomer distribution. *Free Radical Biology & Medicine*; 40: 2056–2068.
- 87.** Xia Y, 2007. Superoxide Generation from Nitric Oxide Synthases. *Antioxidants & redox signaling*. Vol 9, № 10, 1773–1778.
- 88.** Xu W, Neckers L, 2007. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res*; 13:1625-1629.
- 89.** Xu W, Yu F, Yan M, 2004. Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding agent, disrupts Stat5 activation in IL-2-stimulated cells. *J Cell Physiol*;198:188-196.
- 90.** Yamasowa H, Shimizu S, Inoue T, Takaoka M, Matsumura Y, 2005. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*; 312: 153–159.
- 91.** Yoshida M, Xia Y, 2003. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*; 278:36953-36958.
- 92.** Zhang L, Nephew KP, Gallagher PJ, 2007. Regulation of death-associated protein kinase. Stabilization by Hsp90 heterocomplexes. *J Biol Chem*; 282:11795-11804.
- 93.** Zhang SL, Yu J, Cheng XK, 1999. Regulation of human Hsp90 alpha gene expression. *FEBS Lett*; 444:130-135.
- 94.** Zou J, Guo Y, Guettouche T, 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*; 94:471-480.

VII. ARTÍCULOS

KARGER

understanding of ischemic ARF pathogenesis, an effective clinical therapy to prevent cellular and organ dysfunction resulting from IR injury is still not available [1–3].

There is a growing body of evidence that inflammation plays a key role in the pathogenesis of ischemic ARF [3, 4]. An acute inflammatory response results in endothelial activation and injury, followed by the expression of different adhesion molecules that enhance endothelial cell-leukocyte interaction, leukocyte infiltration and vascular congestion predominantly in the outer medulla [4]. These processes are accompanied by the production of multiple chemokines and proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6). These proinflammatory cytokines play a key role in leukocyte activation and recruitment. In addition, sequestered leukocytes potentiate injury by further generating cytokines, ROS, eicosanoids and multiple proinflammatory mediators that enhance inflammation and renal vasoconstriction [3]. Renal epithelial cells are also able to generate inflammatory mediators [5].

Angiotensin II (ANGII) is the main peptide of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). The kidney contains all the components of RAAS and it is capable of producing ANGII locally. RAAS activation is involved in the pathogenesis of several renal diseases [6]. ANGII binds to two main receptors: ANGII type 1 receptor (AT1) and ANGII type 2 receptor (AT2). AT1 receptor is responsible for most of the pathophysiological actions of ANGII and it is extensively expressed in renal vasculature, glomeruli and tubules [7]. Acting through AT1 receptor, ANGII is a potent intrarenal vasoconstrictor and modulates GFR by exerting direct actions on the tone of afferent and efferent arterioles and on mesangial contraction.

ANGII via AT1 also mediates non-hemodynamic actions such as inflammation, proliferation and fibrosis, which are important in the development of renal damage [6]. The proinflammatory actions of ANGII include vascular permeability increment, enhancement of adhesion of circulating cells to endothelial and mesangial cells, recruitment of inflammatory cells to the kidney and leukocyte activation [8] and upregulation of adhesion molecules [9], chemokines and cytokines [10], and growth factors [6].

ANGII also stimulates aldosterone secretion from the adrenal gland. Recent studies in humans and experimental models have shown that aldosterone plays a major role in the pathophysiology of renal injury [11, 12]. The block-

ade of ANGII actions by using angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or AT1 receptor antagonists has been shown to have renoprotective effects in human and experimental nephropathies [13–15]. Several studies have described increased levels of intrarenal ANGII after renal IR injury [16, 17]. However, the role of ANGII in the course of ischemic ARF has not been fully established and the studies reported are contradictory [17–19].

In the present work, we studied the effects of pretreatment with the AT1 receptor blocker, losartan, on post-ischemic renal function, histopathology, inflammatory response and serum aldosterone levels in an experimental model of unilateral IR injury.

Materials and Methods

Animals

Adult male Wistar rats (300–350 g) were used in all the experiments. The animals were housed in temperature- (21–23°C) and light-controlled (06:00–18:00 h) rooms and maintained on a standard diet and water ad libitum. All experiments were performed according to our institutional guidelines for the care and use of laboratory animals.

Animals were randomly divided into the following groups: sham operated rats (C), losartan pretreated animals (8 mg/kg/day) during 3 days and submitted to sham operation (CL8), losartan pretreated animals (80 mg/kg/day) and submitted to sham operation (CL80), rats that underwent 40 min of unilateral ischemia followed by 24 h of reperfusion (IR) and rats pretreated with losartan 8 mg/kg/day (IRL8) or 80 mg/kg/day (IRL80) before unilateral ischemia was performed. Losartan (Roemmers Laboratory, Buenos Aires, Argentina) was dissolved in saline in order to inject all the rats with the same volume, and was administered intraperitoneally [20, 21] over 3 consecutive days. The last dose was administered 1 h before the ischemic insult. The selection of the doses was based on previous pilot experiments performed in our laboratory.

Unilateral renal ischemia or sham operation were performed under anesthesia with sodium thiopental (70 mg/kg b.w., i.p.). A non-traumatic vascular clamp was placed around the right renal artery for 40 min [22, 23]. Total ischemia was confirmed by observing blanching of the entire kidney surface. The animals were placed on a heating pad to keep a constant body temperature (37°C). After 40 min of ischemia, the clamp was removed and blood reflow was verified visually, thereafter abdominal incision was sutured. The animals were allowed to recover from anesthesia and placed in individual cages for 24 h with free access to food and water.

A group of animals ($n = 4$) was pretreated with losartan vehicle (saline) for 3 days before undergoing unilateral ischemia. Urine output (V') and glomerular filtration rate (GFR) in the postischemic kidneys of these rats did not differ to that observed in the IR rats without saline pretreatment (V' : 1.5 ± 0.6 ; 1.6 ± 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ and GFR: 0.03 ± 0.01 ; 0.04 ± 0.01 $\text{ml}/\text{min}/\text{g}$, respectively).

Renal Function Studies and Mean Arterial Pressure Measurements

One hour before the end of the 24-hour reflow period, the animals were anesthetized with sodium thiopental (70 mg/kg b.w., i.p.; n = 5–10 per experimental group) and they were prepared for renal clearance studies as previously reported [22, 23]. The femoral vein and the femoral artery were cannulated. The ureter from the postischemic kidney was exposed and cannulated with a catheter for urine collection. In sham operated animals, the right ureter was cannulated for urine collection. An isotonic saline solution containing inulin (1 g/100 ml) was infused through the femoral vein at a rate of 5.0 ml/h using a constant infusion pump (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, Mass., USA). After equilibration for 60 min, urine samples were obtained over two 30-min periods. Blood samples from the femoral artery were obtained at the midpoint of each collection period. Mean arterial pressure (MAP) was determined through the left femoral artery catheter connected to a manometer. Two consecutive measurements were obtained before the beginning of the infusion for clearance studies.

Plasma was separated immediately after centrifugation for inulin, Na⁺, K⁺ and osmolality measurements. Urine volume was measured gravimetrically. Urinary inulin, Na⁺ and osmolality were measured. GFR was estimated by inulin clearance. Urine output, fractional excretion of water and sodium were calculated by conventional formulae for each animal. The urine-to-plasma osmolality ratio (U/P) was also calculated. V' and GFR were expressed per gram of kidney. Serum aldosterone levels were also measured (n = 5).

In other groups of rats (n = 6 per group), renal blood flow (RBF) was measured with an ultrasound transit time flow probe. Due to anatomical limitations to perform this technique in the right renal artery, in this experimental group, ischemia was performed by clamping the left renal artery. After 24 h of reperfusion, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg) and placed on a homeothermic table. Via a midline abdominal incision, the left renal artery was exposed. An ultrasound transit time flow probe (1RB; Transonic, Ithaca, N.Y., USA) was placed around the left renal artery and filled with ultrasonic coupling gel (HR Lubricating Jelly; Carter-Wallace, New York, N.Y., USA) for recording RBF.

Histopathological Studies

Excised kidneys (n = 4–6 per group) were processed for light microscopic observation, according to standard procedures. Briefly, the tissue was fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin and sectioned (3–5 μm). The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or periodic acid-Schiff (PAS) and examined under a light microscope. A quantitative score of PAS-positive tubules was evaluated in 5 recorded digital microphotographs using a digital camera incorporated in a Nikon microscope, which were randomly taken from corticomedullary fields per kidney (magnification ×200). Results were expressed as percentage of PAS-positive tubules from total counted tubules.

Renal Myeloperoxidase (MPO) Activity

Kidneys were excised (n = 6 per experimental group) and MPO activity was measured as previously described [24]. The cortex and medulla were dissected out, minced and homogenized (1 g of tissue per 19 ml of buffer) in a buffer solution containing

0.1 M NaCl, 0.02 M Na₃PO₄, 0.015 M EDTA, pH 4.7, and centrifuged for 15 min at 3,000 g at 4°C. The pellet underwent hypotonic lysis (15 ml of 0.2% NaCl solution followed by addition of 15 ml of a solution containing 1.6% NaCl and 5% glucose). After a further centrifugation, the pellet was resuspended in pH 5.4 buffer containing 0.05 M Na₃PO₄ and 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and rehomogenized. One-milliliter aliquots of the suspension were transferred into 1.5-ml Eppendorf tubes and freeze-thawed three times in liquid nitrogen. To verify MPO heat resistance, the tubes were incubated in a water bath for 2 h at 60°C [25] and then centrifuged for 15 min at 10,000 g at 4°C. MPO activity in the supernatants was assayed by measuring the change in optical density (OD) at 652 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM), H₂O₂ (0.5 mM) and Na₃PO₄ (80 mM) pH 5.4. One unit of MPO activity was defined as the quantity required to reduce 1 μmol of H₂O₂/min at 25°C. Results were expressed as changes in OD per gram of tissue.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNA levels were measured by RT-PCR (n = 5 per experimental group). RNA was isolated from cortical or medullary tissues using TRIzol (Invitrogen, Capital Federal, Argentina) according to the manufacturer's instructions. Oligo dT-primed reverse transcription was performed at 37°C for 1 h after denaturation of the RNA at 70°C for 5 min with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT; Promega, Madison, Wisc., USA).

PCR was performed in a master mix: 1.5 μl of cDNA solution, 1× PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTPs, and 1 U platinum DNA polymerase (Invitrogen). Each cytokine (TNF-α, IL-1β or IL-6) was co-amplified in the same tube with β-actin. Primer concentrations for amplification of the different cytokines were: TNF-α 0.2 μM and β-actin 0.04 μM; IL-1β 0.4 μM and β-actin 0.04 μM; IL-6 0.2 μM and β-actin 0.04 μM.

The amplification profile consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by cycles of 94°C for 1 min, T_m (according to the mRNA of interest) for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min. T_m values were: TNF-α: 58°C, IL-1β: 50°C, and IL-6: 60°C. To validate the use of this RT-PCR assay as a tool for the semiquantitative measurement of cytokine mRNA, cycle number curves were established for the different cytokines, and the samples were quantitated in the curvilinear phase of PCR amplification. The number of cycles used was 33 for TNF-α and 32 for IL-1β and IL-6. The primers used were: TNF-α (product length: 382 bp), sense 5'-GTTCTATGGCCCAGACCCCTACA-3' and antisense 5'-TCCCAGGTATATGGGCTCATAACC-3'; IL-1β (product length: 184 bp), sense 5'-CTGACAGACCCCCAAAAGATT-3' and antisense 5'-AGAAGGTGCTCATGTCTCTCA-3'; IL-6 (product length: 154 bp), sense 5'-TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3' and antisense 5'-TCTGACCACAGTGA-GGAATGTCCAC-3'; β-actin (product length: 911 bp), sense 5'-GGTGACGAGGCCAGAGCAAG-3' and antisense 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGGT-3'. All the amplification conditions were assayed in order to use, in each sample, the minimal number of amplification cycles that allows analyses of products in agarose gels. Amplified PCR products were electrophoresed on a 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and analyzed using a Kodak Electrophoresis Documentation Analysis System (EDAS). The intensity of bands was measured by densitometry for semiquantification. The intensities of TNF-α, IL-1β and IL-6

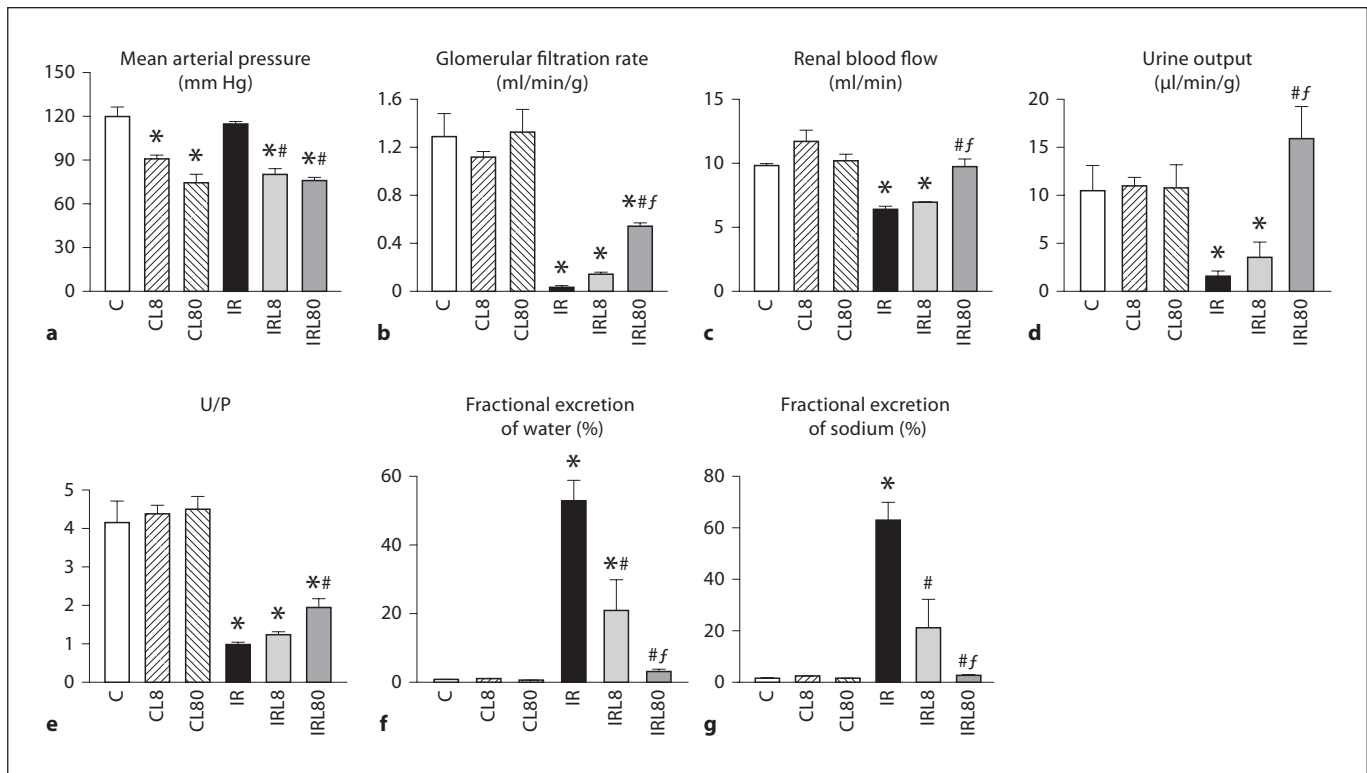


Fig. 1. Effects of losartan pretreatment on MAP and renal function after IR. Renal functional parameters were evaluated in sham operated rats (C), rats submitted to IR, and rats pretreated with losartan 8 or 80 mg/kg/day and submitted to sham operation (CL8 and CL80) or to IR injury (IRL8 and IRL80). Urine was collected from the ureter of the postischemic kidney or the right kidney of sham operated rats: (a) mean arterial pressure, (b) glomerular

ular filtration rate, (c) renal blood flow, (d) urine output, (e) urine-to-plasma osmolality ratio (U/P), (f) fractional excretion of water, and (g) fractional excretion of sodium. Results are expressed as mean \pm SEM. $n = 5-10$ per experimental group. * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. IR; $^f p < 0.05$ vs. IRL8. Glomerular filtration rate and urine output are expressed per gram of kidney.

mRNA were normalized to the corresponding band intensity of β -actin in the same sample. Comparisons were performed between samples run on the same gel. Values from control samples were averaged and were assumed as 1.

Analytical Methods

Plasma and urine inulin concentrations were determined by Roe's procedure [26]. Sodium and potassium concentration were measured by flame photometry, and osmolality by using a freezing-point osmometer (Osmomat 030; Gonotec GmbH, Berlin, Germany). Serum aldosterone levels were measured by radioimmunoassay according to the manufacturer's directions (DiaSorin SpA, Saluggia, Italy).

Statistics

All results were expressed as mean \pm SEM. Statistics were performed using the one-way analysis of variance followed by Newman-Keuls contrasts. The 0.05 level of probability was used as the criterion of significance in all cases.

Results

Effects of Losartan Pretreatment on MAP, Renal Function and Tissue Damage after IR

As shown in figure 1a, IR injury did not modify MAP in non-pretreated rats. In contrast, AT1 receptor blockade with both doses of losartan assayed reduced MAP in sham operated and IR rats to the same level. Kidneys submitted to IR showed a marked reduction in GFR, RBF, V' , and in the urine-to-plasma osmolality ratio (U/P) (fig. 1b-e). Pretreatment with the higher losartan dose (80 mg/kg/day) completely abolished the RBF and V' decrement promoted by IR injury (fig. 1c, d). The lower losartan dose assayed promoted lesser improvement in GFR, RBF and V' than that achieved with the higher dose. Fractional excretion of water and sodium (fig. 1f, g) in IR kidneys were significantly higher than in controls. Pretreatment with losartan 80 mg/kg/day promoted a higher improve-

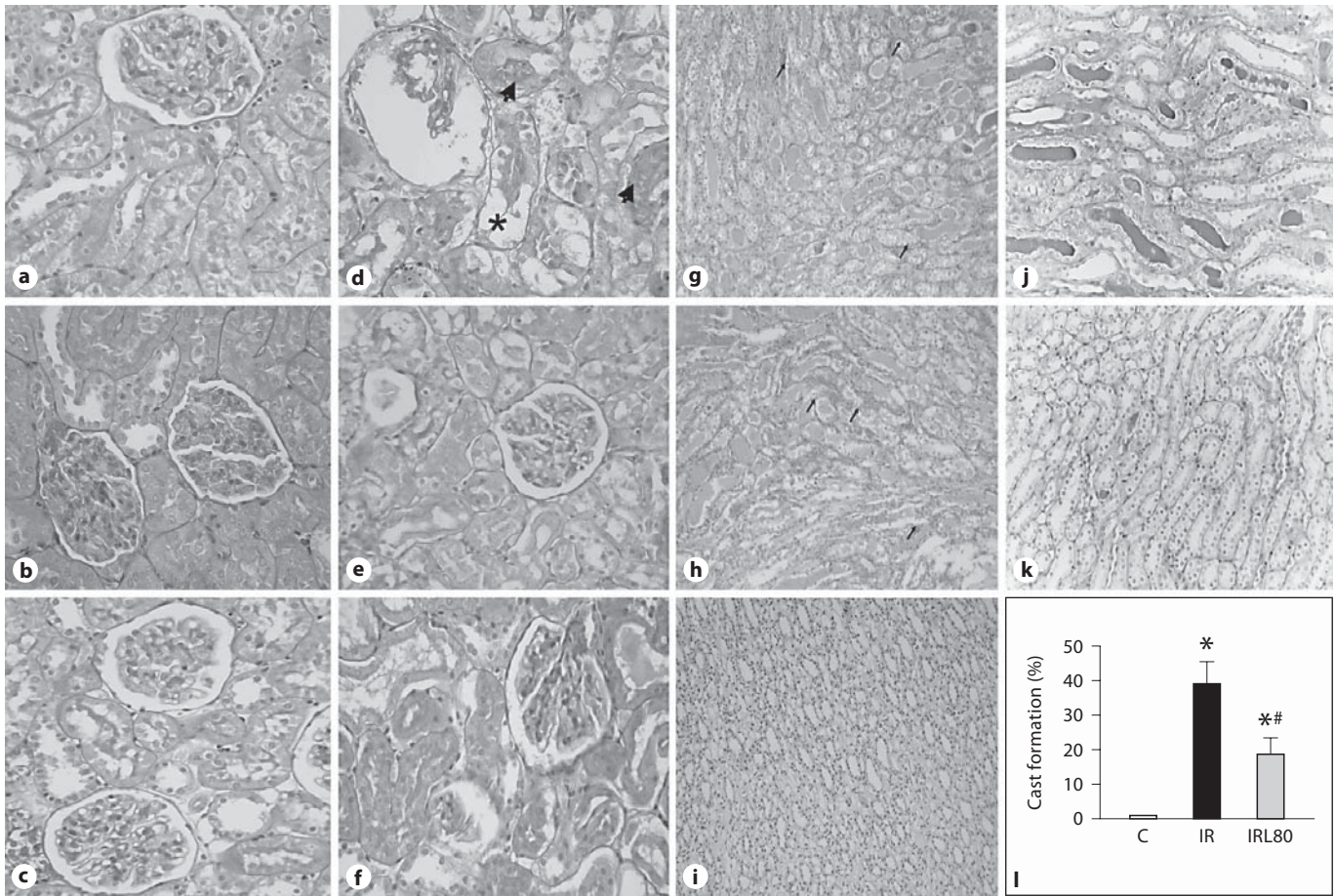


Fig. 2. Effects of losartan pretreatment on tissue damage after IR. Histological characteristics were analyzed by light microscopy in tissue sections from kidneys of sham operated rats (**a**) and post-ischemic kidneys after 24 h of reperfusion (**d, g, j**). Histological characteristics were also assessed in kidneys from losartan 8 mg/kg/day pretreated animals and submitted to sham operation (**b**), losartan (80 mg/kg/day) pretreated animals and submitted to sham operation (**c**), losartan 8 mg/kg/day pretreated animals submitted to ischemia followed by 24 h of reperfusion (**e, h**) and losartan 80 mg/kg/day pretreated animals submitted to ischemia followed by 24 h of reperfusion (**f, i**). **a-f** Sections stained with PAS

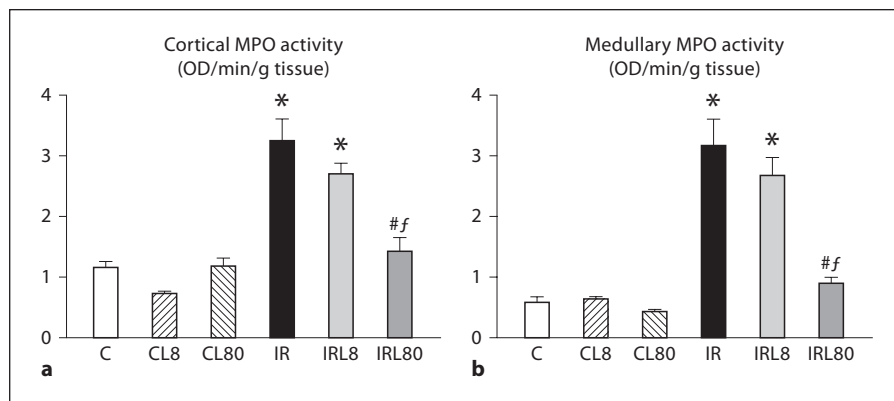
($\times 200$). In (**d**), * shows vacuolization of tubular cells cytoplasm, and arrowheads show tubular casts. **g-i** Sections stained with HE ($\times 100$) corresponding to the corticomedullary junction; arrows in these figures indicate capillary congestion. **j, k** Representative corticomedullary histological sections stained with PAS ($\times 200$) used to quantify intratubular cast formation from rats that underwent IR (**j**) and from rats pretreated with losartan 80 mg/kg/day before IR (IRL80) (**k**). **l** Percentage of PAS-positive tubules from total counted tubules evaluated in corticomedullary sections from sham operated (C) rats, IR and IRL80 rats. $n = 4-6$ per experimental group. * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. IR.

ment in tubular function than the lower losartan dose. The administration of either losartan dose in animals submitted to sham operation did not modify any of the renal functional parameters studied.

