



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN
BIOTENOLÓGICA**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
HETERECEPTOR EPO-R/ β CR (CD131) EN
CÉLULAS DE RIÑÓN DE HUMANO EN
HIPOXIA**

Biól. Exp. Daniela Elizabeth Gómez Ramírez

**Director de Tesis
Dr. Hugo Esquivel Solís**

**Co-Director(a)
Dra. Ana Laura Márquez Aguirre**

**Asesor Externo
UNAM
Dr. Benjamín H. León Mancilla**

Guadalajara, Jal. Ago., 2020

A mi familia, por supuesto

AGRADECIMIENTOS

Tengo mucho que agradecer, en primer lugar, al Dr. Hugo Esquivel Solís, mi tutor, por aceptarme y no renunciar a mí. Agradezco su esfuerzo de siempre haber procurado de adecuadas herramientas que propiciaron un óptimo quehacer científico y que me han ayudado a enriquecer y desarrollar un pensamiento crítico. Le agradezco por compartir su tiempo e inestimable conocimiento no solo académico, además de gestionar este proyecto de investigación y por su apoyo para poder culminarlo. De todos los invaluable beneficios obtenidos me resulta un honor haber sido su alumna.

También, quiero expresar mi más sincera gratitud a los miembros de mi comité tutorial: a la Dra. Ana Laura Márquez por su apropiada co-tutoría, por brindarme un provechoso asesoramiento científico y por su interés en mi desarrollo profesional y al Dr. Benjamín León Mancillas por su siempre atenta disponibilidad y comentarios certeros.

Reitero mi agradecimiento y aprecio por la afortunada experiencia académica y de vida motivada por el Dr. Hugo y mis compañeros del laboratorio de “Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa” en particular al doctorantes Jorge Mazorra y Luis García por su colaboración técnica.

Agradezco al pueblo mexicano porque gracias a sus contribuciones y por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología pude beneficiarme de la beca de maestría y del apoyo recibido para la realización de mi estancia.

Al igual, agradezco al CIATEJ por figurar en mi trayectoria profesional, a mis profesores, compañeros y al staff de la coordinación de la maestría especialmente para la Mtra. Fátima Ordoñez por su eficiente trabajo.

A las Dras. Nuria Montserrat y Carmen Hurtado por haberme permitido tener una fructífera estancia de investigación en el laboratorio de “Pluripotencia para la regeneración de órganos” en el IBEC.

Agradezco haber conocido a personas entrañables y finalmente, agradezco a mi familia por su amor infinito.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
Antecedentes	1
Enfermedad Renal Crónica	1
Enfermedad Renal Crónica en México	2
Hipoxia en la ERC	3
Eritropoyetina	5
La Eritropoyetina como agente terapéutico	10
Receptor de Eritropoyetina no canónico	11
Vías de señalización del receptor EPO-R/CD131	12
Planteamiento del problema	18
Justificación	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
Metodología	22
Diseño experimental	22
Materiales	24
Línea celular HEK 293	24
Cultivo y propagación de células HEK 293.....	24
Métodos	26
Ensayo de viabilidad celular por MTT	¡Error! Marcador no definido.
Ensayo de fragmentación de ADN (apoptosis) por electroforesis	27
Inmunodetección de EPO-R, CD131, PI3, Akt, GSK3 β y HIF-1 α por Western Blot	28
Inmunoprecipitación del receptor EPO-R/CD131	29
Detección in situ del receptor EPO-R/CD131 por inmunofluorescencia.....	¡Error! Marcador no definido.
Detección de apoptosis por marcado de corte en extremo terminal con dUTP deoxinucleotidil transferasa (TUNEL)	30

ÍNDICE DE CONTENIDO

Detección de apoptosis por condensación y fragmentación nuclear: tinción de Hoechst.....	31
Cuantificación de la expresión de los genes <i>EPO-R</i> y <i>GATA 1</i> por q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)	32
Resultados	34
Viabilidad celular: evaluación de respuesta de células HEK 293 al daño por hipoxia.....	34
Electroforesis de fragmentos del ADN por apoptosis.....	35
Expresión de HIF-1 α	37
Conformación del heteroreceptor EPO-R/CD131 en hipoxia.....	38
Cinasas efectoras en la activación de EPO-R/CD131.....	41
Discusión.....	47
La hipoxia reduce la viabilidad celular de las células embrionarias tubulares de riñón de humano.....	47
La hipoxia causa fragmentación del ADN en las células tubulares embrionarias de riñón humano	47
Análisis de la expresión de HIF-1 α como validación del modelo de hipoxia en las células	48
EPO-R y CD131 se expresan en las células tubulares embrionarias de riñón por la hipoxia	49
El receptor EPO-R/CD131 es funcional a través de la vía PI3/Akt/GSK-3 β	52
Efecto antiapoptótico de la activación del receptor EPO-R/CD131	55
¿HIF-1 α regula la transcripción de EPO-R en hipoxia?	56
Conclusión	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Bibliografía	60
Anexos	69
Especificación de reactivos utilizados	69

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1 Estructura del dominio extracelular del homodímero de EPO-R. 1ERN.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2 Vía de señalización activada por la unión de EPO su receptor homodimérico en eritroblastos, precursor del eritrocito.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3 Estructura homodimérica del dominio extracelular de CD131.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4 Representación del receptor no canónico de EPO-R.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5 Vías de señalización descritas en la activación del heteroreceptor EPO-R/CD131 en distintos tipos celulares</i>	<i>17</i>
<i>Figura 6 Fotografía de la cámara de hipoxia para cultivo celular de Stem cell.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 7. Diseño experimental de la células HEK 293 en diferentes tratamientos.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 8 Viabilidad celular de células tubulares renales en distintos tratamientos.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9 Electroforesis de ADN en gel de agarosa.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 10. Expresión de HIF-1α en las células tubulares embrionarias de riñón en la hipoxia..</i>	<i>37</i>
<i>Figura 11 Blot de la expresión de EPO-R y CD131 en células tubulares renales con diferentes tratamientos.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 12 Co-inmunoprecipitación e inmunodetección de EPO-R y CD131 en células tubulares renales normóxicas e hipóxicas.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13 Inmunofluorescencia de EPO-R y CD131 en células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.</i>	
<i>Figura 14 Western blot de fosfo-Akt en células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 15 Western blot de fosfo Y216-GSK-3β y fosfo S9-GSK-3β en células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 16. Inhibición de apoptosis por la activación del receptor EPO-R/CD131 en células tubulares embrionarias de riñón de humano en hipoxia.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 17. Vía de señalización propuesta para la activación del receptor EPO-R/CD131 en células tubulares embrionarias de riñón humano.....</i>	<i>58</i>

ÍNDICE DE CUADROS, IMÁGENES Y TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS Y REFERENCIAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	22
TABLA 2. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS.....	28

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN
Ácido desoxirribonucleico

Akt
Proteína cinasa B

BAD
Agonista de Bcl-2 asociada a la muerte celular

Bcl-2
Célula B de Leucemia/Linfoma 2

Bcl-XL
Bcl-2 extra largo

BIM
Proteína 11 de la familia Bcl-2

CEPO
Eritropoyetina carbamylada

CO₂
Dióxido de carbono

CoCl₂
Cloruro de Cobalto

D.O
Densidad óptica

DAPI
4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM
Medio de cultivo celular "Dulbecco's Modified Eagle's"

EPO
Eritropoyetina

EPOR
Receptor de Eritropoyetina

ERK
Cinasa reguladora de la señal extracelular

ERC
Enfermedad renal crónica

GATA-1
Factor de transcripción que se une a la secuencia de nucleótidos "GATA" del ADN

GFPA
Proteína acida fibrilar glial

GSK 3 α/β
Glucógeno sintasa cinasa 3 α/β

H₂O₂
Peróxido de hidrógeno

HEK-293
Células embrionarias de riñón humano - 293

HIF-1
Factor de transcripción inducible por hipoxia 1

JAK2
Janus cinasa 2

Kda
Kilodaltons

L
Litro

LY
LY24009: Inhibidor de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt

MTT
3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NF- κ B
Factor de Necrosis tumoral- κ B

ABREVIATURAS

Nix
Proteína pro-apoptótica: Bcl-2/adenovirus
E1B 19 kDa protein-interacting 3-like

nmol
nanomol

O.N
Over night; toda la noche

O₂
Oxígeno diatómico

PAGE
Electroforesis en gel de poliacrilamida

pmol
Picomol

PUMA
Modulador de apoptosis regulado por p53

R.T
Room temperature; temperatura ambiente

rhEPO
Eritropoyetina recombinante humana

RIPA
Buffer del ensayo de
radioinmunoprecipitación

rpm
Revoluciones por minuto

SDS
Dodecilsulfato de sodio

TBS
Tris buffer salino

TUNEL
Marcado final de corte de dUTP de
Terminal deoxinucleotidil transferasa

xG
Gravedades

XIAP
Inhibidor de apoptosis ligado a la proteína
X

PI3K
Fosfatidilinositol- 3-cinasa

RESUMEN

La hipoxia es una condición que exagera el daño en el tejido renal desencadenando el progreso de la enfermedad renal crónica. El propósito de este estudio fue investigar la expresión y activación del receptor EPO-R/ β CR (CD131) en células embrionarias tubulares de riñón humano en hipoxia, así como las cinasas efectoras de su activación en la inhibición de la apoptosis celular. Se estudió la vía de señalización Akt/PI3K y GSK-3 β . Los resultados muestran que hay una sobreexpresión de EPO-R y expresión de CD131 en las células embrionarias de riñón humano en hipoxia y que estas proteínas interaccionan para formar el receptor EPO-R/ β CR (CD131). Las células en hipoxia que recibieron el tratamiento con rhEPO, que es ligando del receptor EPO-R/CD131, mostraron una fosforilación de la cinasa pAkt y bloqueo de la activación de la proteína GSK-3 β con la fosforilación en el residuo de serina 9. Finalmente, cuando el receptor fue activado con rhEPO se observó una disminución de apoptosis en células que fueron inducidas a la hipoxia por CoCl₂.

Palabras clave— hipoxia, receptor EPO-R/ β CR (CD131), GSK-3 β , apoptosis

ANTECEDENTES

Antecedentes

Enfermedad Renal Crónica

Los riñones constituyen un órgano par, localizados en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral. Anatómicamente, cada riñón es cubierto por una membrana fibrosa llamada la capsula renal, internamente el órgano esta conformado por una región externa o corteza renal y una interna conocida como médula renal. La médula renal esta formada por estructuras cónicas; las pirámides renales, cuyo vértice, conocido como la papila renal, apunta a la pelvis renal la cual desemboca en el uréter (López, Gaafar, & Andrés, 2009) (Lidid, Mora, & Ramírez, 2010). Cada riñón contiene aproximadamente 1 000 000 de nefronas, siendo esta la unidad funcional del riñón. A grandes rasgos cada nefrona contiene un glomérulo, que es una red de capilares que se ramifican y anastomosan, rodeados por la cápsula de Bowman y un túbulo largo que se divide en diferentes segmentos: túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y el túbulo colector (Guyton & Hall, 2016).

La estructura compleja del riñón está adaptada a varias funciones esenciales, entre ellas la excreción de productos metabólicos de desecho y sustancias químicas extrañas, fármacos y metabolitos de hormonas. Los riñones regulan el equilibrio hídrico y electrolítico, manteniendo el balance entre las entradas y salidas de iones y la regulación de la presión arterial, mediante la secreción de hormonas y sustancias vasoactivas como la angiotensina II. Además, producen la forma activa de la vitamina D (vitamina D₃ o colecalciferol) y secretan eritropoyetina, que estimula la producción de eritrocitos en la médula ósea (Guyton & Hall, 2016). Los riñones realizan sus funciones más importantes filtrando el plasma y eliminando sustancias del filtrado con intensidad variable. En un adulto promedio el líquido filtrado o filtrado glomerular es de 125 ml/min o 180 l/día (Tamayo y Orozco Juan, 2016; Guyton & Hall, 2016).

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) se define como la disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG; indicado en mL/min/1.73m²) por debajo de 60 ml/min, acompañada por anormalidades anatómicas o funcionales presentes por más de tres meses, con implicaciones para la salud (Espinosa-Cuevas, 2016). Guyton y Hall (2016) definen a la ERC como una progresión en la pérdida de las nefronas funcionales, mientras que la organización Kidney

ANTECEDENTES

Disease Improved Global Outcomes (KDIGO) la clasifica en 5 diferentes etapas (1 al 5) de acuerdo con la TFG y la albuminuria. En la etapa 1 hay un daño renal leve con un filtrado glomerular normal (≥ 90), en la etapa 2 se presenta un filtrado glomerular anormal (60 - 89), en la etapa 3 el daño renal es moderado con TFG anormal (30 - 59), para la etapa 4 se presenta la insuficiencia renal crónica (IRC) con la disminución de la TFG a 15 - 29, en la etapa 5 o terminal hay una TFG menor al 15.

La progresión de la ERC supone un proceso irreversible que culmina en una insuficiencia renal caracterizada por una fibrosis renal generalizada (Sato & Yanagita, 2017). Estudios previos sugieren que las células epiteliales de los túbulos renales sufren una transdiferenciación a células mesenquimatosas (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), para transformarse en miofibroblastos productores de fibra (matriz extracelular) (Louis & Hertig, 2015) (Wylie et al., 2015). Cuando se detona la insuficiencia renal, se hace necesario retirar los desechos y normalizar el volumen y composición del líquido corporal mediante la terapia sustitutiva, que se refiere a diálisis peritoneal o hemodiálisis por un riñón artificial y eventualmente el trasplante de riñón (Tamayo y Orozco Juan, 2016; Guyton & Hall, 2016).

Enfermedad Renal Crónica en México

La ERC representa un problema con grandes dimensiones en México. Por un lado, se hace referencia a sus proporciones epidémicas, pues tiene altas tasas de morbilidad y mortalidad, que en su mayor parte son consecuencia de enfermedades crónicas no transmisibles mal atendidas que se ya se mencionaron, como la obesidad, la diabetes y la hipertensión arterial, que por sí mismas tienen altas tasas de morbilidad en México (Méndez-Durán, Méndez-Bueno, Tapia-Yáñez, Muñoz Montes, & Aguilar-Sánchez, 2010; Espinosa-Cuevas, 2016). Además, la ERC es una de las principales causas de atención en hospitalización y en los servicios de urgencias, conduciendo a altos costos para su tratamiento (Tamayo y Orozco Juan, 2016).

La Asociación Nacional de Medicina de México (ANMM) en el 2016, concluyó que a nivel nacional hubo alrededor de 6.2 millones de personas diabéticas con ERC en las distintas etapas de la clasificación de la KDIGO. La ANMM estimó que hasta el 98% de las personas con ERC por diabetes en México se encuentra en las etapas 1 a 3, mientras que el 2% restante está en las etapas 4 y 5, requiriendo de la terapia sustitutiva para sobrevivir. Esto es, aproximadamente 124

ANTECEDENTES

000 enfermos renales en terapia sustitutiva en México. Otras evaluaciones realizadas por el Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) arrojaron en el 2012 la existencia de 1,000 pacientes con ERC en etapa 5 por millón de derechohabientes (38.5 millones de derechohabientes en IMSS en 2015; INEGI, Encuesta Intercensal 2015; Espinosa-Cuevas, 2016). La ERC se encuentra entre las primeras 10 causas de mortalidad general en el IMSS, institución de salud que brinda la mayor cobertura de atención en México y específicamente a pacientes con diálisis. La ERC ocupa la octava causa de defunción en el varón de edad productiva y la sexta en la mujer de 20 a 59 años (Fernandez-Canton, 2004). En el 2017, el IMSS estimó que más de 10 millones de mexicanos sufren ERC y que solo unos 100 000 reciben tratamiento.

Abordando el tema de terapia sustitutiva en México, su panorama no es alentador. Por un lado, México tiene una baja tasa de trasplantes renales, 23 pacientes por millón de habitantes (pmp). Múltiples factores económicos, sociales, biológicos y religiosos dan por resultado un acceso deficiente al trasplante renal (Tamayo y Orozco Juan, 2016). En cuanto a la diálisis, este tratamiento es limitado además de muy alto costo.

Hipoxia en la ERC

Las enfermedades como la diabetes mellitus e hipertensión arterial, son causantes de ERC. Estas enfermedades provocan un aumento en la presión glomerular, un aumento en la filtración glomerular, o ambas, desencadenando una esclerosis glomerular (sustitución de tejido normal por tejido conectivo fibroso) (Guyton & Hall, 2016). La esclerosis glomerular reduce la oxigenación del riñón (Sturiale et al., 2007).

Dado que el riñón es un órgano muy perfundido, es muy vulnerable a la disminución de la circulación sanguínea y a estresores ambientales causantes de isquemia que disminuyen la oxigenación (hipoxia). La vasoconstricción renal genera hipoxia, que en el curso crónico desarrolla fibrosis (Nolin et al., 2016; Fu, Colgan, & Shelley, 2016) característica de la etapa terminal de la enfermedad renal (etapas 4 y 5), además de la excreción de proteínas (proteinuria) como la albúmina (Fine, Bandyopadhyay, & Norman, 2000).

ANTECEDENTES

Ante una baja tensión de oxígeno en el riñón (hipoxia $PO_2 \leq 10$ mm Hg), las células renales responden en defensa con la expresión y estabilización del Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF-1 α), permitiendo que se forme y estabilice el dímero HIF-1 α/β , que induce la expresión de diversos factores transcripcionales que regulan los procesos de protección celular, así como la producción de eritropoyetina o el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Lemus-Varela et al., 2010) (Diaz-Gonzalez, Russell, Rouzaut, Gil-Bazo, & Montuenga, 2005). Sin embargo, en un periodo prolongado, se desarrollan procesos celulares patológicos como la inflamación y el desarrollo de fibrosis, que agrava la hipoxia renal al reducir el acceso a los eritrocitos y limitar la difusión de oxígeno (Q. Fu et al., 2016).

La activación de los fibroblastos y la infiltración de células inflamatorias se suman a los efectos de la muerte celular (apoptosis) ocasionada por la hipoxia que en conjunto generan la fibrosis tubulointersticial (Webster, Nagler, Morton, & Masson, 2017).

En resumen, la hipoxia es originada por compresores vasculares, que a su vez causan patologías celulares que comprometen la oxigenación renal, provocando cambios estructurales que generan más hipoxia, llevando a la degeneración del tejido hasta su muerte (reducción a 187 500 nefronas en la etapa 5 de la ERC; cálculo obtenido de Guyton & Hall, 2016).

En normoxia la presión parcial de O_2 intracelular es dependiente del tejido. En el riñón la corteza tiene un promedio de 30 mm Hg y en la médula renal de 10 mm Hg (Ortiz-Prado, Dunn, Vasconez, Castillo, & Viscor, 2019). El O_2 liberado por el eritrocito se une al motivo HEM de la enzima prolin-hidroxilasa dentro de la célula, ésta a su vez hidroxila a HIF-1 α en los residuos prolina 402 y 564. Este marcaje es reconocido por la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau (VHL), que se activa y se une a HIF-1 α llevando a su degradación en el proteosoma, evitando la formación del dímero HIF-1 α/β y sus efectos (J. Liu et al., 2017).

En la hipoxia, no se activa la prolin-hidroxilasa y por lo tanto HIF-1 α no se degrada y se forma el dímero estable HIF-1 α/β . La inducción por hipoxia de la muerte celular programada o apoptosis, que culmina en la fragmentación del ADN, involucra además la inactivación de VHL (Cai, Verma, Kumar, Ma, & Robertson, 2010) por lo que se prolonga la actividad de HIF-1 α/β . La activación crónica de HIF-1 α/β por la hipoxia permanente provoca la inhibición de la

ANTECEDENTES

proteína Bcl-2, que bloquea la apoptosis, por lo que se induce más apoptosis (Greijer & Wall, 2004).

En conclusión, la pérdida paulatina y continua de nefronas por apoptosis es una consecuencia directa de la hipoxia tisular y celular y es causante de la degeneración del tejido renal, que se reemplaza por proteínas fibrosas de matriz extracelular, causando mas hipoxia, en un circuito sin fin de degradación del órgano y su funcionamiento. Por lo tanto, se requieren estrategias para detener este proceso y revertir el daño.

Al conocer el mecanismo que dispara la fibrosis y a su vez la hipoxia, que culmina en la muerte del tejido, se plantea como propuesta degradar la fibra de matriz extracelular para permitir el paso del oxígeno y detener la hipoxia, adicionalmente a detener la apoptosis, pero esto se convertiría en una carrera con riesgo de perderla. Por lo tanto, la propuesta es utilizar a la hipoxia y su mecanismo de señales para disparar el bloqueo de apoptosis y evitar así más pérdida de nefronas, que se reflejaría en una recuperación del tejido y su funcionamiento, presentándose como una opción de reforzamiento en la terapia de la ERC.

Existe un mecanismo similar de impedir más apoptosis, ya descrito en otros tejidos, que involucra al receptor no canónico de eritropoyetina y su ligando. Sin embargo, hasta ahora no ha sido descrito en células de riñón de humano. Por lo que es necesario conocer su funcionamiento para saber como aprovecharlo a favor del tejido y tratar la ERC.

Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoprotéica de aproximadamente 34 KDa, producida en su mayoría en los riñones. Tiene una estructura terciaria globular de 4 hélices- α antiparalelas, con dos puentes disulfuro que se establecen entre las cisteínas 29 y 33 y entre la 7 y 131. La eritropoyetina está compuesta por una porción proteica de 165 aminoácidos y por una estructura de hidratos de carbono (N-glicosilación) que constituye del 30 – 40 % de la molécula, que le brindan estabilidad y prolongan su vida media (Alegre et al., 2005).

