



## El factor de transcripción WT-1 y su relación con el desarrollo de la injuria renal inducida durante la nefropatía obstructiva

 15 min.



La nefropatía obstructiva congénita es la causa primaria de la enfermedad renal terminal en niños. En el siguiente trabajo la Lic. Mazzei y el Dr. Manucha nos describen la relación entre el factor de transcripción WT-1 y el desarrollo de la injuria renal inducida durante la nefropatía obstructiva. Conocer los mecanismos genéticos y moleculares permitirá saber con mayor profundidad la relación entre las diferentes proteínas y las posibles consecuencias fisiopatogénicas. Esto permitirá realizar un diagnóstico e inicio del tratamiento rápido, lo que ayudará a preservar las funciones vitales del riñón.



Luciana Jorgelina MAZZEI<sup>1,3</sup>,  
Walter MANUCHA<sup>2,3</sup>

1-Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo

2-Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo

3-Instituto de Biología y Medicina Experimental de Cuyo IMBECU-CONICET



### Resumen

El estudio del desarrollo renal sirve como un paradigma para comprender los mecanismos que son la base de la formación de un órgano. Múltiples genes desempeñan funciones trascendentes en el desarrollo renal temprano, entre los que se destaca WT-1. Se ha comprobado experimentalmente que la proteína WT1 en unos casos reprime y en otros activa la transcripción de numerosos genes, pero sus

dianas fisiológicas son poco conocidas. Recientes investigaciones genéticas han permitido caracterizar muchas de las complejas interacciones entre los componentes individuales, sin embargo la concreción de nuevos experimentos bioquímicos, moleculares y funcionales como los propuestos en nuestro y otros laboratorios de investigación, nos permitirán establecer con mayor profundidad el grado de compromiso entre las proteínas participantes y las posibles consecuencias fisiopatogénicas de su desacople.

La enfermedad renal crónica tiene una elevada incidencia en todo el mundo y entre los desórdenes renales más complejos, se destaca la nefropatía obstructiva. Por nefropatía y uropatía obstructiva se describen entidades patológicas que causan hidronefrosis por obstrucción del tracto urinario. Esta enfermedad es frecuente en niños debido a fallas congénitas del tracto urinario sobre todo a nivel de la unión ureteropélvica e involucra respuestas hemodinámicas así como hidrodinámicas, las que conducirían a cambios celulares en todos los compartimientos renales, fibrosis intersticial, apoptosis y atrofia tubular (1).

El riñón como órgano regulador del medio interno es una estructura extremadamente compleja que se ocupa de funciones endocrinas importantes que incluyen la producción de renina, prostaglandinas y eritropoyetina, eliminación de desechos metabólicos, control y regulación del estado ácido-base, el volumen y la composición química del líquido extracelular. La denominada unidad funcional o nefrona, está constituida por

aproximadamente unas 10.000 células, y éstas, junto con los túbulos colectores, forman los túbulos uriníferos. Se han caracterizado al menos 14 subtipos celulares diferentes, perfectamente organizados y ubicados en los distintos segmentos de los túbulos. Esto implica que la morfogénesis renal debe estar perfectamente regulada durante el desarrollo, de tal forma que cada tipo celular en particular se sitúe en su correspondiente localización final, en relación a los demás tipos celulares a lo largo de los túbulos.

El desarrollo renal requiere la conversión de células del mesénquima mesodérmico en células epiteliales polarizadas (2), este es uno de los procesos que tienen lugar durante la organogénesis del riñón, gónadas y mesotelio. El número de células maduras en un tejido depende del balance entre la mitosis y la apoptosis (muerte celular programada). En el riñón, las células que permanecen alrededor del mesénquima inducido muestran características morfológicas y bioquímicas de muerte celular programada. En embriones E14-E19 aún se encuentran islotes de células apoptóticas entre las nefronas en desarrollo, indicando así la importancia de este fenómeno en el desarrollo renal (3,4).

Recientemente, ha sido identificado un gen que parece ser el principal determinante del inicio en la secuencia de transformación mesenquimal a epitelial. Se trata de un gen que se identificó ausente o mutado en el cáncer de células embrionarias renales (tumor de Wilms o WT-1). Este gen se encuentra en el cromosoma 11 (11p13) y codifica una

proteína cuyo extremo amino-terminal es rico en prolina y glutamina, además de cuatro dedos de zinc (cis)2-(his)2 en el extremo carboxilo-terminal (5-7). Existe evidencia de que WT-1 puede estar directamente implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. Estudios de hibridación "in situ" han demostrado que es selectivamente expresado en el blastema metanéfrico y epitelio glomerular durante el desarrollo embrionario y fetal (8). Los patrones de expresión de WT-1 encontrados (9) señalan un importante papel de este gen no sólo durante el desarrollo urogenital, sino durante la vida fetal y postnatal. Además, usando técnicas de microscopia láser se sub-localizó WT-1 en el núcleo, independientemente del tipo celular y el estadio de desarrollo. Además, se ha concluido que el crecimiento inicial del brote uretérico es dependiente de una señal del blastema metanéfrico y que WT-1 sería indispensable (10-12). Para determinar el efecto de una mutación en el WT-1, se determinó si la deficiencia en éste afecta la expresión del Pax-2 (un posible factor regulador presente durante el desarrollo