Light microscopic studies (fig. 2) revealed that IR kidneys presented severe tubular necrosis, tubular cast formation, vacuolization of tubular cell cytoplasm and signs of glomerular damage, such as collapse of the glomerular tuft (fig. 2d). These kidneys also presented extensive capillary congestion, predominantly in the corticomedul-

lary area (fig. 2g). No morphological alterations were detected in kidneys from losartan pretreated animals that were submitted to sham operation (fig. 2b, c). Kidneys from losartan 80 mg/kg/day pretreated rats (fig. 2f) presented less histological damage than kidneys from rats pretreated with 8 mg/kg/day (fig. 2e). Postischemic kidneys from the IRL80 group presented a better preservation of tubular architecture with lesser tubular injury, evidenced by less widespread tubular necrosis and more areas with brush border preservation (fig. 2f) than the IR

Fig. 3. Effects of losartan pretreatment on renal MPO activity after IR. Cortical (a) and medullary (b) MPO activity was measured in kidneys from sham operated rats (c), rats submitted to IR, and rats pretreated with losartan 8 or 80 mg/kg/day and submitted to sham operation (CL8 and CL80) or to IR injury (IRL8 and IRL80). Results are expressed as mean \pm SEM. n = 6 per experimental group. * p < 0.05 vs. C; # p < 0.05 vs. IR; ^f p < 0.05 vs. IRL8.



kidneys. Capillary congestion in the corticomedullary area in kidneys from the IRL80 group (fig. 2i) was markedly attenuated when compared with kidneys from the IRL8 group (fig. 2h).

IR kidneys showed numerous intratubular casts (fig. 2j). As the high losartan dose pretreatment promoted a better protection of renal function than the lower dose, we performed quantification of tubular casts in C, IR and IRL80 kidneys. The percentage of tubules affected by formation of casts was significantly reduced with high-dose losartan pretreatment (fig. 2k, l). The quantification of tubular casts confirmed that pretreatment with this losartan dose reduced renal structural injury.

Effects of Losartan Pretreatment on Renal Inflammation after IR

MPO activity of postischemic tissue reflects the presence of polymorphonuclear cells. Monocytes and macrophages can also contribute to MPO activity [27]. Cortical and medullary MPO (fig. 3a, b) activity was significantly increased after IR injury. Interestingly, this increase was completely abolished in IRL80 kidneys, while MPO levels were not modified in the IRL8 kidneys.

Figure 4 shows cortical and medullary proinflammatory cytokine mRNA levels. Postischemic (IR) kidneys presented a marked increase in cortical and medullary TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA levels. In accord with MPO activity, the high-dose losartan pretreatment in IR kidneys completely abolished these increases. The lower dose did not prevent the upregulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA levels induced by IR. None of the losartan pretreatments modified MPO activity or cytokine levels in control kidneys.

Effects of Losartan Pretreatment on Serum Aldosterone Levels after IR

IR was associated with a significant increase in serum aldosterone levels, suggesting the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system after unilateral renal ischemia and 24 h of reperfusion. The low dose of losartan reduced plasma aldosterone levels, but only the rats pretreated with the higher dose of losartan showed aldosterone levels that did not differ from those of control rats (C = 373 \pm 48, IR = 1,680 \pm 196*, IRL8 = 791[#] \pm 63; IRL80 = 353 \pm 33^{#f}; n = 5 per experimental group; * p < 0.05 vs. C; # p < 0.05 vs. IR; ^f p < 0.05 vs. IRL8). Neither of the two doses of losartan assayed modified serum aldosterone levels in sham operated animals. Plasma K⁺ levels did not differ in any of the experimental groups (C: 3.7 \pm 0.2 mEq/l).

Discussion

In the present study we used an experimental model of ARF that was induced by 40 min of unilateral renal ischemia followed by 24 h of reperfusion. Unilateral ischemia without removal of the contralateral kidney is an established and commonly used model of acute renal injury [16, 28, 29] and has previously been characterized in our laboratory [22, 23]. Kidneys submitted to ischemia showed a profound hemodynamic and tubular dysfunction. The extensive epithelial damage observed in these kidneys by light microscopy correlated with the tubular dysfunction found 24 h postischemia. Tubular obstruction by casts and vascular congestion observed predominantly in the corticomedullary junction could account for the observed decrease in GFR and the impairment of urinary concentration ability.

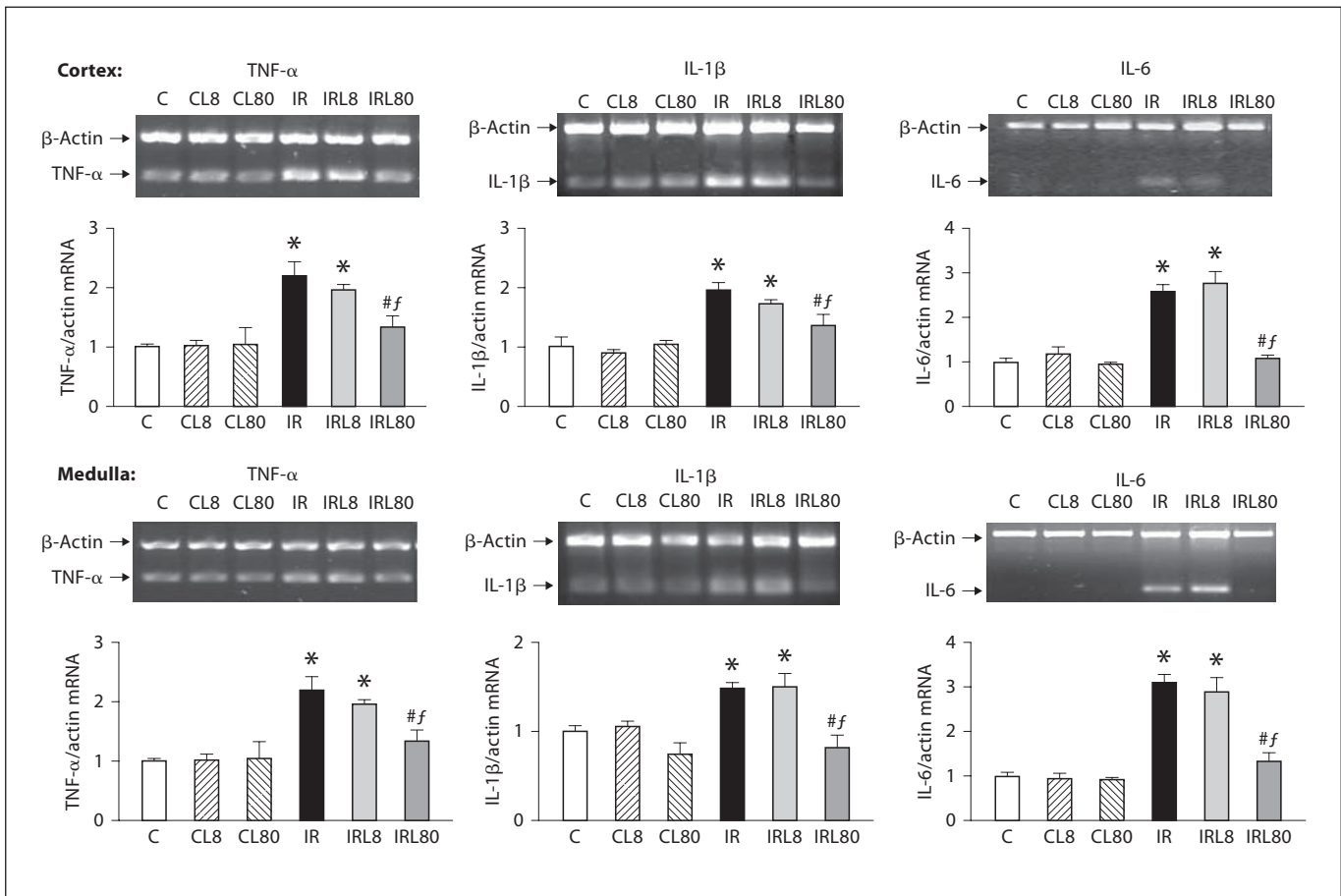


Fig. 4. Effects of losartan pretreatment on mRNA expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 after IR. mRNA levels were measured by RT-PCR analysis in renal cortex and medulla from sham operated (C) rats, rats submitted to IR, and rats pretreated with losartan 8 or 80 mg/kg/day and submitted to sham operation (CL8 and

CL80) or to IR injury (IRL8 and IRL80). Results are shown as the ratio of intensity of each cytokine mRNA to β -actin mRNA. Control values were averaged and assumed as 1. Data are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$ per experimental group. * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. IR; f $p < 0.05$ vs. IRL8.

It is increasingly appreciated that inflammation plays a major role in the pathophysiology of ischemic ARF. The inflammatory response after IR injury results in endothelial activation and injury, enhanced endothelial cell-leukocyte adhesion, and leukocyte infiltration, compromising microvascular blood flow [4]. In the present study we found that after 24 h of reperfusion, postischemic kidneys presented elevated MPO activity and upregulation of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA levels. These results strongly suggest the presence of an inflammatory process in this model of renal injury. The inflammatory response could also account for the extensive capillary congestion in the corticomedullary junction found by light microscopy in IR kidneys.

The vasoactive and proinflammatory actions of ANGII, through AT1 receptor, play an important role in the development of progressive renal injury [6]. However, the role of AT1 receptor in the early course of renal IR injury remains unclear. Using different experimental designs, some authors found that the administration of the AT1 receptor antagonist, losartan, accelerated the recovery of renal function after IR injury [17], while others found no improvement [18, 19].

In the present work, we studied the effects of two doses of losartan administered before the induction of IR injury. The high dose assayed promoted a marked protection against renal hemodynamic and tubular dysfunction, as well as against tissue injury. Cast formation in tubular lumen and capillary congestion in IR kidneys

was significantly decreased by high losartan dose pretreatment. Moreover, only the high dose completely inhibited the MPO activity increment, and TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA upregulation induced 24 h postischemia. Both doses promoted the same degree of MAP reduction. As the hemodynamic effects of losartan mainly depend on the availability of AT1 receptors on vascular smooth muscle cells, both doses probably exert the same blockade of this receptor population. Taken together, these results could suggest that the renoprotective effect of 80 mg/kg/day losartan would be mediated mainly by its anti-inflammatory actions independently of its effects on systemic arterial pressure.

ANGII, via AT1 receptors, upregulates many proinflammatory genes, such as vascular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-6, IL-1 β and TNF- α , through the activation of several intracellular signaling systems, including the nuclear factor- κ B (NF- κ B), mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, Rho proteins and redox pathways [6, 30]. Based on our present results, we propose that AT1 activation would contribute to leukocyte infiltration and to TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA upregulation induced by a renal ischemic insult. The inhibition of proinflammatory cytokine upregulation achieved with losartan (80 mg/kg/day) could at least partly be responsible for the improvement in tubular damage and vascular congestion found after 24 h of reperfusion. TNF- α is a proinflammatory cytokine capable of upregulating its own expression and the production of other inflammatory mediators. TNF- α contributes to cellular damage by inducing cellular dysfunction and/or apoptosis [31], and neutrophil-mediated tissue injury [32, 33]. This cytokine could also reduce GFR and RBF by stimulating the production of a variety of vasoactive mediators, and it has also been demonstrated that TNF- α contributes to neutrophil infiltration and renal dysfunction that occurs early after IR [34]. TNF- α and IL-1 β have also been implicated in mediating exfoliation of epithelial cells by disrupting cell-matrix adhesion dependent on β 1 integrin [35] – a fact that could contribute to intratubular cast formation. TNF- α , together with IL-1 β and IL-6, also contributes to enhance inflammation and vasoconstriction that leads to outer medullary vascular congestion.

MPO activity is extensively used as a marker of neutrophil infiltration. The role of neutrophils in the course of ischemic ARF remains controversial [36]. Some authors have demonstrated that blockade of neutrophil migration and activation improved renal injury in experimental IR models, while others have not found a protec-

tive effect [33, 37, 38]. Monocytes and macrophages can also contribute to MPO activity [27]. Our results suggest that the prevention of proinflammatory cytokine upregulation by a high losartan dose could contribute to preventing leukocyte accumulation. Although we cannot identify which inflammatory cells are more relevant, our present results afford evidence that losartan prevents the renal inflammatory response.

In the present study, we also observed that IR injury promoted an increase of aldosterone serum levels, suggesting RAAS activation in this model. The higher losartan dose, which afforded a higher degree of functional renoprotection, was more effective than the lower dose in preventing the increase in aldosterone levels promoted by IR. Our present results could suggest that although in this experimental model aldosterone would not be a major determinant of renal dysfunction, prevention of an aldosterone increment by losartan could contribute at least in part to its renoprotective effects. We recently showed that the blockade of mineralocorticoid receptors using spironolactone previous to the induction of IR prevented renal injury, suggesting that aldosterone could play a central role in this model of renal injury [39]. More studies would be necessary to establish aldosterone's contribution to the inflammatory process induced by IR.

Our results suggest a potential pathophysiological role of AT1 activation in the early course of ischemic ARF. However, there is evidence to suggest that losartan has AT1 receptor-independent actions primarily related to anti-inflammatory and antiaggregatory mechanisms [40]. These possible actions of losartan cannot be disregarded. Finally, we could not exclude the possibility that the AT2 receptor contributes to accelerate recovery of IR-induced cellular damage, since an increase in AT2 receptor expression has been reported during renal ischemia [17] and the stimulation of AT2 receptors is proposed to antagonize the effects mediated by AT1 receptors [41]. Nevertheless, there are results which demonstrated that AT2 could mediate some proinflammatory actions of ANGII [42]. Further studies will be needed to evaluate whether AT2 receptor could be responsible for some of the beneficial effects observed in the present work.

It has recently been proposed that the renoprotective effect of AT1 blockade is strongly dose-dependent and independent of its effect on systemic arterial pressure [43]. The high dose used in our experiments might account for a higher availability of the drug in the kidney that would be necessary to counteract more effectively the intrarenal acute inflammatory response induced by IR. However, the contribution of losartan vasodilator ac-

tions in ameliorating renal dysfunction cannot be disregarded.

The protective effects of losartan against renal injury induced by IR observed in this study suggest that the renin-angiotensin-aldosterone system plays a central role in the pathophysiology of ischemic ARF.

Acknowledgements

This work was supported by grants from: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Argentina (CONICET PIP 06039), Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología de México (CONACYT 48483) and National University of México (PAPIIT 228206-3). We thank Roemmers (Argentina) for providing losartan, Dr. Esteban Serra for providing some reagents and facilities for the RT-PCR analyses, and Fernanda Toniolo and Norma Uribe for expert assistance.

References

- Shoskes DA, Halloran PF: Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996;155:1831–1840.
- Kelly KJ, Molitoris BA: Acute renal failure in the new millennium: time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* 2000;20:4–19.
- Bonventre JV, Weinberg JM: Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2199–2210.
- Bonventre JV, Zuk A: Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004;66:480–485.
- Daha MR, van Kooten C: Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(suppl 6):41–43.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J: Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:16–20.
- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM, Vinson GP, el-Dahr SS: Immunohistochemical localization of ANGII AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 1997;273:F170–F177.
- Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E: Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 2005;11:194–205.
- Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E: Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 1997;81:804–811.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J: Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int* 2002;62:S12–S22.
- Chrysostomou A, Pedagogos E, MacGregor L, Becker GJ: Double-blind, placebo-controlled study on the effect of the aldosterone receptor antagonist spironolactone in patients who have persistent proteinuria and are on long-term angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, with or without an angiotensin II receptor blocker. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:256–262.
- Zhou X, Ono H, Ono Y, Frohlich ED: Aldosterone antagonism ameliorates proteinuria and nephrosclerosis independent of glomerular dynamics in L-NAME/SHR model. *Am J Nephrol* 2004;24:242–249.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861–869.
- Jafar TH, Schmid CH, Landa M, Giatras I, Toto R, Remuzzi G, Maschio G, Brenner BM, Kamper A, Zucchelli P, Becker G, Himmelmann A, Bannister K, Landais P, Shahinfar S, de Jong PE, de Zeeuw D, Lau J, Levey AS: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data. *Ann Intern Med* 2001;135:73–87.
- Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, Zatz R: Renal expression of COX-2, ANGII, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a non-steroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F945–F954.
- Allred AJ, Chappell MC, Ferrario CM, Diz DI: Differential actions of renal ischemic injury on the intrarenal angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F636–F645.
- Kontogiannis J, Burns KD: Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol* 1998;274:F79–F90.
- Jerkic M, Miloradovic Z, Jovovic D, Mihailovic-Stanojevic N, Elena JV, Nastic-Miric D, Grujic-Adanja G, Rodriguez-Barbero A, Markovic-Lipkovski J, Vojvodic SB, Manero MV, Prieto MP, Lopez-Novoa JM: Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:83–94.
- Kim SJ, Lim YT, Kim BS, Cho SI, Woo JS, Jung JS, Kim YK: Mechanism of reduced GFR in rabbits with ischemic acute renal failure. *Ren Fail* 2000;22:129–141.
- Deegan PM, Nolan C, Ryan MP, Basinger MA, Jones MM, Hande KR: The role of the renin-angiotensin system in cisplatin nephrotoxicity. *Ren Fail* 1995;17:665–674.
- Khalil A, Tullus K, Bakhiet M, Burman LG, Jaremko G, Brauner A: Angiotensin II type 1 receptor antagonist (losartan) down-regulates transforming growth factor- β in experimental acute pyelonephritis. *J Urol* 2000;164:186–191.
- Coux G, Trumper L, Elias MM: Renal function and cortical (Na^+ , K^+ -ATPase activity, abundance and distribution after ischaemia-reperfusion in rats. *Biochim Biophys Acta* 2002;1586:71–80.
- Molinas SM, Trumper L, Serra E, Elias MM: Evolution of renal function and Na^+ , K^+ -ATPase expression during ischaemia-reperfusion injury in rat kidney. *Mol Cell Biochem* 2006;287:33–42.
- Pompermayer K, Souza DG, Lara GG, Silveira KD, Cassali GD, Andrade AA, Bonjardim CA, Passaglio KT, Assreuy J, Cunha FQ, Vieira MA, Teixeira MM: The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int* 2005;67:1785–1796.
- Schierwagen C, Bylund-Fellenius AC, Lundberg C: Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods* 1990;23:179–186.
- Roe HH, Epstein JH, Goldstein NP: A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J Biol Chem* 1949;178:839–843.
- Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, De Broe ME: Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1562–1574.
- Supavekin S, Zhang W, Kuchelapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P: Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003;63:1714–1724.

- 29 Sandovici M, Henning RH, van Goor H, Helfrich W, de Zeeuw D, Deelman LE: Systemic gene therapy with interleukin-13 attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2008;73:1364–1373.
- 30 Klahr S, Morrissey J: Angiotensin II and gene expression in the kidney. *Am J Kidney Dis* 1998;31:171–176.
- 31 Lieberthal W, Koh JS, Levine JS: Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998;18:505–518.
- 32 Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR: The role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 1999;162:196–203.
- 33 Rabb H, O'Meara YM, Maderna P, Coleman P, Brady HR: Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1997;51:1463–1468.
- 34 Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR: Early kidney TNF- α expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999;277:R922–R929.
- 35 Glynne PA, Picot J, Evans TJ: Coexpressed nitric oxide synthase and apical β 1 integrins influence tubule cell adhesion after cytokine-induced injury. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2370–2383.
- 36 Friedewald JJ, Rabb H: Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004;66:486–491.
- 37 Lauriat S, Linas SL: The role of neutrophils in acute renal failure. *Semin Nephrol* 1998;18:498–504.
- 38 Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV: Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996;97:1056–1063.
- 39 Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA: Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F78–F86.
- 40 Sadoshima J: Novel AT1 receptor-independent functions of losartan. *Circ Res* 2002;90:754–756.
- 41 Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenti P: The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005;90:S57–S65.
- 42 Esteban V, Ruperez M, Vita JR, Lopez ES, Mezzano S, Plaza JJ, Egado J, Ruiz-Ortega M: Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NF- κ B pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl* 2003;86:S33–S38.
- 43 Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, Zatz R: An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int* 2005;67:1913–1924.

Opposite Effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS Ability to Produce Nitric Oxide or Superoxide Anion in Human Embryonic Kidney Cells

Cesar Cortes-González^{1,2}, Jonatan Barrera-Chimal^{1,2}, María Ibarra-Sánchez^{1,3}, Mark Gilbert^{1,2}, Gerardo Gamba^{1,2,4}, Alejandro Zentella^{1,3}, María Elena Flores¹ and Norma A. Bobadilla^{1,2}

Molecular Physiology Unit, ¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Departments of ²Nephrology and ³Biochemistry Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and ⁴Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City

Key Words

eNOS phosphorylation • Monomer/dimer ratio • AKT/PKB • eNOS dimerization

Abstract

Heat shock protein 90 subfamily is composed by two cytosolic isoforms known as Hsp90 α and Hsp90 β . Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is regulated by Hsp90, however the specific role of each Hsp90 isoform on NO production has not been established. This study was designed to evaluate the effect of Hsp90 α and Hsp90 β over-expression on eNOS/NO pathway. Rat Hsp90 α and Hsp90 β were cloned into pcDNA3.1(+) and transfected in human embryonic kidney cells (HEK-293). Hsp90 α and Hsp90 β transfection was corroborated by Western blot analysis and their effect on NO production (NO₂/NO₃), eNOS protein and its phosphorylation at Ser1177 and Thr495, as well as Akt/PKB Ser473 phosphorylation was determined. The interaction of Hsp90 α and Hsp90 β with eNOS and the dimer/monomer ratio of Hsp90, as well as O₂⁻ generation were also assessed. After transfection, Hsp90 α and Hsp90 β levels were significantly increased in HEK-293 cells. The Hsp90 α over-expression induced a significant increase in NO₂/

NO₃ levels, an effect that was associated with increased phosphorylation of eNOS Ser 1177 and Akt/PKB Ser473, as well as with a greater Hsp90 α dimerization. Noteworthy, pcHsp90 β transfection reduced significantly NO₂/NO₃ and increased O₂⁻ generation. These effects were associated with a reduction of eNOS dimeric conformation, increased eNOS Thr495 phosphorylation, reduced Akt/PKB phosphorylation, and by a greater amount of monomeric Hsp90 β conformation. These data show for first time that Hsp90 α and Hsp90 β differentially modulate NO and O₂⁻ generation by eNOS through promoting changes in eNOS conformation and phosphorylation state.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

The heat shock protein subfamily of 90 kDa belongs to a group of highly conserved stress proteins and it is one of the most abundant proteins in eukaryotic cells, comprising 1-2% of the total protein under non-stress conditions [1]. Five isoforms of Hsp90 have been identified that differ in their cellular localization and abundance. In particular, Hsp90 α and Hsp90 β are the major cytosolic isoforms, sharing approximately 85% sequence identity

at the protein level. The structure of both Hsp90 isoforms consists of an N-terminal ATP-binding domain and a C-terminal dimerization domain, a middle domain linker region responsible for substrate-protein interactions, and a following charged domain that promotes the dimerization [2, 3]. The ATP binding site is the major target for Hsp90 inhibitors, but until now, specific inhibitors for Hsp90 α or Hsp90 β have not been developed.