La concentración de EPO circulante se afecta dinámicamente por la presencia de hipoxia o anemia. Sucede un aumento de hasta 1000 veces en la concentración de EPO circulante en pacientes anémicos (Bunn, 2013).

ANTECEDENTES

Su función principal es la regulación de la eritropoyesis mediante el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores eritroides (precursores de eritrocitos) en la médula ósea. En la médula ósea la EPO se une a su receptor homodimérico (EPO-R)₂ presente en las membranas celulares de las Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E), proeritroblastos y eritroblastos basofílicos tempranos (Shih, Wu, & Lin, 2018).

La unión de EPO a EPO-R da como resultado la endocitosis de los complejos de EPO-EPO-R que luego se degradan en lisosomas, lo que conduce al consumo de EPO circulante. Este mecanismo proporciona una retroalimentación negativa para reducir el nivel de EPO para evitar la sobreproducción de eritrocitos cuando un paciente se recupera de la pérdida de sangre aguda (Shih et al., 2018).

Células productoras de eritropoyetina

En el pasado, varios estudios reconocieron erróneamente las células epiteliales tubulares renales como las células productoras de EPO (REPC). Sin embargo, estudios con hibridación *in situ* del ARNm de EPO revelaron que las REPC se encuentran en el intersticio de la médula externa y la corteza renal, entre las células tubulares.

Las REPC tienen forma polimórfica con procesos citoplasmáticos interconectados y son células intersticiales similares a los fibroblastos. Estas células son positivas para CD73 y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas b (PDGFRb), conocidos por ser marcadores de fibroblastos. También son positivas para el receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), un marcador de cresta neural.

Las REPC son reconocidas como pericitos o fibroblastos perivasculares. Los pericitos se localizan en el intersticio y se unen al capilar, por lo tanto, se colocan en la primera línea para detectar el oxígeno en la sangre. Los pericitos renales además son las principales células productoras de colágeno en el riñón sano (Asada et al., 2011; Bachmann, Hir, & Eckardt, 1993; Maxwell et al., 1993; Shih et al., 2018).

Las REPC no solo producen EPO, sino que también se diferencian en miofibroblastos positivos a α -actina de músculo liso (α -SMA) después de estímulos profibróticos (por ejemplo, ligadura ureteral). La diferenciación de REPC a miofibroblastos reduce la expresión de EPO y los

ANTECEDENTES

miofibroblastos α -SMA⁺ poseen una capacidad reducida para aumentar la producción de EPO con estímulos hipóxicos. En línea con estos hechos, las células productoras de EPO están críticamente involucradas en la fibrosis renal y su diferenciación hacia miofibroblastos reduce la producción de EPO, causando anemia durante la progresión de la ERC (Shih et al., 2018).

En el riñón sano, cuando se produce hipoxia, los pericitos producen EPO mediante la unión del complejo HIF-1 α /HIF-1 β a la HRE 5' del gen *EPO*, lo que conduce a la transcripción de este. En la ERC, el elemento regulador 5' de *EPO* en miofibroblastos sufre silenciamiento epigenético por metilación del ADN, reduciendo la capacidad de unión del complejo HIF-1 α /HIF-1 β y, por lo tanto, la transcripción de EPO (Maxwell et al., 1993).

Receptor canónico de la eritropoyetina

El receptor de EPO es un clásico receptor de citocinas tipo 1, con un tamaño molecular de 68 – 70 KDa, tiene 2 dominios extracelulares tipo de inmunoglobulina y 4 residuos de cisteína espaciados como motivos estructurales (figura 1). Con la unión de la EPO al receptor homodimérico se inicia una cascada de señalización que permite la maduración de los eritrocitos por la inhibición de un programa apoptóticos (figura 2), siendo el primer indicio de su efecto protector antiapoptótico (M. Brines et al., 2004). La inhibición de la apoptosis resulta por el bloqueo de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 con dominio BH3. Nix es una proteína proapoptótica con dominio BH3 que ha sido propuesta como inductora de la liberación del citocromo c de la mitocondria para desencadenar la apoptosis en el eritroblasto (Diwan et al., 2008; Socolovsky, Fallon, Wang, Brugnara, & Lodish, 1999).

La regulación genética de EPO-R ha sido investigada en la hematopoyesis y se ha reportado que el factor de transcripción zinc-finger GATA-1 tiene un papel crucial en la diferenciación de los eritrocitos. GATA-1 se une a la secuencia consenso (A/T)GATA(A/G), la cual está presente en la región promotora de genes eritroides como el gen de EPO-R (Welch et al., 2004). En la hematopoyesis los niveles de EPO-R y GATA-1 aumentan y alcanzan la máxima expresión durante la maduración de las unidades formadoras de eritrocitos a los proeritroblasto y su

ANTECEDENTES

subsecuente diferenciación a eritroblasto (Broudy, N.Lin, M.Brice, B.Nakamoto, & T.Papayannopoulou., 1991).

Hay evidencia científica que muestra un entrecruzamiento entre la actividad transcripcional de EPO-R y GATA-1, uno de estos modelos propone a la cascada PI3K/Akt como vía de señalización que conecta a EPO-R y GATA-1, en donde EPO se une a su receptor y a su vez se activa la vía PI3K/Akt posteriormente Akt fosforila a GATA-1 y esta última tiene una autorregulación positiva (Palani & Sarkar, 2008).

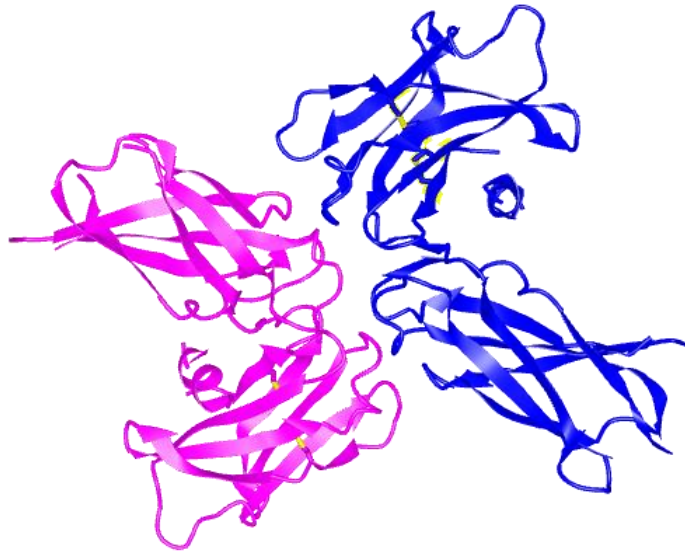


Figura 1 Estructura del dominio extracelular del homodímero de EPO-R. Representación homodimérica de EPOR. EPOR tiene 2 dominios de tipo inmunoglobulina, cada dominio consiste en dos laminas beta de 7 cadenas antiparalelas cada una y forman, entre ambas, un “sandwich” o cilindro que rodea los sitios hidrófobos. Otra característica del dominio son los residuos de cisteína con los cuales se forman enlaces disulfuro entre las cadenas beta (Alzari, 1998; Watowich, 2011). Imagen obtenida de NCBI; PDB ID 1ERN.

ANTECEDENTES

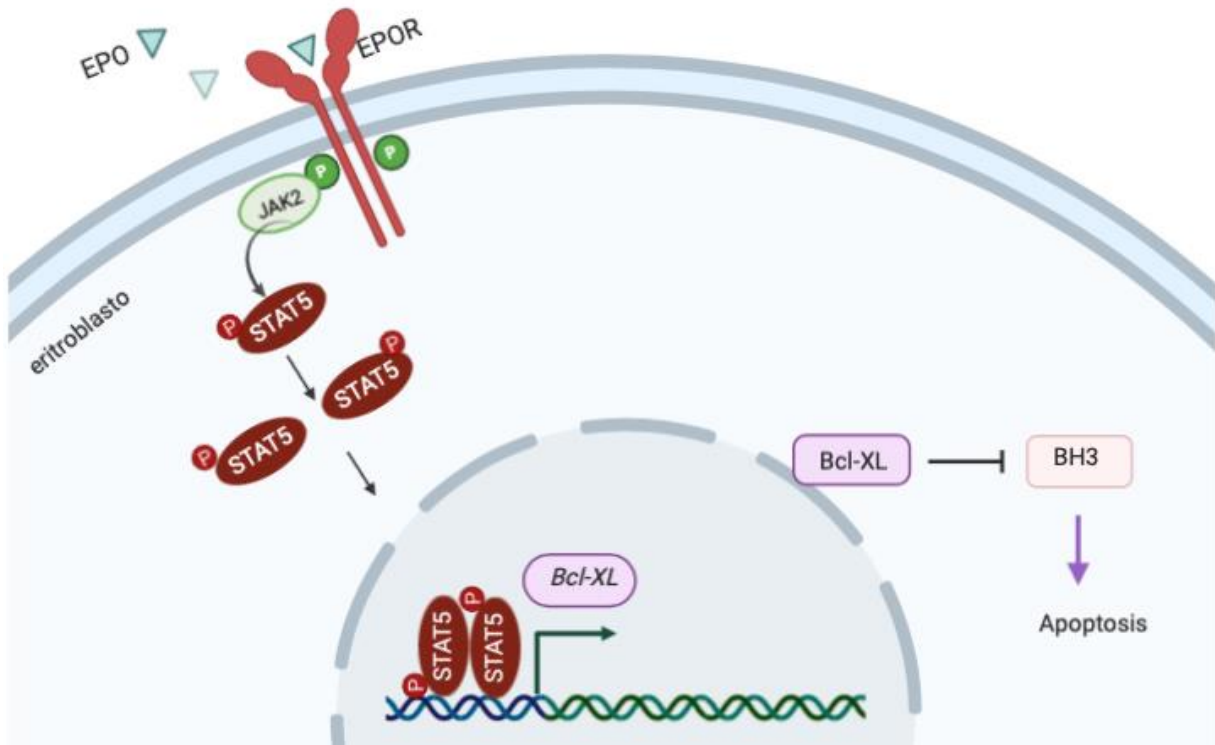


Figura 2 Vía de señalización activada por la unión de EPO su receptor homodimérico en eritroblastos, precursor del eritrocito. EPO activa la vía de señalización JAK2/STAT5 sobrerregulando la transcripción y expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL, a su vez, Bcl-xL secuestra e inhibe a proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas con dominio BH3 (Diwan et al., 2008; Socolovsky et al., 1999).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la proteína EPO-R es expresada en células no hematopoyéticas, como las neuronales, miocardiocitos, así como renales (Michael Brines & Cerami, 2012; Xu et al., 2009). Además, estos tipos celulares responden al ligando EPO recombinante (Broxmeyer, 2013).

Uno de los efectos de protección de la EPO en tejidos renales de rata con isquemia/ reperusión es la inhibición de la apoptosis (Young et al., 2005). Aunado a esto se demostraron propiedades antioxidantes, restauración de la autorregulación vascular y la atenuación de las respuestas inflamatorias (Grasso, Sfacteria, Cerami, & Brines, 2004). Dicho efecto protector de la EPO fue identificado en estudios preclínicos con modelos de enfermedades neurológicas (Brines et al., 2000).

ANTECEDENTES

Dadas estas propiedades protectoras no hematopoyéticas de la EPO, esta glicoproteína ha sido catalogada como una mediadora central contra los efectos inflamatorios en el daño al tejido (Brines & Cerami, 2008).

Los factores patogénicos como las infecciones, la isquemia y el trauma, activan la producción de citocinas proinflamatorias como la Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α). En un estudio *in vitro* se demostró que EPO redujo la producción de IL-1 y TNF- α en la línea celular U937, linfoma histiocítico de humano (monocitos), respecto al control y cuando las células estuvieron expuestas a la infección por LPS (Yazihan, Karakurt, & Ataoglu, 2008). Otro estudio reportó la disminución de IL-1 y TNF- α por la EPO en leucocitos humanos en neonatos y adultos (Strunk et al., 2008). Por lo que, adicional a sus efectos anti-apoptóticos, la EPO también es antagonista de citocinas proinflamatorias previniendo la futura progresión del daño.

La Eritropoyetina como agente terapéutico

Para que los efectos protectores de la EPO se presenten se requieren altas concentraciones de esta hormona (1–10 nmol/L) comparándose con los niveles plasmáticos necesarios para la hematopoyesis (10–15 pmol/L) (M Brines & Cerami, 2008). Las altas concentraciones de la EPO recombinante usadas en la clínica potencian su actividad estimulante de producción plaquetaria causando la formación de trombos (Bennett et al., 2008).

Un metaanálisis reportó la asociación entre el incremento de la mortalidad y las complicaciones trombóticas en pacientes con anemia tratados con 300 U/kg de EPO, una dosis alta (Henke et al., 2003) La dosis anterior es equivalente a 1.2 mM /L de EPO, la equivalencia a mM se obtuvo a partir de que 100 UI EPO es igual a .026 mM (Montero et al., 2007), es decir, en 300 U/Kg de EPO hay .078 mM/Kg de EPO, considerando a una persona de 70 kg la dosis necesaria sería 5.4 mM de EPO, de esta cifra y tomando en cuenta que el volumen de plasma para una persona de 70 Kg es de 4.5 L (Godínez, 2017) quedaría un total de 1.2 mM de EPO/L de plasma.

Para contrarrestar los efectos hematopoyéticos de la rhEPO se han diseñado distintos compuestos derivados de esta como la eritropoyetina carbamilada o CEPO, que es una

ANTECEDENTES

eritropoyetina modificada al reaccionar con cianato, que no se unen al receptor canónico de EPO. Por otro lado, en la clínica se han establecido nuevos parámetros para el uso de la rhEPO en pacientes con anemia determinándose nuevos rangos de hemoglobina de entre 10 y 12 g/dl y no excediendo la concentración de 12g/dl (Cabrera, Ruiz, & Sancho, 2009).

Receptor de Eritropoyetina no canónico

Los efectos protectores no hematopoyéticos de la EPO son efectuados por el receptor no canónico, compuesto de un heterodímero: un monómero del receptor de la EPO (EPO-R) acompañado con el monómero del receptor β común (β CR) o CD131 (Moore & Bellomo, 2011). El β CR o CD131, es la subunidad compartida por el receptor de las interleucinas (IL-) 3, IL-5 y del factor de crecimiento estimulante de granulocitos - macrófagos (GM-CSF) y tiene un peso de 120-140 kDa. El dominio extracelular contiene aproximadamente 200 aminoácidos con módulos de fibronectina tipo 3, cada módulo contiene 7 cadenas β antiparalelas (figura 3) (Murphy & Young, 2006).

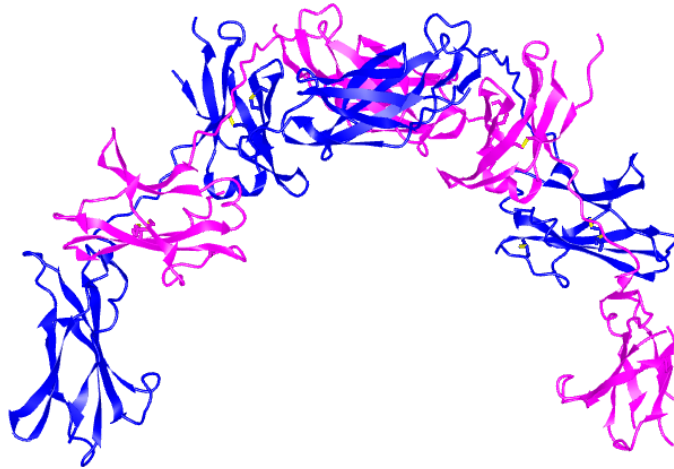
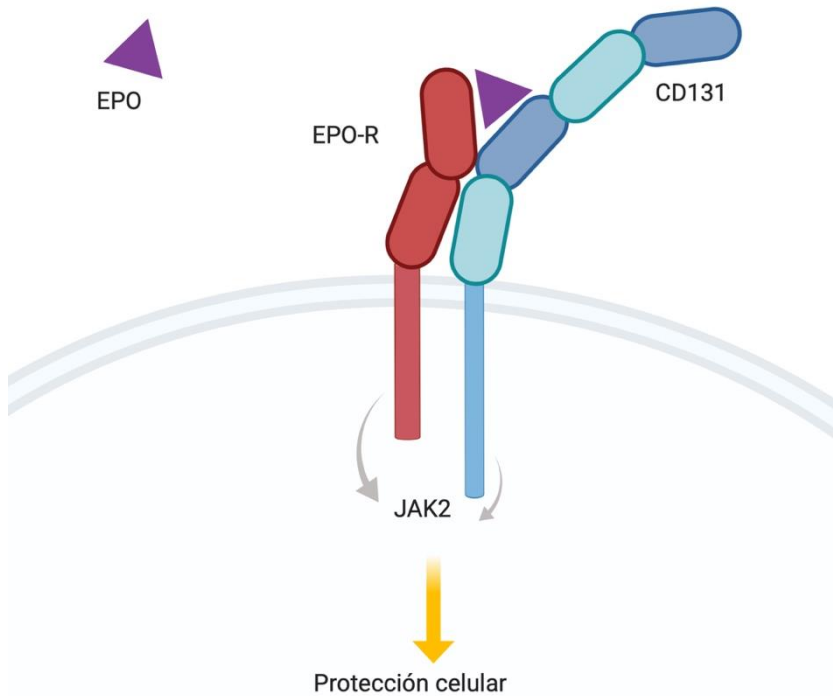


Figura 3 Estructura homodimérica del dominio extracelular de CD131. El entrelazamiento de las dos unidades de CD131 (una en azul y a la otra en rosa) provoca una conformación arqueada. Cada cadena de CD131 contiene 4 dominios con topología de fibronectina tipo III (FN3). Cada dominio de FN3 posee una estructura de sandwich beta compuesto de 7 cadenas antiparalelas que son arregladas en dos hojas beta. Los módulos de FN3 no contienen enlaces disulfuro entre las hojas y mantienen una forma elipsoidal de 38 X 20 X 25 Å aproximadamente (I. D. Campbell & Spitzfaden, 1994; Murphy & Young, 2006). NCBI PDB ID: 2GYS.

Los efectos protectores del receptor no canónico fueron demostrados por un estudio realizado por Brines et al. en el 2004, en donde la EPO no mostro un efecto protector en ratones mutados

ANTECEDENTES

de la subunidad CD131. Y además se encontró que dicha subunidad no es requerida para la



eritropoyesis (M. Brines et al., 2004). El receptor no canónico está representado en la figura 4.

Figura 4 Representación del receptor no canónico de EPO-R. En respuesta al estrés celular las unidades del receptor: EPO-R y CD131 migran hacia la membrana celular donde se ensamblan y se unen mediante un enlace disulfuro. Datos publicados sugieren que el receptor se forma con una estequiometría 2:2 sin embargo su representación muestra una estequiometría 1:1. Cuando una molécula de EPO se une al

receptor EPO-R/CD131 resulta un cambio de conformación de este y la fosforilación de JAK2. La fosforilación de JAK2 desencadena la activación de diversas vías de señalización que bloquean procesos patológicos como la inflamación y la muerte celular programada (Michael Brines, 2018; Cheung Tung Shing et al., 2018).

Vías de señalización del receptor EPO-R/ β CR (CD131)

Se han reportado más de 3 rutas de activación del receptor heterodimérico y múltiples efectores de la señalización. Las principales son: vía JAK2/STAT5, la vía PI3K y la ruta de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Michael Brines & Cerami, 2012).

Ruta JAK2/STAT5

La ruta JAK2/STAT5 ha sido descrita en células de la estirpe neuronal. Recientemente, se demostró que en células PC-12 bajo un estrés oxidativo y tratadas con EPO y una variante de ésta, EPOL, que tiene un porcentaje bajo de sustituyentes de ácido siálico, tuvieron un incremento en la expresión genética de Bcl-2 comparadas con las células en su ausencia. La neuroprotección se observó con el aumento en la viabilidad celular en las células en presencia de EPO y EPOL. Los autores demuestran que dicha protección es mediante la activación de la

ANTECEDENTES

vía de señalización JAK2/STAT5 pues este efecto fue bloqueado con el inhibidor de JAK2/STAT5, AG490 (Castillo et al., 2018).

Una vez establecida la conformación del ligando-receptor ocurre la auto-fosforilación de JAK2 que induce la fosforilación y activación de STAT5 el cual se dimeriza translocándose al núcleo. Como factor de transcripción, STAT5 activa la transcripción del gen *Bcl2* que da como resultado el bloqueo de apoptosis. De acuerdo con lo anterior, el estrés oxidativo lleva a la sobre-regulación de proteínas proapoptóticas BH3 es decir las proteínas que tienen homología con el dominio 3 de *Bcl2*, entre ellas BIM, PUMA y BAD.

Las proteínas proapoptóticas con dominio BH3 inducen cambios conformacionales de proteínas efectoras multidominio (BH1,2,3), BAK y BAX, las cuales se ensamblan en poros multímeros en la membrana mitocondrial. La formación de poros multímeros facilita la liberación del citocromo C al citosol, evento que desencadena la activación de la caspasa 3 provocando la fragmentación del ADN y apoptosis celular (Hata, Engelman, & Faber, 2015; Singh, Sharma, & Singh, 2007).

En cambio, con la activación de la vía JAK2/STAT5 por la unión de EPO hay un aumento en la transcripción y traducción de *Bcl2* que inhibe la apoptosis secuestrando las proteínas proapoptóticas BH3 (Chipuk, Moldoveanu, Llambi, Parsons, & Green, 2010).

Otros modelos experimentales donde ha demostrado la activación de la vía STAT5 por la EPO es en la neuronas hipocámpales de la región CA1 con daño isquémico, donde se observó una sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas de *Bcl-xL* y *XIAP* (F. Zhang, Wang, Cao, Gao, & Chen, 2007). Además de la inhibición de la apoptosis, se ha reportado que EPO estimula la proyección axonal en neuronas inmaduras del hipocampo (Byts et al., 2008).