renal, miembro de la familia Pax) (13) que se encuentra en el tubo de Wolff y el brote uretérico, así como en el mesénquima matanéfrico, cuando comienza a condensarse alrededor de este último (14, 15). Se obtuvieron secciones de embriones E11 mutados y «wild type» para el WT-1 y se incubaron con un anticuerpo policlonal para el Pax-2; se obtuvo una señal en el tubo de Wolff tanto en el mutante como en el «wild type»; sin embargo, no se detectó expresión en el blastema metanéfrico del mutante, lo cual indica la necesidad de WT-1 para la expresión de Pax-2.

Por otro lado, estudios de la última década confirman que la nefropatía obstructiva crónica induce entre las principales alteraciones: respuesta inflamatoria (citoquinas), modulación de sustancias vasoactivas (angiotensina II, óxido nítrico, etc.) y aumento de los procesos apoptóticos y/o necróticos, lo que favorece la aparición temprana de signos de atrofia tubular así como fibrosis tubulointerstitial (16). La transición de células epiteliales a miofibroblastos ha sido discutida como posible mecanismo

involucrado con la fibrosis renal (17). Por lo tanto inflamación, estrés oxidativo y apoptosis son los principales mecanismos involucrados en la nefropatía obstructiva y permanecen en el centro de atención de muchos investigadores. Al respecto, se demostró en nuestro laboratorio que la corteza renal de rata neonata sometida a obstrucción ureteral unilateral (OUU) manifestaba una sensible disminución de la expresión del intercambiador sodio/hidrógeno isoforma 1 (NHE1) y que esto sería un evento de señalización que participaría en la inducción de la apoptosis epitelial tubular a través de la regulación de la familia de genes Bcl2 y la activación de caspasa 3 (18). Se conoce que la disminución del pH intracelular es un factor que favorece la activación de las principales enzimas ejecutoras de la muerte celular programada (caspasas) y nuestros hallazgos contribuirían a intentar explicar esa acidificación mediante la reducción de la expresión del intercambiador de H+.

El desarrollo y la función renal durante la nefropatía obstructiva neonatal se ven alterados por la

# Diestro

MEDICAL DEVICE TECHNOLOGY

## La más amplia gama de Analizadores de Electrolitos

Desde equipos semiautomáticos para pocas muestras diarias, hasta automáticos de alta gama y prestación para una gran carga de trabajo

Diseñados y producidos en Argentina

Comercializados en todo el mundo

- Expandibles hasta 5 electrolitos simultáneos en cualquier combinación

Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup> Ca<sup>++</sup> Li<sup>+</sup>

- Lector de código de barras y teclado externo (opcionales)
- Conexión al LIS
- Software de control de calidad incorporado
- El menor costo operativo del mercado

Diestro® 103/103+/103A/103A+

DIESTRO 103 AP

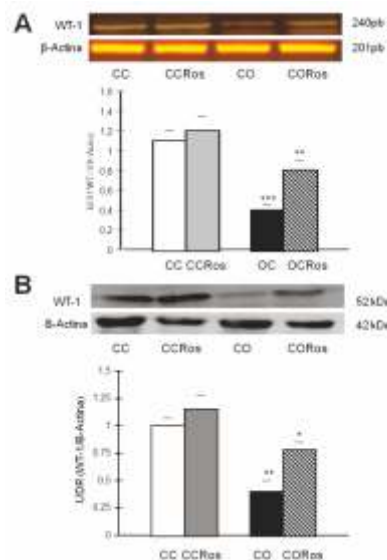


mecánica de células tubulares (19) así como por modificaciones en la expresión temporal/espacial de genes que controlan la nefrogénesis. En tal sentido, estudios recientes dan cuenta que WT-1 y Pax-2 (principales reguladores génicos de transformación mesenquimatosa a epitelial), se encuentran disminuidos durante la nefropatía obstructiva; lo que favorece la apoptosis por disminución de genes dependientes relacionados a inhibición de la misma (Bcl-2, HGF, IGF, BMP7), e incremento en la expresión de genes proapoptóticos tales como Bax y TGF $\beta$  (20). En acuerdo, nuestro laboratorio mostró disminución del mensajero de WT-1 en cortezas de ratas neonatas sometidas a obstrucción ureteral unilateral completa (21). Además, resultados recientemente publicados también por nuestro grupo, sugieren que el tratamiento farmacológico con Rosuvastatina podría preservar marcadores nefrogénicos como WT-1, Snail, BMP-7 y caderina E durante la injuria neonatal obstructiva (22). Figura 1