In spite of the molecular similarity of these proteins important differences at the transcriptional and transductional levels have been described, suggesting that Hsp90 α and Hsp90 β might have differential roles in the cellular processes in which they are involved. Hsp90 α transcription is tightly regulated by its promoter region, which contains several heat shock elements (HSEs) that are involved in the inducible gene expression of Hsp90 α . However, differences between Hsp90 α and Hsp90 β are found in the promoter region; for Hsp90 β HSEs are found in the first intron of the gene, and is not regarded as a highly inducible protein [4]. Another important difference is that Hsp90 α easily dimerizes, whereas Hsp90 β is mainly found as a monomer; the regions that facilitate these variations reside at the carboxyl-terminal amino acids of Hsp90 [2]. In this regard, it has been reported that the Hsp90 protein dimer, but not the monomer, stabilizes or activates different proteins known as Hsp90 client proteins in a nucleotide-dependent cycle. The Hsp90 cycle includes the following stages: an open, nucleotide-free form; a closed, ATP-bound structure; and a closed, ADP-bound conformation [5]. The closed conformation had been suggested to form stable client-protein complexes, emphasizing the importance of Hsp90 dimerization for activating the client proteins [6]. Thus, Hsp90 is a crucial regulator of a vast array of cellular processes by interacting with more than 100 client proteins (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors>). Included among these proteins are steroid hormones, transcription factors, kinases, G proteins subunits, and endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

eNOS is the primary source of nitric oxide (NO) in endothelial cells. It has been demonstrated that the interaction between Hsp90 and eNOS increases the activity of this enzyme, with greater NO production as a result. In contrast, the dissociation of these complex is not only associated with a reduction of NO synthesis but also turns eNOS into a superoxide generator [7-9]. Recent studies have shown that Hsp90 binds to the N-terminal oxygenase domain of eNOS present in residues 301-320 [9]. This interaction has a physiological connotation, because eNOS activity is regulated by at least four well-

described mechanisms: 1) by enhancing calmodulin binding affinity to eNOS [10, 11]; 2) by facilitating the ability of Ca²⁺/calmodulin to dissociate the interaction between caveolin-1 and eNOS, which reverses the inhibitory action of caveolin-1 on eNOS [12]; 3) by propitiating eNOS serine 1179/1177 (bovine/human) phosphorylation, a translational modification that activates this enzyme [13]; and 4) by recruiting Akt/PKB, which facilitates eNOS phosphorylation in the serine residue 1179 [14]. However, in the eNOS activation by Hsp90, the specific role of the α or β isoforms has not been completely addressed. To explore the specific participation of each Hsp90 isoform, this study was designed to evaluate the effect of Hsp90 α or Hsp90 β over-expression on the NO/eNOS pathway in human embryonic kidney (HEK-293) cells.

Materials and Methods

Plasmid constructs

Hsp90 α and Hsp90 β genes were amplified by PCR from cDNA synthesized from total rat RNA by using the forward primers 5' AAG GAAAAAGC GGC CGC TCG TCAAGATGC CTG AGG AA 3' and 5' AAG GAAAAAGC GGC CGC CTG CCA AGA TGC CTG AGG AA 3', respectively, and the reverse primers 5' CTA GTC TAG AGA GCC TTT AAT CCA CTT CTT CC 3' and 5' CTA GTC TAG ATT CTG GTG AAG CCT AGT CTA CTT C 5', respectively. In the forward primers, a *Not I* restriction site was included in the sequence, whereas in the reverse primers, a *Xba I* restriction site was introduced. The amplified fragments of 2260 for Hsp90 α and 2220 bp for Hsp90 β were cloned into the pcDNA3.1 (+) vector (Invitrogen) by using the *Not I* and *Xba I* restriction sites. The identities of the constructions were confirmed by automatic sequencing.

Hsp90 plasmid isolation

The isolation of the plasmids containing Hsp90 α or Hsp90 β sequences (pc-Hsp90 α or pc-Hsp90 β , respectively) was performed using the same general strategy for the large-scale isolation described by Qiagen Science (Maryland, USA). The DNA was crudely checked for concentration and purity, using 1% agarose gel electrophoresis against molecular weight markers standards (λ DNA/*Hind III* fragments from Invitrogen, Carlsbad, CA), and it was then corroborated with the molecular weights reported for the Hsp90 α or Hsp90 β gene. The DNA plasmid yield was 10-15 μ g in a 10-ml starting culture.

Cell Culture and Transfection

Human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technology), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C with 5% CO₂. One day before the transfection, 5 x 10⁵ HEK-293 cells were plated in 1 ml of DMEM medium per well in

six-well culture plates until they reached 90% confluence. To determine the amount of plasmid/liposome complex for obtaining the greater Hsp90 α or Hsp90 β over-expression, 0.5-2 μ g of Hsp90 α plasmid (pcDNA3.1/Hsp90 α) or 4-8 μ g of Hsp90 β plasmid (pcDNA3.1/Hsp90 β) was diluted in 100 μ l of Opti-MEM[®] reduced serum medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) and incubated for 15 min at room temperature. Next, 4 μ l of Lipofectamine[™] 2000 transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) in 100 μ l of Opti-MEM reduced serum was added, and the samples were maintained at room temperature for an additional 15 min. Thereafter, 200 μ l of each Hsp90 complex was added to each well containing cells. The optimal transfection time for obtaining the higher over-expression of Hsp90 α or Hsp90 β was assessed at 24, 48 and 72 hours after transfection. Thus, the optimal conditions for Hsp90 α and Hsp90 β over-expression in HEK-293 cells were 1 μ g of pc-Hsp90 α or 6 μ g of pc-Hsp90 β and 48 hr after transfection. Cells transfected with the pcDNA3.1(+) empty vector were included as controls in each experiment. All sets of transfections were performed at least in triplicate.

Small-interfering RNA (siRNA) transfection

The silencer pre-designed siRNAs corresponding to the target sequence of Hsp90 α (Cat. number 4390818) or Hsp90 β (Cat. number AM16831) were purchased from Ambion Inc. (Austin, TX). A silencer negative siRNA was used as a negative control (Cat. Number AM4613). In six-well plates, proliferating HEK-293 cells (at 70-90% confluency) were cultured and transfected with 100 nM of Hsp90 α siRNA or Hsp90 β siRNA. After 24 hr of transfection, Western blot analysis was carried out to examine the knockdown of targeted proteins and nitric oxide production.

Western Blot Analysis

Proteins from cell cultures transfected with pcDNA3.1/Hsp90 α , pcDNA3.1/Hsp90 β , pcDNA3.1, siRNA-Hsp90 α , or siRNA-Hsp90 β were extracted using a lysis buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) and phosphatase inhibitors, followed by centrifugation at 14000 rpm. Thereafter, the supernatants containing the proteins were recovered, and samples containing 20 μ g of total protein were resolved by 8.5% SDS-PAGE and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Membranes were then blocked in 5% blotting solution (Bio-Rad) and incubated with their respective specific antibodies, as detailed below. The lower part of the membranes was incubated with a goat anti-actin antibody (1:5000) overnight at 4°C (Santa Cruz Biotechnology, Santa Barbara, CA), whereas the upper membranes were incubated with polyclonal anti-rabbit Hsp90 β (1:5000, Abcam Inc. Cambridge, MA), polyclonal anti-rabbit Hsp90 α (1:5000, Abcam Inc. Cambridge, MA), anti-rabbit eNOS (1:500, Cell Signalling Technology), polyclonal anti-rabbit phosphorylated eNOS Ser1177 (1:500, Cell Signalling Technology), polyclonal anti-rabbit phospho-eNOS Thr495 (1:500, Cell Signalling Technology), polyclonal anti-human Akt (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology), or polyclonal anti-human

phospho-Akt Ser473 (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology) antibodies. Membranes were then incubated with the secondary HRP-conjugated rat anti-rabbit IgG antibody (1:5000, Alpha Diagnostics, San Antonio, TX). Proteins were detected with an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare Life Sciences, Amersham) and autoradiography. The bands were scanned for densitometric analysis.

Analysis of dimer and monomer conformation

The Hsp90 α and Hsp90 β dimer/monomer ratio was evaluated by Western blot for non-denatured proteins. Non-boiled samples containing 10 μ g of total protein were resolved in 7.5% PAGE at 4°C. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and Western blot analysis for Hsp90 α or Hsp90 β was performed as described above. For eNOS dimer/monomer conformation analysis, non-boiled samples containing 50 μ g of total protein were resolved in a 6% SDS-PAGE at 4°C. Then, proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and Western blot analysis for eNOS was performed as described above.

Immunoprecipitation (IP) analysis

Subconfluent proliferating cells in 300-mm² dishes were harvested, and whole cell extracts were prepared and subjected to IP. After 48 h of transfection, the cells were washed with 2 ml of phosphate buffered saline (PBS), and lysis ELB buffer was added. Cell debris was removed from the cell lysates, and eNOS protein was immunoprecipitated using a protein G immunoprecipitation kit (Sigma Aldrich, Inc. St Louis, MO). Each IP was performed using 3 μ g of eNOS antibody (BD Transduction Laboratories) and 1 mg of cell protein. The immunoprecipitated proteins were eluted by boiling in Laemmli sample buffer, separated by 8.5% SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes and subjected to Western blotting. The membrane was blocked with 5% non-fat milk in TBS-Tween (0.1%) and then immunoblotted for eNOS and Hsp90 α (Abcam Inc., Cambridge, MA), as previously described. Next, the membranes were stripped and reprobed with anti-Hsp90 β (1:5000 dilution, Abcam Inc., Cambridge, MA) and eNOS (1:500 dilution) antibodies to demonstrate equal amounts of eNOS immunoprecipitation in all samples.

Hydrogen Peroxide Determination

The amount of hydrogen peroxide was determined in whole cell lysates (WCL) from each group of cells transfected using the Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit (Invitrogen 29851 Willow Creek Road), according to the instructions provided. Briefly, 50 μ l of each WCL or standard curve (H₂O₂ 1- 10 μ M) was mixed with 50 μ l of the Amplex Red reagent/HRP in a microplate. The samples were incubated for 30 minutes protected from light to allow the reaction between H₂O₂ and the Amplex reagent to occur. The plate was read at 560 nm. The amount of H₂O₂ detected in the samples is expressed as nM/ μ g of protein.

Measurement of NO release or NO Assay

NO production was indirectly determined in WCL from each transfected group using the colorimetric Nitric Oxide Assay

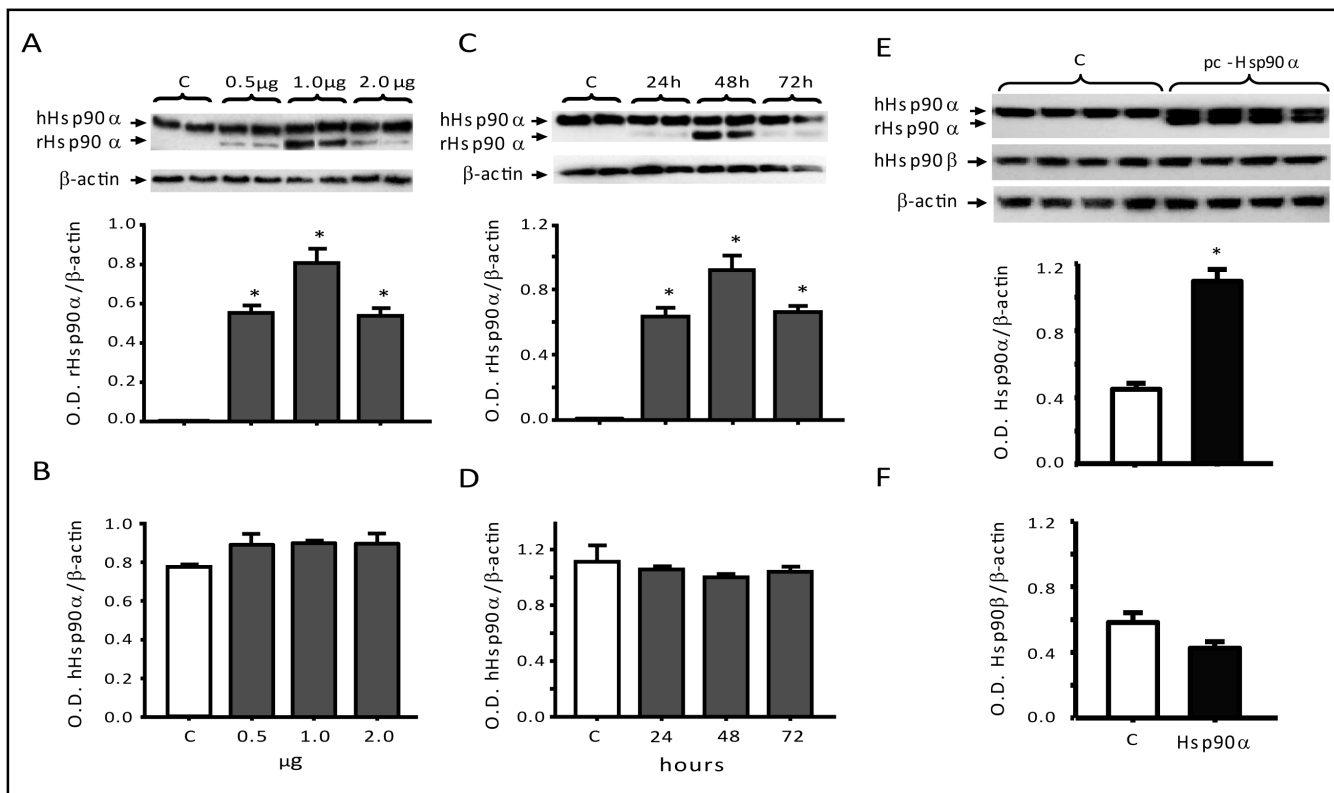


Fig. 1. A) Hsp90 α protein levels in HEK-293 cells transfected with different amounts of pc-Hsp90 α construct (black bars) compared with liposome-treated HEK-293 cells (white bars). Greater over-expression was obtained with 1 μ g of pc-Hsp90 α , B) without modifying endogenous Hsp90 α . C) Western blot analysis of Hsp90 α , showing that the higher efficiency of over-expression was obtained after 48 h of pc-Hsp90 α transfection, D) without modifying endogenous Hsp90 α . E) After 48h of transfection using 1 μ g of pc-Hsp90 α , Hsp90 α protein levels were significantly increased, F) without modifying basal Hsp90 β expression. These experiments were performed in at least three different cell transfected cultures. * $p < 0.05$ vs. empty vector-transfected cells.

Kit (Oxford Biomedical Research Inc., Oxford, MI). This assay consists of reducing the sample nitrates to nitrites with the use of nitrate reductase, followed by nitrite quantification with the Griess reaction and detection at 540 nm. The protein concentration in each WCL was determined by the Lowry assay (Bio Rad, Hercules, CA) and in duplicate. The concentration of nitrites in the WCL is expressed as μ M/ μ g of protein.

Superoxide anion detection

Intracellular superoxide detection was assessed by hydroethidine staining (Polysciences, Inc., Warrington, PA). A stock solution of hydroethidine (HE) was prepared by dissolving 7 mg of HE in 1 mL of N,N-dimethylacetamide. The working solution was prepared by the addition of 20 μ l of HE to 10 ml of PBS, and this mixture was filtered through a 0.22- μ m Millipore filter. After 48 h of transfection, the medium was removed, and the cells were washed three times with PBS. The staining solution was added, and the cultures were incubated for 15 minutes at room temperature and protected from the light. Thereafter, the staining solution was removed, and the cells were washed three times. The cells were re-suspended in PBS for flow cytometry analysis. Ten thousand cells from each transfection group were analyzed in a FACScan cytometer

(Becton Dickinson), and the fluorescence intensity was determined using an excitation of 535 nm and an emission of 610 nm. The data were analyzed using the Cell Quest program.

Statistical analysis

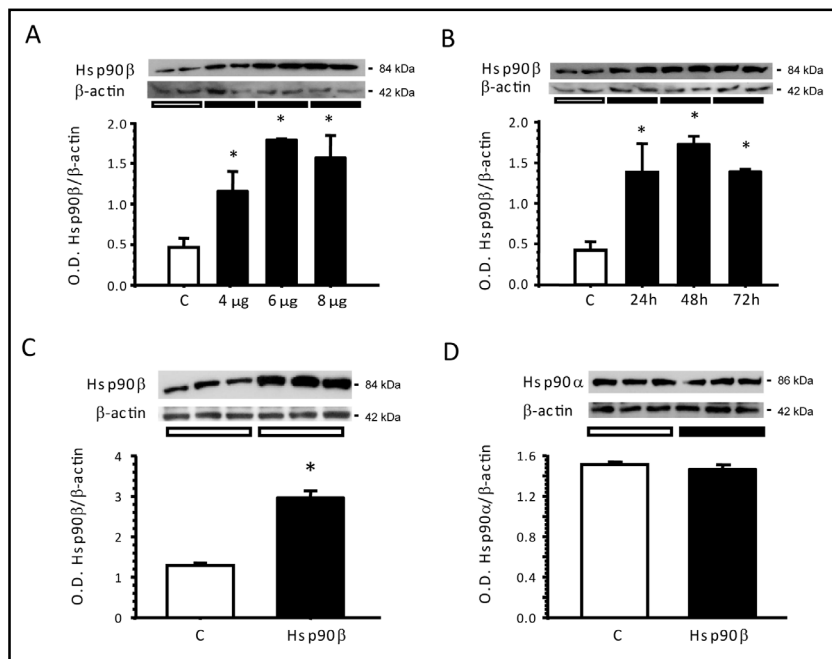
Results are presented as means \pm SE. The significance of the differences among groups was tested by ANOVA using Bonferroni's correction for multiple comparisons and between two groups by the un-paired T test. Statistical significance was defined as a p value < 0.05 .

Results

Hsp90 α cloning and HEK-293 transfection

The Hsp90 α gene was amplified from rat kidney cDNA using specific primers, as detailed above. After the proper purification of PCR product of \approx 2260 bp, rat Hsp90 α (rHsp90 α) was cloned into the pcDNA3.1(+) expression vector via a multi-cloning site by using *Xba I* and *Not I* sites. After *Xba I* and *Not I* digestion, two

Fig. 2. A) Hsp90 β protein levels in HEK-293 cells transfected with different amounts of pc-Hsp90 β construct (black bars) compared with liposome-treated HEK-293 cells (white bars). The greater over-expression was obtained with 6 μ g of pc-Hsp90 β . B) Western blot analysis of Hsp90 β showing that the higher efficiency of over-expression was obtained after 48 h of pc-Hsp90 β transfection. C) After 48h of transfection using 6 μ g of pc-Hsp90 β , Hsp90 β protein levels were significantly increased, D) without modifying basal Hsp90 α expression. These results were obtained from at least two different experiments * $p < 0.05$ vs. empty vector-transfected cells.



fragments were obtained, with the larger corresponding to the pcDNA3.1 vector and the smaller to the Hsp90 α sequence (data not shown). The sequence of Hsp90 α was corroborated by automatic sequencing that revealed 99% identity with the rat sequence reported for Hsp90 α in GenBank (number AJ428213.1). Similarly, Hsp90 α was cloned in the expression vector pcDNA3.1/NT-GFP (which codifies for the green fluorescent protein). Epifluorescence inverted microscopy was employed to detect the transfection efficiency. It was shown that 80% of HEK-293 cells were able to express the GFP (data not shown).

Different concentrations of Hsp90 α plasmid were transfected into HEK-293 cells to determine the optimal conditions for pcDNA 3.1/Hsp90 α transfection. The upper panel of Fig. 1A shows the insets of the Western blot analysis for Hsp90 α and β actin. Two bands in the Hsp90 α Western blot were detected. The larger band corresponds to the human endogenous Hsp90 α that is expressed in HEK-293 cells, and the lower band corresponds to the transfected rat Hsp90 α . Greater rat Hsp90 α over-expression was detected when the cells were transfected with 1 μ g of pcDNA 3.1/Hsp90 α without changes in the endogenous Hsp90 α expression, as shown in Fig. 1B. In addition, different times after transfection were assessed to determine the greatest Hsp90 α over-expression. As shown in Fig. 1C, the higher rat Hsp90 α expression was obtained after 48 h, without changes in human Hsp90 α expression (Fig. 1D). Other groups of cells were transfected with the optimal conditions, then Hsp90 α and Hsp90 β protein levels were detected by

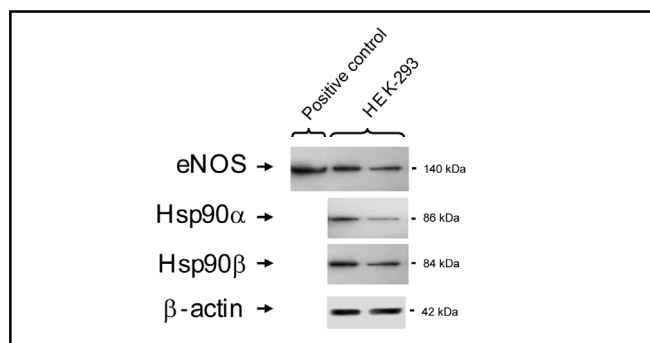


Fig. 3. Western blot analysis showing basal protein levels of eNOS, Hsp90 α , Hsp90 β and β -actin in HEK-293 intact cells.

Western blot analysis. As expected, pcDNA3.1/Hsp90 α transfection increased Hsp90 α protein levels, as shown in Fig. 1E, without altering Hsp90 β protein levels as is represented in Fig. 1F. These results shown that Hsp90 α and Hsp90 β antibodies were specific to detect each Hsp90 isoform studied.