Ruta PI3K/Akt

La segunda vía de señalización involucra a la activación de la cinasa fosfatidil inositol 3 (PI3K) y de la proteína cinasa B (Akt). Después de la unión del receptor al ligando, la PI3K de clase I es reclutada a la membrana plasmática donde genera el segundo mensajero lipídico: el fosfatidil inositol trifosfato (3,4,5) (PIP3). La producción de PIP3 inicia una cascada de eventos que

ANTECEDENTES

comienza con el reclutamiento y activación de efectores que tienen dominios de unión a PIP₃, entre estos se encuentra Akt.

La ruta PI3K/Akt es un eje en la fisiología celular (Gharbi et al., 2007). Esta vía de señalización se ha propuesto en diversos tejidos entre los que se encuentra el renal. En un modelo murino de enfermedad renal se mostró un incremento en la fosforilación de Akt en ratas con nefrectomía a las que se les administró EPO y una disminución de la apoptosis en las células epiteliales tubulares (Imamura et al., 2012).

En otro modelo de daño renal con isquemia-reperfusión se encontró que el tratamiento con EPO incrementó los niveles de la fosforilación de Akt y la fosforilación de GSK-3 β en el residuo de serina 9. La fosforilación en este residuo inactiva a la proteína GSK-3 β lo que a su vez inhibe la actividad de NF- κ B, reduciendo la translocación de su subunidad p65 al núcleo y la transcripción de genes de mediadores proinflamatorios (Patel et al., 2012). En este mismo trabajo también se demostró que la EPO desencadena la fosforilación de la serina 1177 de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial, eNOS, mediante la activación de Akt. Con la activación de eNOS ocurre el aumento de óxido nítrico (ON) en la microcirculación.

La formación de ON en tejido dañado por isquemia es benéfico pues causa una vasodilatación local, inhibe la adhesión de las plaquetas y neutrófilos, además de regular la angiogénesis (Luque Contreras, Vargas Robles, Romo, A, & Escalante, 2006).

En un modelo murino con enfermedad renal aguda por lipopolisacárido también se encontró un aumento en la fosforilación de Akt, GSK-3 β y eNOS, cuando los animales fueron tratados con EPO 1 h después del tratamiento con LPS. Además, con EPO hubo una disminución de la subunidad p65 de NF- κ B en la fracción nuclear, por lo tanto, EPO previno la activación de este factor de transcripción. Los anteriores efectos fueron ausentes en los animales Knockout de β CR (Coldewey et al., 2013).

En el tejido muscular cardiaco, específicamente en células endoteliales aórticas de bovino, la EPO desencadenó angiogénesis en estas células y se propuso el siguiente mecanismo de señalización: EPO produjo la fosforilación de la proteína AMPK en el residuo treonina 172 por medio de la activación del heteroreceptor EPO-R/CD131; se demostró que la AMPK esta

ANTECEDENTES

acoplada a la subunidad CD131 en estas células. La enzima eNOS también fue incrementada con la fosforilación en los residuos de serina 635 y 1179 por la AMPK. Como evento subsecuente a la activación de eNOS ocurre la biosíntesis del ON que desencadena la angiogénesis (Su et al., 2012).

La angiogénesis dependiente del ON es un proceso de remodelación en que se generan vasos sanguíneos mejorando la función endotelial, suprimiendo la proliferación de las células del músculo liso, inhibiendo la trombosis o reduciendo la liberación de mediadores inflamatorios (Sessa, 2004).

Otro estudio en células cardíacas muestra la activación de la vía PI3/Akt por rhEPO, las células que se usaron fueron células de mioblastos H9C2 expuestas a hipoxia/reperfusión y se demostró que el pre-tratamiento de EPO incrementó la fosforilación de Akt y redujo la actividad de la caspasa -3 (Asiya Parvin et al., 2014).

En cuanto a neuronas se ha reportado que EPO induce la proliferación en células primarias de embrión de ratón en un modelo de hipoxia, y con deprivación de glucosa (OGD), por medio de la activación de Akt. El bloqueo de la vía de Akt con el inhibidor LY294002 disminuyó la neurogénesis (Ding et al., 2017).

Ruta MAPK

Los tres principales miembros de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) corresponden a la cinasa regulada de señal extracelular (ERK), p38 y la cinasa C-Jun N-terminal, cada una representa 3 diferentes cascadas de señalización (Honda et al., 2016). Las cascadas de señalización de las MAPKs son iniciadas por una señal extracelular que lleva a la activación de una MAPK en particular que es seguida de la activación sucesiva de una MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAP cinasa) y una MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) (Morrison, 2012).

Para que las cascadas MAPK sean activadas se necesitan intermediarios como las proteínas G. De acuerdo con lo anterior, hay evidencia que muestra que en células ováricas de hámster chino (CHO) EPO puede activar la vía de señalización MAPK ERK 1/2 dependiente de la activación de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (Guillard et al., 2003). El anterior grupo de investigación demostró que el receptor de eritropoyetina en su dominio amino terminal tiene acoplado una

ANTECEDENTES

proteína G_i heterotrimérica. Las proteínas G están formadas de 3 polipéptidos: una subunidad α que se une e hidroliza a GTP y las subunidades $\beta\gamma$ que forman un monómero funcional. La activación del receptor induce un cambio de GDP por GTP en la subunidad α posteriormente la subunidad α se disocia del receptor y de las subunidades $\beta\gamma$. Una vez libres las subunidades α y $\beta\gamma$ activan diferentes efectores (Guillard et al., 2001).

La familia de las proteínas RAS son conocidas por traducir señales a través de moléculas target entre las que se encuentran la MAPKKK Raf-1 (Campbell et al., 1998). RAS activa a Raf-1 uniéndose a su membrana, Raf-1 fosforila a MEK, una MAPKK, que activa fosforilando a la MAPK ERK 1 y 2 (ERK1/2), posteriormente ERK se trasloca al núcleo y modifica la expresión genética, fosforilando factores de transcripción (Fakuda, Gotoh, Adachi, Gotoh, & Nishida, 1997).

Comúnmente, la respuesta biológica de la activación de la vía ERK es el crecimiento, supervivencia, así como la diferenciación celular (Morrison, 2012), por ejemplo, la exposición de EPO (5 U/mL) en cultivo de células madre neuronales durante 1,3,5 y 7 días produjo cambios morfológicos de diferenciación a astrocitos, lo anterior fue consistente con el aumento de células positivas y expresión de GFAP, marcador de astrocitos, comparando con las células que no recibieron tratamiento de EPO. A partir del día 2 hubo un aumento de en la expresión de ERK2 y en el factor de transcripción NF- κ B que en células neuronales es un factor crucial para la diferenciación; la inhibición de ambos redujo la diferenciación a astrocitos. Por último, la activación de ERK/NF- κ B fue dependiente del receptor de EPO (Min Lee et al., 2004).

Otro estudio en tejido cardíaco de rata mostró que el tratamiento con darbepoyetina (Dpa) (2.5 ug/kg) antes del daño isquémico produjo una disminución en el tamaño del tejido dañado y en la liberación de troponina 1, un indicador de daño al miocardio, en el plasma. La anterior cardioprotección fue dependiente de la fosforilación de la ERK 42/44. La Dpa es un derivado de la EPO que tiene dos sitios mas de N-glicosilación a diferencia de EPO (Baker et al., 2007).

La protección celular por EPO mediada por la vía de las MAPK también se ha reportado en el tejido renal isquémico en donde se encontró que EPO induce la sobreexpresión de p-JNK

ANTECEDENTES

mientras que redujo la activación de la caspasa – 3 (J. Zhang et al., 2018). Usando un modelo de enfermedad renal aguda en rata se reportó que la isquemia- reperfusión produjo un aumento en la fosforilación de la MAPK p38 esta activación fue atenuada por EPO (Patel et al., 2012).

La activación de p38 ocurre en respuesta a isquemia y desencadena la proliferación y producción de citosinas proinflamatorias (X. Guo, Gerl, & Scrader, 2003). En hepatocitos se mostró que el pretratamiento con EPO incremento la actividad de ERK después de la hepatectomía en el tejido de rata (Greif et al., 2010).

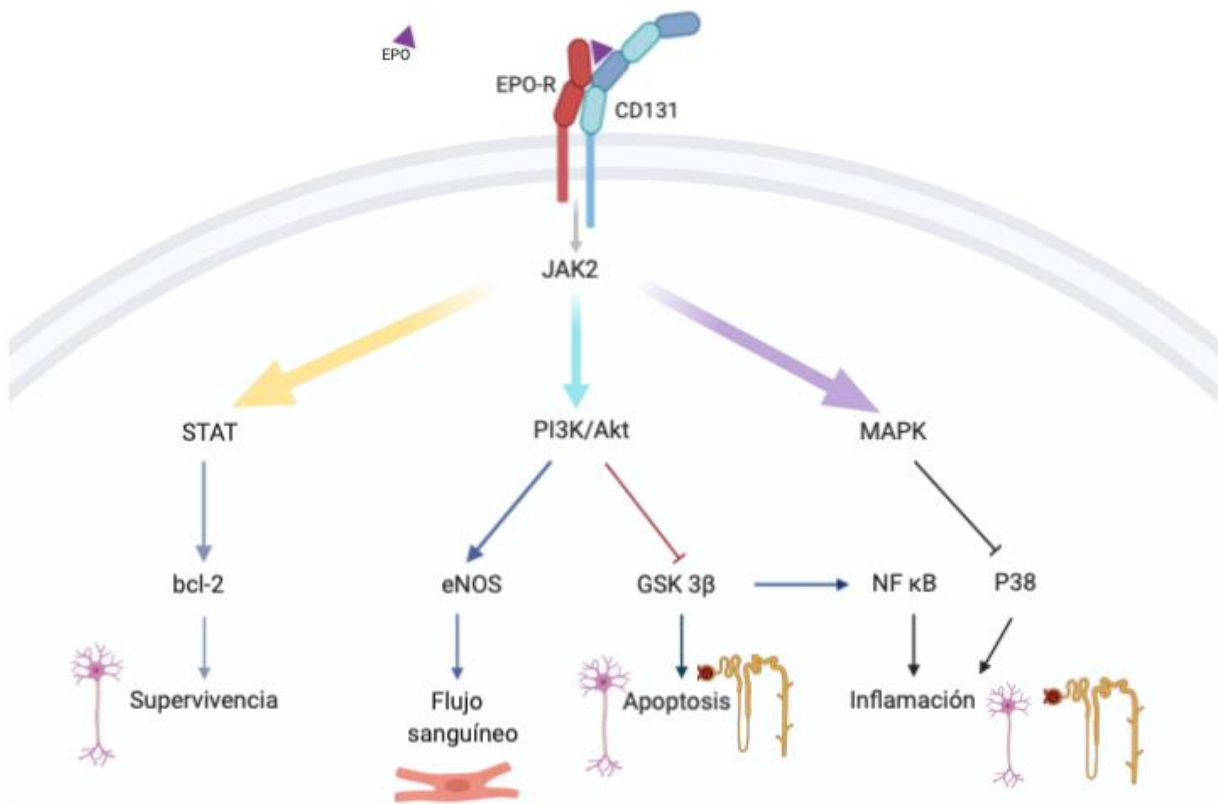


Figura 5 Vías de señalización descritas en la activación del heteroreceptor EPO-R/CD131 en distintos tipos celulares. Distintas proteínas son activadas en células neuronales, renales y coronarias disminuyendo la apoptosis e inflamación (Brines & Cerami, 2012; Su et al, 2001; Coldewey, 2013; Patel et al, 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La ERC es causada principalmente por la inflamación y la disminución en la circulación sanguínea del riñón provocada por factores de riesgo como la alta presencia de glucosa en la sangre, creando un ambiente hipóxico que genera fibrosis y vasoconstricción renal, induciendo la muerte del tejido por apoptosis disminuyendo progresivamente la cantidad de nefronas y la función renal. Las terapias sustitutivas, como la diálisis, no detienen la progresión de la ERC. Por ello, es necesario el impulso del desarrollo de terapias alternativas. Se ha propuesto que el efecto protector, de supervivencia e inhibición de la apoptosis de EPO, es llevado a cabo mediante la activación del receptor heterodimérico, no hematopoyético, EPO-R/CD131. Por lo que, la activación de este heteroreceptor (EPO-R/CD131) sería necesaria para mediar los efectos protectores de la EPO en los tejidos que sufren de hipoxia. Dado que se desconoce si esto sucede en células renales durante la hipoxia, es importante investigar si el receptor EPO-R-CD131 se expresa y es funcional y en consecuencia, conocer su papel sobre la apoptosis y en la protección tisular.

JUSTIFICACIÓN

Justificación

La ERC es un problema de grandes dimensiones en México y el mundo, por ser una de las principales causas de atención en hospitalización y servicios de urgencias y que se deriva de otras enfermedades de importancia como hipertensión, diabetes y obesidad. La actual terapia contra la ERC no detiene la degeneración (muerte) del tejido y no resuelve el problema. Por lo que se requieren alternativas eficaces para su tratamiento. Dado que la EPO y sus derivados han mostrado efectos protectores a través de la activación del receptor EPO-R/CD131, el conocimiento de sus mecanismos moleculares que probablemente intervienen en el bloqueo de la apoptosis de células de riñón humano durante la hipoxia, son cruciales para proponer nuevos blancos terapéuticos y el futuro de nuevas aplicaciones de derivados de EPO. Aunado a lo anterior, puntualizar la vía de protección celular contra la apoptosis conllevaría no solo a la aplicación de derivados de EPO, sino también al de otras moléculas. Por estas razones, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la hipoxia sobre la expresión y activación del receptor EPO-R/CD131 en células de riñón de humano.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La expresión y activación del receptor EPO-R/CD131 se induce en las células de riñón humano durante la hipoxia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión del receptor heterodimérico EPO-R/CD131 y su papel en la activación de cinasas efectoras implicadas en la interrupción de la apoptosis inducida por hipoxia, en células de riñón de humano.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión del receptor EPO-R/CD131 durante la hipoxia en las células de riñón humano.
2. Evaluar la fosforilación de proteínas cinasas involucradas en la activación del receptor EPO-R/CD131 en las células de riñón humano durante la hipoxia.
3. Estimar el nivel de apoptosis en las células de riñón humano durante la hipoxia con bloqueo de la actividad del receptor EPO-R/CD131.

METODOLOGÍA

Metodología

Diseño experimental

- i. Tipo de estudio

Experimental

- ii. Grupos de estudio

Ver tabla 1

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS Y REFERENCIAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO		
Variables de estudio (independiente)	Característica	Referencia
Normoxia	Condiciones estándares de ~20% de O ₂ y 5% de CO ₂	ATCC
Anoxia	Sistema de Anaerobiosis GaZPack, >4 h ausencia de oxígeno	Hamdan & Malek, 2014
Hipoxia	Atmósfera en cámara de hipoxia de 1% de O ₂ y 5% de CO ₂	Hamdan et al. 2014
H₂O₂ 2mM	Inductor inespecífico de daño celular	Chatong et al. 2013
CoCl₂ 200 uM	Inductor de hipoxia por ser estabilizador químico de HIF-1 α	Moroz et al 2009
Cisplatino 80 uM	Inductor específico de daño renal	Atilano-Roque et al. 2016
Hipoxia + rhEPO 100 U/mL	Efecto del ligando del receptor EPO-R/CD131, rhEPO, en la hipoxia	Montero et al. 2007
Hipoxia + rhEPO100 U/mL + 10nm LY294002	Efecto del inhibidor de PI3K, LY294002, en presencia del ligando del receptor EPO-R/CD131	Ding et al., 2016
CoCl₂ 800 uM	Inductor de apoptosis por hipoxia	Yang et al., 2008
CoCl₂ 800 uM rhEPO 100 U/mL	Efecto del ligando del receptor EPO-R/CD131 en la apoptosis por hipoxia	Montero et al. 2007
CoCl₂ 800 uM + 10nm LY294002	Efecto del inhibidor de PI3K en la apoptosis por hipoxia	Ding et al., 2016
CoCl₂ 800 uM + Chrysin 30 uM	Efecto del inhibidor de HIF-1 α , Chrysin, en la apoptosis por hipoxia	Fue et al., 2007

METODOLOGÍA

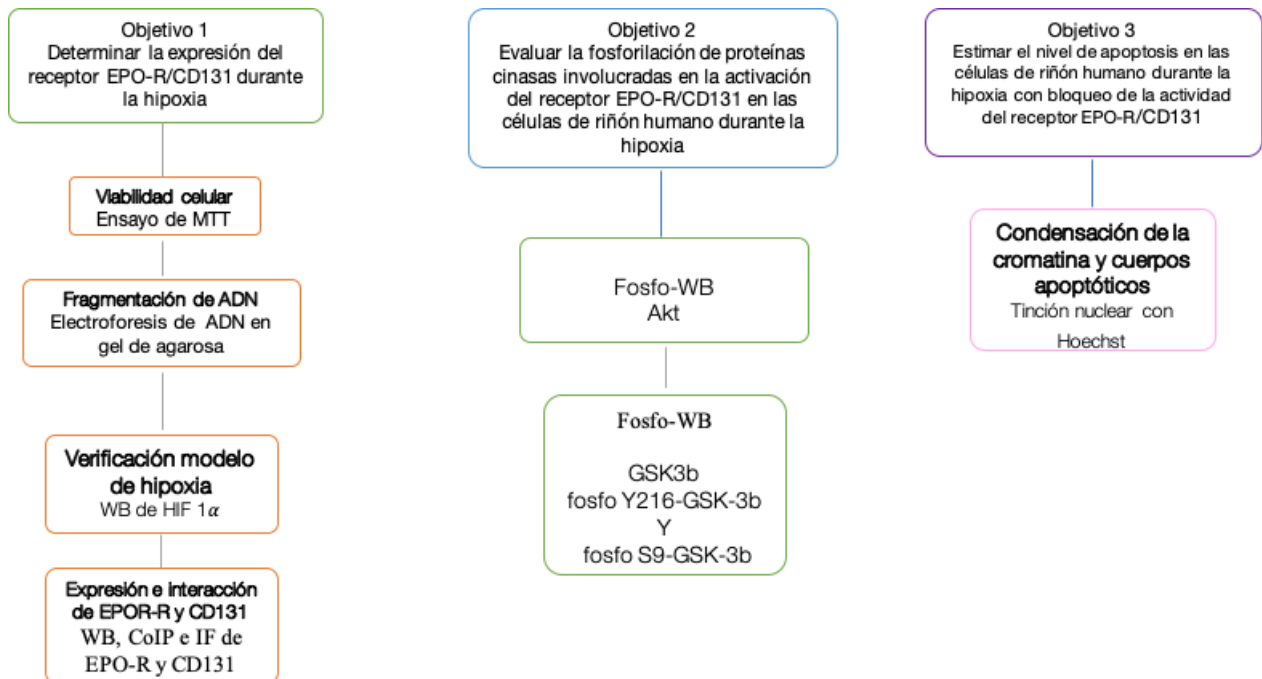
- iii. Variables de efecto (dependiente):
 - Viabilidad celular
 - Fragmentación de ADN
 - Expresión de EPO-R y CD131
 - Fosforilación de Akt
 - Inhibición de apoptosis

- iv. Tamaño de muestra

Para cada tratamiento se realizan 3 réplicas independientes para cada ensayo experimental

- v. Análisis estadístico

Para analizar los resultados de los ensayos que así lo requirieron se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post-hoc para determinar las diferencias entre los grupos. Se usó el programa GraphPad PRISM Version 5.01 y el valor de α se consideró significativa con una $P \leq 0.05$.



METODOLOGÍA

Materiales

Línea celular HEK 293

La línea celular HEK 293 fue utilizada para el estudio, estas células son consideradas como células epiteliales embrionarias del riñón (Ashokkumar, Vaziri, & Said, 2006) o incluso fibroblastos (Cooper et al., 1998; Yung et al., 2012). Presentan fenotipo de las células de los túbulos proximales y distales del riñón, como la producción del urodilatin, un péptido natriurético encontrado en la orina que modula el volumen de plasma y presión sanguínea inhibiendo la reabsorción de sodio (Ashokkumar et al., 2006; Hirsch & Schlatter, 2003).

Se ha demostrado que las células HEK 293 expresan marcadores de una etapa temprana de nefrogénesis tal como ocurre in vivo durante la transición del mesénquima condensado al cuerpo epitelial en forma de S, que mantiene la expresión del factor de transcripción paired box gene 2 (PAX2), vimentina modificada, E-cadherina y la proteína de tumor Wilms 1 (Torban, E., Goodyer, 1998). Las células HEK 293 no expresan marcadores de segmentos tubulares diferenciados, túbulos proximales o conductos colectores (Torban, E., Goodyer, 1998).

Las células HEK 293 tienen propiedades de un epitelio renal en desarrollo y, por lo tanto, adecuadas para el análisis de la función renal (Braun & Huber, 2002). En estudios previos, como el realizado por Jurkovicova et al. (2008), las células HEK 293 se emplearon para evaluar la modulación de receptores de calcio y la relación del decremento de su expresión en el desarrollo del estado patológico de la enfermedad renal aguda. A pesar de que las células HEK 293 muestran características de las células del linaje neuronal, no manifiestan el fenotipo neuronal funcional (Jurkovicova et al., 2008).