### Figura 1

A-Expresión del mensajero WT-1 por RT-PCR y  $\beta$ -Actina de cada muestra. Semicuantificación en Unidades Densitométricas Relativas.  
B-Expresión de la proteína WT-1 por western blot y  $\beta$ -Actina de cada muestra. Semicuantificación en Unidades Densitométricas Relativas.  
CC= Corteza Control, CCRos= Corteza Control tratada con Rosuvastatina, CO= Corteza Obstruida y CORos= Corteza Obstruida tratada con Rosuvastatina.  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$



relacionados al desarrollo vascular renal como renina y receptores AT2 de angiotensina II, lo cual juega un rol central en el inicio de la fibrogénesis renal. En tal sentido, nuestro laboratorio demostró que el bloqueo selectivo de receptores AT1 de angiotensina II, disminuye la fibrosis intersticial renal durante la nefropatía obstructiva; dicho efecto estaría asociado a la actividad y expresión de las enzimas óxido nítrico sintasas y ciclooxigenasa (23). Por otro lado, de interés para nuestros hallazgos, Johannesen y colaboradores demostraron interacción funcional entre el gen promotor de la principal fuente productora de óxido nítrico (iNOS) y WT-1 (24). Por su parte, Marcet-Palacios y colegas sugirieron un rol modulador del óxido nítrico en la proliferación de linfocitos T y que WT-1 podría ser un componente importante de la regulación de proliferación y función de los mismos (25). WT-1 funciona como regulador transcripcional y su actividad depende de fosforilación controlada por la proteína quinasa A, dicha fosforilación transloca WT-1 del núcleo al citosol lo que interfiere con su actividad transcripcional. También, un novedoso estudio en isquemia reperfusión renal sugiere que el uso de sildenafil (un donante de óxido nítrico) tiene efectos antiapoptóticos mediados por fosforilación de ERK e inducción de iNOS/eNOS así como disminución del índice Bax/Bcl-2 (26). La fosforilación de WT-1 y su relación con mediadores génicos relacionados, podría ser uno de los mecanismos regulados por el óxido nítrico en la inducción a la muerte celular. El gen WT-1 presenta extrema complejidad de regulación que involucra a una familia de aproximadamente 24 isoformas proteicas expresadas desde el mismo gen. Diferentes isoformas WT-1 poseen funciones disímiles definidas por los diversos sitios de empalme. De mismo modo, diversos tratamientos pueden afectar la expresión diferencial de isoformas de WT-1 (27).

Muy recientemente, el óxido nítrico ha emergido como inhibidor endógeno de la apoptosis durante la nefropatía obstructiva neonatal (28), destacándose la interacción con Hsp70 y sus efectos antioxidantes así como antiapoptóticos (29). Por otro lado, Hsp70 sería un cofactor importante para la función de WT-1, lo que sugiere un rol determinante durante la diferenciación renal (30). En concordancia, nuestro grupo demostró en ratas neonatas

sometidas a obstrucción ureteral unilateral durante 14 días, una marcada apoptosis cortical renal con significativa pérdida de peso renal y disminución de la expresión de Hsp70 asociado a menor disponibilidad de óxido nítrico (28, 29). Los resultados de nuestro laboratorio así como preliminares observaciones, fortalecerían la hipótesis de nuestro trabajo dado que hemos observado en ratas neonatas sometidas a la injuria renal, una sensible disminución en la expresión del mensajero de WT-1 que podría relacionarse con marcadores de fibrosis y apoptosis (21, 31 y 32). Por otro lado, el uso de rosuvastatina a razón de 10mg/Kg/día, condicionó una importante recuperación de los niveles del óxido nítrico en concordancia con menor grado de apoptosis renal (33). Además, establecimos en el mismo modelo que la disponibilidad del óxido nítrico podría estar asociado a una mayor interacción eNOS/Hsp70 con menor expresión de caveolina 1 contribuyendo a proteger al tubulointersticio de la fibrosis (34) Figura 2. También, resultados preliminares de expresión por western blot para WT-1 realizados en corteza renal de rata neonata sometida a daño obstructivo, y tratadas con donantes de óxido nítrico, nos sugieren una posible recuperación en los niveles de la proteína asociados a disminución de la fosforilación de ERK y p38. Esto resulta muy interesante si se considera que ERK y p38 son factores vitales para el desarrollo renal. ERK parece jugar un papel en la organogénesis mientras que p38 estaría asociado a crecimiento y desarrollo renal (35). Figura 3



### Figura 2

A- Coimmunoprecipitación de las proteínas Caveolina 1, Hsp70 y eNOS. Revelado por western blot.  
B- Semicuantificación de las relaciones Caveolina 1/eNOS y Hsp70/eNOS.