Hsp90 β cloning and HEK-293 transfection

The Hsp90 β gene was also amplified from rat kidney cDNA using specific primers, as detailed above. The PCR product of \approx 2220 bp was purified and cloned into pcDNA3.1(+) using *Not I* and *Xba I* restriction sites. The Hsp90 β sequence was first corroborated by restriction analysis; for this, the vector was digested with *Xba I* and *Not I*, *Xba I*, *Sac I*, *EcoR I*, *Kpn I*, and *Mfe I*. When the vector was digested with *Xba I* and *Not I*, two fragments were obtained, with the larger corresponding

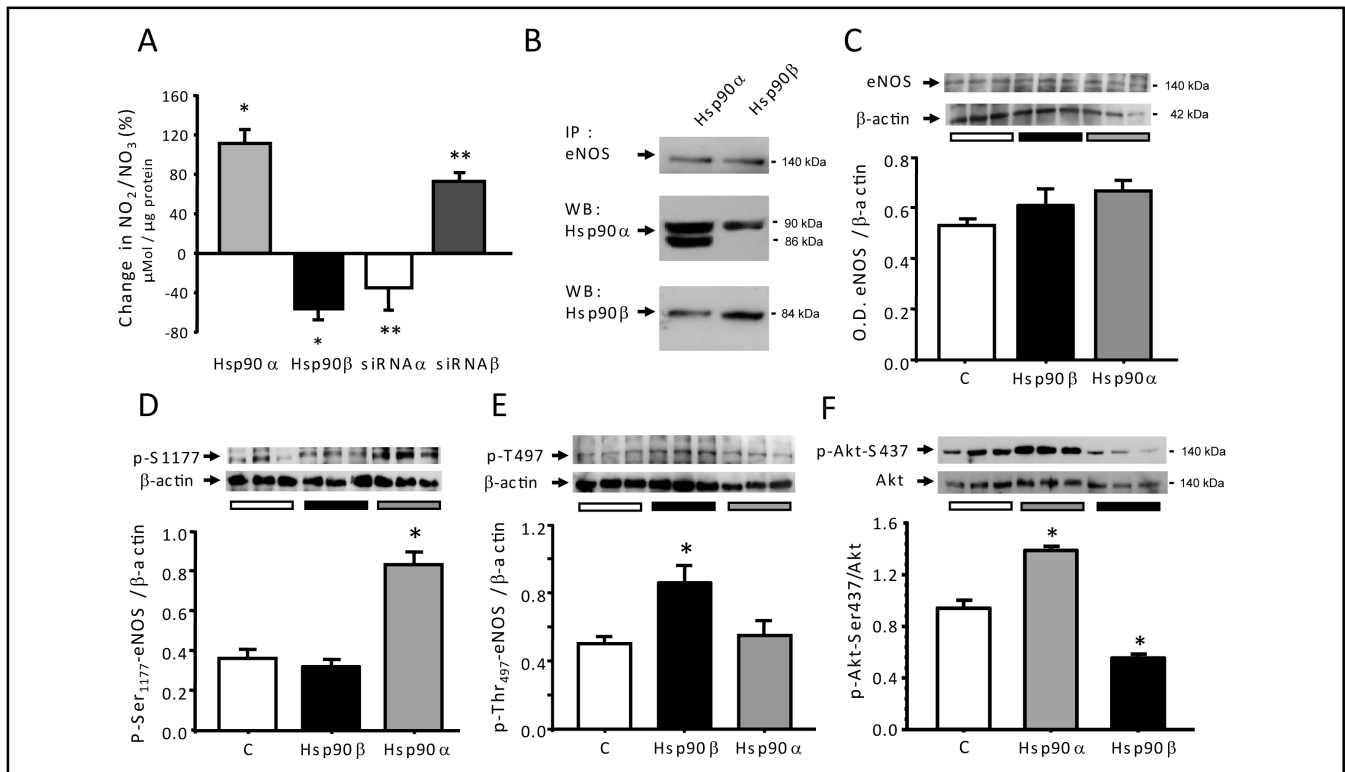


Fig. 4. Effects of pc-Hsp90α and pc-Hsp90β transfection on eNOS/NO pathway. A) Change in percentages of NO₂/NO₃ levels in the lysates of HEK-293 cells transfected with pc-Hsp90α (gray bars), pc-Hsp90β (black bars), siRNA Hsp90α (white bars), and siRNA Hsp90β (dark gray bars). B) Co-immunoprecipitation of eNOS and Hsp90α or Hsp90β from HEK-293 cell lysates transfected with either Hsp90α or Hsp90β respectively. C) eNOS expression detected by Western blot analysis from HEK-293 cells transfected with empty vector, Hsp90α or Hsp90β. D) eNOS Ser1177 phosphorylation, E) eNOS Thr497 phosphorylation, and F) Akt expression and phosphorylation at residue Ser437, determined by Western blot analysis using specific phospho-antibodies in the studied groups of HEK-293 cells. The proteins were isolated from at least three different cell transfected cultures *p<0.05 vs. liposome-transfected cells. **p<0.05 vs. pc-Hsp90α or pc-Hsp90β-transfected cells.

to the pcDNA3.1 vector and the smaller to Hsp90β (data not shown). With the rest of the enzymes, we obtained the expected specific size fragments for Hsp90β (these size fragments are not obtained when Hsp90α was digested with these enzymes). The sequence was also corroborated by automatic sequencing, which revealed 100% identity with the rat sequence reported for Hsp90β in GenBank (number DQ022068.2). To determine the optimal conditions for Hsp90β over-expression, HEK-293 cells were transfected with different plasmid concentrations. As shown in Fig. 2A, maximum over-expression was detected when cells were transfected with 6 μg of pcDNA 3.1/Hsp90β a unique band of Hsp90β was detected corresponding to both human endogenous and rat transfected sequence. In addition, the best period of time to obtain maximum over-expression with 6 μg of plasmid was at 48 h after transfection (Fig. 2B). Independent groups of cells were transfected with the optimal conditions, and Hsp90α and Hsp90β protein levels

were detected by Western blot analysis. As expected, pcDNA3.1/Hsp90β transfection increased Hsp90β by ≈2-fold, as shown in Fig. 2C, without modifying the Hsp90α protein levels (Fig. 2D).

Effects of Hsp90α and Hsp90β over-expression on the eNOS/NO pathway

Because it has been shown that Hsp90 regulates eNOS activity [10-13, 15], we studied the specific role of Hsp90α and Hsp90β over-expression in nitric oxide production. First we assessed eNOS protein levels in untransfected HEK-293, as Fig. 3 shows these cells do express eNOS, as well as Hsp90α and Hsp90β. This finding was further confirmed by the measurement of NO₂/NO₃ levels in these cells. Figure 4A shows the percentage changes in NO₂/NO₃ levels in groups transfected with Hsp90α or Hsp90β, compared with the cells that were transfected with the empty pcDNA vector. Hsp90α over-expression produced a significant increase

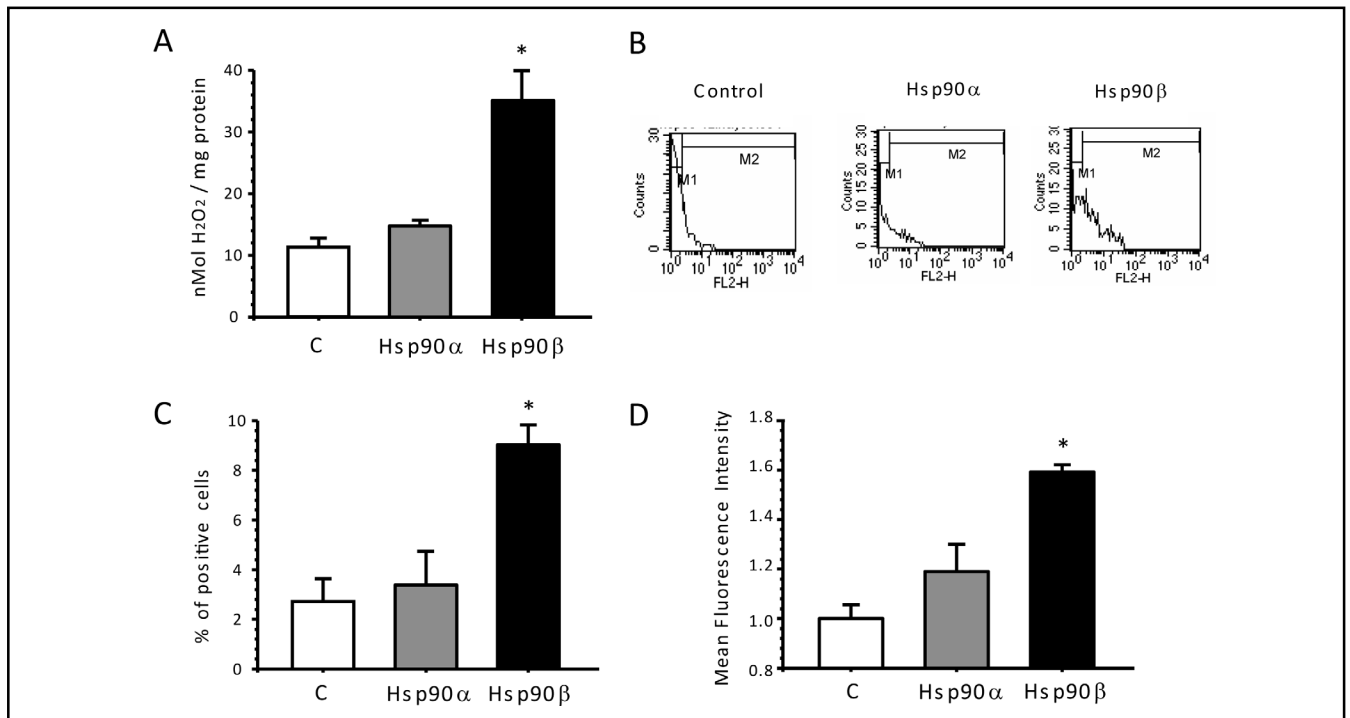


Fig. 5. Effects of Hsp90 α and Hsp90 β over-expression on oxidative stress in HEK-293 cells. A) Hydrogen peroxide levels in lysates of HEK-293 cells transfected with empty vector (white bars), pc-Hsp90 α (dark gray bars), and pc-Hsp90 β (black bars). Hydroethidine staining was assessed as a measure of superoxide anion production and was quantified by flow cytometry. B) Upper panel, representative histograms of the three groups of transfected HEK-293 cells, showing a greater hydroethidine staining in the group that was transfected with pc-Hsp90 β . C) The percentage of HEK-293 cells positive for hydroethidine staining and D) Fold increase in the Mean Fluorescence Intensity (FMI). These results were performed with at least three different transfected cultures. * $p < 0.05$ vs. empty vector-transfected cells.

in NO metabolites (from 0.29 ± 0.01 to $0.61 \pm 0.03 \mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein) that represented an increase of 113.3%. Intriguingly, Hsp90 β over-expression produced the opposite effect, such that NO₂/NO₃ levels were significantly reduced in transfected HEK-293 cells ($0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}/\mu\text{g}$ of protein). The specificity of the observed effects was studied by reducing the endogenous Hsp90 α and Hsp90 β expression by using specific siRNAs for these proteins. Therefore, other groups of cells were transfected with the corresponding siRNA/Hsp90 α or siRNA/Hsp90 β . We assessed the Hsp90 α and Hsp90 β expression after 24 to 72 h after respective siRNAs transfection and from these results the experiments with siRNAs were performed after 48h (data not shown). When the NO₂/NO₃ levels were evaluated, we observed that siRNA/Hsp90 α transfection produced a significant reduction in NO metabolites, by 36.5 % as is depicted in Fig. 4A. In contrast, siRNA/Hsp90 β transfection was associated with a significant increase in NO₂/NO₃ levels, by 74.7%. These data strongly suggest that Hsp90 α and Hsp90 β have differential roles in regulating eNOS activity.

We examined whether these differences were propagated by changes in the interaction of Hsp90 α or Hsp90 β with eNOS. As shown in Fig. 4B, it was not the case, as the IP-Western blotting analysis revealed that eNOS was able to associate with both Hsp90 α and Hsp90 β , suggesting that the reduction of eNOS activity by Hsp90 β did not result from an inability of this chaperone to associate with eNOS.

To evaluate if the differential modification of NO production induced by Hsp90 α and Hsp90 β over-expression was mediated by changes in eNOS expression and its phosphorylation, eNOS protein levels and the phosphorylation of serine 1177 and threonine 497 residues of eNOS were evaluated in transfected HEK-293 cells by Western blot analysis using the corresponding phospho-antibodies. The eNOS protein levels in HEK-293 cell cultures was not modified by either Hsp90 α or Hsp90 β transfection, as evident in the top inset and by the densitometric analysis shown in Fig. 4C. A significant increase in the immune-detection signal of phosphorylated Ser1177 was observed in the cells that over-expressed

Fig. 6. Effects of Hsp90 α or Hsp90 β over-expression on the monomer and dimer conformations. A) Hsp90 α Western blot analysis of non-denatured proteins extracted from HEK-293 cells transfected with empty vector (white bars) pc-Hsp90 α (dark gray bars), and pc-Hsp90 β (black bars). The upper panel shows a representative image of the Hsp90 α Western blot, and the lower panel shows graphical representations of the dimers, monomers and dimer/monomer ratios of Hsp90 α . B) Hsp90 β Western blot analysis of non-denatured proteins extracted from HEK-293 cells transfected with empty vector (white bars), pc-Hsp90 α (dark gray bars), and pc-Hsp90 β (black bars). The proteins were extracted from three different HEK-293 transfected cell cultures. * $p < 0.05$ versus empty transfected cells.

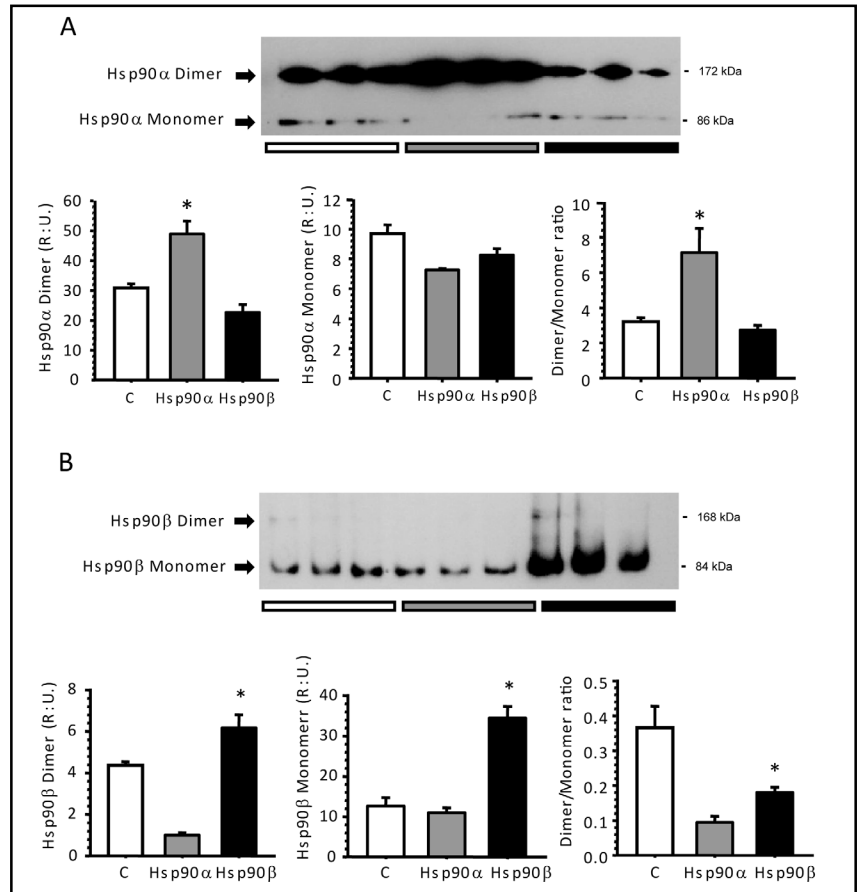
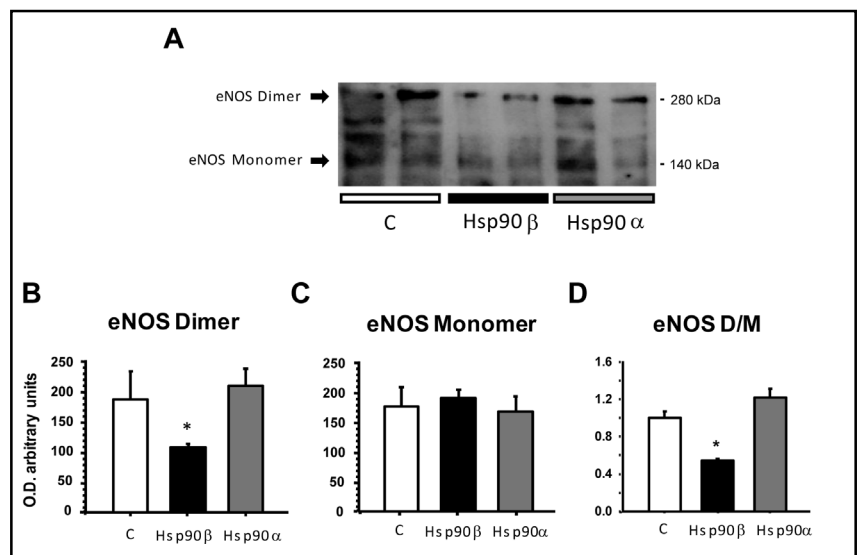


Fig. 7. Effect of Hsp90 α and Hsp90 β over-expression on eNOS dimer/monomer conformation. A) A representative image of eNOS Western blot from total proteins extracted from HEK-293 cells transfected with empty vector (open bars), Hsp90 β (black bars), and Hsp90 α (gray bars), respectively. Two bands were detected: 280kDa and 140kDa, corresponding to eNOS dimeric and monomeric conformations, respectively. B and C) dimeric and monomeric eNOS densitometric analysis, and D) eNOS dimer/monomer ratio (D/M). The results reported here were repeated two times with similar results. * $p < 0.05$ vs. empty vector transfected cells.



Hsp90 α , an effect that was not seen in Hsp90 β -transfected cells (Fig. 4D). The mean ratio of phosphorylated Ser1177 eNOS/ β -actin in pc-Hsp90 α -transfected cells was 0.83 ± 0.08 , compared to 0.32 ± 0.04 and 0.36 ± 0.05 AU for pc-Hsp90 β and pcDNA3.1 empty vector, respectively. In contrast, the transfection of pc-Hsp90 β significantly increased

Thr495 eNOS phosphorylation (Fig. 4E), but over-expression of Hsp90 α did not modify the phosphorylation of this eNOS residue. The mean ratio of phosphorylated Thr495-eNOS/ β -actin in Hsp90 β and pcDNA3.1-transfected cells was 0.86 ± 0.1 , compared to 0.50 ± 0.05 and 0.55 ± 0.09 in liposomes and Hsp90 α -transfected cells, respectively.

Because it has been reported that Hsp90 plays an important role in the activation of p-Akt/PKB [16] and because this kinase is able to phosphorylate Ser1177 of eNOS [17, 18], we evaluated the effect of over-expressing Hsp90 α or Hsp90 β on Akt/PKB activation. As shown in Figure 4F, the transfection of either Hsp90 α or Hsp90 β did not modify the Akt/PKB protein levels, but a different effect was observed for the phosphorylation of this kinase. Thus, Hsp90 α over-expression was associated with a significant increase in Akt/PKB phosphorylation, whereas Hsp90 β over-expression induced a significant reduction in the amount of phosphorylated Akt/PKB.

Moreover, it has been previously shown that eNOS is able to generate superoxide anion when it is phosphorylated at Thr-497; thus, we assessed the effect of Hsp90 α or Hsp90 β over-expression on the cellular oxidative stress state by measuring the hydrogen peroxide levels in HEK-293 cell cultures. Figure 5A shows the H₂O₂ levels in WCL, expressed as nmol/ μ g of protein. It is noteworthy that the H₂O₂ levels increased by two-fold when Hsp90 β was over-expressed, an effect that was not observed when pc-Hsp90 α was transfected. To further confirm these findings, we performed hydroethidine (HE) staining to detect intracellular superoxide anion generation by flow cytometry analysis. Figure 5B shows the representative histograms of each transfected group, and Figure 5C and 5D show the percentage of stained cells and the quantification of the mean fluorescence intensity (MFI), respectively. The HE staining confirmed that Hsp90 β over-expression induced a higher generation of superoxide anion, as shown by the increase in the percentage of cells positive for HE staining (from 2.7 ± 0.9 to 9.0 ± 0.8 %, $p=0.002$) and by the MFI measurement (from 1 ± 0.06 to 1.6 ± 0.03 AU, $p=0.002$).

Because the dimeric Hsp90 conformation has been shown to be necessary for interactions with the client proteins, the monomeric/dimeric ratio in HEK-293 cells transfected with Hsp90 α and Hsp90 β was evaluated. The insets in Fig. 6A and Fig. 6B show Westerns blot under non-denaturing conditions of proteins extracted from Hsp90 α and Hsp90 β -transfected cells, respectively. Typically, most of the Hsp90 α was found in its dimeric conformation (Fig. 6A), in contrast with the Hsp90 β which was found mainly in the monomeric conformation (cells transfected with the empty vector) as is shown in Fig. 6B. When the monomeric/dimeric ratio was evaluated in cells transfected with either pc-Hsp90 α or pc-Hsp90 β most of the Hsp90 α was found in its dimeric conformation. In addition, a greater amount of this protein

was detected in the cells that were transfected with pc-Hsp90 α . In contrast, when Hsp90 β was over-expressed, most of the protein was found in its monomeric conformation, and again, more monomeric Hsp90 was observed in the cells that were transfected with pc-Hsp90 β (Fig. 6B).

It has been previously reported that dimeric eNOS conformation is required for a suitable NO production [19], thus we evaluated if Hsp90 α and Hsp90 β over-expression modify the dimeric/monomeric eNOS conformation. The upper panel of Figure 7 shows the inset of eNOS Western blot analysis in non-denaturing conditions from HEK-293 cells transfected with empty vector, pcHsp90 α and pcHsp90 β respectively. The lower panel depicts the densitometric analysis of dimeric and monomeric bands of eNOS, together with the resulting dimeric/monomeric ratio. The reduction of NO synthesis induced by Hsp90 β over-expression was associated with a significant decrease in eNOS dimeric conformation, with the concomitant eNOS dimeric/monomeric ratio reduction. This effect was not seen in pcHsp90 α transfected cells.

Discussion

Hsp90 plays a key role in cellular signal transduction networks, as it is essential for maintaining the activity of numerous signaling proteins. One of the most studied Hsp90 interactions is that established with eNOS. Several studies have shown that Hsp90 regulates eNOS activity through modulations of the following processes: helping to activate eNOS by dissociating it from caveolin-1; enhancing eNOS enzymatic activity by promoting its dimerization; facilitating the activating eNOS phosphorylation; and modulating the release of NO vs. superoxide by eNOS [10-13]. Furthermore, Hsp90 has also been proposed to facilitate the calcineurin-dependent dephosphorylation of the residue Thr495 site of eNOS, which contributes to enhance its enzymatic activity [15]. Therefore, Hsp90 plays a critical role in vascular NO synthesis through the regulation of eNOS activity. In this regard, we have recently shown that Hsp90 inhibition with radicicol, that reduced Hsp90 interaction with their client proteins, produced a significant reduction in renal plasma flow and glomerular filtration rate, an effect that was associated with a decreased urinary excretion of nitrites and nitrates (NO₂/NO₃), suggesting that the disruption of eNOS-Hsp90 complex reduced renal NO synthesis [20]. In addition, previous studies have shown that the disruption of eNOS/Hsp90 complex promotes not only the reduction

of NO but also the generation of O_2^- anion by eNOS [8, 9, 21, 22]. Even though there is enough evidence about the Hsp90/eNOS coupling and uncoupling in NO and O_2^- generation, respectively, the specific role of Hsp90 α and Hsp90 β in this pathway have not been completely addressed. Two previous studies [7, 23] suggested that transfection of Hsp90 β induces an increase in NO production in COS and pulmonary arterial endothelial cells (PAEC). However, results from these studies are hard to evaluate because the Hsp90 antibody that was used recognizes both isoforms and thus Hsp90 β over-expression was not demonstrated. In addition, in one of the studies [23], the effect of empty adenovirus transfection was not evaluated. Other studies in which the interaction between eNOS and Hsp90 was enhanced by a transient Hsp90 transfection, did not specify which isoform of Hsp90 was used for the transfection [15, 24].