Cultivo y propagación de células HEK 293

Las células HEK 293 se cultivaron en medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) suplementado con 2mM de L-glutamina y 10 % de SFB a 37 °C en condiciones estándar; en una atmósfera de 5 % CO₂ – 95 % de aire (~20% de O₂). Habitualmente se utilizan a una confluencia de 80 – 90 % en los pasajes 13 – 17. Las células se sembraron en placas de 6, 24 y 96 pozos y/o T25, según el ensayo a una densidad de 1.4x10⁵ células/cm², 24 h antes de que fueran tratadas. Las condiciones estándares de cultivo son consideradas como normoxia.

Para ensayos preliminares se indujo anoxia. Para inducir anoxia se empleó el sistema GaZPack; el sistema está compuesto por una bolsa hermética sellada y un paquete generador de gas. Los compuestos activos del paquete (ácido ascórbico y carbón activado) reaccionan rápidamente al

METODOLOGÍA

contacto con el aire y consumen el oxígeno reduciendo así su concentración a menos de 1 % de O₂ dentro de la bolsa; a las 4 h se tiene una ausencia de oxígeno (Hamdan & Malek, 2014).

Para inducir niveles límite de oxígeno (1%) reportada como hipoxia extrema, se empleó la cámara de hipoxia (Stem Cell), donde se puede generar un ambiente de oxígeno controlado suministrado por un tanque de gas con la mezcla del porcentaje de O₂ indicado (1% O₂, 5% CO₂ y 94% N₂) (ver figura 6).



Figura 6 Fotografía de la cámara de hipoxia para cultivo celular de Stem cell. Como puede ser apreciado en la fotografía, la cámara de hipoxia es un dispositivo sellado que mantiene una atmósfera de oxígeno regulado, su tamaño permite que pueda ser mantenida en la incubadora. El tanque de gas con una mezcla especial compuesta de 1% O₂, 5% CO₂ Y 94% N₂ suministra la cámara con 80 L de gas creando un ambiente hipóxico. Esta cámara cuenta con 2 tubos necesarios para la inyección y purga de gas. La entrada de gas a la cámara es regulada por un flujometro a 20 L/min.

El CoCl₂ se administró a una concentración de 200 mM para la inducción química de hipoxia. Dado que el CoCl₂ es un inhibidor de la prolil-hidroxilación, evita que se degrade HIF-1 α y por lo tanto ocurren los eventos regulados por el dímero HIF-1 α / β (Moroz et al., 2009).

Como control positivo inespecífico de inducción de apoptosis se utilizó el H₂O₂ a 2mM, ya que produce especies reactivas de oxígeno o ROS que generan apoptosis. Por otra parte, el cisplatino

METODOLOGÍA

es un fármaco nefrotóxico selectivo sobre las células tubulares proximales, se usó para inducir daño en las células HEK 293 a una concentración de 80 uM, como se aprecia en la tabla 1. A excepción del tratamiento de H₂O₂, que se llevó a cabo por 2 h, el resto de los tratamientos se realizó por 24 h (figura 7).

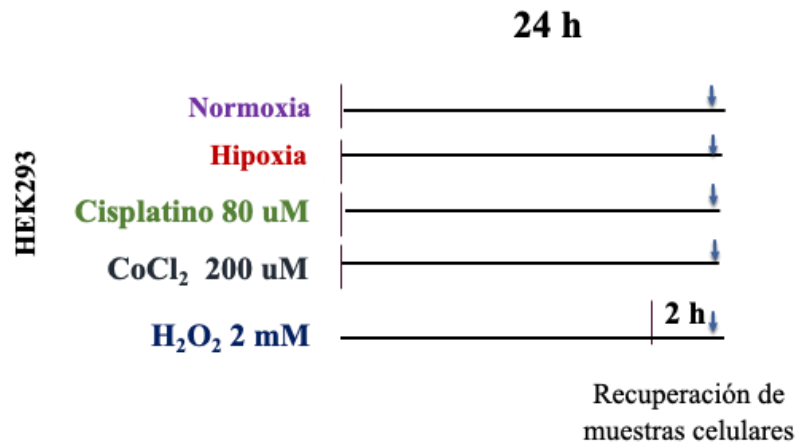


Figura 7. Diseño experimental de las células HEK 293 en diferentes tratamientos. Las muestras se recuperaron 2 o 24 h después de sus respectivos tratamientos para su posterior procesamiento en los diferentes ensayos y análisis.

Para estudiar la funcionalidad del receptor EPO-R/CD131 las células se incubaron en hipoxia y fueron tratadas con eritropoyetina recombinante rhEPO a una concentración de 100 UI/mL (Montero et al. 2007). Para evaluar las rutas de señales intracelulares involucradas en la activación del receptor EPO-R/CD131 por rhEPO durante la hipoxia, se bloquearon químicamente las proteínas Akt, efectora directa del bloqueo de apoptosis y HIF-1 α , efectora de las respuestas celulares a la hipoxia. Para inhibir la activación de la proteína Akt, se usó el compuesto químico LY294002 a una concentración de 10 nM (Ding et al., 2017). Para bloquear la función de HIF-1 α , se usó el compuesto químico Chrysin 30 uM (B. Fu et al., 2007). Chrysin aumenta la ubiquitinación y degradación de HIF-1 α al aumentar su proil-hidroxilación. El tratamiento con Chrysin inhibe la expresión de HIF-1 α , reduce su estabilidad e inhibe la síntesis de la proteína (B. Fu et al., 2007). También se utilizó CoCl₂ a dosis de 800 uM para inducir apoptosis (Yang, Shu, Zhu, & Yang, 2008).

Métodos

METODOLOGÍA

Ensayo de viabilidad celular por MTT

La reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se utiliza para determinar la viabilidad celular. El ensayo de MTT evalúa la actividad mitocondrial, esta actividad mitocondrial es un indicador de viabilidad en donde las células con un metabolismo activo reducen las sales de MTT por las enzimas deshidrogenasas de la mitocondria (Riss, R., & Niles A., 2013). Para este ensayo se sembraron 1×10^4 células HEK 293 en placas de 96 pozos 24 h antes de tratarlas. Después del tiempo indicado de tratamiento, se agregaron 50 uL de MTT a una concentración de 5 mg de MTT en PBS 1X a cada pozo, se incubó por 4 h a 37 °C. Para la solubilización de las sales de formazan, se removió cuidadosamente el MTT y se agregó 100 uL de isopropanol, se mezcló por pipeteo. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm y se obtuvo el porcentaje de células vivas (D.O células tratadas/ D.O células controles (sin tratamiento) X 100).

Ensayo de fragmentación de ADN (apoptosis) por electroforesis

Las células HEK-293 se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB y 2 mM de L-glutamina en una atmósfera de 5% de CO₂ y en condiciones estándares de oxígeno (~20%). Posteriormente se sometieron a los diferentes tratamientos: normoxia (~20% de O₂), hipoxia (1 % de O₂), anoxia (0% de O₂), CoCl₂ 200 uM, Cisplatino 80 uM por 24 h y H₂O₂ 2 mM por 2 h. Se recolectaron las células apoptóticas flotantes y adheridas en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 5000 rpm/5 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 uL de buffer de lisis (10mM de Tris-HCl, 10mM EDTA y 50 mM NaCl), se añadió SDS al 1% y proteinasa K a una concentración de 200 ug/mL y se mezcló en vortex, se incubó a 42° C por 12 h, posteriormente a 65 °C por 15 min. Se añadió 700 uL de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y se incubó a 25 °C durante 10 min, se centrifugó a 12 000 rpm/ 5 min, se transfirió la fase acuosa a microtubos, se añadió NaCl 5M a una concentración final de NaCl 0.1M. Después, se agregó un volumen igual de isopropanol 100% frío, se mezcló por inmersión y se incubó a -20°C/30 min. Se centrifugó a 15 000 g/5 min a R.T y se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet por 30 min y se disolvió con 50 uL de H₂O destilada. El DNA se cuantificó en NanoDrop. Finalmente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa de 1.5% con 1:100 mL de SYBR-Safe a 100 Voltios durante 50 min para resolver los multímeros en las escaleras de ADN características indicativas de muerte celular por apoptosis. Al término de la corrida se tomó una fotografía en un transiluminador con luz UV a 365 nm de longitud de onda, para visualizar las bandas de ADN.

METODOLOGÍA

Immunodetección de EPO-R, CD131, PI3, Akt, GSK3 β y HIF-1 α por Western Blot

Para determinar si existen cambios en la expresión de proteínas en los cultivos en condiciones basales y en respuesta a los tratamientos aplicados se realizó la técnica de Western blot. Las células se lisaron con buffer RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) se centrifugaron para separar las proteínas solubles. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron con el kit Pierce BCA Protein Assay. Se realizaron SDS-PAGE empleando geles de 10 % de acrilamida con 15 μ g de proteína soluble por cada muestra. La electroforesis se llevó a cabo en condiciones reductoras y desnaturizantes durante 1 h 20 min a 110 V. Las proteínas se transfirieron del gel de acrilamida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Millipore) en una cámara Mini-PROTEAN® Vertical Trans-Blot® (Bio-rad) con el amortiguador Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mM de Tris base, 39 mM de glicina, 20% de metanol, 1.3 mM de SDS, pH 9.2). La membrana se bloqueó con 5% de leche grado proteómico durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron ON a 4°C a la dilución recomendada por el fabricante en TBS-T .05% (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, .05 % Tween 20) Después de 3 lavados con TBS-T, se incubaron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa anti-IgG de ratón, de cabra y de conejo según el anticuerpo primario. durante 1.5 horas a R.T Después de 3 lavados con TBS-T, se realizó un lavado extra con TBS para eliminar el exceso de Tween-20. La membrana se reveló con 200 μ L de luminol (Luminata Forte Western HRP substrate, Millipore) y la reacción se fotodocumentó en el equipo UVP ChemStudio SA2 (DBA Analytik Jena). Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la detección de las distintas proteínas.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Fuente</i>	<i>Catálogo y Marca</i>	<i>Tamaño (kDa)</i>	<i>Dilución WB</i>	<i>Epítipo</i>
EPO-R	Clona D-5 de ratón	sc-365662; Santa Cruz	64 – 78	1:200	Entre los aminoácidos 491 - 513 del dominio citoplasmático, C-terminal, de EpoR de origen humano
CD131	Clona A- 3 de ratón	sc-398246; Santa Cruz	130	1:200	Entre los aminoácidos 21 - 46 de la región N terminal de CD131 de origen humano
HIF-1α	Clona 28b de ratón	sc-13515; Santa Cruz	132	1:100	Entre los aminoácidos 329-530 de HIF-1 α de origen humano

METODOLOGÍA

Akt	Clona A-11 de ratón	sc- 377457; Santa Cruz	62	1:200	Reconoce la secuencia entre los aminoácidos 443 y 479 de la región C- terminal de Akt1 de origen humano
p Akt	Anticuerpo policlonal de conejo	Sc-135650; Santa Cruz	62	1:200	Secuencia corta de aminoácidos que reconoce la treonina 308 fosforilada de Akt de origen humano
GSK 3 α/β	Clona 0011-A de ratón	Sc-7291; Santa Cruz	51 y 47	1:200	Entre los aminoácidos 1 a 420 de la GSK 3 β de origen humano
pTyr GSK 3 α/β	Clona 6D3 de ratón	Sc-81496; Santa Cruz	p-GSK-3 α : 51 p-GSK-3 β : 47	1:200	Reconoce los aminoácidos de Tyr 279 de GSK-3 α y Tyr 216 of GSK-3 β de origen humano
pSer9 GSK 3β	Clona F-2 de ratón	sc-373800; Santa Cruz	47	1:200	Secuencia corta de aminoácidos que reconoce la serina 9 fosforilada de GSK-3 de origen humano
β- tubulina	Clona 2-28-33 de ratón	sc-23949; Santa Cruz	55	1:200	No se especifican los aminoácidos que reconoce. Su epítipo está en el microtubulo del flagelo del esperma de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (erizo de mar).

Immunoprecipitación del receptor EPO-R/CD131

Para confirmar que el heteroreceptor se formó por la unión de EPO-R a CD131 se realizó el ensayo de co-inmunoprecipitación. La co-inmunoprecipitación es una técnica para analizar la interacción entre dos o más proteínas, en donde primero se lleva cabo una inmunoprecipitación de una de las proteínas de interés con el uso de su anticuerpo específico de esta manera se precipitarán las proteínas con las que está haciendo complejos o interacciones moleculares fuertes, estas proteínas están unidas por interacciones nativas en una solución acuosa.

METODOLOGÍA

Para este ensayo se realizó la precipitación de CD131 con su anticuerpo específico y se inmunodetectó EPO-R en el precipitado: se extrajo la proteína total de las células HEK 293 con buffer de lisis RIPA siguiendo las especificaciones del fabricante y se cuantificó con el kit Pierce BCA Protein Assay. De 100 – 500 ug de proteína total en 1 mL de buffer de RIPA se incubó O/N con 10 uL de anticuerpo CD131 (tabla 2). Se agregaron 10 uL del complejo proteínas A/G-agarosa y se incubó por 2h a 4°C. Se obtuvo el inmunoprecipitado (pellet) por centrifugación a 1000 xg/5min a 4°C. Tanto el extracto total, como el sobrenadante y el pellet obtenido se disolvieron en buffer Laemli 5x (250 mM Tris, .5 mM β -Mercaptoetanol, 10 % SDS, 50 % Glicerol y 0.25 % de azul de bromofenol). Las muestras se desnaturalizaron a 100 °C por 5 min y se realizó SDS-PAGE al 8 %. Se realizó Western Blot descrito anteriormente para la inmunodetección de EPO-R (tabla 2).

Detección *in situ* del receptor EPO-R/CD131 por inmunofluorescencia

Las células HEK 293 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 2mM de L-glutamina en una atmósfera de 5% de CO₂ en hipoxia (1 % de O₂) en presencia y ausencia de 100U/mL de rhEPO por 24 h. Se lavaron las células con PBS1X y se fijaron con PFA 4% en PBS O/N a 4°C, se lavaron con PBS 1x y se bloquearon con 25 uL de suero de caballo al 10% en PBS 1X/1 h. Se removió la solución de bloqueo y se colocaron 25 uL de la solución (1% de suero de caballo en PBS) de anticuerpos primarios (dilución 1:100 uL). Anticuerpos primarios: CD131 (sc-677; Santa Cruz) y EPO-R (sc-85593; Santa Cruz). Se incubaron O/N a 4°C. Se lavó 3 veces con 100uL de PBS 1X y se incubó por 2 h a R.T con su respectivo anticuerpo secundario en una dilución 1:150 en 1% de suero de caballo en PBS 1X. Anticuerpos secundarios: Alexa 488 Anti-rabbit para CD131 y Alexa 594 Anti-goat para EPO-R. Las muestras se observaron en el microscopio confocal LEICA DM5500Q en el canal verde (Alexa 488) y en el canal rojo (Alexa 594).

Detección de apoptosis por marcado de corte en extremo terminal con dUTP deoxinucleotidil transferasa (TUNEL)

Se detectó la fragmentación de ADN por apoptosis mediante la técnica de TUNEL con el kit APO-BRDU (ALX-850-042-KI01; ENZO). Las endonucleasas activas en la apoptosis cortan la cromatina entre los nucleosomas para producir fragmentos de ADN entre los 50 y 300 kilobases y sus múltiplos. La formación de estos fragmentos largos de ADN deja expuestos gran cantidad de terminaciones 3'-hidroxil (OH). El ensayo de TUNEL utiliza la enzima deoxinucleotidil transferasa

METODOLOGÍA

terminal (TdT) que cataliza la adición de un deoxiribonucleosido trifosfato, 2'-deoxiuridina 5' trifosfato (dUTP), a la terminación 3'-OH de los fragmentos de ADN de doble cadena. El dUTP está modificado con bromo para formar Br-dUTP que una vez incorporado al ADN puede ser detectado con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU que a su vez está conjugado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína o FITC por sus siglas en inglés.

Para la realización de este ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante, sin embargo para la fijación celular se modificó de la siguiente manera el protocolo: se recuperaron las células flotantes y adheridas en tubo cónico de 15 mL: se utilizó EDTA 2mM o tripsina, se centrifugó a 300 g/ 5 min a R.T. se decantó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de PBS, se agitó suavemente y se centrifugó, se decantó y se añadió la solución de FACS (2mM EDTA + .1% de BSA) se agitó y se centrifugó, se resuspendió en 2 mL de PFA 1% y se dejó fijar durante 60 min en hielo, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, se prosiguió a lavar con 5 mL de PBS, se centrifugó, se repitió el lavado. Finalmente, se le adicionó etanol al 70% frío a $1-2 \times 10^6$ cel/mL y se almacenó a -20°C por al menos 24 h. Se utilizó el citómetro Easy Wava de Millipore para procesar y analizar las muestras.

Como primer paso, se realizó una calibración para obtener una adecuada distribución de las células HEK293 según su tamaño por forward scatter (FSC) y complejidad interna o granularidad por side scatter (SC). Estas características dependen del grado y de la magnitud de la dispersión de la luz del láser al interactuar con las células (Suárez, Delvallepérez, Domínguez, & Abraham, 2015). Las células utilizadas para la calibración fueron las células HEK293 en normoxia. Una vez que se determinaron los parámetros de FSC y SC se delimitó mediante un histograma la región de células apoptóticas. En el histograma se representaron las cuentas celulares o número de eventos contra la fluorescencia emitida por la excitación de FITC en escala logarítmica.

Detección de apoptosis por condensación y fragmentación nuclear: tinción de Hoechst

Se sembraron 1×10^5 células sobre cubreobjetos redondos de vidrio (12mm de diámetro) en placas de 24 pozos, 24 h previas antes de ser expuestas a sus respectivos tratamientos: CoCl_2 800uM, CoCl_2 800uM + rhEPO 100U/mL, CoCl_2 800 uM + LY2940002 10 nM, CoCl_2 800 uM + Chrysin 30mM, Cisplatino 80uM por 24h y H_2O_2 2mM durante 2h. A la concentración de 800 uM, el CoCl_2 ha mostrado ser potente inductor de apoptosis por hipoxia (hasta 60% de apoptosis) en células HEK 293 por 24 h (Yang et al., 2008). Por lo que se utilizó dicha concentración para evaluar

METODOLOGÍA

si la funcionalidad del receptor EPO-R/CD131 es relevante en condiciones extremas de apoptosis, como las que originan la pérdida de nefronas en la ERC.

El Chrysin, una flavona natural, se utilizó para inhibir las respuestas celulares a la hipoxia por ausencia de HIF-1 α (B. Fu et al., 2007) y así evaluar si la hipoxia regula la actividad antiapoptótica del receptor EPO-R/CD131, pero también para evaluar si el receptor EPO-R/CD131 es capaz de contrarrestar las señales proapoptóticas inducidas por CoCl₂ 800 y por Chrysin (induce la activación de la proteína proapoptótica Bax y disminuye la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 con la activación de caspasas e inactivación de la señalización de Akt), descritas en células cancerosas (Khoo, Chua, & Balaram, 2010).

Una vez terminado el tratamiento se fijaron con PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente y se preservaron las células flotantes. Los pocillos fueron lavados con H₂O inyectable para eliminar los restos de PFA y las células fueron teñidas con 150 μ L de solución Hoechst 3322 a una concentración de 0.5 μ g/mL por 30 min. Se montaron los cubreobjetos y se tomaron fotos con el microscopio de fluorescencia, LEICA DM5000 B, en canal azul a una excitación de 350nm y emisión de 460 nm.

Cuantificación de la expresión de los genes *EPO-R* y *GATA 1* por q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Se realizó la técnica q-PCR con la finalidad de cuantificar el nivel de expresión a nivel de ARNm de los genes EPO-R y CD131 en las células tubulares embrionarias de riñón humano en normoxia, en hipoxia, en hipoxia en presencia de EPO, hipoxia en presencia de EPO y LY294002 e hipoxia en presencia de EPO y Chrysin. Como gen calibrador o de referencia se usó el gen de la subunidad 18S del ribosoma.

Se obtuvo el ARN total de las células mediante TRIzol y la retrotranscripción se realizó incubando a 65°C la siguiente mezcla: 1 μ g de ARN total, 0.5 μ L de oligo dT 0.1 μ g/ μ L, 0.2 μ L de 10 mM de cada dNTP y 2.5 μ L de agua libre de nucleasas. Después se incubó en hielo por 1 minuto y se agregó: 4 μ L de buffer de transcriptasa reversa 5X, 1 μ L de DTT 0.1 M, 1 μ L de inhibidor de RNasa OUT y 1 μ L de SuperScript® III Reverse Transcriptase. Esta solución se incubó por 60 min/50°C y se inactivó por 15 min/70°C. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 12 μ L. Se utilizó 1 μ L de la mezcla de reacción de ADNc como templado, además de 6 μ L de Fast SYBR® Green Master Mix, 1 μ L de ADNc, 1 μ L de oligo directo y 1 μ L de oligo reverso (GATA-1 5' ATCACAAGATGAATGGGCAGAA 3' / 3' ACGACCACCACGACACTGTG 5',

METODOLOGÍA

EPO-R 5' GAGCATGCCCAGGATACCTA 3' / 3' TCTGCTGCCAGCTTTGAGTA 5', 18S 5' CTTAGAGGGACAAGTGGCG 3' / 3' TGCGACTCGGTTCAGTCACAT 5') y 3 µL de agua libre de nucleasas.

La reacción se realizó en el termociclador QuantStudio de Applied Biosystems. Las condiciones de reacción fueron: pre-incubación de 1 min/ 95°C, 40 ciclos de 30 seg/95°C, 30 seg/65°C y 30 seg/72°C, extensión final de 1 min/ 72°C y finalmente enfriamiento a 37°C. Se utilizó como control de mantenimiento de la expresión génica el ARNm de la proteína ribosómica 18S. Se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas. La cuantificación de la expresión génica relativa al gen 18S se calculó según el método comparativo Ct (método de $\Delta\Delta CT$). El Ct (cycle threshold) corresponde al número de ciclos necesarios para que cada curva de amplificación alcance un umbral en la señal de fluorescencia. El método comparativo de Ct o $\Delta\Delta CT$ calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en el número de veces entre un gen de interés y un gen endógeno o calibrador (Aguilera, Ruiz Tachiquín, Rocha Munive, Pineda Olvera, & Chánez Cárdenas, 2015). Este método utiliza la siguiente ecuación:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[(Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ control interno}) \text{ de la muestra tratada}]}{-(Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ del gen control interno}) \text{ muestra no tratada}}$$

Con este método los datos pueden ser interpretados como la expresión del gen de interés relativo al control interno en las muestras tratadas comparadas con el control o las muestras no tratadas (Schmittgen & Livak, 2008).

RESULTADOS

Resultados

Resultados correspondientes al objetivo 1:

Determinar la expresión del receptor EPO-R/CD131 durante la hipoxia en las células de riñón humano.

Entre las actividades realizadas para cumplir el objetivo número 1, las células renales humanas HEK 293 fueron incubadas en hipoxia (1% de O₂) y controles de daño celular: H₂O₂ como control inespecífico de inducción de apoptosis y cisplatino, fármaco nefrotóxico selectivo de células tubulares proximales. Posteriormente su viabilidad fue analizada con el ensayo de MTT. Para la identificación de apoptosis se realizó electroforesis de ADN en geles de agarosa y Westerns Blot para analizar la expresión de las proteínas de interés: EPO-R, CD131 y HIF-1 α . A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

Viabilidad celular: evaluación de respuesta de células HEK 293 al daño por hipoxia

Los resultados se muestran en la figura número 8. Los datos fueron procesados con Prism Graph usando ANOVA de una vía, la prueba post-hoc de Dunnet arrojó cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular en hipoxia, H₂O₂ 2mM y Cisplatino 80 uM con respecto a normoxia. Como puede apreciar, hubo un decremento en la viabilidad celular del 20% para hipoxia, 50 % para H₂O₂ 2 mM y 30 % en las células en presencia de cisplatino 80 uM. Con dichos resultados se confirmó que la hipoxia causa daño a las células HEK 293, incluso a niveles comparables con el cisplatino y que las células son reactivas a la hipoxia, por lo tanto, permitirán evaluar si sucede la expresión del receptor EPO-R/CD131.

RESULTADOS

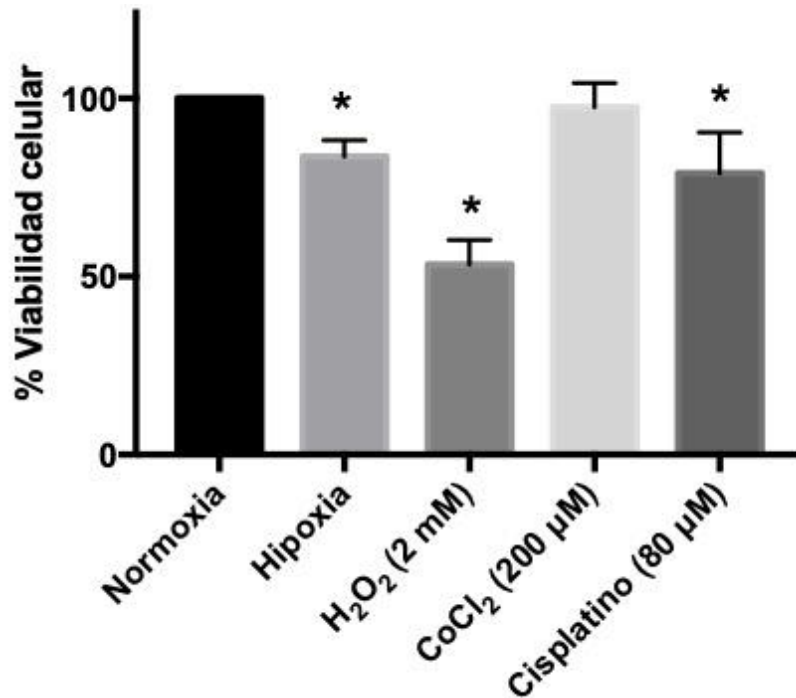


Figura 8 Viabilidad celular de células tubulares renales en distintos tratamientos. Las células tubulares renales humanas fueron tratadas en presencia de hipoxia, CoCl₂ 200 µM, Cisplatino 80 µM por 24h y H₂O₂ 2mM durante 2 h. Los resultados arrojados con el ensayo de MTT muestran un decremento en la viabilidad celular en las condiciones de hipoxia, H₂O₂ 2 mM y Cisplatino 80 µM con 20, 50 y 30 % de disminución en la viabilidad celular respectivamente. Los datos fueron analizados con ANOVA One way con un valor p < .05 respecto normoxia. Se muestran el valor SEM.

Para evaluar si la muerte de las células causada por los diferentes tratamientos involucraba a la apoptosis, se analizó la presencia de multímeros de ADN en escaleras a consecuencia de la fragmentación evidenciada por electroforesis en agarosa.

Electroforesis de fragmentos del ADN por apoptosis

La inducción de apoptosis se analizó por el fraccionamiento de ADN en escaleras por electroforesis en geles de agarosa. El fraccionamiento de ADN es uno de los procesos moleculares que ocurren en la apoptosis, en donde las caspasas llevan a la activación de endonucleasas específicas de apoptosis que rompen la cadena de ADN en los sitios de unión de nucleosomas, produciendo oligómeros en múltiplos de 180 pb, obteniendo una apariencia de escalera (bando de ADN) por electroforesis en geles de agarosa (Matassov, Kagan, Leblanc, & Sikorska, 2004). Los resultados de este experimento se muestran en la figura número 9.

RESULTADOS

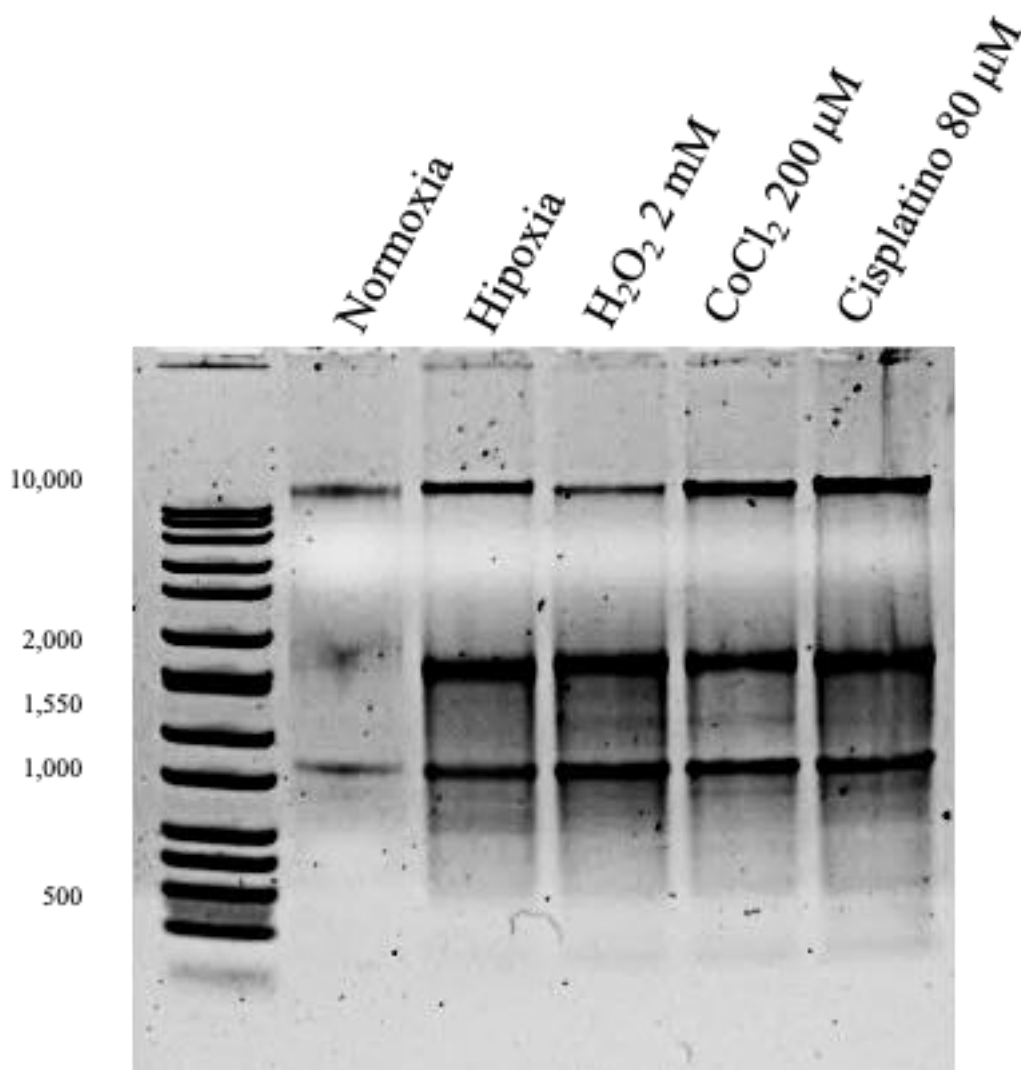


Figura 9 Electroforesis de ADN en gel de agarosa. El patrón de bandas de la fragmentación del ADN de las células tubulares embrionarias de riñón humano en normoxia, hipoxia, H₂O₂ 2mM, CoCl₂ 200 uM y Cisplatino 80 uM fue analizado en geles de agarosa al 1.5%. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 100-10000 pb. Se observa que en todas las condiciones excepto en normoxia se observa un patrón de bandeado del ADN simulando una escalera.

Como se puede observar, las células en hipoxia, los controles de daño H₂O₂ 2mM y Cisplatino 80 uM y el tratamiento de CoCl₂ 200 uM muestran un patrón de bandas a lo largo del gel, dicho bandeo no fue observado en las células en normoxia. Estos resultados indican que la hipoxia por 24 h causa apoptosis en las células tubulares embrionarias de riñón humano HEK293. Para evaluar si la apoptosis de las células HEK293 en el modelo de hipoxia utilizado se debió a una respuesta fortuita o se debió a un mecanismo celular inducido, se analizó la expresión de HIF-1 α como indicador biológico de los mecanismos de respuesta de las células a la hipoxia.

RESULTADOS

Expresión de HIF-1 α

HIF-1 α es el indicador biológico y regulador clave de respuesta celular a hipoxia. De acuerdo con los resultados, HIF-1 α fue estabilizado en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia (figura número 10).

Células tubulares embrionarias de riñón humano

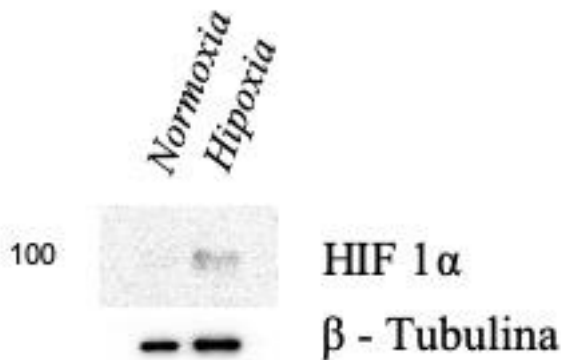


Figura 10. Expresión de HIF-1 α en las células tubulares embrionarias de riñón en la hipoxia. Las células tubulares embrionarias de riñón humano HEK 293 fueron cultivadas en normoxia e hipoxia durante 24 h. En el blot se muestra la expresión de la proteína HIF-1 α . La proteína tiene un peso de 110 KDa aproximadamente.

Habiendo establecido que el modelo de hipoxia utilizado induce la expresión y estabilización de HIF-1 α en células HEK 293, se analizó si dentro de esta respuesta involucraba la expresión del receptor EPO-R/CD131. Además de las condiciones antes mencionadas, también se incluyó anoxia para comparar la expresión de estas proteínas en ausencia total de O₂, donde los mecanismos de respuesta no sobrepasan al daño.

Expresión de EPO-R y CD131

La expresión de las proteínas fue analizada por western blot. La figura número 11 muestra el patrón de expresión de las proteínas EPO-R y CD131 en las células tubulares embrionarias de riñón humano en las distintas condiciones. Como se puede observar, la proteína CD131 muestra una sobreexpresión en las células en hipoxia, anoxia, H₂O₂, CoCl₂ y cisplatino, en cambio en las células normóxicas se observa su expresión basal. Por otro lado, EPO-R se sobreexpresa en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia, a diferencia de las células en anoxia, H₂O₂ o Cisplatino donde la expresión de EPO-R es casi indetectable. Mientras que en normoxia la expresión de EPO-R no alcanzó a ser detectada en este ensayo.

RESULTADOS

Con estos resultados se demostró que EPO-R y CD131 se expresan en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia. Sin embargo, la sola expresión de ambas proteínas no demuestra la interacción entre ellas, requisito para conformar el heteroreceptor. Por lo tanto, se analizó si estas proteínas interaccionaban entre sí.

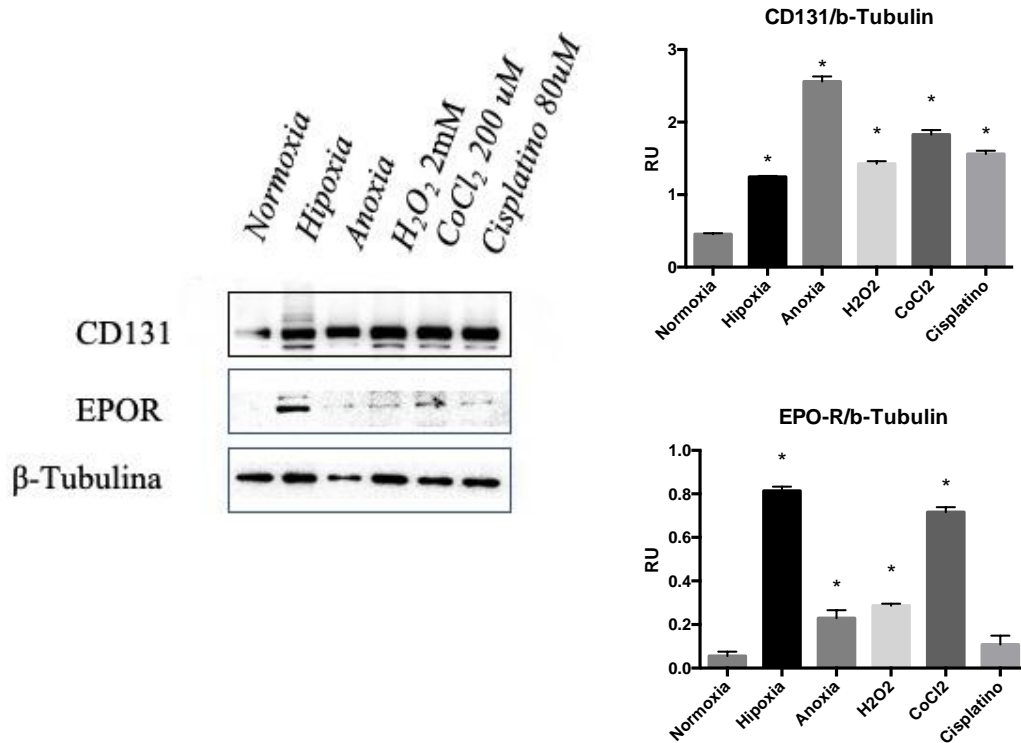


Figura 11 Blot de la expresión de EPO-R y CD131 en células tubulares renales con diferentes tratamientos. Las células tubulares embrionarias de riñón humano fueron cultivadas en normoxia, anoxia e hipoxia y en presencia de $CoCl_2$ 200 μ M, Cisplatino 80 μ M y H_2O_2 2 mM por 24 y 2 h respectivamente. La subunidad β del receptor compartido por las interleucinas (IL-) 3, 5 y el Factor Estimulante de Crecimiento de Colonias Granulocito-Macrófago también se conoce como CD131 y tiene un peso reportado de 130 KDa, en todas las condiciones excepto en normoxia, se observa una sobreexpresión de CD131. Por otra parte, se muestra la detección de proteína EPO-R con un peso de 64 - 78 KDa, la banda que se muestra se obtuvo por encima de 75 KDa, se aprecia una sobreexpresión de la proteína en las células hipóxicas. Para proteína control de carga se detectó β -Tubulina.

Conformación del heteroreceptor EPO-R/CD131 en hipoxia

Para averiguar la conformación del heteroreceptor se realizó la inmunoprecipitación de CD131 e inmunodetección de EPO-R en su precipitado (figura 12). También se indagó la co-localización de las proteínas mediante inmunofluorescencia (figura 13). Después, en el inmunoprecipitado, se

RESULTADOS

inmunodetecta con un anticuerpo que reconozca alguna proteína que supuestamente interacciona con la primera; para esto último se utilizó el anticuerpo contra EPO-R.

Células tubulares embrionarias de riñón humano

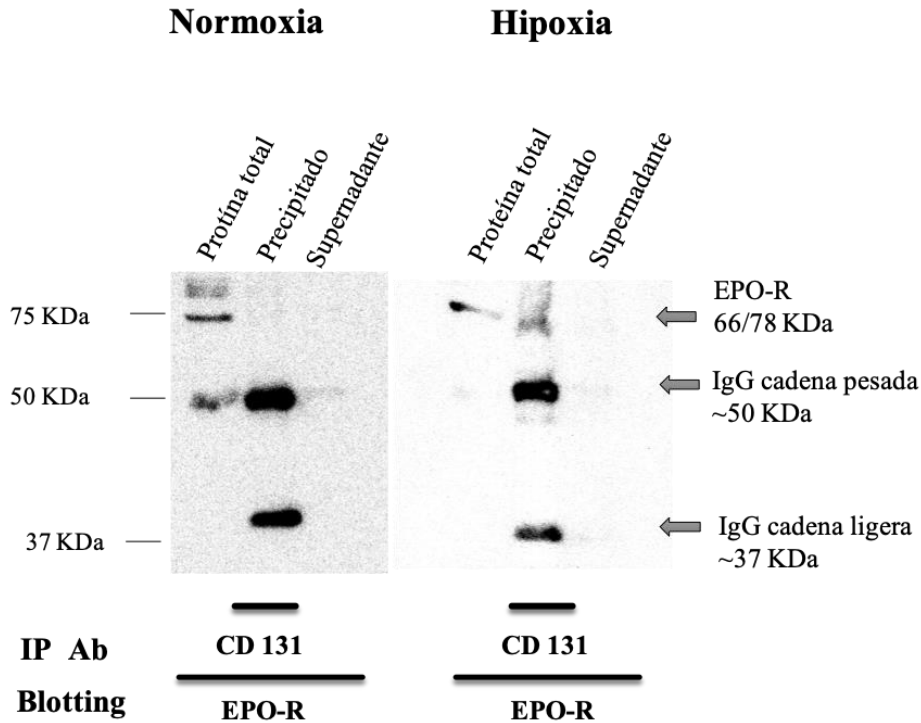


Figura 12 Co-inmunoprecipitación e inmunodetección de EPO-R y CD131 en células tubulares renales normóxicas e hipóxicas. Las células embrionarias de riñón humano se mantuvieron en normoxia o hipoxia por 24 h. El extracto proteico (500ug) se incubó con anticuerpo contra CD131 y se inmunoprecipitó con proteínas A/G unidas a agarosa. Posteriormente se hizo una inmunodetección para EPO-R. El inmunoprecipitado de las células en hipoxia muestran una banda de aproximadamente 75 kDa, que corresponde al peso de EPO-R, misma que no se observa en el inmunoprecipitado de las células en normoxia. Las bandas que se observan en un peso de 37 y 50 kDa corresponden a las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina (anticuerpo contra CD131), respectivamente.

Como se puede observar en la figura 12, tanto en el extracto total de proteína como en el inmunoprecipitado (IP) de CD131 de las células hipóxicas se inmunodetectó EPO-R, con un peso aproximado de 75 KDa. Mientras que en el IP de CD131 de las células en normoxia no se detectó EPO-R.

RESULTADOS

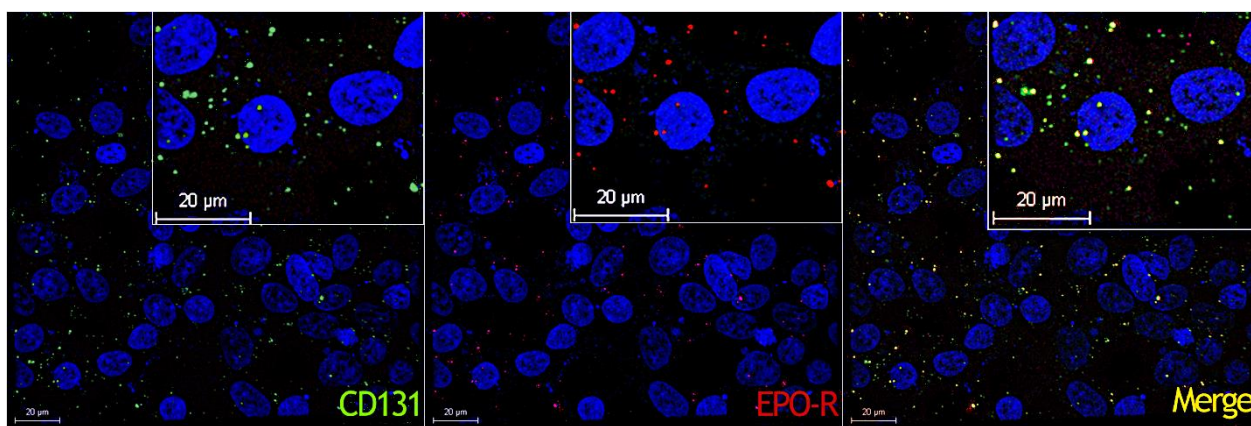


Figura 13 *Inmunofluorescencia de EPO-R y CD131 en células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.* Las células tubulares embrionarias de riñón humano se mantuvieron en hipoxia por 24 h en ausencia (-) y presencia (+) de rhEPO. Se observa la expresión de CD131 y EPO-R y la co-localización de ambas proteínas en las células, confirmando la conformación del receptor EPO-R/CD131 en hipoxia, independientemente de la adición de rhEPO. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Las células tubulares embrionarias de riñón humano HEK 293 fueron incubadas en hipoxia y en ausencia (-) y presencia (+) de rhEPO, con el fin de averiguar si el ligando tiene algún efecto en la localización del receptor EPO-R/CD131 en las células.