In the present study, the participation of Hsp90 α or Hsp90 β in the eNOS/NO/ O_2^- pathway was evaluated by inducing the over-expression of each isoform in HEK-293 cells. For this issue, we cloned Hsp90 α and Hsp90 β into an expression vector and the over-expression was gotten by transitory transfection. The pc-Hsp90 α transfection produced a significant elevation in Hsp90 α without modifying Hsp90 β protein levels. Similarly, in cells transfected with pc-Hsp90 β , the levels of this protein were significantly enhanced, whereas the endogenous Hsp90 α protein levels were not affected. Therefore, the effects seen in this study on the NO/eNOS pathway were solely induced by the transitory over-expression of each Hsp90 isoform.

Accordingly, we observed that Hsp90 α over-expression was associated with a significant increase in NO_2/NO_3 levels. Quite interestingly, pc-Hsp90 β transfection produced the opposite effect; thus, NO metabolites were significantly reduced in HEK-293 cells. These findings were supported by results using respective siRNAs of Hsp90 α or Hsp90 β . Consequently, when Hsp90 α expression was reduced by this strategy, the NO metabolites were significantly decreased. In contrast, when HEK-293 cells were transfected with Hsp90 β siRNA, the NO_2/NO_3 levels were significantly enhanced. In this regard, these results suggest that cytosolic Hsp90 isoforms exert distinctive functions in the NO pathway, in which Hsp90 α positively regulates NO synthesis whereas Hsp90 β has a contrary effect.

To begin to understand the mechanisms by which Hsp90 α and Hsp90 β have differential roles in NO production, we evaluated the eNOS protein levels and the eNOS phosphorylation of two main residues that are

implicated in this enzyme activity. We found that eNOS protein levels were not modified when the HEK-293 cells were transfected with either Hsp90 α or Hsp90 β , however, profound changes in its phosphorylation state were observed. Hsp90 α over-expression was associated with a significant increase in eNOS-activating phosphorylation (Ser1177), whereas Hsp90 β over-expression produced an increase in the eNOS-inactivating phosphorylation (Thr495). In this regard, previous studies have shown that increased eNOS phosphorylation at Thr495, as caused by eNOS-Hsp90 uncoupling, resulted in lesser NO production [20, 25, 26]. In support of this, Lin et al. [27] reported that the T495A eNOS mutant, which cannot be phosphorylated at this site, was able to enhance eNOS activity. The immunoprecipitation analysis performed in this study revealed that both Hsp90 α and Hsp90 β are able to associate with eNOS, suggesting that these two Hsp90 isoforms exert differential eNOS regulation through modulating eNOS phosphorylation. Incidentally, it has been shown that eNOS activation by Hsp90 is mediated, in part, by a scaffolding effect that enhances the interaction between eNOS and the active serine/threonine kinase Akt/PKB [10], which, in turn, promotes eNOS Ser1177 phosphorylation. Intriguingly, Akt/PKB activity is also regulated by Hsp90 through the prevention of PP2A-mediated Akt dephosphorylation [16]. Consequently with these previous findings, we observed that pc-Hsp90 α transfection increased Akt/PKB phosphorylation, suggesting that the greater NO synthesis observed in these transfected cells was in part due to an enhanced Akt/PKB activity, resulting in eNOS Ser1177 phosphorylation. Of note, pc-Hsp90 β transfection induced a significant reduction of Akt/PKB phosphorylation, which was associated with an increase in the inactivating eNOS phosphorylation (Thr495), and these findings were associated with a significant reduction in NO production. Thus, our results suggest that another way by which Hsp90 α and Hsp90 β differentially regulate eNOS is by modifying Akt/PKB phosphorylation.

Several studies have shown that eNOS Thr495 phosphorylation promotes the superoxide anion (O_2^-) generation instead of NO [8, 9, 23, 28, 29]. To explore the significance of the increased eNOS Thr495 phosphorylation induced by pc-Hsp90 β transfection on O_2^- generation, the levels of peroxide hydrogen and O_2^- anion were evaluated in transfected HEK-293 cells. The reduction of NO induced by Hsp90 β over-expression was associated with a significant increase in hydrogen peroxide, suggesting a greater O_2^- generation. These results were confirmed by measuring cellular O_2^- by

cytofluorometry, in which a significant increase in the generation of this anion was observed in HEK-293 cells transfected with pc-Hsp90 β , an effect that was not seen following transfection with pc-Hsp90 α . Altogether, these results suggest that Thr 497 phosphorylation switches the ability of eNOS to produce O₂⁻, and, interestingly, this effect seems to be promoted by the association of Hsp90 β with eNOS.

The dimeric molecular conformation of Hsp90 is required for the activation and stabilization its client proteins. Hsp90 consists of a C-terminal dimerization domain, a middle domain (which may interact with substrate proteins), and an N-terminal ATP-binding domain. The activation process depends on the hydrolysis of ATP by Hsp90. Thus, the ability of Hsp90 to interact with its client proteins is strongly determined by its conformational state [3, 30, 31]. In this sense, Hsp90 β human and mouse is less frequently found as a dimer than Hsp90 α . The impeded ability of Hsp90 β to dimerize is related to the 16 amino acid substitutions located in the 561-685 amino acid region of the C-terminal dimerization domain [32]; specifically, Thr566 and Ala629 seem to be responsible for the reduced ability of Hsp90 β to dimerize [33]. Here, we evaluated the monomer/dimer ratio of Hsp90 α and Hsp90 β in HEK-293 cells before and after pc-Hsp90 α or pc-Hs90 β transfection. As has been previously reported, we found that Hsp90 α was predominantly in its dimeric molecular conformation, whereas Hsp90 β persisted in a monomeric conformation in the cells that were transfected with the empty vector. When Hsp90 α was over-expressed, most of the protein was found in the dimeric form, without changes in the Hsp90 β monomer form. In contrast, the over-expression of Hsp90 β rendered a greater proportion of the monomeric conformation. These results suggest that both Hsp90 isoforms are able to associate with eNOS, but the conformation state of Hsp90 seems to be a regulator of eNOS ability to produce NO or O₂⁻. Because Hsp90 is also able to interact with neuronal and inducible NOS [34-36], we can not exclude the participation of other NOS isoforms in the NO production seen when Hsp90 α or Hsp90 β were over-expressed.

References

- 1 Lindquist S, Craig EA: The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631-677.
- 2 Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G: The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998;79:129-168.
- 3 Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K: The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J Biol Chem* 2009;284:22559-22567.

The differential regulation of eNOS by Hsp90 α and Hsp90 β seems not only to be explained by changes in eNOS phosphorylation or Hsp90 conformation, but also, Hsp90 β over-expression induced a significant reduction in eNOS active conformation. Thus, the reduction in NO synthesis observed in HEK-293 cells transfected with pcHsp90 β was associated with a lesser dimeric conformation of eNOS, suggesting that this is another mechanism by which Hsp90 β differentially regulates eNOS activity.

Taken together, our results suggest that to obtain a suitable NO synthesis, the formation of the dimeric conformation of Hsp90 α is required, which not only allows eNOS dimerization, but also helps to eNOS phosphorylation at Ser1177 by Akt/PKB. In contrast, when Hsp90 β is predominantly found as a monomer, it affects eNOS pathway through two different mechanisms: by reducing Akt/PKB phosphorylation/activity and by propitiating the inactive eNOS conformation which in turns is associated with eNOS phosphorylation at Thr495, an effect that causes eNOS to produce O₂⁻ instead of NO. These findings could have important implications for abnormal vascular physiology in which the generation of the superoxide anion is increased and nitric oxide availability is reduced.

Acknowledgments

We thank to Rosalba Pérez for her technical assistance and all members of the Molecular Physiology Unit for their enthusiastic comments. The results presented in this paper have not been published previously in whole or in part, except for the abstracts, which were presented at the ASN 42nd and 43rd Annual Meetings & Scientific Expositions, 2008 and 2009 (Philadelphia, PA, and San Diego, CA, respectively). This project was supported by grants from the Mexican Council of Science and Technology 48483 and 101030 to NAB, from the National University of Mexico IN200909-3 to NAB, and DK64635 from NIDDK to GG.

- 4 Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF: Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 2004;562:11-15.
- 5 Richter K, Hendershot LM, Freeman BC: The cellular world according to Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:90-94.
- 6 Wandinger SK, Richter K, Buchner J: The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 2008;283:18473-18477.
- 7 Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC: Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998;392:821-824.
- 8 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* 2001;276:17621-17624.
- 9 Xu H, Shi Y, Wang J, Jones D, Weilrauch D, Ying R, Wakim B, Pritchard KA Jr: A Heat Shock Protein 90 Binding Domain in Endothelial Nitric-oxide Synthase Influences Enzyme Function. *J Biol Chem* 2007;282:37567-37574.
- 10 Takahashi S, Mendelsohn ME: Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 2003;278:30821-30827.
- 11 Takahashi S, Mendelsohn ME: Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J Biol Chem* 2003;278:9339-9344.
- 12 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* 2000;275:22268-22272.
- 13 Papapetropoulos A, Fulton D, Lin MI, Fontana J, McCabe TJ, Zoellner S, Garcia-Cardena G, Zhou Z, Gratton JP, Sessa WC: 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* 2004;65:407-415.
- 14 Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC: Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 2002;90:866-873.
- 15 Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, Raake P, Daneau G, Bouzin C, Boekstegers P, Feron O: Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1435-1441.
- 16 Sato S, Fujita N, Tsuruo T: Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10832-10837.
- 17 Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597-601.
- 18 Wei Q, Xia Y: Roles of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function by heat shock protein 90. *J Biol Chem* 2005;280:18081-18086.
- 19 Bauersachs J, Schafer A: Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio—a clue to eNOS uncoupling in diabetes? *Cardiovasc Res* 2005;65:768-769.
- 20 Ramirez V, Mejia-Vilet JM, Hernandez D, Gamba G, Bobadilla NA: Radicolol, a heat shock protein 90 inhibitor, reduces glomerular filtration rate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1044-F1051.
- 21 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* 2001;276:17621-17624.
- 22 Li Z, Carter JD, Dailey LA, Huang YC: Vanadyl sulfate inhibits NO production via threonine phosphorylation of eNOS. *Environ Health Perspect* 2004;112:201-206.
- 23 Sud N, Sharma S, Wiseman DA, Harmon C, Kumar S, Venema RC, Fineman JR, Black SM: Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L1444-L1453.
- 24 Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O: Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:32663-32669.
- 25 Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K: Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:462-467.
- 26 Sessa WC: eNOS at a glance. *J Cell Sci* 2004;117:2427-2429.
- 27 Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA Jr, Sessa WC: Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem* 2003;278:44719-44726.
- 28 Konduri GG, Ou J, Shi Y, Pritchard KA Jr: Decreased association of HSP90 impairs endothelial nitric oxide synthase in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H204-H211.
- 29 Ou J, Ou Z, Ackerman AW, Oldham KT, Pritchard KA Jr: Inhibition of heat shock protein 90 (hsp90) in proliferating endothelial cells uncouples endothelial nitric oxide synthase activity. *Free Radic Biol Med* 2003;34:269-276.
- 30 Richter K, Soroka J, Skalniak L, Leskovar A, Hessling M, Reinstein J, Buchner J: Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *J Biol Chem* 2008;283:17757-17765.
- 31 Hessling M, Richter K, Buchner J: Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:287-293.
- 32 Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K: Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem* 1995;233:1-8.
- 33 Kobayakawa T, Yamada S, Mizuno A, Nemoto TK: Substitution of only two residues of human Hsp90alpha causes impeded dimerization of Hsp90beta. *Cell Stress Chaperones* 2008;13:97-104.
- 34 Yoshida M, Xia Y: Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003;278:36953-36958.
- 35 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* 1999;274:1472-1478.
- 36 Bachmann S, Bosse HM, Mundel P: Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 1995;268:F885-F898.

Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury

Jonatan Barrera-Chimal^{1,2}, Rosalba Pérez-Villalva^{1,2}, Cesar Cortés-González^{1,2},
Marcos Ojeda-Cervantes², Gerardo Gamba^{1,2,3}, Luis E. Morales-Buenrostro², Norma A. Bobadilla^{1,2*}

Keywords: early biomarker; stratifying biomarker; spironolactone renoprotection; patients with AKI

DOI 10.1002/emmm.201000105

Received May 17, 2010

Revised November 01, 2010

Accepted November 08, 2010

This study was designed to assess whether heat shock protein Hsp72 is an early and sensitive biomarker of acute kidney injury (AKI) as well as to monitor a renoprotective strategy. Seventy-two Wistar rats were divided into six groups: sham-operated and rats subjected to 10, 20, 30, 45 and 60 min of bilateral ischemia (I) and 24 h of reperfusion (R). Different times of reperfusion (3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96 and 120 h) were also evaluated in 30 other rats subjected to 30 min of ischemia. Hsp72 messenger RNA (mRNA) and protein levels were determined in both kidney and urine. Hsp72-specificity as a biomarker to assess the success of a renoprotective intervention was evaluated in rats treated with different doses of spironolactone before I/R. Renal Hsp72 mRNA and protein, as well as urinary Hsp72 levels, gradually increased relative to the extent of renal injury induced by different periods of ischemia quantified by histomorphometry as a benchmark of kidney damage. Urinary Hsp72 increased significantly after 3 h and continued rising until 18 h, followed by restoration after 120 h of reperfusion in accord with histopathological findings. Spironolactone renoprotection was associated with normalization of urinary Hsp72 levels. Accordingly, urinary Hsp72 was significantly increased in patients with clinical AKI before serum creatinine elevation. Our results show that urinary Hsp72 is a useful biomarker for early detection and stratification of AKI. In addition, urinary Hsp72 levels are sensitive enough to monitor therapeutic interventions and the degree of tubular recovery following an I/R insult.

INTRODUCTION

Ischemia/reperfusion (I/R) and nephrotoxic injuries are the major causes of acute kidney injury (AKI) in native and transplanted kidneys (Friedewald & Rabb, 2004). AKI occurs in about 5% of hospitalized patients and up to 40–60% of intensive care unit (ICU) patients (Kelly, 2006). Despite technical improvements in clinical care and the development

of preventive strategies, the prevalence of AKI has risen significantly in the last 15 years due to population aging and the rising pandemics of obesity, diabetes and hypertension (Liano & Pascual, 1996; Waikar et al, 2006). Despite efforts and advances in the development of new therapeutics, the mortality rate of AKI remains between 40 and 80% and has not been reduced in the last four decades, mainly because current tools used for the early detection of AKI are not adequately sensitive or specific (Wu & Parikh, 2008). In current clinical practice, AKI is typically diagnosed by a rise in serum creatinine (SCr). Indeed, acute kidney injury network (AKIN) and risk injury failure lost end stage renal disease (RIFLE) classifications for the detection of AKI are based on elevation of SCr (Bagshaw, 2010; Lopes et al, 2008; Wu & Parikh, 2008). It is generally accepted, however, that SCr is an unreliable and delayed marker of kidney injury. Substantial injury to the kidney may occur without affecting glomerular filtration; for

(1) Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

(2) Department of Nephrology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico.

(3) Department of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico.

*Corresponding author: Tel: +5255 5485 2676; Fax: +5255 5655 0382; E-mail: nab@biomedicas.unam.mx

example, extensive kidney mass reduction may occur without changes in SCr levels, and urinary obstruction caused by post-renal factors may be associated with an elevation in SCr without renal tubular injury (Coca & Parikh, 2008). Moreover, it has been demonstrated that SCr rises too late to facilitate early diagnosis of AKI; creatinine elevation is detected after 48 h of ischemic insult (Parikh et al, 2006).

It is known that early initiation of treatment substantially improves the prognosis for patients with AKI. Therefore, the development of novel, sensitive renal biomarkers is crucial for the identification of new therapeutic strategies for AKI; such biomarkers will facilitate early treatment and monitoring of the disease course (Yamamoto et al, 2007). Ideally, a sensitive biomarker for AKI should comprise the following characteristics: easy detection, non-invasive and capable of detecting AKI early in the clinical course. Because acute tubular necrosis (ATN), which is characterized by loss of brush border and polarity in the tubular epithelium with necrosis and apoptosis as well as cell tubular detachment (Devarajan, 2006; Liu & Brakeman, 2008; Price et al, 2009), is a common feature of most AKI, a good biomarker should also possess the ability to predict the extent of tubular injury. The detection of the extent of insult would identify those patients with severe tubular damage and who could be at risk for developing end stage chronic kidney disease. Consequently, a good biomarker could also be used to identify patients that will require subsequent follow-up to decrease or slow the progression of chronic renal failure. In addition to early diagnosis and prognosis, it would also be desirable to identify biomarkers capable of discerning AKI subtypes, identifying etiologies, predicting clinical outcomes, allowing for risk stratification and monitoring the response to interventions (Coca & Parikh, 2008).

It is well known that, during AKI, several mechanisms are activated to compensate for the resultant cell injury; one of these compensatory mechanisms is the up-regulation of heat shock proteins (Hsp) (Csermely et al, 2007; Ritossa, 1962), which help to restore cell homeostasis. These proteins, which have molecular weights ranging from 10 to 150 kDa (Lindquist & Craig, 1988), are encoded by different genes. The Hsp70 subfamily is composed of four isoforms: Hsc70, the inducible isoform Hsp72, mHsp75 and Grp78. Hsp72 is expressed in response to cell stress, and its induction can be as great as 15% of the total cell protein (Fan et al, 2003). Several studies have shown that Hsp72 is up-regulated in damaged tubules after ischemic and toxic kidney injury (Hernandez-Pando et al, 1995; Kelly, 2002; Kelly et al, 2001; Molinas et al, 2010; Mueller et al, 2003; Turman & Rosenfeld, 1999; Zhipeng et al, 2006). Given that Hsp72 is induced in renal tubules during AKI and that proximal tubular detachment is projected to the urinary space, we reasoned that the urinary Hsp72 level could serve as an early biomarker to detect, monitor and/or stratify AKI. The performance of Hsp72 as a sensitive biomarker to detect different degrees of renal injury and recovery was corroborated by using histopathological analysis as a benchmark of kidney damage. Here, we provide evidence that Hsp72 is an early and sensitive biomarker of AKI in both rats subjected to I/R and in humans with clinical AKI.

RESULTS

Different degrees of renal injury were induced in five groups of rats that underwent various periods of bilateral renal ischemia (10 to 60 min); all rats were studied after 24 h of reperfusion. Figure 1 shows the renal function parameters in the six groups studied together with the quantification of two classic tubular injury markers. Although increases in SCr were only significant after 30 min of bilateral ischemia (Fig 1A), all rats that underwent I/R exhibited renal dysfunction characterized by gradual reduction in creatinine clearance (Fig 1B) and renal plasma flow (Fig 1C). These alterations were not associated with changes in mean arterial pressure (MAP) (Fig 1D). As expected, the worst renal dysfunction was observed in the animals subjected to 60 min of bilateral ischemia. Tubular injury induced by different periods of ischemia was assessed by the elevation of urinary *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and proteinuria. Statistical differences in NAG were seen only after 30 min of ischemia, suggesting that NAG is not adequately sensitive to detect slight or mild renal injury.

Tubular injury was also detected by light microscopy, the gold standard in evaluating acute renal injury. The left panels of Fig 2 show representative images of kidney sections from rats subjected to different periods of ischemia, and the right panels show quantified cast numbers and the percentage of injured tubular area quantified by morphometry. Tubular histopathology induced by I/R was characterized by brush border loss, lumen dilatation or collapse and cellular detachment from tubular basement membranes (Fig 2A–F). Thus, a proportional increase in tubular injury correlates to a longer period of induced renal ischemia. After 24 h of reperfusion, the smallest degree of tubular injury was observed in rats that underwent 10 min of bilateral ischemia, and the worst injury was observed in rats subjected to 60 min of ischemia (Fig 2 G–H). Therefore, progressive increases in tubular damage are proportional to the ischemia period provoked.

I/R induced renal Hsp72 up-regulation

To evaluate if Hsp72 is proportionally induced with different degrees of ischemic injury, messenger RNA (mRNA) and protein levels were detected in the renal cortex from rats subjected to different periods of ischemia. As shown in Fig 3A, after 24 h of reperfusion, Hsp72 mRNA levels were significantly and progressively increased following 10 min of bilateral ischemia. These findings were reflected at protein level, as is shown in Fig 3B. Renal injury induced by different periods of renal ischemia was associated with a gradual and significant increase in Hsp72 expression, compared with almost undetectable levels in sham-operated rats. The greatest expression of Hsp72 was observed in the group with severe tubular injury, around 30-fold greater compared to control levels. These results show that Hsp72 is gradually increased relative to the intensity of induced renal injury.

Urinary Hsp72 levels as a biomarker of AKI

Consequently, we addressed whether Hsp72 could be detected in the urine of animals that suffered from AKI. First, Hsp72

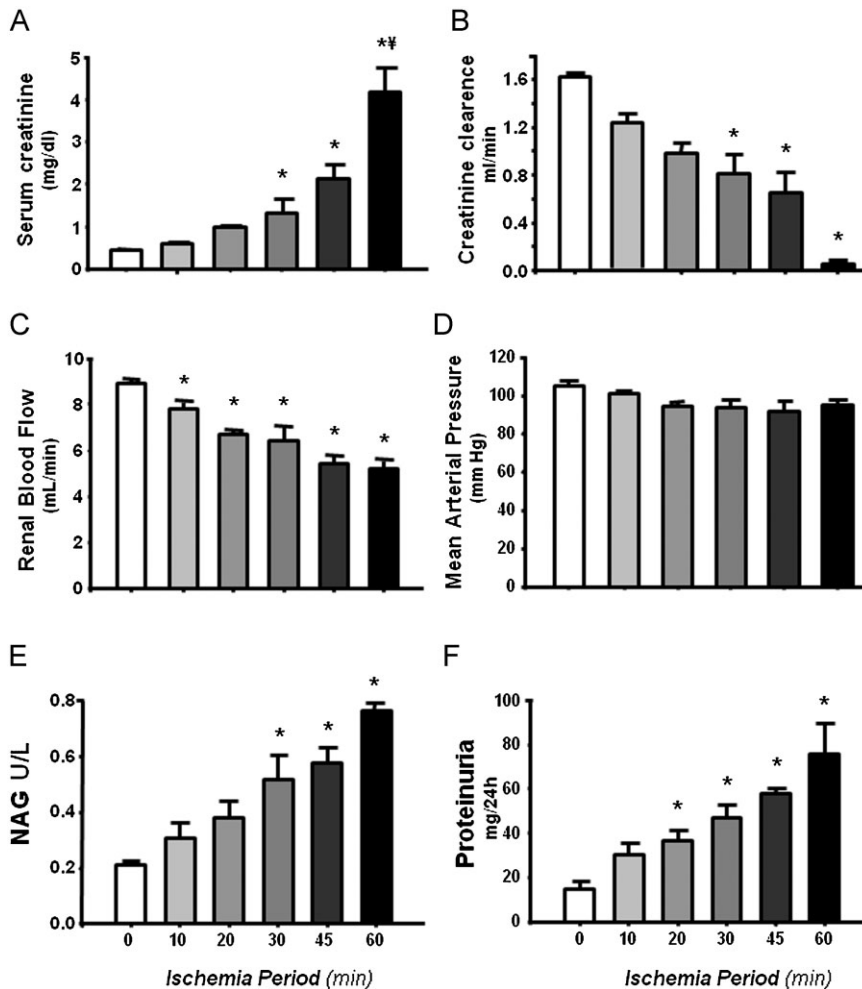


Figure 1. Renal functional parameters in rats underwent which different periods of bilateral renal ischemia (10, 20, 30, 45, and 60 min) and 24 h of reperfusion compared to sham-operated rats (white bars).

A. Serum creatinine levels.
 B. Creatinine clearance.
 C. Renal blood flow.
 D. Mean arterial pressure.
 E. Urinary NAG excretion.
 F. Protein excretion.