Con estos resultados se confirma que el receptor EPO-R/CD131 se expresa y se forma en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.

RESULTADOS

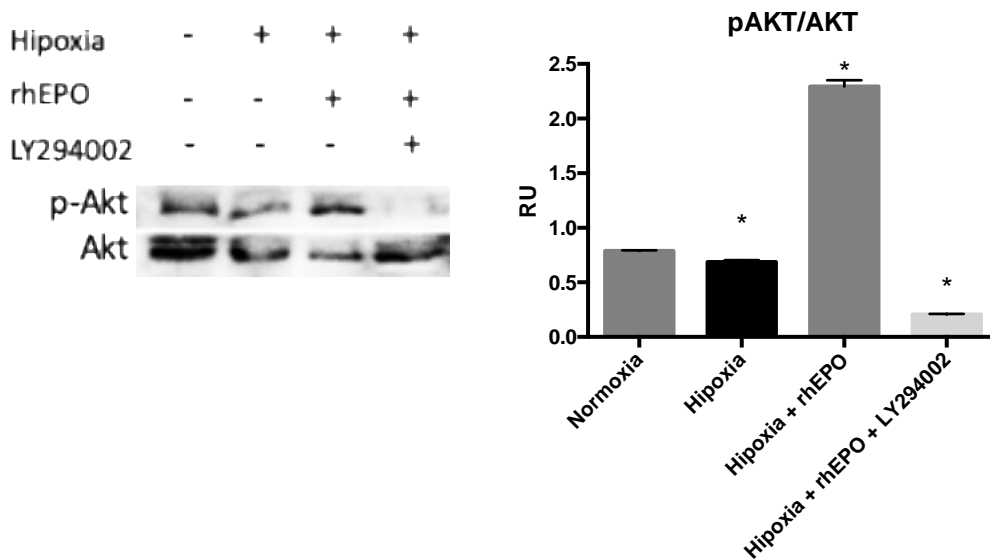
Resultados del objetivo 2:

Evaluar la fosforilación de proteínas cinasas involucradas en la activación del receptor EPO-R/CD131 en las células de riñón humano durante la hipoxia.

Cinasas efectoras en la activación de EPO-R/CD131

El siguiente objetivo consistió en evaluar si el receptor expresado durante la hipoxia es funcional. Esto es, averiguar si el receptor puede ser activado por su ligando rhEPO mediante la fosforilación de cinasas que han sido descritas como efectoras en distintos tejidos como el neuronal, cardíaco, hepático y renal (figura 5, mostrada en los antecedentes). La vía de señalización propuesta que se analizó fue la vía de señalización PI3/Akt que lleva al bloqueo de GSK-3 β al ser fosforilada en el residuo de Serina 9. Estas cinasas son las efectoras de la protección al daño del tejido por la inhibición de la apoptosis en el riñón (Coldewey et al., 2013; Kitamura et al., 2008; Wang et al., 2010).

Por lo anterior se evaluó la fosforilación de las cinasas Akt y GSK-3 β como indicador de la activación del receptor EPO-R/CD131 en las células tubulares embrionarias de riñón humano HEK 293 cultivadas en hipoxia y en presencia de rhEPO (100 U/mL). Para confirmar la activación funcional del receptor EPO-R/CD131 por su ligando se utilizó el compuesto químico LY294002 (10 nM) que bloquea a la cinasa PI3K. La PI3K es activada por el receptor y fosforila a Akt. En la figura 14, que a continuación se presenta, se muestran los resultados de la fosforilación de Akt.



RESULTADOS

Figura 14 Western blot de fosfo-Akt en células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia. Análisis cuantitativo de la proteína Akt en sus formas nativa y fosforilada en células HEK-293 en normoxia o hipoxia (24h), en ausencia (-) y presencia (+) de rhEPO (100 U/ml) e inhibidor de PI3K (LY294002). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar de unidades relativas (RU) del cociente de la proteína fosforilada y su forma nativa. * P <0.05.

Según los resultados de la figura 14, se puede observar que el tratamiento con rhEPO durante la hipoxia indujo mayor fosforilación de Akt que sin rhEPO o normoxia, lo que indica que Akt es activado por el receptor EPO-R/CD131. El bloqueo de PI3K con LY29400 en presencia de rhEPO, interrumpió la fosforilación de Akt, lo que confirma que la activación de Akt es dependiente de PI3K, ruta activada por el receptor EPO-R/CD131.

Se analizó tanto la activación de GSK-3 β (pY216), como su inactivación (pS9), durante la hipoxia en presencia y ausencia de rhEPO (figura 15).

RESULTADOS

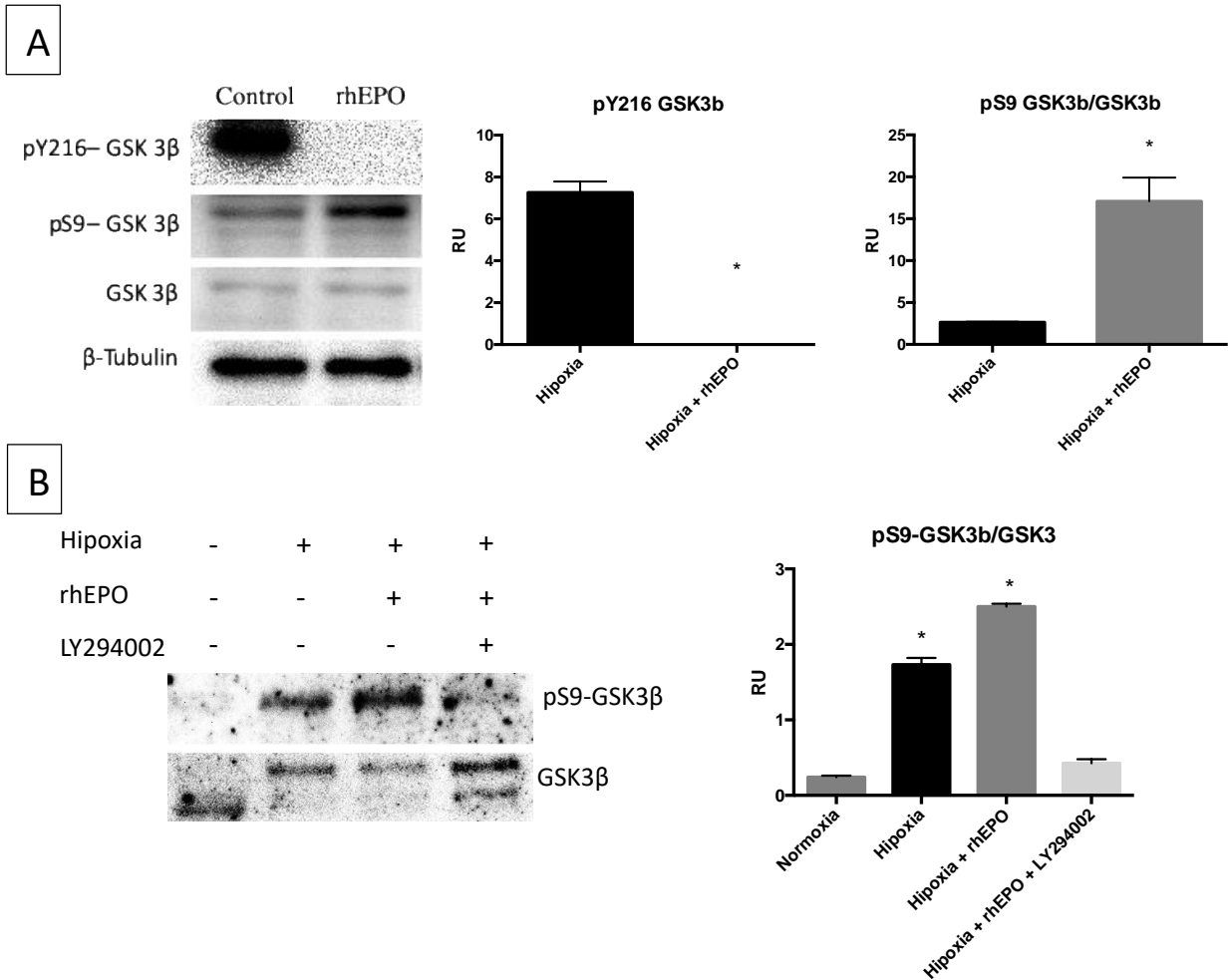


Figura 15 Western blot de fosfo Y216-GSK-3 β y fosfo S9-GSK-3 β en células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia. Análisis cuantitativo de las proteínas GSK3b y sus formas fosforiladas (Y216 y S9) y b-tubulina en células HEK-293 en hipoxia (24h). Panel A, células en hipoxia en ausencia (control) y presencia de rhEPO (100 U/mL). Panel B, células en normoxia o hipoxia en ausencia (-) y presencia (+) de rhEPO (100 U/mL) con o sin el inhibidor de PI3K (LY294002). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar de unidades relativas (RU) del cociente de la proteína fosforilada y su forma nativa. * P <0.05.

Como se observa en la figura 15, la forma activa de GSK3 β (pY216) se expresa abundantemente en las células tubulares embrionarias de riñón humano (HEK-293) en hipoxia. Mientras que ante el estímulo con eritropoyetina (rhEPO, 100 U/mL), ligando de EPO-R/CD131, se inhibió la actividad de GSK-3 β (ausencia de fosforilación en tirosina 216 y aumento de la fosforilación en la serina 9; pS9).

Estos resultados demuestran que el receptor EPO-R/CD131 es funcional en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia y que, al ser activado, el receptor EPO-R/CD131 bloquea

RESULTADOS

la actividad de GSK-3 β , cinasa efectora de la apoptosis. Por lo que la activación del receptor EPO-R/CD131 puede inhibir la apoptosis de células tubulares embrionarias de riñón humano, inducida por la hipoxia.

Resultados del objetivo 3:

Estimar el nivel de apoptosis en las células de riñón humano durante la hipoxia con bloqueo de la actividad del receptor EPO-R/CD131.

El siguiente objetivo consistió en evaluar el papel del receptor EPO-R/CD131 en la regulación de la apoptosis inducida por la hipoxia. Las células HEK-293 fueron cultivadas en condiciones estándares o suplementadas con CoCl₂ 800 uM, como inductor químico de hipoxia. Las células se suplementaron con CoCl₂ 800 uM, CoCl₂ 800 uM más rhEPO (100U/mL), CoCl₂ 800 uM más rhEPO y LY294002 (10 nM) o CoCl₂ 800 uM más rhEPO y Chrysin (30 uM). LY294002 se utilizó para bloquear la señalización del receptor activada por rhEPO y así descartar otros mecanismos antiapoptóticos no relacionados.

RESULTADOS

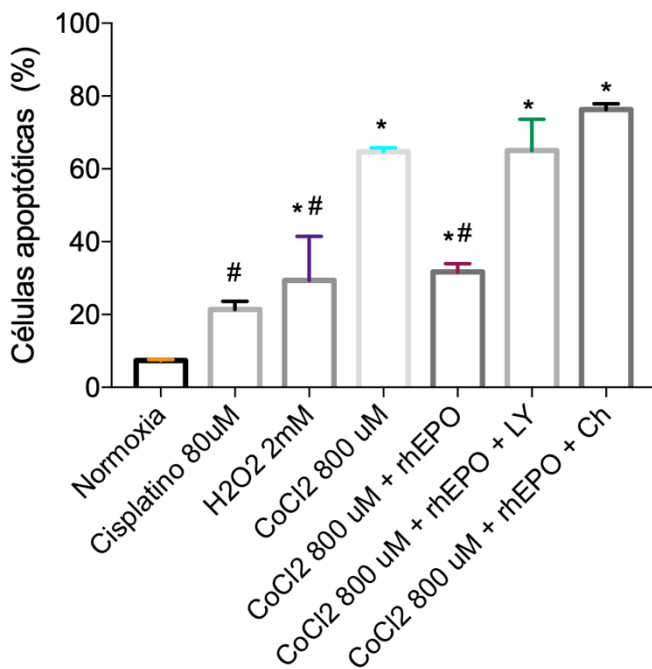
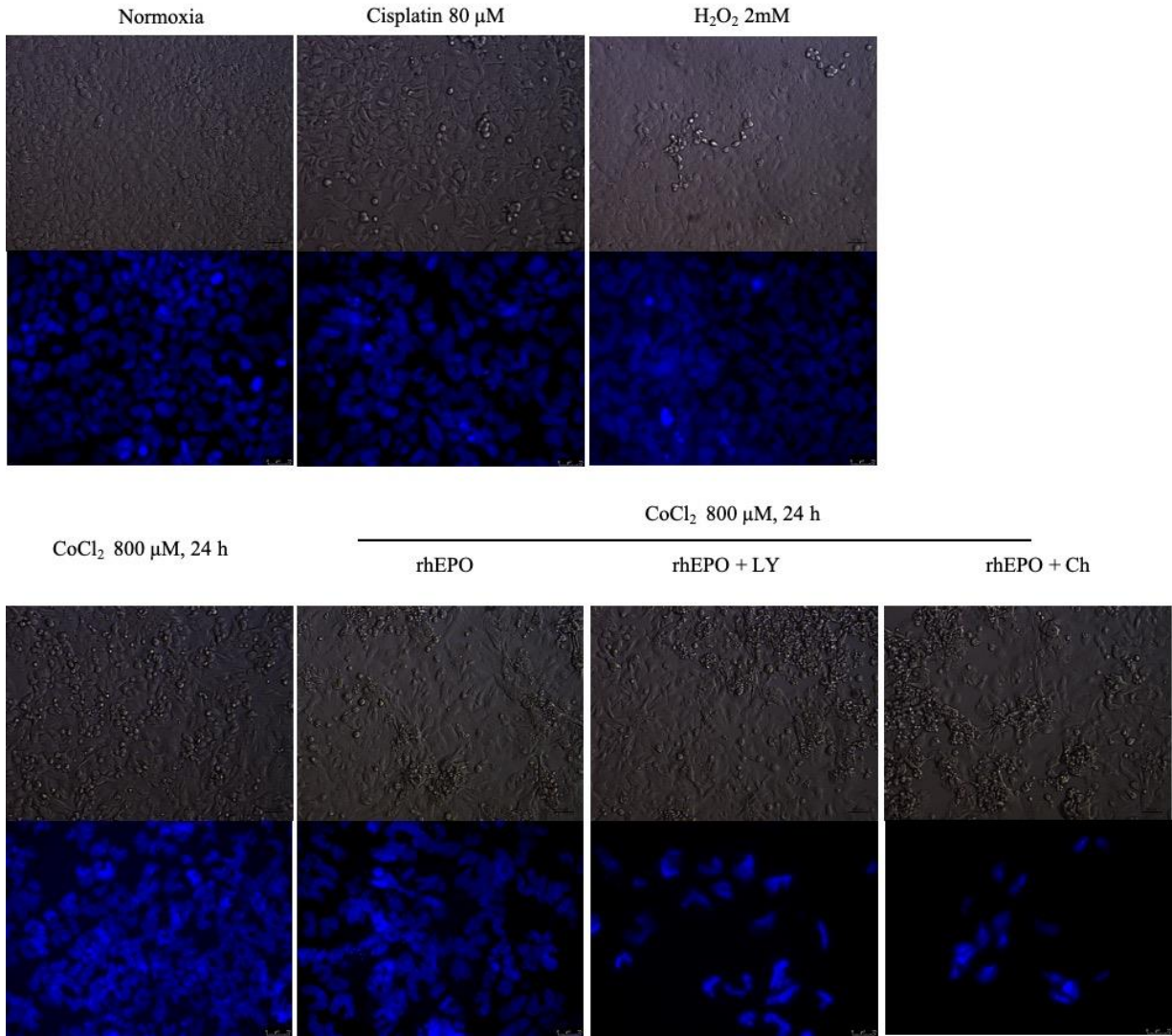


Figura 16 Inhibición de apoptosis por la activación del receptor EPO-R/CD131 en células tubulares embrionarias de riñón de humano en hipoxia. Análisis cualitativo y cuantitativo de células HEK293 con fragmentación de cromatina (apoptosis) a las 24h de los tratamientos: medio de cultivo (-), CoCl₂ 800uM, CoCl₂ 800 uM + rhEPO 100 U/mL, CoCl₂ 800 uM + LY294002 (LY) 10 nM, CoCl₂ 800 uM + Chrysin (Ch) 30 mM, además de Cisplatino 80 uM y H₂O₂ 2 mM como inductores de apoptosis. Imágenes de contraste de fases (objetivo 20X) y fluorescencia (objetivo 40X) de células teñidas con Hoechst 33342. Los datos se expresan como media ±

RESULTADOS

desviación estándar. Significancia, $P < 0.05$, * diferencia respecto a normoxia, # diferencia respecto a CoCl_2 800 μM .

En la figura 16 se puede apreciar que las células en hipoxia química (CoCl_2 800 μM) mostraron una evidente morfología de daño, incluso más pronunciada que en los controles de muerte, cisplatino 80 μM y H_2O_2 2 mM. El tratamiento con rhEPO (100 U/mL) disminuyó considerablemente el porcentaje de células en apoptosis por hipoxia, lo que ratifica que la función del receptor es inhibir la apoptosis. Mientras que el tratamiento con LY294002, bloqueador de la activación de Akt, interrumpió el efecto antiapoptótico de rhEPO, lo que confirma que el efecto anti-apoptosis del receptor EPO-R/CD131 es dependiente de la vía PI3/Akt.

Por otro lado, el tratamiento con Chrysin, inhibidor de HIF-1 α , también bloqueó el efecto anti-apoptosis de rhEPO y a su vez, rhEPO no pudo contrarrestar los efectos proapoptóticos de Chrysin aditivos a los de CoCl_2 800 μM , lo que sugiere que el efecto protector antiapoptótico del receptor EPO-R/CD131 puede estar regulado por HIF-1 α . Adicionalmente, se observó que con LY294002 al igual que con Chrysin las células pierden su adherencia, lo que sugiere que con este tratamiento se estaría bloqueando otras vías de supervivencia.

DISCUSIÓN

Discusión

La hipoxia reduce la viabilidad celular de las células embrionarias tubulares de riñón de humano

Los resultados muestran que la hipoxia produce un decremento en la viabilidad celular de un 20 % comparado con las células en normoxia. L. Zhang et al., 2019 demostraron en la línea celular HK2, células epiteliales de riñón adulto de humano, que la proliferación es inversa al tiempo de exposición a la hipoxia. A partir de las 24 h en hipoxia encontraron diferencias significativas en el aumento de apoptosis.

Una disminución en la proliferación celular por la hipoxia también se ha demostrado en las células cardíacas, estas células al igual que las epiteliales renales son propensas a los cambios de presión del oxígeno. Mata-Greenwood, Goyal, & Goyal, 2017 demostraron que la disminución de la presión de O₂ produjo un decremento de la viabilidad en células endoteliales en hipoxia crónica (0.5% de O₂ por 72 h). De manera contrastante, Lee y colaboradores en el 2013 demostraron que la hipoxia induce proliferación en diversas líneas celulares epiteliales entre ellas las HEK-293, ellos evaluaron la proliferación en hipoxia por 24 h y a partir de las 6 h observaron un aumento en la proliferación comparado con las células normóxicas (Lee et al., 2013). El propósito de ese trabajo fue averiguar el papel de RECK, que es un supresor de tumores y encontraron que HIF-1 α inhibe su expresión. Esta inhibición activa a HIF-2 α la cual fosforila a c-Myc y STATs, factores de transcripción que inducen la proliferación celular.

La hipoxia causa fragmentación del ADN en las células tubulares embrionarias de riñón humano

Aunado al resultado previo, para comprobar que el decremento en la viabilidad celular se debió a la apoptosis se llevaron a cabo análisis de fragmentación del ADN por electroforesis en geles de agarosa. Los resultados obtenidos muestran que la hipoxia y el CoCl₂ provocaron fragmentación del ADN concordante con apoptosis, al igual que los controles de daño. Samanta et al., (2018) evidenciaron por la misma técnica que la hipoxia induce fragmentación de ADN en células renales De acuerdo con lo anterior ¿Cómo es que la hipoxia puede provocar la fragmentación del ADN?

DISCUSIÓN

En primer lugar, la baja pO_2 en la hipoxia puede reducir la habilidad de la célula para mantener sus niveles basales de energía que son obtenidos de la glucólisis y la fosforilación oxidativa lo que conllevará a una adaptación metabólica estimulando, por ejemplo, la proliferación celular y angiogénesis.