$n = 6$, * $p < 0.05$ versus sham-operated rats and † $p < 0.05$ versus 45 min I/R group.

mRNA levels were analyzed in collected urine samples of the different groups studied. As shown in Fig 4A, Hsp72 mRNA levels were increased following 10 min of ischemia compared to the control group, and the incremental increase in Hsp72 was progressively enhanced relative to the duration of ischemia. When these values were compared to the number of casts, a significant correlation was found ($r^2 = 0.72$ and $p < 0.0001$, data not shown). Similar results were observed when Hsp72 mRNA levels and tubular affected area were correlated, as is shown in Fig 4B ($r^2 = 0.82$ and $p < 0.0001$).

Urinary protein levels of Hsp72 were assessed by two immunoassays: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot analysis. The urinary determination of Hsp72 by ELISA is shown in Fig 4C and revealed that this protein can be detected in urine samples and that it is an excellent marker of acute renal injury as it is capable of differentiating scant (since 10 min), moderate (20 and 30 min) and severe renal injury (45 and 60 min of ischemia). Thus, Hsp72 correlates with the extent of renal injury induced by different periods of ischemia. The amount of Hsp72 detected was the greatest in the group that underwent 60 min of ischemia; it increased by 23-fold compared to the control group. As demonstrated in Fig 4D, the progressive

urinary elevation of Hsp72 correlated with the intensity of renal injury, as measured by tubular injured area, $r^2 = 0.62$ ($p < 0.0001$). Similar results, but with a greater sensitivity, were observed when urinary Hsp72 protein levels were detected by Western blot. The upper panel of Fig 4E shows Western blots of the urine from four different rats from each group studied. Hsp72 was undetectable in the urine of sham-operated rats; in contrast, Hsp72 was progressively increased in the urine from rats that suffered increasing periods of ischemia. As shown in Fig 4E, Hsp72 protein levels, assessed by Western blot, were significantly enhanced after 10 min of ischemia and increased in animals subjected to longer ischemia periods. However, the sensitivity to detect different degrees of renal damage was greater with Western blot analysis than with ELISA. Urinary Hsp72 was 40-fold increased in the group subjected to 10 min of ischemia and 535-fold in the group with severe renal damage (60 min of ischemia) compared to sham-operated rats. As shown in Fig 4F, stronger correlations were found between the amount of Hsp72 in the urine and the % affected tubular area, $r^2 = 0.89$ ($p < 0.0001$). These findings show that Hsp72 is found in the urine of ischemic rats and its urinary detection is adequately sensitive to assess the extent of tubular injury.

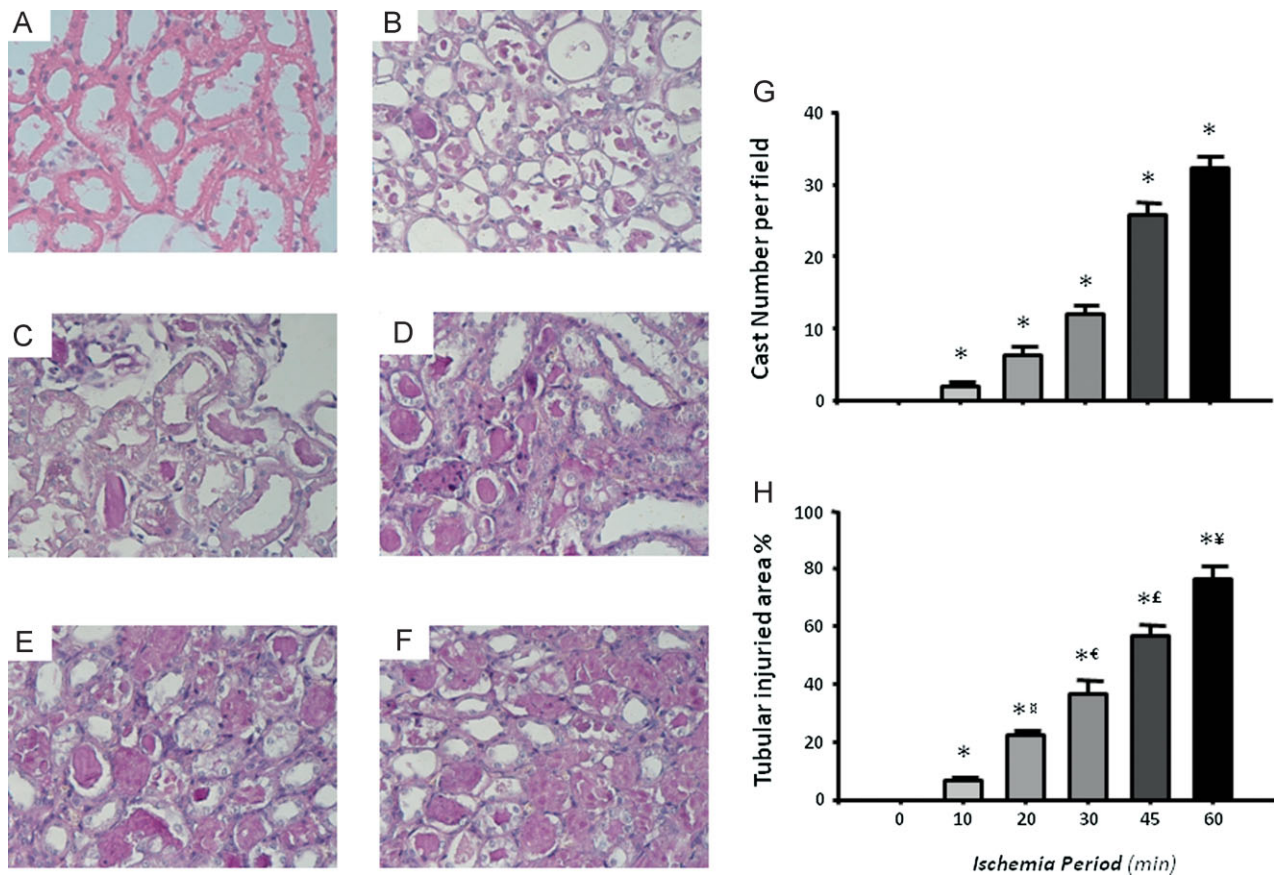


Figure 2. Representative images and morphometry of subcortical histopathological lesions induced by different periods of ischemia and 24 h of reperfusion.

A. Sham-operated rats.

B. 10 min.

C. 20 min.

D. 30 min.

E. 45 min.

F. 60 min.

G. Mean cast number per field.

H. Percentage of tubular affected area.

* $p < 0.05$ versus sham-operated rats, ** $p < 0.05$ versus 10 min, € $p < 0.05$ versus 20 min, £ $p < 0.05$ versus 30 min and ¥ $p < 0.05$ versus 45 min of ischemia group.

Urinary Hsp72 as an early biomarker of AKI

To evaluate if Hsp72 could be utilized as an early biomarker of AKI and if it is adequately sensitive to detect tubular recovery after an ischemic insult, urinary Hsp72 concentrations were assessed in animals subjected to 30 min of bilateral ischemia followed by 3–120 h of reperfusion. Figure 5 shows representative microphotographs from kidneys after reperfusion periods of 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 and 120 h (Fig 5A–J). In the right panels, quantification of injured areas and casts number per field are shown. As the morphometric analysis shows in Fig 5K, there was a progressive increment in tubular injury, reaching the maximal degree after 18 h of reperfusion, at which point more than 50% of the tubular area was damaged. After this point, there was progressive tubular recovery until 120 h of reperfusion, at which point only 12% of tubular area was

injured. The same pattern was observed when casts number were quantified, as depicted in Fig 5L.

In Fig 6A (urinary detection of Hsp72 by ELISA), a significant elevation was detected from 3 h after reperfusion. Similarly to histological injury, the greatest urinary Hsp72 was found after 18 h and return to basal values after 96 h of reperfusion. Again a significant correlation between urinary Hsp72 and % of tubular injured area was observed, $r^2 = 0.65$ ($p < 0.0001$). Insets in the top of Fig 6C show Western blots from three rats of each group; densitometric analysis is shown below. Urinary Hsp72 was almost undetectable in sham-operated rats; in contrast, there was a significant increase in Hsp72 in groups subjected to renal ischemia followed by 3 h of reperfusion and a progressive increase in the amount of Hsp72 detected in the urine was observed relative to the reperfusion period, peaking at 18 h of reperfusion with a

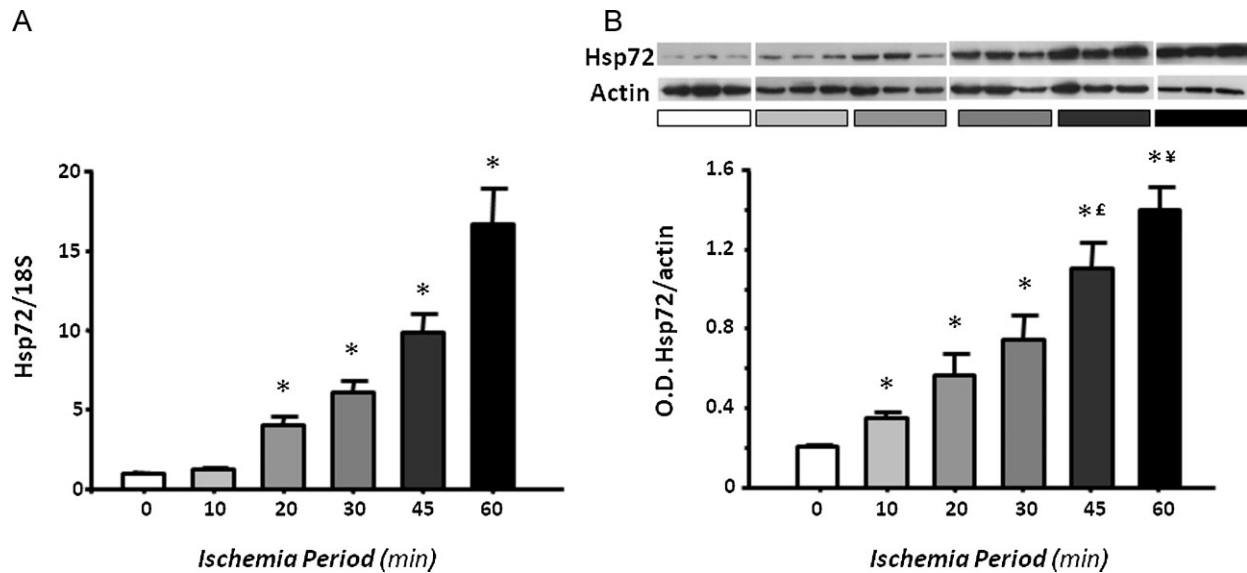


Figure 3. Renal Hsp72 expression in rats subjected to different periods of ischemia.

A. Total RNA was individually extracted from the renal cortex of all studied groups ($n = 5$) and Hsp72 mRNA levels were determined by real time RT-PCR.
B. Renal cortex proteins were individually extracted from three rats of each group, and Hsp72 protein levels were assessed by western blot. Upper inset shows a representative image of the autoradiography of the membrane and the lower graph depicts densitometric analyses of the ratio of Hsp72 to β -actin. * $p < 0.05$ versus sham-operated rats, £ $p < 0.05$ versus 30 min and ¥ $p < 0.05$ versus 45 min of ischemia group.

subsequent decrease in excretion of this protein. Intriguingly, there was a significant correlation between urinary Hsp72 and the % area of tubular injury, $r^2 = 0.55$ ($p < 0.0001$) as depicted in Fig 6D. A better correlation was found between Hsp72 and cast formation, $r^2 = 0.73$ ($p < 0.0001$, data not shown). These results demonstrate that Hsp72 is an early biomarker to detect AKI and suggest that the amount of Hsp72 detected in the urine might reveal the state of tubular injury and recovery.

Kim-1, NGAL, IL-18 as biomarkers for stratifying and early detecting AKI

The performance of the kidney injury molecule 1 (Kim-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and Interleukin 18 (IL-18) for stratification and early detection of AKI was also investigated to compare it with performance of Hsp72. As shown in figure Fig 7A, urinary Kim-1 levels significantly increased after 20 min of ischemia, and these values reached the maximum increment at 30 min; thus Kim-1 was unable to differentiate greater renal injury induced by 45 and 60 min of ischemia. As a result, a lower correlation between percent of tubular injured area and Kim-1 levels was found ($r^2 = 0.46$). NGAL levels progressively increased with the extent of renal injury induced by different periods of ischemia, $r^2 = 0.61$ ($p < 0.001$) as shown in Fig 7B. However, statistical differences between different periods of ischemia were not found. Thus, NGAL was not as good a biomarker as Hsp72 to predict different degrees of renal damage. Similarly to Hsp72 and NGAL, IL-18 increased proportionally to the renal injury induced from 20 min of ischemia ($r^2 = 0.59$, $p < 0.001$), as depicted in Fig 7C.

The usefulness of these biomarkers for early diagnosis of AKI was also assessed. Figure 7D shows the urinary Kim-1 values

from rats exposed to different periods of reperfusion. A significant elevation of Kim-1 was observed after 9 h of reperfusion, reaching the maximal value after 48 h. As a result, a low correlation between tubular affected area and urinary Kim-1 levels ($r^2 = 0.27$) was found. In the case of urinary NGAL, a significant elevation was found after 3 h of reperfusion; however, NGAL levels reached the maximum peak at 6 h and did not reflect the greater renal injury that is observed after 18 h. As a result, a lower correlation between urinary NGAL levels and tubular affected area was observed, $r^2 = 0.48$ versus $r^2 = 0.65$ observed with Hsp72. When IL-18 was assessed, a significant increase was observed after 6 h and levels remained elevated after 24 h of reperfusion. As a result, the correlation between tubular affected area and urinary IL-18 was $r^2 = 0.51$, $p < 0.001$ (Fig 7F), which was similar to NGAL ($r^2 = 0.48$), but lower than Hsp72 ($r^2 = 0.65$).

Urinary Hsp72 levels as a monitor of a renoprotective intervention in AKI

Because we previously reported that aldosterone blockade is a helpful treatment to prevent renal injury induced by I/R (Mejia-Vilet et al, 2007; Ramirez et al, 2009), we assessed if this renoprotective effect could be reflected by the prevention of Hsp72 elevation. Figure 8A and B shows the SCr and creatinine clearance in two groups of rats subjected to ischemia and 24 h of reperfusion without treatment (I/R) and pre-treated with spironolactone 3 days before I/R (I/R + Sp). Spironolactone administration prevented renal dysfunction. This renoprotective effect was associated with a significant reduction in urinary Hsp72 levels detected by ELISA and Western blot, as shown in Fig 8C and D, respectively. In order to evaluate if Hsp72 might allow to monitor different degrees of renoprotection in the

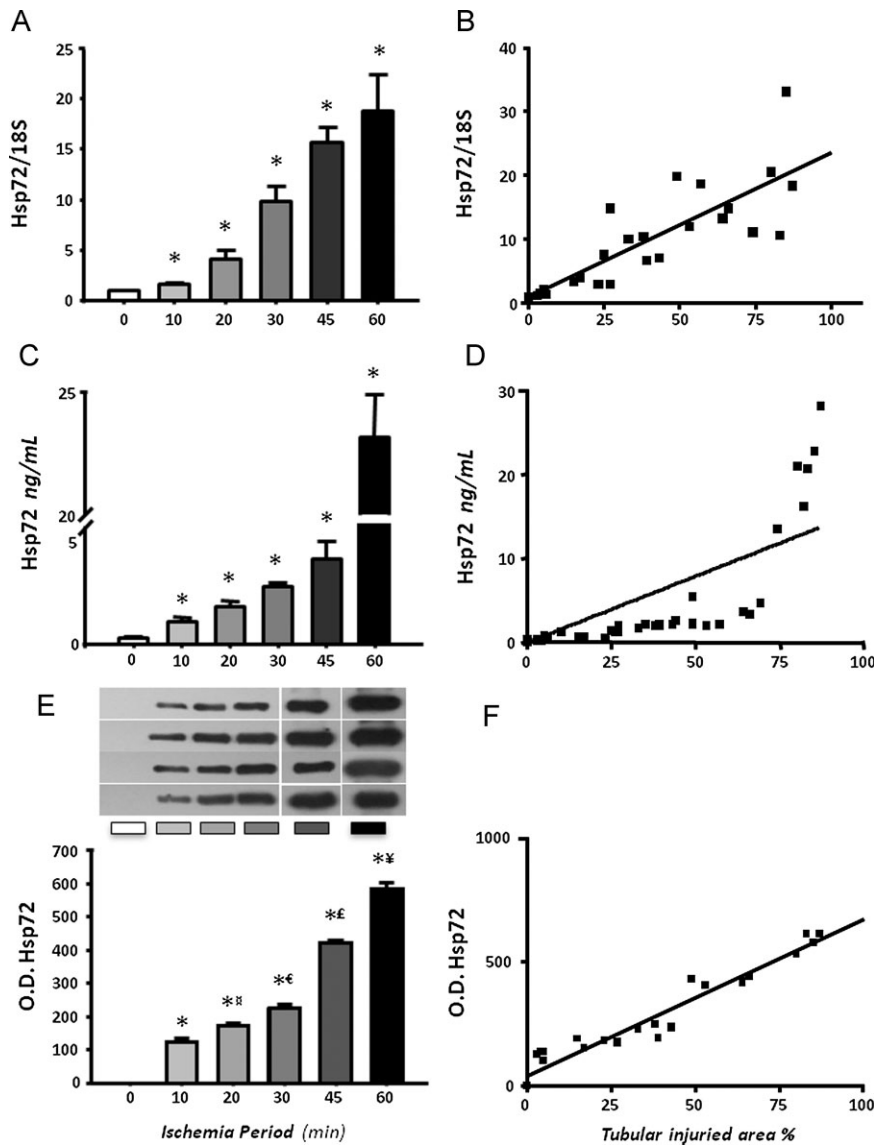


Figure 4. Urinary Hsp72 mRNA and protein levels from rats subjected to different periods of ischemia.

A. Total RNA was individually extracted from the urine of six rats per group and Hsp72 mRNA levels were determined by real time RT-PCR.
B. Relationship between mRNA levels and tubular affected area.
C. Urinary Hsp72 levels assessed by ELISA.
D. Relationship between urinary Hsp72 levels and the % of tubular affected area.
E. Urinary Hsp72 levels assessed by WB analysis from four rats of each group.
F. Relationship between urinary Hsp72 levels detected by WB and tubular injured area.
^{*}*p* < 0.05 versus sham-operated rats, ^{**}*p* < 0.05 versus 10 min, [€]*p* < 0.05 versus 20 min, [£]*p* < 0.05 versus 30 min and [§]*p* < 0.05 versus 45 min of ischemia group.

absence of creatinine elevation, different groups with I/R were pre-treated with lower doses of spironolactone. As is shown in Fig 8E, rats pre-treated with spironolactone at 10 and 5 mg/kg exhibited normal values of SCr that contrast with the 2.5 mg/kg dose, in which the values were similar to untreated I/R group. Interestingly, urinary Hsp72 levels were significantly increased from 10 mg/kg of spironolactone and progressively enhanced when the lower doses of were administrated, as is depicted in Fig 8F. These findings suggest that the lower the dose of spironolactone, the lower the renoprotection. This can be efficiently detected by urinary Hsp72.

Urinary Hsp72 levels in healthy kidney donors and patients with AKI

To determine whether Hsp72 is a sensitive biomarker to detect AKI in humans, the levels of this protein were assessed by Western blot in the urine of normal subjects and compared to

those patients who developed AKI in the ICU of our institution. AKI was defined as an increase in SCr by at least 0.3 mg/dL, or urine output ≤0.5 ml/kg/h over 6 h. The Supplementary Table 1 shows general characteristics and renal function of five healthy kidney donors and nine patients with septic AKI. AKI patients included five females and four males aged between 24 and 84 years. At admission to the ICU, all patients exhibited normal creatinine levels; however, increases in SCr from 0.55 ± 0.05 to 2.30 ± 0.52 mg/dl were subsequently observed (*p* = 0.004). Urinary Hsp72 levels are depicted in Fig 9A. In the urine of healthy kidney donors, Hsp72 was almost undetectable (3.4 ± 0.7 arbitrary units), whereas urinary Hsp72 levels significantly increased by 17.3-fold in patients with clinical AKI (58.3 ± 8.5 arbitrary units). These results were confirmed by ELISA. The basal levels of urinary Hsp72 from healthy living donors were 0.22 ± 0.07, contrasting with the values in patients diagnosed with AKI of 4.90 ± 1.5 ng/ml (22-fold increase). Of

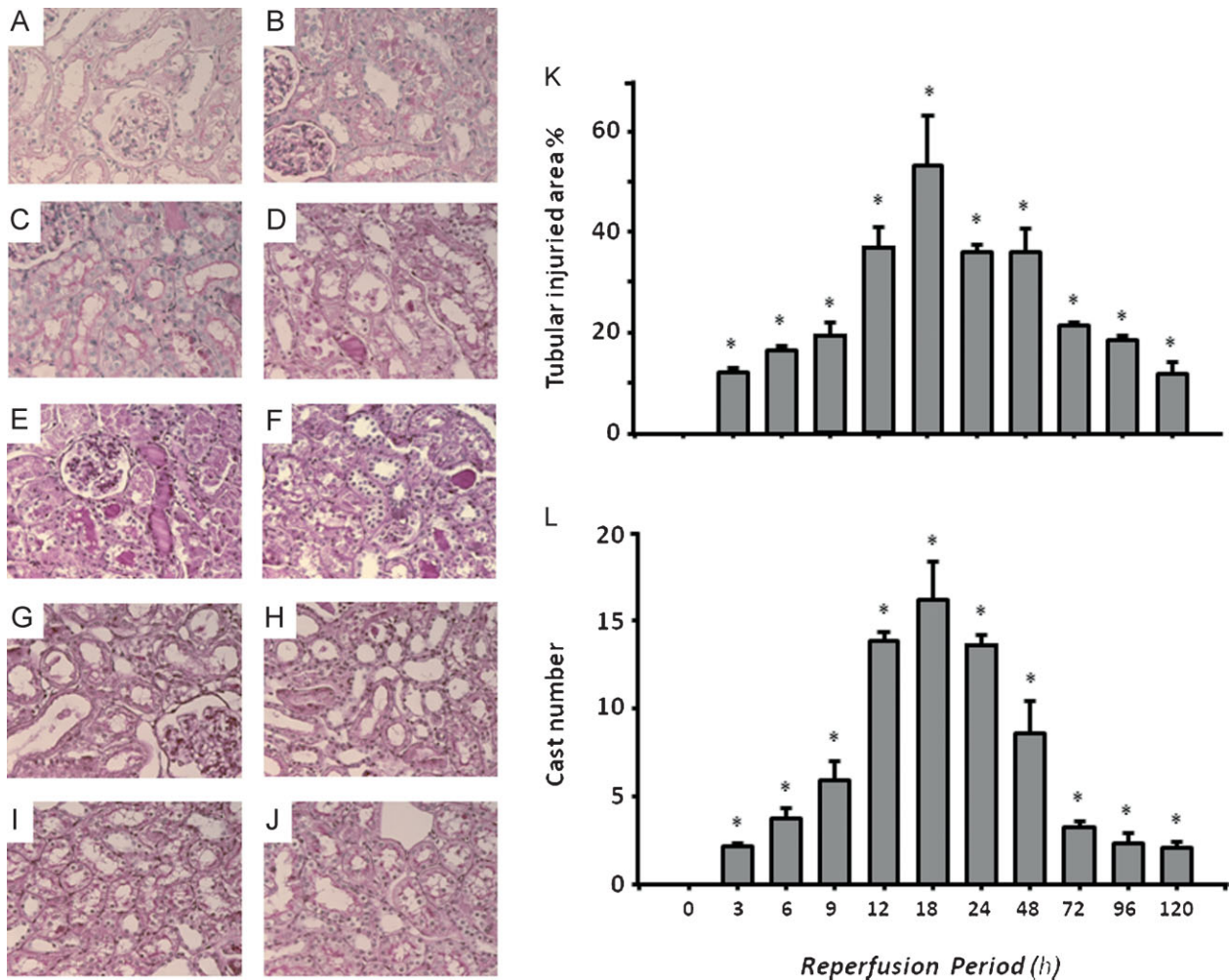


Figure 5. Representative images and morphometry of subcortical histopathological lesions induced by 30 min of ischemia and different periods of reperfusion.

A. 3 h, B. 6 h, C. 9 h, D. 12 h, E. 18 h, F. 24 h, G. 48 h, H. 72 h, I. 96 h and J. 120 h of reperfusion.

K. Morphometric quantification of affected tubular area.

L. Mean cast number per field * $p < 0.05$ versus sham-operated rats.

note, two patients diagnosed with AKI died during hospitalization; these patients exhibited greater urinary values of Hsp72 as assessed by either Western blot or ELISA.

To identify if Hsp72 is an early biomarker to detect AKI in humans, daily urine samples were collected from patients who were admitted to the ICU exhibited and respiratory failure (mechanical ventilation) complicated with other organ failure. These patients had normal renal function at the admission. Five patients that developed AKI and five patients with no evidence of clinical AKI were included. Urine samples taken every day were analyzed to investigate if an elevation of Hsp72 could be detected before AKI criteria was fulfilled. Figure 9C and 9D show the mean daily serum creatinine and urine output from patients with or without AKI. Day 0 means the day at which AKI was diagnosed based on AKI criteria. Figure 9E depicts Western blots showing the daily urinary Hsp72 levels from the patients

diagnosed with AKI, compared with the Western blots from patients without AKI (Fig 9F). The basal levels of Hsp72 were minimal in patients without AKI and three days before AKI was diagnosed in AKI patients. In agreement with our experimental studies, one or two days before AKI diagnosis, there was a significant increase in urinary Hsp72 levels, suggesting that, indeed, Hsp72 can be an early marker of AKI in humans.

DISCUSSION

In this study, we found that urinary Hsp72 is a reliable biomarker for the early detection of AKI. This novel biomarker was adequately sensitive for stratifying different degrees of tubular injury and recovery, as well as for monitoring a renoprotective intervention in an experimental rat model of AKI.

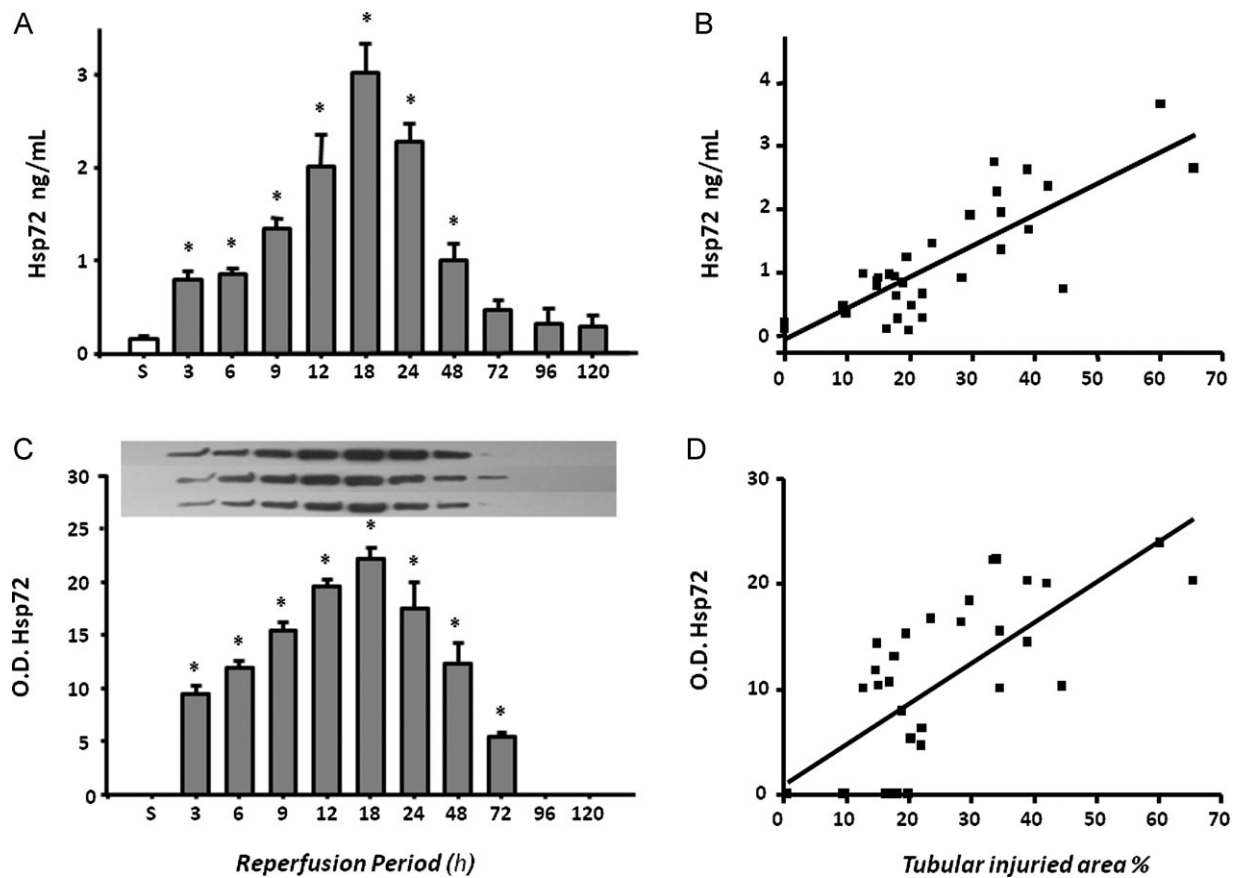


Figure 6. Urinary Hsp72 levels in rats which underwent to 30 min of ischemia with different periods of reperfusion.

- A. Urinary Hsp72 levels assessed by ELISA.
- B. Relationship between urinary Hsp72 and % of tubular damaged area.
- C. Urinary Hsp72 protein levels determined by Western blot.
- D. Relationship between Hsp72 and % of tubular injured area.

n = 3 per period of reperfusion, *p < 0.05 versus sham operated rats.

In addition, these experimental findings were corroborated in humans who suffered from AKI. Thus, a significant increase in urinary Hsp72 was observed in patients diagnosed with AKI even 48 h before SCr elevation occurred, revealing that this Hsp is a promising biomarker for both early detection and stratification of AKI.

Because Hsp72 expression could increase during stress conditions to as much as 15% of total cellular proteins (Fan et al, 2003) and tubular detachment is proportional to the extent of renal injury, we reasoned that urinary Hsp72 levels could be used to stratify renal injury induced by ischemic insult. First, we observed that, after 24 h of reperfusion, kidney Hsp72 expression was proportionally increased in response to the ischemic insult provoked by different periods of ischemia. Thus, Hsp72 increased significantly following slight injury induced by 10 min of ischemia and increased progressively more with mild to severe ischemia, suggesting that the induction of this protein in the kidney is proportional to the degree of the resulting damage. Furthermore, the same pattern was found in the urine of these

animals when Hsp72 was detected both at mRNA and at protein levels. Significant increase in urinary Hsp72 was observed in rats that underwent 10 min of ischemia and greater amounts were found in rats following 60 min of ischemia. In contrast, increase in SCr, NAG and urinary protein excretion reached significance after 30 min of ischemia.

In this study, we performed a blindly morphometric quantification of the tubular affected area and the casts number per field. Thus, when the amount of Hsp72 was interrelated with the tubular injured area affected by different periods of ischemia, a significant correlation was found at mRNA and protein levels. These data show that Hsp72 seems to be a sensitive biomarker to stratify the extent of the renal insult.

To investigate if urinary Hsp72 levels could detect early stages of AKI, different groups of rats were subjected to renal ischemia of 30 min and were studied at different periods of reperfusion. Histopathologic analysis showed that the greatest tubular injury was found after 18 h of reperfusion, and the extent was progressively reduced with longer periods of reperfusion due to

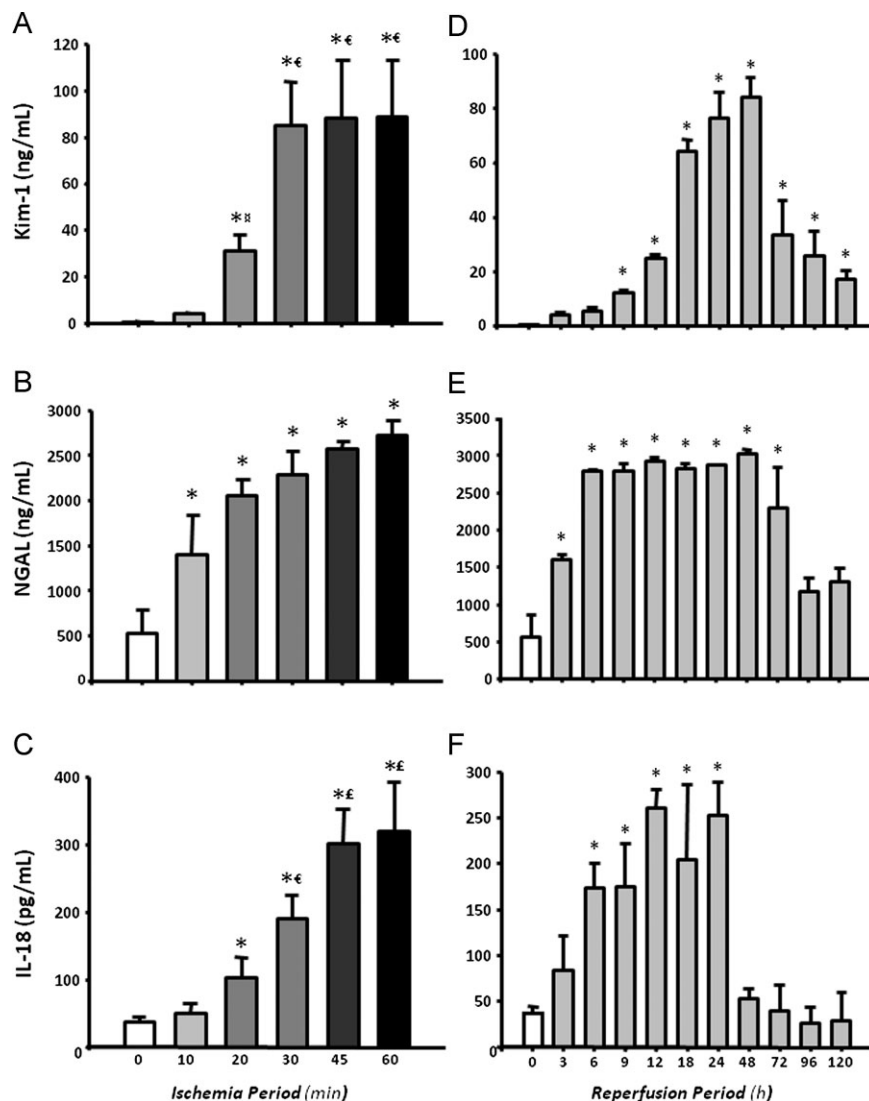


Figure 7. Urinary levels of Kim-1, NGAL and IL-18 in rats which underwent different periods of ischemia and reperfusion (n = 6).

A, B, C. Urinary levels of Kim-1, NGAL, and IL-18 in different degrees of renal injury induced by increasing periods of ischemia (10, 20, 30, 45 and 60 min), respectively.

D, E, F. Urinary concentrations of Kim-1, NGAL and IL-18 after several times of reperfusion (3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96 and 120 h), respectively.

#*p* < 0.05 versus 10 min, €*p* < 0.05 versus 20-min, §*p* < 0.05 versus 30 min and **p* < 0.05 versus 45 min of ischemia group.

the concomitant tubular recovery observed after 72 h. Interestingly, the amount of urinary Hsp72 detected also reflected the extent of tubular epithelium injury during different periods of reperfusion and the regeneration of tubular epithelium. Urinary Hsp72 increased significantly after 3 h and continually rose until 18 h of reperfusion. After this time, a progressive reduction was detected until 120 h of reperfusion, at which point Hsp72 returned to basal levels. The pattern of urinary Hsp72 expression observed with different periods of reperfusion significantly correlated with the tubular injury quantified by morphometry. This finding suggests that this protein was not only able to detect early AKI but that it could also reflect the tubular recovery processes that occur after the epithelium is exposed following ischemic/reperfusion insult.

Recently, a sequence of studies which evaluated seven different biomarkers of glomerular or tubular injury induced by different nephrotoxic drugs in the rat was reported. These biomarkers included urinary total protein, cystatin C, α 2-microglobulin, Kim-1, urinary trefoil factor 3 (TFF3), clusterin

(CLU) and albumin urinary excretion. Renal histopathology was used as the benchmark or gold standard to define renal injury (Dieterle et al, 2010a; Vaidya et al, 2010; Yu et al, 2010). As was discussed by the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium, in these rat toxicology studies, Kim-1, CLU, urinary albumin excretion and TFF3 were helpful to diagnose drug-induced acute kidney tubular injury in the rat and were superior to the traditional markers such as SCr and blood urea nitrogen (BUN), whereas urinary total protein, cystatin C, and α 2-microglobulin were useful to identify acute drug-induced glomerular damage or impairment of kidney tubular reabsorption (Dieterle et al, 2010b). This consortium emphasized, however, that these findings must wait validation in order to be employed for clinical practice. The renal injury induced by I/R, as the most common cause of AKI in ICUs and during cardiovascular surgery, was not addressed in most of these studies (Dieterle et al, 2010; Vaidya et al, 2010; Yu et al, 2010).

Regarding AKI induced by renal ischemia in animals and humans, several urinary biomarkers have been identified over

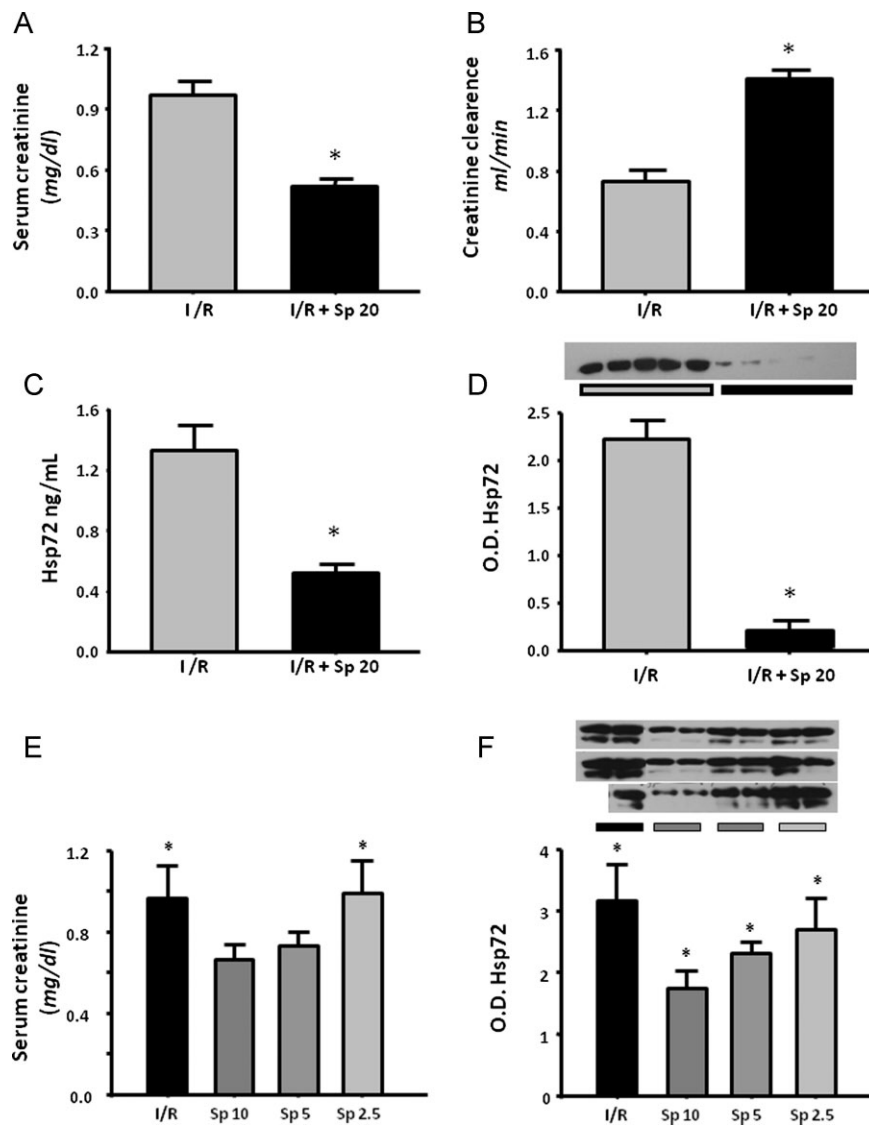


Figure 8. Urinary Hsp72 as a biomarker of renoprotection conferred by spironolactone in I/R rats (n = 5).

A. Serum creatinine in I/R group without treatment (gray bar) and rats pre-treated with spironolactone (black bar),
B. Creatinine clearance,
C. Urinary Hsp72 assessed by ELISA and
D. By WB analysis, the inset shows the individual analysis from five individual urines.
E. Serum creatinine in I/R group and in rats pre-treated with lower doses of spironolactone (10, 5 and 2.5 mg/kg) and
F. WB analysis of Hsp72 in rats pre-treated with lower doses of spironolactone, the superior inset shows the individual Hsp72 level from five different animals. **p* < 0.05 versus I/R group.

the past few years. These biomarkers include the following: NAG (Tsutsumi & Neckers, 2007), neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) (McIlroy et al, 2010; Mishra et al, 2003, 2005), Kim-1 (Han et al, 2009; Vaidya et al, 2006, 2009), cystatin C (Nejat et al, 2010; Uchida & Gotoh, 2002), interleukin-18 (IL-18) (Melnikov et al, 2001; Parikh et al, 2005, 2006), hepatocyte growth factor (HGF) (Taman et al, 1997) and liver fatty acid binding protein (L-FABP) (Ferguson et al, 2010; Negishi et al, 2009; Yamamoto et al, 2007). In humans with AKI induced by an ischemic insult, NGAL, NAG and IL-18 have shown to be early biomarkers (Han et al, 2009; Parikh et al, 2006; Wagener et al, 2006), whereas Kim-1 elevation is seen several hours after AKI has occurred and remains elevated along the time (Han et al, 2009). In addition, it is still unknown if these biomarkers individually possess the features that an ideal biomarker should have, such as the ability to detect AKI early in the disease course, to stratify different degrees of renal injury, to identify tubular recovery, to predict patients at risk of

developing end stage renal disease (ESRD) and those at increased risk of death. In fact, it has been proposed that a panel of biomarkers might be a powerful tool to diagnose AKI before SCr elevation occurs; however, this strategy represents greater effort and cost (Han et al, 2009; Liangos et al, 2007; Vaidya et al, 2008). In this study, we compared the performance of Kim-1, NGAL and IL-18 for stratifying and early detecting AKI compared to Hsp72. As was shown before (Han et al, 2009), although Kim-1 differentiated low and moderate renal injury, it was unable to stratify severe renal injury degrees (Fig 7A). This is supported by the low correlation between tubular affected area and urinary Kim-1 levels ($r^2 = 0.27$). In addition, Kim-1 did not perform well as an early biomarker, since a significant elevation of Kim-1 was observed only after 9 h of reperfusion. With respect to NGAL, this biomarker increased progressively with the extent of renal injury induced by different periods of ischemia, but statistical differences between different periods of ischemia were not found. Although NGAL was an early

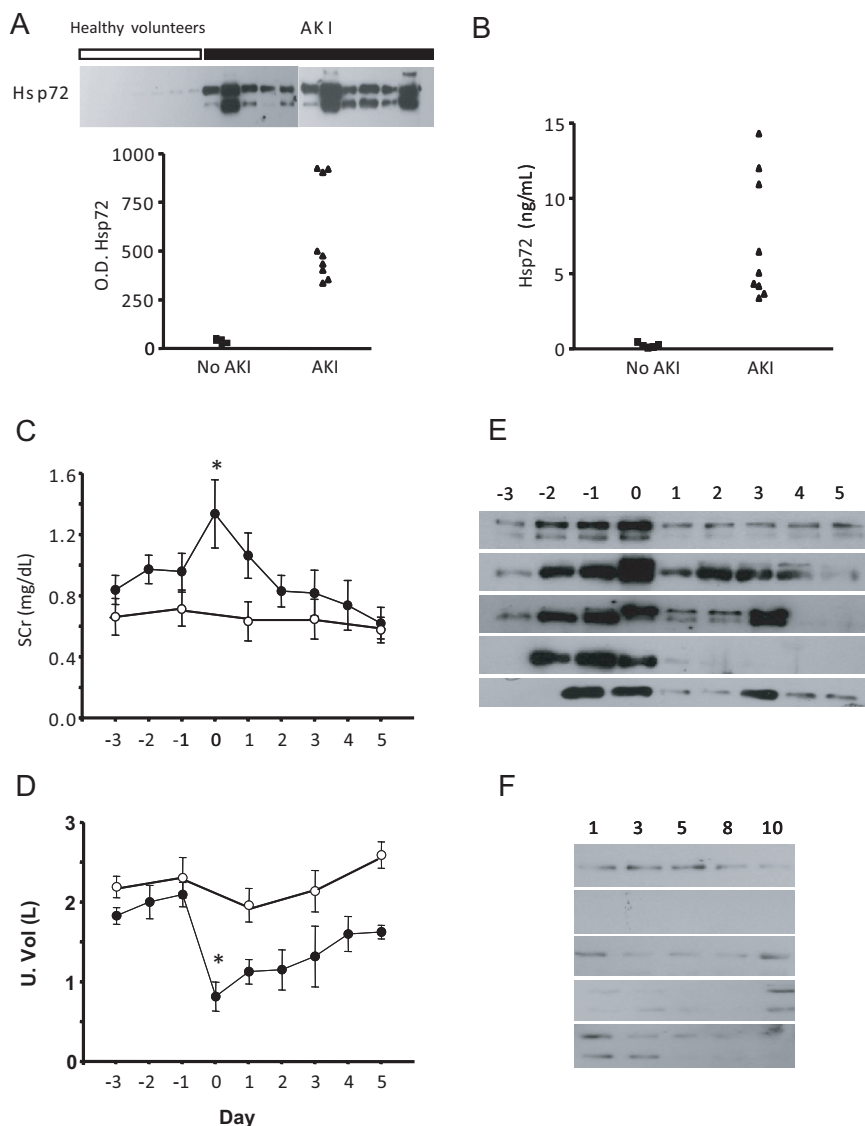


Figure 9. Urinary Hsp72 levels as a biomarker of AKI in humans.

A, B. Hsp72 levels assessed by Western blot and ELISA, respectively, in five healthy kidney donors (■) and nine patients that were diagnosed with AKI (▲).