Sin embargo, dependiendo de la severidad en la privación de oxígeno o en tiempos prolongados, la hipoxia puede inducir apoptosis a causa de la hiperpermeabilidad de la membrana mitocondrial interna, esto es, la falta de oxígeno inhibe la cadena transportadora de electrones y por lo tanto causa un decremento en el potencial de membrana mitocondrial (Tsujimoto, Nakagawa, & Shimizu, 2006). Adicionalmente, la disminución de ATP causa la activación de Bax o Bak (proteínas proapoptóticas) que perforan la membrana mitocondrial y provocan la liberación del citocromo C al citosol, lo que conlleva a la activación de las caspasas 9 y 3 (Westphal, Dewson, Czabotar, & Kluck, 2011). La caspasa 3 escinde a ICAD (inhibidor de la caspasa-DNAasa activada) de la CAD y CAD es activada. La CAD es la responsable de la fragmentación del ADN entre los nucleosomas (Larsen & Sørensen, 2017).

Distintos trabajos han demostrado que la hipoxia causa apoptosis en células epiteliales renales. Utilizando la línea HK2 se encontró un aumento en las células con el ADN fragmentado (células TUNEL positivas) a las 24 y 48 h de exposición a hipoxia respecto de las células normóxicas.

Por otro lado, el H_2O_2 es un estresor oxidativo que induce apoptosis en las células epiteliales renales a través de la vía mitocondrial con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C y la activación de caspasas 9 y 3 (Xiang, Wan, Guo, & Guo, 2016; Zhuang, Yan, Daubert, Han, & Schnellmann, 2007).

Yang et al., (2008) reportaron que las células HEK393 incubadas con $CoCl_2$ a una concentración de 200 μM por 24 h causó un porcentaje de 5% apoptosis, aproximadamente. Otro reporte muestra que el $CoCl_2$ usado a las concentraciones de 150 μM y 300 μM en células embrionarias de ratón, aumenta la viabilidad las primeras 12 h y posteriormente se observa un decremento de esta.

Análisis de la expresión de HIF-1 α como validación del modelo de hipoxia en las células

DISCUSIÓN

En normoxia el gen de *HIF-1 α* es expresado pero la proteína es degradada. La rápida degradación de HIF-1 α por el proteosoma en la normoxia resulta de su ubiquitinación por la proteína von Hippel Lindau (VHL). La unión de VHL a HIF-1 α requiere de la hidroxilación de HIF-1 α en su dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) por prolinas hidroxilasas (Bruick & McKnight, 2001). En hipoxia, menos de 10 mm Hg de presión parcial de O₂ en el riñón, la reacción de hidroxilación de prolinas es inhibida, por lo tanto, la interacción VHL/HIF-1 α se evita y HIF-1 α ya no puede ser degradada resultando en su estabilización y acumulación. Por lo cual se verificó la expresión de HIF-1 α en las células hipóxicas (Q. Fu et al., 2016).

HIF-1 α se estabiliza en las células tubulares embrionarias de riñón humano como respuesta a hipoxia. En los resultados obtenidos, se demostró la estabilización de la proteína HIF-1 α por Western blot. L. Zhang et al., (2019) mostraron por Western blot que el nivel de expresión de HIF-1 α en las células HK-2 alcanzó su punto máximo de expresión a las 12 h de hipoxia y posteriormente su expresión fue disminuyendo; a las 72 h de hipoxia no se encontró diferencia significativa de la expresión de HIF-1 α respecto a las células normóxicas. La expresión de HIF-1 α en el modelo de hipoxia empleado indica que el método y tiempo para los experimentos fue el indicado.

Una vez estabilizada, HIF-1 α transloca hacia el núcleo y se dimeriza con HIF-1 β formándose el factor de transcripción HIF-1. El factor de transcripción HIF-1 se une a los Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE por sus siglas en ingles) y activa la transcripción de genes diana. En modelos de enfermedad renal crónica se ha descubierto que con la estabilización de HIF-1 α se transcriben genes profibróticos, entre los cuales esta la *fibronectina* y *FSP1*, un marcador de la transición epitelio mesenquimal (EMT). Por lo tanto, la detección de HIF-1 α en el presente trabajo indica además que HIF-1 estaría activo en la transcripción de genes y en la activación de rutas de señales en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.

EPO-R y CD131 se expresan en las células tubulares embrionarias de riñón por la hipoxia

Una vez validado el modelo de hipoxia en las células HEK293 se evaluó si las proteínas EPO-R/CD131 se expresan en dichas células para formar el receptor. De manera interesante, se observó

DISCUSIÓN

que ambas proteínas EPO-R y CD131, no solo se expresaron si no que se sobreexpresaron en hipoxia.

La banda de proteína detectada por el anticuerpo que se utilizó (D-5; sc-365662) corresponde a la isoforma de EPO-R completa y funcional, EPO-R-F, con un peso de ~75 KDa aproximadamente (Gene Cards, UNIPROT; Gene ID: 2057). EPO-R puede presentar otras dos isoformas: la trunca y la soluble, EPO-R-T y -S respectivamente. El anticuerpo que se usó detecta aminoácidos en el dominio citoplasmático del extremo carboxilo terminal, que está ausente en EPO-R-T y en la isoforma soluble.

Específicamente, la proteína CD131 mostró una sobreexpresión en todos los tratamientos, pues la expresión basal fue evidentemente menor. Investigaciones previas han demostrado que CD131 se expresa en células de estirpe no hematopoyético (Vázquez-Méndez et al., 2020) Por ejemplo, Bohr y colaboradores (2014), reportaron que el estrés oxidativo por butilhidroxiperóxido y la inflamación por LPS desencadenaron la translocación de CD131 a la superficie celular en líneas celulares de origen mesénquimático (células de medula ósea y fibroblastos aórticos primarios de ratón), comprobando que el receptor CD131 también se expresa en células no hematopoyéticas (Bohr et al., 2014). Particularmente, CD131 se expresa en el tejido renal con una mayor expresión en las células tubulares proximales de la corteza renal, en ratas con daño renal agudo (Tögel et al., 2016).

Con el objetivo de proponer una vía de señalización por la cual CEPO, una eritropoyetina modificada por carbamilación llevando a la transformación de residuos de lisina a homocitrulina, que tiene un efecto de neuroprotección, se realizó un análisis del transcriptoma en el hipocampo de ratas y en células PC12 y se demostró que la CEPO incrementó la expresión del ARNm de ciertos genes incluido el de CD131, aunque CD131 no fue inducido por rhEPO en las células PC12. En ese estudio los animales y células no recibieron ningún estímulo estresor, solo recibieron la administración de CEPO o rhEPO (Tiwari, Sathyanesan, Schweinle, & Newton, 2019).

Con los resultados aquí presentados se demuestra que CD131 se expresa en las células tubulares embrionarias de riñón humano en estímulos estresores.

A diferencia de CD131, la literatura muestra una gran cantidad de trabajos en modelos murinos de enfermedad renal aguda que reportan la expresión de EPO-R a nivel transcripcional y traduccional (M. Shi et al., 2018).

DISCUSIÓN

Además de las células renales de animales, la expresión de EPO-R también se ha demostrado en células renales humanas (De Beuf et al., 2009; Hu et al., 2013). Elliott et al., (2012), reportaron un nivel bajo de expresión de la proteína de EPO-R en distintos tipos de células de riñón humanas entre ellas las HEK293. En concordancia con lo que se encontró, en normoxia el nivel de expresión de EPO-R resultó indetectable.

Pero ¿Qué sucede cuando las células tubulares epiteliales humanas están bajo un estímulo dañino? De Beuf et al., 2010 demostraron que el estrés oxidativo con H₂O₂ induce la expresión de EPO-R, en células tubulares humanas, así como se demostró aquí que EPO-R es sobreexpresado cuando las células están en estrés por hipoxia. Contrastantemente, Chou et al., 2019 reportaron que en las células tubulares de ratas isquémicas no se observó expresión de EPO-R ni de CD131. No especifican los anticuerpos para detectar a EPO-R (Santa Cruz) y CD131 (Bioss Antibodies Inc). Ellos establecieron un modelo de isquemia con nefrectomía.

Ahora bien, sabiendo que EPO-R y CD131 se sobreexpresaron en las células tubulares renales en hipoxia, se prosiguió a averiguar si estas dos proteínas interaccionan entre sí para formar un receptor. Lo anterior fue demostrado por la co-inmunoprecipitación mostrada en la figura 12. El resultado indica que EPO-R coinmunoprecipitó con CD131 únicamente en hipoxia, lo cual confirma que se formó el heteroreceptor dependiente del gradiente de oxígeno, pero no en normoxia. Es importante destacar que las células no recibieron estímulo de rhEPO ni previo ni durante la hipoxia. Por lo que la expresión y conformación del heteroreceptor EPO-R/CD131, fue un evento inducido por la hipoxia.

Brines y colaboradores (2004) proponen que ambos receptores están unidos mediante un enlace disulfuro. Cheung Tung Shing et al., 2018 propusieron por modelaje molecular que los fragmentos extracelulares, es decir la porción N- terminal de EPO-R y CD131 pueden interactuar en ausencia de EPO, suponiendo que los dos receptores se reacomodan estructuralmente y permitan la unión de EPO. Kitamura et al., 2008 argumentaron que los efectos renoprotectores de rhEPO en la disminución de células apoptóticas tubulares de ratas en un modelo de obstrucción unilateral de uretra, modelo típico de la enfermedad renal crónica, fue debido a la activación del receptor EPO-R/CD131, sin embargo, no muestran evidencia de la expresión de las proteínas ni de su interacción.

DISCUSIÓN

La colocalización de EPO-R y CD131 ha sido evidenciada en células del músculo esquelético de humanos con un daño isquémico (Joshi et al., 2014). En el presente trabajo se demuestra la interacción de EPO-R/CD131 en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia. Por consiguiente, para saber si este receptor era activado en hipoxia se estudió las cinasas reportadas en su activación.

El receptor EPO-R/CD131 es funcional a través de la vía PI3/Akt/GSK-3 β

En progenitores de eritrocitos EPO señala mediante la fosforilación de STAT5 A y B además de JAK-2 (Elliott et al., 2012; Heir et al., 2016). Para las células renales se ha propuesto que el efecto renoprotectivo de EPO y sus derivados es mediante la activación de la vía antiapoptótica PI3K/Akt (Cassis et al., 2012). De acuerdo con lo reportado, se encontró un incremento en la fosforilación de Akt cuando las células epiteliales renales humanas estuvieron en hipoxia y en presencia de rhEPO.

La función de PI3K, fosfatidil inositol 3 quinasa, es fosforilar a PIP2 (fosfatidil inositol bifosfato) que se encuentra en la membrana plasmática y generar el segundo mensajero; el fosfatidil inositol trifosfato (PIP-3). PIP-3 recluta a Akt a la membrana plasmática permitiendo su fosforilación.

Para comprobar que Akt es una cinasa intermediaria de la activación de EPO-R/CD131, su activación fue bloqueada químicamente con el inhibidor de PI3K, LY294002, dando como resultado la disminución de la fosforilación de Akt. El incremento, aunque no significativo, de pAkt en ausencia de rhEPO puede haberse debido, como lo reporta J. Zhang et al., (2018) a una respuesta adaptativa para ayudar a las células a recuperarse de la hipoxia. Akt inhibe a la cinasa glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) fosforilándola en el residuo Serina 9. GSK-3 β regula el mecanismo de apoptosis intrínseca (Beurel, E., Jope, 2006).

GSK-3 β fosforila a Bax, proteína proapoptótica expresada constitutivamente en la célula, una vez activada Bax se oligomeriza y permeabiliza la membrana externa de la mitocondria formando poros *de novo* o abriendo los existentes, liberando al citocromo c y otros factores proapoptóticos los cuales activan a la caspasa 9. Wang et al., (2010) mostraron que pY216-GSK-3 β induce la apoptosis *in vitro* en células epiteliales renales con un nivel bajo de ATP e *in vivo* en un modelo murino de isquemia renal aguda. Este grupo de investigación demostró que pY216-GSK-3 β

DISCUSIÓN

fosforila y activa a Bax y que el silenciamiento del gen de GSK-3 β redujo la apoptosis inducida por la depleción de ATP.

Howard et al., (2013) demostraron que la supresión del gen GSK-3 β en células tubulares proximales reduce su apoptosis e induce la proliferación celular, con la estabilización y acumulación de los factores pro-proliferativos, ciclina D1 y c-myc, después del daño renal agudo. Otro trabajo demostró que GSK-3 β se expresa en células en hipoxia y que su actividad indujo la apoptosis y que esta pudo ser prevenida por inactivación de GSK-3 β mediada por Akt (Loberg, Vesely, & Brosius, 2002). En concordancia con Loberg et al., (2002) los resultados muestran que GSK-3 β se expresa en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia.

Se ha reportado que el peso molecular de GSK-3 puede ser aumentado debido a la O-glicosilación, esta modificación postraducciona determina la estabilidad de la proteína, capacidad de interacción y estado de fosforilación (Leney, El Atmioui, Wu, Ovaa, & Heck, 2017). J. Shi et al., (2012) demostraron que la O-glicosilación es necesaria para la inactivación de GSK-3 β por fosforilación en el residuo Ser9 en células HEK 293FT.

En la O-glicosilación, la enzima O-GlcNAc transferasa (OGT) agrega moléculas de N-Acetilglucosamina (GlcNAc) a los residuos serina y treonina a partir de Uridina-5-difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (Very et al., 2018). Se ha reportado que la hipoxia aumenta la actividad de la enzima OGT (Fisi, Miseta, & Nagy, 2017). Adicionalmente, HIF-1 α induce la transcripción del gen *GFAT* que codifica a la enzima que regula la producción de UDP-GlcNAc (Shirato et al., 2011).

Otro resultado mostró que en la hipoxia con rhEPO y el inhibidor LY no hubo diferencia significativa de la fosforilación de pSer9 GSK-3 β respecto a normoxia, es decir, como si LY estuviese inhibiendo la glicosilación, a partir de esto surgió la siguiente pregunta: ¿Hay alguna conexión entre la vía PI3K/AKT y la activación de la enzima OGT? Sí, Akt activa a mTOR y Very et al., 2018 demostraron que la OGT y O-GlcNAcetilación es regulada por mTOR en células normales del colon. En este trabajo se demostró que GSK-3 β esta activada en las células tubulares embrionarias de riñón humano en hipoxia. Otros trabajos también han reportado que GSK-3 β es inducido después de un daño celular, por ejemplo: estrés oxidativo en células tubulares (Lu et al., 2019) o alta concentración de glucosa en podocitos (J. Guo, Yang, Qiao, & Liu, 2016). La vía PI3K/Akt/ GSK-3 β fue activada por rhEPO mediante el receptor EPO-R/CD131.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que las células en hipoxia mostraron fosforilación de GSK-3 β en tirosina 216 (figura 15). Lo cual puede explicar la inducción de apoptosis inducida por la hipoxia a través de esta cinasa. No obstante, cuando las células se incubaron con rhEPO, se observó un incremento significativo de la fosforilación de GSK-3 β en serina 9 y una disminución muy marcada de la fosforilación de GSK-3 β en tirosina 216, concordando con el efecto de inhibición de apoptosis a través del receptor EPO-R/CD131 por la vía PI3K/Akt. La fosforilación de Ser9 GSK-3 β decreció cuando se bloqueó la actividad cinasa de Akt.

La hipoxia activa la cinasa glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) al ser fosforilada en la tirosina 216 (Y216). Otra de las respuestas celulares de GSK-3 β activada es desestabilizar hasta la degradación al complejo asociado a polipéptidos nacientes (NAC), que participa en la maduración adecuada de las proteínas recién sintetizadas. La acumulación de proteínas no plegadas, por ausencia de NAC, desencadena el estrés del retículo endoplásmico (RE) y se considera parte de las respuestas celulares a la hipoxia (Hotokezaka et al., 2009). Las respuestas al estrés del RE activadas específicamente causan disfunción mitocondrial, que resulta en apoptosis a través de la activación de las caspasas. Adicionalmente, GSK-3 β activada fosforila a la β -catenina para ser degradada en el proteasoma (Maurer, Preiss, Brauns-Schubert, Schlicher, & Charvet, 2014) y como se mencionó anteriormente, GSK-3 β activada induce la apoptosis al activar a Bax (Beurel, E., Jope, 2006).

Los factores de crecimiento protegen a las células de la muerte celular activando las vías de señalización de supervivencia mediada por cinasas. Una vía de señalización clave que promueve potentemente la supervivencia celular, que es inducida por la señalización de receptores de factores de crecimiento, es la vía PI3K. Se ha demostrado que la señalización de PI3K, así como su cinasa sustrato *in vivo*, AKT, suprime la apoptosis inducida por Myc, miembro proapoptótico de la familia de proteínas Bcl-2. Es importante destacar que la señalización PI3K-Akt inhibe la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, un evento que representa el paso decisivo en la vía de apoptosis intrínseca para la liberación del citocromo C y otras proteínas que se encuentran en el espacio de la intermembrana mitocondrial y que están reguladas por miembros de la familia Bcl-2, como Bax (Beurel, E., Jope, 2006). GSK-3 β es un sustrato directo de Akt. Akt

DISCUSIÓN

inactiva a GSK-3 β fosforilándola en la serina 9 (pS9), por lo que la señalización PI3K-Akt-pS9-GSK-3 β inhibe la apoptosis (Maurer et al., 2014).

Efecto antiapoptótico de la activación del receptor EPO-R/CD131

Para averiguar si la activación del receptor disminuía la apoptosis en las células embrionarias de riñón humano se incubaron, siguiendo a Yang et al., 2008, en CoCl₂ 800 μ M por 24 h. En esta concentración los autores reportaron un porcentaje mayor al 50 % de núcleos teñidos apoptóticos en las células HEK293.

Como se ha mencionado anteriormente, el CoCl₂ estabiliza a HIF-1 α por lo que se utiliza para mimetizar la hipoxia. El CoCl₂ sustituye al ion ferroso (Fe²⁺) por el ion cobaltoso (Co²⁺) en el centro de unión al Fe²⁺ de la proteína proil hidroxilasa dando como resultado la inactivación de la proteína y de esta manera se reduce la hidroxilación de HIF-1 α evitando su degradación. A este método se le conoce como inducción química de hipoxia. Gran cantidad de grupos de investigación lo han utilizado para estudiar la hipoxia en diferentes condiciones y estirpes celulares. Bajo este contexto se utilizó CoCl₂ para inducir muerte celular por hipoxia.

Como se observa en los resultados las células en hipoxia tuvieron un porcentaje de apoptosis mayor que los controles de daño. Pero el porcentaje de células apoptóticas fue disminuido cuando estas se incubaron con rhEPO, esta disminución de la apoptosis se debió a la activación del receptor EPO-R/CD131.

Según el mecanismo aquí descrito, al activarse el receptor la fosfatidil inositol 3 recluta a Akt para su posterior fosforilación, una vez activada Akt a su vez fosforila el residuo de serina 9 de GSK-3 β inhibiendo su función. La inhibición de la apoptosis mediada por la inactivación de GSK-3 β ha sido demostrada en diferentes estirpes celulares, como por ejemplo en la línea celular PC12 (Culbert et al., 2001). La inhibición de GSK-3 β desencadenaría la activación de diferentes mecanismos antiapoptóticos. Uno de ellos es que reduce la activación de BAX y previene la liberación del citocromo C de la mitocondria por lo que no es activada la vía de las caspasas (Howard et al., 2013).

DISCUSIÓN

Regresando a los resultados, cuando fue bloqueada la fosforilación de AKT con el inhibidor de PI3K el porcentaje de células apoptóticas fue incrementado lo que indica que la activación del receptor inhibió la apoptosis por la activación de la vía PI3K/Akt. Usando CoCl_2 800 μM , como inductor de hipoxia y Chrysin, un inhibidor de HIF-1 α , el porcentaje de células apoptóticas también fue incrementado por lo que pudiera atribuirse que HIF-1 α participa en la regulación de la activación del receptor. Aunque se ha reportado que Chrysin inhibe la activación de Akt (Maruhashi et al., 2019).

La literatura reporta que además de la activación de Bax otros mecanismos como la inhibición de factores de transcripción de supervivencia como CREB y el factor de choque térmico - 1 generan la apoptosis por GSK-3 β . GSK-3 β es una proteína regulatoria de la acetilación de p53 facilitando su estabilización e inhibiendo su represor, MDM2, previniendo la degradación de p53 (Nayak & Cooper, 2012). Por otro lado, β -catenina ha mostrado ser un blanco que es inhibido por GSK-3 β para inducir la apoptosis. La acumulación de β -catenina causada por la inhibición de GSK-3 β se ha correlacionado con el incremento de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y survivin (Kaga, Zhan, Altaf, & Maulik, 2006).

¿HIF-1 α regula la transcripción de EPO-R en hipoxia?

Como se ha mencionado antes, HIF-1 es el factor de transcripción principal en la regulación de hipoxia. Una vez dimerizadas las HIF-1 α y HIF-1 β , forman el factor de transcripción HIF-1 en el núcleo donde reconoce los HRE o elementos de respuesta a hipoxia de distintos genes. Una vez detectados los HRE o la región consenso detectada por HIF-1 5'-(A/G)CGTG-3', se da inicio a la transcripción genética (W. Liu, Shen, Zhao, & Chen Dr., 2012). Los genes inducidos por HIF-1 han mostrado ser funcionales en diferentes contextos: metástasis, angiogénesis, metabolismo, diferenciación celular y apoptosis (Dengler, Galbraith, & Espinosa, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y con los resultados obtenidos de la sobreexpresión proteínica de EPO-R nos preguntamos si esta se debe a una síntesis *de novo* y si HIF-1 la induce.