C. Serum creatinine from five patients with no evidence of AKI (○) or in five patients with AKI diagnosed with AKIN criteria (●).

D. Urine output from five patients with no evidence of AKI (○) or in five patients with AKI diagnosed with AKIN criteria (●).

E. Daily urinary Hsp72 levels from patients with diagnosed AKI.

F. Daily urinary Hsp72 levels in patients without AKI.

The samples were collected during three days before and 5 days after AKI was diagnosed.

**p* < 0.05 versus 3 days before AKI.

biomarker as Hsp72, it reached the maximum peak at 6 h and thus did not reflect the greater renal injury that is observed after 18 h of reperfusion. In the case of IL-18, it showed a similar pattern to Hsp72 for stratifying renal injury induced by different periods of ischemia; however, it was unable to detect slight renal injury induced by 10 min of ischemia. In addition, IL-18 was not useful for early AKI detection.

It has been reported that a sensitive biomarker must sense if a therapeutic strategy could reduce AKI (Yamamoto et al, 2007). In this regard, we have previously shown that mineralocorticoid receptor blockade is an effective intervention to prevent renal injury induced by I/R (Mejia-Vilet et al, 2007; Ramirez et al, 2009). Therefore, in this study, we pre-treated rats with spironolactone 3 days before induction of ischemia. Then, renal function and urinary Hsp72 were detected. In untreated rats, renal function was significantly reduced, and a significant rise in urinary Hsp72 was observed. The renoprotection conferred by spironolactone was associated with the prevention

of this Hsp72 increase, and this effect was consistent with the preservation of tubular architecture, as we previously reported (Mejia-Vilet et al, 2007; Ramirez et al, 2009). In this study, we also evaluated urinary Hsp72 performance for monitoring different degrees of renoprotection. For this purpose, rats subjected to I/R were pre-treated with different doses of spironolactone. The lower dose employed (2.5 mg/kg) was not able to protect the kidneys from ischemic injury, as demonstrated by a similar increase in SCr in rats treated with this dose as compared to those untreated (Fig 8E). In contrast, some degree of protection was observed with administration of 5 or 10 mg/kg. Consistent with urinary Hsp72 being a good biomarker, the lower the renoprotection, the higher the Hsp72 amount in urine. These data suggest that urinary Hsp72 is a helpful tool for monitoring the effectiveness of a pharmacological intervention to prevent ischemic insult.

Acute kidney injury remains a common syndrome in hospitalized patients and has consistently been associated

with increased morbidity and mortality. However, advances in reducing this complication have long been hindered by the lack of early and sensitive biomarkers. In spite of creatinine limitations, current AKIN and RIFLE classifications for diagnosing AKI are based on the elevation of SCr or urine output reduction. In this study, we included patients that developed AKI and were diagnosed by the AKIN classification. Once the diagnosis was made, a urine sample was taken to evaluate urinary Hsp72 levels to compare with healthy living donors. To determine Hsp72 concentration, the urine sample was analyzed by Western blot analysis and ELISA. Hsp72 levels were almost undetectable in healthy subjects; in contrast, patients with clinical AKI exhibited an abrupt increase in this protein. The variability in the AKI patients observed might result from different degrees and extension of the renal injury. In this regard, two of three patients that exhibited high urinary Hsp72 died during their hospitalization, suggesting that this protein could also serve as a biomarker of AKI-associated death. However, more studies are necessary to evaluate this issue.

To evaluate the potential of urinary Hsp72 as an early biomarker in humans, daily urine samples from ten patients with normal renal function at the admission to ICU in severe conditions (mechanical ventilation and other organ failure) were included. In accord with our experimental data, an increase in urinary Hsp72 was found even two days before AKI criteria were fulfilled (SCr elevation or urine output reduction), suggesting that urinary Hsp72 could be a promising early biomarker of AKI in humans. Most of the biomarkers studies include patients that are expected to develop AKI, such as after cardiovascular surgery or organ transplantation (Han et al, 2009; McIlroy et al, 2010; Mishra et al, 2005; Parikh et al, 2006; Yamamoto et al, 2007), however, in the daily clinical setting, we cannot predict which patients will develop AKI. In this study, urinary Hsp72 had the potential to predict AKI 48 h before AKIN criteria were fulfilled. Further clinical studies will be required to validate its use in multiple cohort studies. In this regard, it has been reported that there are five critical phases in a biomarker development that include: (1) experimental studies that identify proteins that are up-regulated in AKI mice and rat models, (2) development of clinical assays to detect the biomarker in samples from patients with clinical AKI that should be obtained non-invasively, (3) evaluation of the biomarker's ability to detect preclinical disease prior to clinical diagnosis, and (4) phase IV and V studies that involve large-scale biomarker validation (Coca & Parikh, 2008).

In summary, in an experimental model of AKI, our results revealed that Hsp72 possesses most of the specific characteristics of an ideal sensitive biomarker. Hsp72 is an early, non-invasive and easily detected biomarker that can be used to stratify renal injury that correlates with tubular injury and recovery. It also seems to be a tool to monitor the effectiveness of a pharmacological intervention. In addition, the preliminary data that we found in humans support the notion that Hsp72 could be an early predictor of AKI in the clinical setting. Taken together, these results suggest that urinary Hsp72 detection is a promising and sensitive biomarker in a clinical translational context.

MATERIALS AND METHODS

All experiments involving animals were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington, DC, 1996) and were approved by the Animal Care and Use Committee of our Institution. One hundred and five male Wistar rats, weighing 270–300 g, were included in this study and divided into two different experimental protocols. In the first protocol, seventy-two rats were randomly divided into six groups: sham-operated (sham) or subjected to bilateral ischemia of 10, 20, 30, 45 or 60 min. All of these groups were studied after 24 h of reperfusion. One half of each group was used only for the determination of urinary Hsp72 mRNA levels, as is described below. In the second protocol, thirty rats were subjected to 30 min of bilateral ischemia and divided in ten different groups, which differed by reperfusion time: 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96 and 120 h. A sham-operated group was also included in this protocol.

Kidney I/R injury animal model

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg), placed on a heating pad to maintain core body temperature at 37°C and monitored with a rectal thermometer. A midline abdominal incision was made, and both kidneys were exposed. Renal pedicles were isolated, and bilateral ischemia was induced by non-traumatic clamps over the pedicles for different times, as we previously described (Mejia-Vilet et al, 2007; Ramirez et al, 2009). Ischemia was verified visually by change in kidney colour. Reperfusion was achieved by release of the clips and confirmed by return of oxygenated blood to the kidney. After reperfusion, the incision was closed in two layers with 3–0 sutures. Sham-operated rats underwent anesthesia, laparotomy and renal pedicle dissection only.

Functional studies

Rats were placed in metabolic cages at 22°C with a 12:12 h light–dark cycle and allowed free access to water. Individual urine samples were collected from all studied rats. For urine ribonucleic acid (RNA) isolation, metabolic cages were previously cleaned with RNase ZAP (Ambion) and 300 µL of RNAlater (Ambion) added to the urine recipient. In both cases, urine samples were aliquoted and quickly frozen at 80°C until biomarker analysis.

After the reperfusion period, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg) and placed on a homoeothermic table. The trachea and femoral arteries were catheterized with polyethylene tubing (PE-240 and PE-50). The rats were maintained under euvolemic conditions by infusing 10 ml of rat plasma per kg of body weight during surgery. MAP was monitored with a pressure transducer (model p23 db, Gould) and recorded on a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA). An ultrasound transit-time flow probe was placed around the left artery and filled with ultrasonic coupling gel (HR Lubricating Jelly, Carter-Wallace, New York, NY) to record renal blood flow. Blood samples were taken at the end of the study. Serum and creatinine concentrations were measured with an autoanalyzer (Technicon RA-1000, Bayer, Tarrytown, NY), and renal creatinine clearance was calculated by the standard formula $C = (U \times V)/P$, where U is the concentration in urine, V is the urine flow rate and P is the serum concentration. Urinary protein excretion was measured by a trichloroacetic acid (TCA) turbidimetric method, and NAG was measured spectrophotometrically.

The paper explained

PROBLEM:

Acute kidney injury is a common and serious complication in critically ill patients, especially in the ICU in both native and transplanted kidneys and may also be associated with long-term chronic kidney disease development. AKI may occur in about 5% of hospitalized patients and up to 40–60% patients in ICU. In addition, over the last decade the incidence of AKI has increased mainly due to population aging and the rising pandemics of obesity, diabetes and hypertension. Despite efforts and advances in new therapeutics, the mortality rate of AKI remains between 40 and 80% and has not been reduced in the last four decades, mainly because current tools used for early AKI detection are not adequately sensitive or specific. Therefore, novel renal early biomarkers indicating tubular injury extent are needed.

RESULTS:

In an experimental model of AKI, we found that Hsp72 possess most of the specific characteristics of an ideal biomarker should

have such as: non-invasive, easily detected, to be able to early detect AKI, to stratify renal injury that correlates with tubular injury and recovery, and to be a tool to monitor the effectiveness of a pharmacological intervention. In addition, urinary Hsp72 levels performance to detect and stratify renal injury induced by different periods of ischemia was better than urinary NGAL, Kim-1 and IL-18. Our preliminary data in humans support the notion that Hsp72 could be an early predictor of AKI in the clinical setting.

IMPACT:

Hsp72 may be a useful tool to early AKI diagnose in patients admitted to ICU or with high risk of developing renal injury such as those patients undergoing cardiac surgery, renal transplant or under nephrotoxic treatment. The opportune AKI diagnosis would permit the clinician to make an adequate pharmacologic intervention to improve patient survival and to avoid end stage renal disease development.

Histopathologic studies

At the end of the experiment, the right kidney was removed and quickly frozen for molecular studies, and the left kidney was perfused through the femoral catheter with phosphate buffered saline (PBS). Following blanching of the kidney, the perfusate was replaced by a freshly prepared 4% formalin buffer, and perfusion was continued until fixation was completed. After appropriate dehydration, kidney slices were embedded in paraffin, sectioned at 4 μ m and stained via a periodic acid-Schiff (PAS) technique. Ten subcortical and juxtamedullary fields were randomly recorded from each kidney slide using a digital camera incorporated in a Nikon Light microscope. In each microphotograph, tubular cast per field were counted, and the results were expressed as the average of fields observed. The affected tubular area was analyzed blindly. Tubular damage was characterized by a loss of brush border, lumen dilatation or collapse and detachment from basement membrane. Digital microphotographs were recorded for each rat to assess, by morphometric analysis, the total tubular area (excluding luminal, interstitial and glomerular areas) and damaged tubular area, delimited by using eclipse net software (magnification 400 \times). The damaged tubular area was expressed as a proportion of the affected tubular area and total tubular area.

Hsp72 mRNA levels

Each renal cortex was isolated and snap frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated with the TRIzol method (Invitrogen) and checked for integrity by 1% agarose gel electrophoresis. To avoid DNA contamination, all total RNA samples were treated with DNase (DNAase I, Invitrogen). For urine RNA isolation, 24 h urine-collection from each rat was centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4°C. The sediment was resuspended in 1 ml of PBS; afterward, it was centrifuged at 13,000 rpm for 3 min and processed by the Trizol method for RNA

isolation. Reverse transcription (RT) was carried out with 1 μ g of total RNA and 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The mRNA levels of Hsp72 were quantified by real-time PCR on an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (TaqMan, ABI, Foster City, CA). Primer and probe for Hsp72 were ordered as a kit: Rn00583013_s1 (Assay-on-Demand, ABI). As an endogenous control, eukaryotic 18S rRNA (predesigned assay reagent Applied by ABI, external run) was used. Relative quantification of Hsp72 gene expression was performed with the comparative threshold cycle (Ct) method (Livak & Schmittgen, 2001).

Kidney and urinary Hsp72 protein levels

Hsp72 detected by Western blot

Total renal proteins were isolated from six cortices from each group and homogenized separately in lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40 and complete protease inhibitor (Roche)). Protein samples containing 20 μ g of total protein were resolved by 8.5% sodium polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) electrophoresis and electroblotted onto polyvinylidenediufioride membranes (Amersham). For urinary Hsp72 detection by western blot, urine was diluted 1:100 in 0.9% saline solution, and 10 μ L of each dilution was loaded and resolved by 8.5% SDS-PAGE electrophoresis and electroblotted, as previously described. Membranes were then blocked with 5% blotting-grade non-fat dry milk. Membranes were then incubated in 0.1% blotting-grade non-fat dry milk with their respective antibodies. For detection of Hsp72 in the renal cortex, the lower parts of the membranes were incubated with goat anti-actin antibody (1:5000 dilution) overnight at 4°C. (Santa Cruz Biotechnology, Santa Barbara CA). Upper membranes were

incubated with monoclonal anti-Hsp72 antibody. Afterward, membranes for Hsp72 were incubated with a secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Actin detection was performed using donkey anti-goat IgG-HRP (1:5000, Santa Cruz Biotechnology). Proteins were detected with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham) and autoradiography, following the manufacturer's recommendations. The bands were scanned for densitometric analysis.

Hsp72 detected by ELISA

Urine Hsp72 was analyzed using a commercially available high-sensitivity ELISA (Assay Designs EKS-715, MI, USA). Briefly, samples and standards were added to wells coated with a mouse monoclonal antibody. Hsp72 was captured by the antibody and then detected by adding a rabbit polyclonal detection antibody. Both antibodies are specific for inducible Hsp72 and do not react with other members of the HSP70 family. A horseradish peroxidase conjugate bound to the detection antibody and colour development was accomplished by the addition of tetramethylbenzidine substrate and stopped with an acid stop solution. The optical density of samples was read at 450 nm by a plate reader and was overlapped with the standard curve generated from known concentrations of recombinant Hsp72 that ranged from 0.1 to 12.5 ng/ml.

Urinary Hsp72 levels as a monitor of a renoprotective intervention in AKI

Because we previously found that aldosterone antagonism with spironolactone at 20 mg/kg prevented renal injury induced by I/R, urinary Hsp72 levels as a monitor of a renoprotective intervention in AKI was assessed. Twenty-five Wistar rats, weighing 270–300 g, were divided in five groups: rats subjected to 30 min of ischemia and 24 h of reperfusion and rats that received spironolactone at different doses (20, 10, 5 or 2.5 mg/kg, by gastric gavage) 3 days before I/R was induced. After ischemia, urine was collected in metabolic cages, and blood samples were taken.

NGAL, Kim-1 and IL-18 detected by ELISA

Urine NGAL, Kim-1 and IL-18 levels were analyzed using commercially available ELISA kits: rat NGAL ELISA kit (Innovative Research IRNGALKT), rat Kim-1 ELISA kit (CosmoBIO Co CSB-E08808r) and rat IL-18 ELISA Kit (Invitrogen KRC2341). All procedures were performed according to manufacturer's instructions.

Evaluation of urinary Hsp72 in healthy kidney donors and patients with AKI

Urine samples from five healthy living-kidney donors (controls) and nine patients with septic AKI from the ICU were tested. AKI was defined as a 30% or greater increase in SCr from baseline according to the AKIN criteria (Mehta et al, 2007). In healthy donors, urine samples were collected from the first morning voids one day previous to nephrectomy (previously signed consent). All patients with sepsis in the ICU were followed every day, and, when the AKI criteria were fulfilled, a fresh urine sample was taken after draining the urine collection bag. Moreover, daily fresh urine samples were collected from patients in the ICU that exhibited respiratory failure with mechanical ventilation and together with other organ failure. These

patients had normal renal function at the admission. From these patients, we analyzed, five patients that developed AKI and five that did not. In the urine samples Hsp72 levels were assessed in order to test if this biomarker could predict AKI criteria was fulfilled (SCr elevation or urine output reduction). All urine samples were frozen and stored at 80°C until Hsp72 levels were evaluated. The human subjects included in these study form part of two ongoing clinical studies, which are in accordance with national and international guidelines and regulations and were approved by our institutional ethical review board. All subjects or designed surrogate (when ICU patients could not sign) signed the informed consent form.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm SE. Significance of the differences between groups was tested by ANOVA using Bonferroni's correction for multiple comparisons. All comparisons passed the normality test. Statistical significance was defined as p -value <0.05 .

Author Contributions

JBC, LEM and NAB: Conceived and designed the experiments. JBC, RPV, CCG and MOC: performed the experiments. JBC, GG, LEMB and NAB: analyzed the data. GG and NAB: contributed reagents or analysis tools. JBC, GG and NAB: wrote the paper.

Acknowledgements

We are grateful to the members of the Molecular Physiology Unit for their suggestions and to Dr. Octavio Villanueva for his help with animal care, as well as to Martha Carrasco for her technical assistance. The results presented in this paper have not been published previously neither in whole nor in abstract. This project was supported by grants from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) 101030 and 112780 to NAB, by a grant from the National University of Mexico IN200909-3 to NAB and by a grant from Fundación Miguel Alemán AC to NAB. JBC is a PhD student supported by fellowship grant from CONACyT.

Supporting information is available at EMBO Molecular Medicine online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

For more information

Heat Shock 70-kd protein:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/140550>

National Kidney Foundation

<http://www.kidney.org/>

References

Bagshaw SM (2010) Acute kidney injury: diagnosis and classification of AKI: AKIN or RIFLE? *Nat Rev Nephrol* 6: 71-73

- Coca SG, Parikh CR (2008) Urinary biomarkers for acute kidney injury: perspectives on translation. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 481-490
- Csermely P, Soti C, Blatch GL (2007) Chaperones as parts of cellular networks. *Adv Exp Med Biol* 594: 55-63
- Devarajan P (2006) Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 17: 1503-1520
- Dieterle F, Perentes E, Cordier A, Roth DR, Verdes P, Grenet O, Pantano S, Moulin P, Wahl D, Mahl, et al (2010) Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat Biotechnol* 28: 463-469
- Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, Papaluca M, Ozer JS, Webb CP, Baer W, Senagore A, Schipper MJ, Vonderscher J, et al (2010) Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol* 28: 455-462
- Fan CY, Lee S, Cyr DM (2003) Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40 cell stress. *Chaperones* 8: 309-316
- Ferguson MA, Vaidya VS, Waikar SS, Collings FB, Sunderland KE, Gioules CJ, Bonventre JV (2010) Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury. *Kidney Int* 77: 708-714
- Friedewald JJ, Rabb H (2004) Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 66: 486-491
- Han WK, Wagener G, Zhu Y, Wang S, Lee HT (2009) Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 873-882
- Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Estevez H, Silva-Serna P, Moreno I, Rondan-Zarate A, Elinos M, Correa-Rotter R, Larriva-Sahd J (1995) Histological and subcellular distribution of 65 and 70 kD heat shock proteins in experimental nephrotoxic injury. *Exp Toxicol Pathol* 47: 501-508
- Kelly KJ (2002) Stress response proteins and renal ischemia. *Minerva Urol Nefrol* 54: 81-91
- Kelly KJ (2006) Acute renal failure: much more than a kidney disease. *Semin Nephrol* 26: 105-113
- Kelly KJ, Baird NR, Greene AL (2001) Induction of stress response proteins and experimental renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 59: 1798-1802
- Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJ, et al (2007) Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 18: 904-912
- Liano F, Pascual J (1996) Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int* 50: 811-818
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677
- Liu KD, Brakeman PR (2008) Renal repair and recovery. *Crit Care Med* 36: S187-S192
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$. *Method Methods* 25: 402-408
- Lopes JA, Fernandes P, Jorge S, Goncalves S, Alvarez A, Costa e S, Franca C, Prata MM (2008) Acute kidney injury in intensive care unit patients: a comparison between the RIFLE and the acute kidney injury network classifications. *Crit Care* 12: R110
- McIlroy DR, Wagener G, Lee HT (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 211-219
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A (2007) Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 11: R31
- Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA (2007) Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F78-F86
- Melnikov VY, Ecker T, Fantuzzi G, Siegmund B, Lucia MS, Dinarello CA, Schrier RW, Edelstein CL (2001) Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 107: 1145-1152
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14: 2534-2543
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, et al (2005) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 365: 1231-1238
- Molinas SM, Rosso M, Wayllace NZ, Pagotto MA, Pisani GB, Monasterolo LA, Trumper L (2010) Heat shock protein 70 induction and its urinary excretion in a model of acetaminophen nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol* 25: 1245-1253
- Mueller T, Bidmon B, Pichler P, Arbeiter K, Ruffingshofer D, VanWhy SK, Aufricht C (2003) Urinary heat shock protein-72 excretion in clinical and experimental renal ischemia. *Pediatr Nephrol* 18: 97-99
- Negishi K, Noiri E, Doi K, Maeda-Mamiya R, Sugaya T, Portilla D, Fujita T (2009) Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury. *Am J Pathol* 174: 1154-1159
- Nejat M, Pickering JW, Walker RJ, Endre ZH (2010) Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 25: 3283-3289
- Parikh CR, Abraham E, Ancukiewicz M, Edelstein CL (2005) Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J Am Soc Nephrol* 16: 3046-3052
- Parikh CR, Mishra J, Thiessen-Philbrook H, Dursun B, Ma Q, Kelly C, Dent C, Devarajan P, Edelstein CL (2006) Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 70: 199-203
- Price PM, Safirstein RL, Megyesi J (2009) The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int* 76: 604-613
- Ramirez V, Trujillo J, Valdes R, Uribe N, Cruz C, Gamba G, Bobadilla NA (2009) Adrenalectomy prevents renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F932-F942
- Ritossa FA (1962) New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573
- Taman M, Liu Y, Tolbert E, Dworkin LD (1997) Increase urinary hepatocyte growth factor excretion in human acute renal failure. *Clin Nephrol* 48: 241-245
- Tsutsumi S, Neckers L (2007) Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* 98: 1536-1539
- Turman MA, Rosenfeld SL (1999) Heat shock protein 70 overexpression protects LLC-PK1 tubular cells from heat shock but not hypoxia. *Kidney Int* 55: 189-197
- Uchida K, Gotoh A (2002) Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta* 323: 121-128
- Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV (2006) Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F517-F529
- Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, Collings FB, Sunderland K, Gioules C, Bradwin G, Matsouaka R, Betensky RA, Curhan GC, et al (2008) Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci* 1: 200-208
- Vaidya VS, Ford GM, Waikar SS, Wang Y, Clement MB, Ramirez V, Glaab WE, Troth SP, Sistare FD, Prozialeck WC, et al (2009) A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int* 76: 108-114
- Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S, Muniappa N, Thudium D, Gerhold D, Holder DJ, Bobadilla NA, Marrer E, et al (2010) Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in

- preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* 28: 478-485
- Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, Lee HT (2006) Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology* 105: 485-491
- Waikar SS, Curhan GC, Wald R, McCarthy EP, Chertow GM (2006) Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002. *J Am Soc Nephrol* 17: 1143-1150
- Wu I, Parikh CR (2008) Screening for kidney diseases: older measures *versus* novel biomarkers. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1895-1901
- Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, Doi K, Negishi K, Kamijo A, Kimura K, Fujita T, Kinukawa T, Taniguchi H, *et al* (2007) Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 18: 2894-2902
- Yu Y, Jin H, Holder D, Ozer JS, Villarreal S, Shughrue P, Shi S, Figueroa DJ, Clouse H, Su M, *et al* (2010) Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat Biotechnol* 28: 470-477
- Zhipeng W, Li L, Qibing M, Linna L, Yuhua R, Rong Z (2006) Increased expression of heat shock protein (HSP)72 in a human proximal tubular cell line (HK-2) with gentamicin-induced injury. *J Toxicol Sci* 31: 61-70