Esta muy bien documentado que HIF-1 induce la expresión del gen de eritropoyetina en los fibroblastos intersticiales peritubulares en una manera dependiente de O_2 pero no de su receptor (EPOR-R). La literatura nos muestra que en células progenitoras de eritrocitos el factor de

DISCUSIÓN

transcripción hematopoyético, GATA1, es regulado por HIF-1 (Xie, Li, Feng, Wu, & Li, 2016; X. L. Zhang et al., 2011). GATA1 se expresa en células del linaje hematopoyético y es requerido para la diferenciación de eritrocitos (Ferreira, Ohneda, Yamamoto, & Philipsen, 2005). GATA1 es uno de los factores de transcripción que inducen la expresión de gen EPO-R (GeneCards: GC19M011377) y en células eritroides se mostró que el gen de EPO-R tiene elementos de respuesta a GATA1 y que este activa su expresión genética (X. L. Zhang et al., 2011). En cuanto a células no hematopoyéticas, Kaneko et al., (2017) mostraron que los factores GATA se expresan en el riñón de ratón. Por lo cual se consideró teóricamente en este trabajo que HIF-1 induciría la transcripción de GATA1 en las células tubulares embrionarias de riñón humano.

Se ha demostrado que Akt fosforila a GATA1 en el residuo de serina 310 lo que activa su transcripción en células progenitoras de eritroides de hígado fetal y en células de eritroides (Zhao, Kitidis, Fleming, Lodish, & Ghaffari, 2006; Palani et al., 2008). Con lo anterior se podría decir que si la expresión de EPO-R inducida por hipoxia para completar el receptor EPO-R/CD131 entonces habría mayor producción transcripcional de EPO-R a través de GATA1 en las células tubulares embrionarias de riñón humano y que, al inhibir su activación con LY294002, se observaría lo contrario.

Se han propuestos otros mecanismos que regulan la transcripción de EPO-R, por ejemplo, los sitios que flanquean la región 5' que son hipersensitivos para la DNasa I, otros factores además de GATA1 que induzcan su transcripción (Youssoufian, Longmore, Neumann, Yoshimura, & Lodish, 1993). A nivel traduccional, la proteína EPO-R puede ser regulada negativamente por las proteínas SOCS, supresor de citosinas, que pueden suprimir la señalización de EPO-R (Wojchowski, Sathyanarayana, & Dev, 2010).

En resumen, con los resultados obtenidos en este trabajo y la información de la literatura se propone el siguiente esquema:

DISCUSIÓN

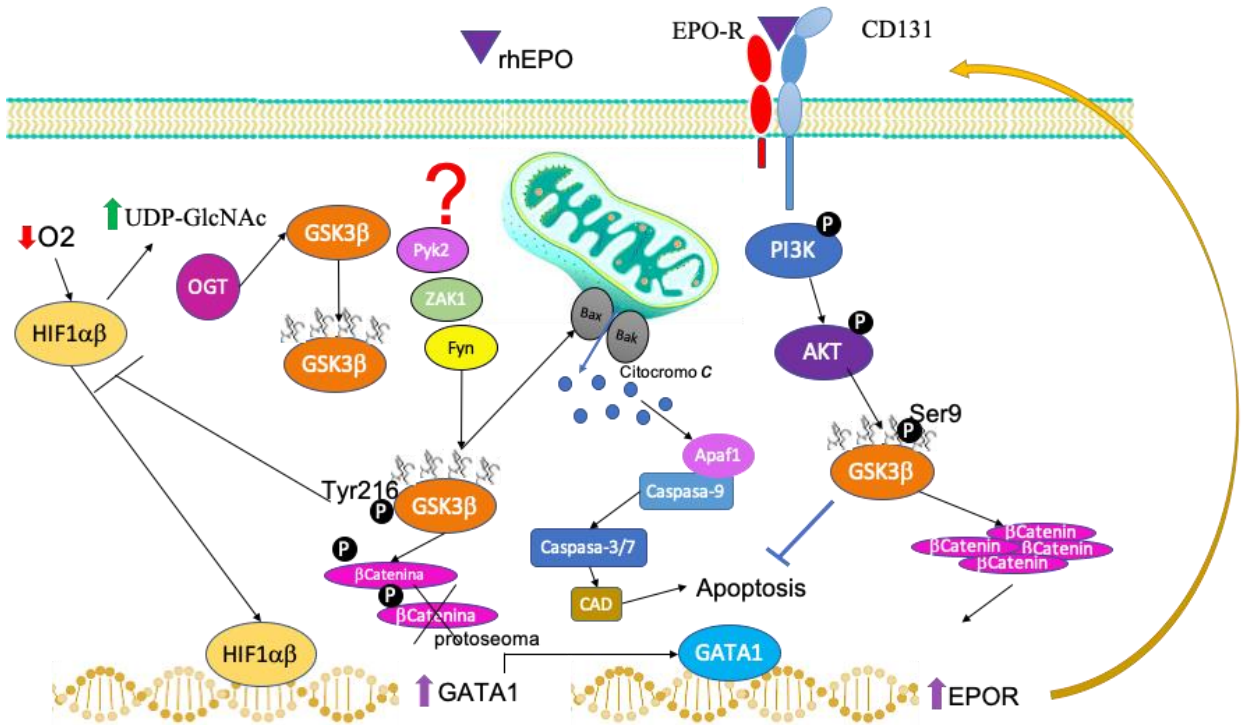


Figura 17. Vía de señalización propuesta para la activación del receptor EPO-R/CD131 en células tubulares embrionarias de riñón humano. Distintas vías de señalización que posiblemente estén relacionadas con la activación del receptor EPO-R/CD131. La hipoxia o baja presión de oxígeno inhibe la degradación de HIF1 α , estabilizando la proteína, que se transloca al núcleo con HIF1 β para formar el factor de transcripción HIF1, el gen GATA 1 tiene elementos de respuesta a HIF1, HRE, desencadenando su transcripción. El gen EPO-R es inducible por los elementos de transcripción que reconocen a GATA1 incrementando su transcripción y traducción para formar el receptor EPO-R/CD131. Con la activación del eje PI3/Akt se fosforila la proteína glicosilada GSK3 β en la serina 9 bloqueando su actividad aparente de apoptosis. Además, se inhibe la degradación de β Catenin que promueve la supervivencia celular. También, la hipoxia aumenta el sustrato UDP-GlcNAc que utiliza la enzima OGT para O-glicosilar proteínas entre ellas GSK3 β , modificación post-traduccional necesaria para la fosforilación. Se han descrito 3 proteínas que fosforilan en la Tyr 2016 de GSK3 β : Pyk2, ZAK1 y Fyn, esta fosforilación causa la degradación de β Catenin por el proteosoma. La vía intrínseca de apoptosis se activa posiblemente por GSK3 β pTyr 216 provocando la liberación de citocromo C con la subsecuente activación de CAD, caspasa activada DNAasa, y la fragmentación del ADN.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Las células tubulares embrionarias de riñón humano expresan el receptor EPO-R/CD131. Este receptor es activado por rhEPO mediante la vía de señalización PI3K/Akt/GSK-3 β en hipoxia. La activación del receptor EPO-R/CD131 inhibe la apoptosis de las células por lo que el receptor, además de ser regulado por hipoxia, tiene la función de proteger a las células renales contra los efectos nocivos de la misma.

Posteriores experimentos son requeridos para proponer los posibles sustratos río abajo de GSK-3 β que participan en la inhibición de la apoptosis. Además de comprobar la inhibición de la apoptosis por rhEPO activando el receptor EPO-R/CD131 con métodos mas robustos.

El estudio de la regulación del gen y proteína de EPO-R en células no hematopoyéticas como las renales esta poco explorado y es un campo de diseño de fármacos de mucho potencial.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., & Chánez Cárdenas, M. E. (2015). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR en tiempo real. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (Vol. 13, pp. 175–202). Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
- Alegre, A., García-Saenz, R., Giraldo, P., Remacha, A., De la Rubia, J., & Steegmann, J. (2005). *Eritropoyetina en hematología* (M. Panamericana, ed.). Buenos Aires.
- Alzari, P. M. (1998). Domains, Immunoglobulin-Type. In P. J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology* (2da ed.).
- Asada, N., Takase, M., Nakamura, J., Oguchi, A., Asada, M., Suzuki, N., ... Kimura, T. (2011). Psjhjo Voefsmjft Sfobm Gjcsptjt. *October*, 121(10). <https://doi.org/10.1172/JCI57301DS1>
- Ashokkumar, B., Vaziri, N. D., & Said, H. M. (2006). Thiamin uptake by the human-derived renal epithelial (HEK-293) cells: Cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 291(4), 796–805. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00078.2006>
- Asiya Parvin, A., Raj Pranap, A., Shalini, U., Devendran, A., Baker, J. E., & Dhanasekaran, A. (2014). Erythropoietin protects cardiomyocytes from cell death during hypoxia/reperfusion injury through activation of survival signaling pathways. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107453>
- Bachmann, S., Hir, M. L. E., & Eckardt, K. (1993). Co-localization of Erythropoietin mRNA and. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(3).
- Baker, J. E., Kozik, D., Hsu, A. K., Fu, X., Tweddell, J. S., & Gross, G. J. (2007). Darbepoetin alfa protects the rat heart against infarction: Dose-response, phase of action, and mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 49(6), 337–345. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318040cf81>
- Bennett, C. ., Silver, S. ., Djulbegovic, B., & Al, E. (2008). Venous thrombo- embolism and mortality associated with recombinant erythro- poietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA*, 299, 914–924.
- Beurel, E., Jope, R. (2006). The paradoxical pro- and anti- apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in Neurobiology*, 79(4), 173–189.
- Bohr, S., Patel, S. J., Vasko, R., Shen, K., Iracheta-Vellve, A., Lee, J., ... Yarmush, M. L. (2014). Modulation of cellular stress response via the erythropoietin/CD131 heteroreceptor complex in mouse mesenchymal-derived cells. *Journal of Molecular Medicine*, 93(2), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1218-2>
- Braun, G. S., & Huber, S. M. (2002). Development of renal function. *Zoology (Jena)*, 105, 341–354.
- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., ... Cerami, A. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common -subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14907–14912. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406491101>
- Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., De Lanerolle, N. C., Cerami, C., ... Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10526–10531. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.19.10526>
- Brines, M., & Cerami, A. (2008). Erythropoietin-mediated tissue protection : reducing collateral damage from the primary injury response. *Journal of Internacional Medicine*, 264, 405–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.02024.x>
- Brines, Michael. (2018). Extrahematopoietic Actions of Erythropoietin. In *Textbook of Nephro- Endocrinology* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803247-3.00024-6>
- Brines, Michael, & Cerami, A. (2012). The Receptor That Temes the Innate Immune Response. *Molecular Medicine*, 18(3), 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00414>
- Broudy, V. C., N.Lin, M.Brice, B.Nakamoto, & T.Papayannopoulou. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human ery- throïd cells. *Blood*, 77, 2583–2590.

BIBLIOGRAFIA

- Broxmeyer, H. E. (2013). Erythropoietin: Multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. *Journal of Experimental Medicine*, 210(2), 205–208. <https://doi.org/10.1084/jem.20122760>
- Bruick, R., & McKnight, S. (2001). A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. *Science*, 294(5545), 1337–1340.
- Bunn, H. F. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(3), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619>
- Byts, N., Samoylenko, A., Fasshauer, T., Ivanisevic, M., Hennighausen, L., Ehrenreich, H., & Sirén, A. L. (2008). Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. *Cell Death and Differentiation*, 15(4), 783–792. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.1>
- Cabrera, L., Ruiz, B., & Sancho, A. (2009). Eritropoyetina: revisión de sus indicaciones. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 33(1), 3–9.
- Cai, Q., Verma, S. C., Kumar, P., Ma, M., & Robertson, E. S. (2010). Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009720>
- Campbell, I. D., & Spitzfaden, C. (1994). Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure*, 2(5), 333–337. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00034-4)
- Campbell, S., Khosravi-Far, R., Rossman, K., CJ, & Der, C. G. (1998). No. *Oncogene*, 17, 1395–1413.
- Cassis, P., Gallon, L., Benigni, A., Mister, M., Pezzotta, A., Solini, S., ... Remuzzi, G. (2012). Erythropoietin, but not the correction of anemia alone, protects from chronic kidney allograft injury. *Kidney International*, 81(9), 903–918. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.473>
- Castillo, C., Zaror, S., Gonzalez, M., Hidalgo, A., Burgos, C. F., Cabezas, O. I., ... Toledo, J. R. (2018). Neuroprotective effect of a new variant of Epo nonhematopoietic against oxidative stress. *Redox Biology*, 14(July 2017), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.010>
- Cheung Tung Shing, K. S., Broughton, S. E., Nero, T. L., Gillinder, K., Ilsley, M. D., Ramshaw, H., ... Dhagat, U. (2018). EPO does not promote interaction between the erythropoietin and beta-common receptors. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29865-x>
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, 37(3), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.025>
- Chou, Y. H., Liao, F. L., Chen, Y. T., Yeh, P. Y., Liu, C. H., Shih, H. M., ... Lin, S. L. (2019). Erythropoietin modulates macrophages but not post-ischemic acute kidney injury in mice. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118(1P3), 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.10.015>
- Coldewey, S. M., Khan, A. I., Kapoor, A., Collino, M., Rogazzo, M., Brines, M., ... Thiemermann, C. (2013). Erythropoietin attenuates acute kidney dysfunction in murine experimental sepsis by activation of the β -common receptor. *Kidney International*, 84(3), 482–490. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.118>
- Cooper, J. K., Schilling, G., Peters, M. F., Herring, W. J., Sharp, A. H., Kaminsky, Z., ... Ross, C. A. (1998). Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 783–790.
- Culbert, A. A., Brown, M. J., Frame, S., Hagen, T., Cross, D. A. E., Bax, B., & Reith, A. D. (2001). GSK-3 inhibition by adenoviral FRAT1 overexpression is neuroprotective and induces Tau dephosphorylation and β -catenin stabilisation without elevation of glycogen synthase activity. *FEBS Letters*, 507(3), 288–294. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02990-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02990-8)
- De Beuf, A., Hou, X. H., D'Haese, P. C., & Verhulst, A. (2010). Epoetin delta reduces oxidative stress in primary human renal tubular cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010(iii). <https://doi.org/10.1155/2010/395785>
- De Beuf, A., Verhulst, A., Helbert, M., Spaepen, G., De Broe, M. E., Ysebaert, D., & D'Haese, P. C. (2009). Tubular erythropoietin receptor expression mediates erythropoietin-induced renoprotection. *Open Hematology Journal*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.2174/1874276900903010001>
- Dengler, V. L., Galbraith, M. D., & Espinosa, J. M. (2014). Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1), 1–15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>
- Diaz-Gonzalez, J. A., Russell, J., Rouzaut, A., Gil-Bazo, I., & Montuenga, L. (2005). Targeting hypoxia

BIBLIOGRAFIA

- and angiogenesis through HIF-1 α inhibition. *Cancer Biology and Therapy*, 4(10), 1055–1062. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.10.2195>
- Ding, J., Wang, J., Li, Q. Y., Yu, J. Z., Ma, C. G., Wang, X., ... Xiao, B. G. (2017). Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT Pathway of Carbamylated Erythropoietin in Hypoxic Neurons. *Molecular Neurobiology*, 54(7), 5051–5060. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0022-0>
- Diwan, A., Koesters, A. G., Capella, D., Geiger, H., Kalfa, T. A., & Dorn, G. W. (2008). Targeting erythroblast-specific apoptosis in experimental anemia. *Apoptosis*, 13(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0236-3>
- Elliott, S., Busse, L., Swift, S., McCaffery, I., Rossi, J., Kassner, P., & Begley, C. G. (2012). Lack of expression and function of erythropoietin receptors in the kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(7), 2733–2745. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr698>
- Espinosa-Cuevas, M. de los Á. (2016). Enfermedad renal. *Gaceta Médica de México*, 152(1), 90–96. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872005000300011>
- Fakuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., & Nishida, E. (1997). No Title. *Biol Chem*, 272, 32642–32648.
- Fernandez-Canton, S. (2004). El IMSS en cifras: la mortalidad en la población derechohabiente. *Rev Med IMSS*, 42, 353–364.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., & Philipsen, S. (2005). Downloaded from <http://mcb.asm.org/> on October 4, 2016 by NATIONAL CENTRE FOR BIOLOGICAL SCIENCES GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(4), 1215–1227. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1215>
- Fine, L. G., Bandyopadhyay, D., & Norman, J. T. (2000). Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney International, Supplement*, 57(75), 22–26. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.57.s75.12.x>
- Fisi, V., Miseta, A., & Nagy, T. (2017). The Role of Stress-Induced O-GlcNAc Protein Modification in the Regulation of Membrane Transport. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1308692>
- Fu, B., Xue, J., Li, Z., Shi, X., Jiang, B. H., & Fang, J. (2007). Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor 1- α through reducing hypoxia-inducible factor-1 α stability and inhibiting its protein synthesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(1), 220–226. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0526>
- Fu, Q., Colgan, S. P., & Shelley, C. S. (2016). Hypoxia: The force that drives chronic Kidney disease. *Clinical Medicine and Research*, 14(1), 15–39. <https://doi.org/10.3121/cmr.2015.1282>
- Gharbi, S. I., Zvelebil, M. J., Shuhleworth, S. J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J. F., & Waterfield, M. D. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochemical Journal*, 404(1), 15–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20061489>
- Godínez, L. Z. (2017). Cálculos del volumen sanguíneo. *Rev Mex Med Tran*, 10, 14–17. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/medicinatransfusional/%0A14>
- Grasso, G., Sfacteria, A., Cerami, A., & Brines, M. (2004). Erythropoietin as a Tissue-Protective Cytokine in Brain Injury: What Do We Know and Where Do We Go? *Neuroscientist*, 10(2), 93–98. <https://doi.org/10.1177/1073858403259187>
- Greif, F., Ben-Ari, Z., Taya, R., Pappo, O., Kurtzward, E., Cheporko, Y., ... Hochhauser, E. (2010). Dual Effect of Erythropoietin on Liver Protection and Regeneration after Subtotal Hepatectomy in Rats. *Liver Transplantation*, 16, 631–638. <https://doi.org/10.1002/lt>
- Greijer, A. E., & Wall, E. Van Der. (2004). *The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. 1*, 1009–1014. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015032>
- Guo, J., Yang, L., Qiao, Y., & Liu, Z. (2016). Glycogen synthase kinase3 is required for epithelialmesenchymal transition and barrier dysfunction in mouse podocytes under high glucose conditions. *Molecular Medicine Reports*, 14(5), 4091–4098. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5786>
- Guo, X., Gerl, R., & Scrader, J. (2003). Defining the involvement of p38 α MAPK in the production of anti- and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form of the kinase. *J. Biol. Chem*, 278, 22237–22242.

BIBLIOGRAFIA

- Guyton, A., & Hall, J. (2011). *Tratado de Fisiología Médica* (12th ed.; Elsevier, ed.).
- Hamdan, F., & Malek, A. (2014). Gene expresión alterations in chronic hypoxic MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, *104*(6).
- Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2005). The BCL-2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics. *Cancer Discovery*, *5*(5), 475–487.
- Heir, P., Srikumar, T., Bikopoulos, G., Bunda, S., Poon, B. P., Lee, J. E., ... Ohh, M. (2016). Oxygen-dependent regulation of erythropoietin receptor turnover and signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(14), 7357–7372. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694562>
- Henke, M., Laszig, R., Rube, C., & Al., E. (2003). Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, *362*(9392), 1255–1260.
- Hirsch, J. R., & Schlatter, E. (2003). Genistein potentiates the ANP effect on a K⁺-conductance in HEK-293 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *13*(4), 223–228. <https://doi.org/10.1159/000072425>
- Honda, T., Kataoka, T., Ueshima, C., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2016). A Case of Noonan Syndrome with Multiple Subcutaneous Tumours with MAPK-ERK/p38 Activation. *Acta Derm. Venereol.*, *96*, 130–131.
- Hotokezaka, Y., van Leyen, K., Lo, E. H., Beatrix, B., Katayama, I., Jin, G., & Nakamura, T. (2009). α NAC depletion as an initiator of ER stress-induced apoptosis in hypoxia. *Cell Death and Differentiation*, *16*(11), 1505–1514. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.90>
- Howard, C., Tao, S., Yang, H., Fogo, A. B., Woodgett, J. R., Harris, R. C., & Rao, R. (2013). *mice*. *82*(9), 1000–1009. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.239>. Specific
- Hu, M. C., Shi, M., Cho, H. J., Zhang, J., Pavlenco, A., Liu, S., ... Moe, O. W. (2013). The erythropoietin receptor is a downstream effector of Klotho-induced cytoprotection. *Kidney International*, *84*(3), 468–481. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.149>
- Imamura, R., Isaka, Y., Sandoval, R. M., Ichimaru, N., Abe, T., Okumi, M., ... Nonomura, N. (2012). A nonerythropoietic derivate of erythropoietin inhibits tubulointerstitial fibrosis in remnant kidney. *Clin Exp Nephrol*, *16*(6), 852–862. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Joshi, D., Abraham, D., Shiwen, X., Baker, D., & Tsui, J. (2014). Potential role of erythropoietin receptors and ligands in attenuating apoptosis and inflammation in critical limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery*, *60*(1), 191–201.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.06.054>
- Jurkovicova, D., Sedlakova, B., Lacinova, L., Kopacek, J., Sulova, Z., Sedlak, J., & Krizanova, O. (2008). Hypoxia Differently Modulates Gene Expression of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Mouse Kidney and HEK 293 Cell Line. *Stress, Neurotransmitters, and Hormones Neuroendocrine and Genetic Mechanisms*, *1148*(1), 421–427.
- Kaga, S., Zhan, L., Altaf, E., & Maulik, N. (2006). Glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *40*(1), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.09.009>
- Kaneko, H., Katoh, T., Hirano, I., Hasegawa, A., Tsujita, T., Yamamoto, M., & Shimizu, R. (2017). Induction of erythropoietin gene expression in epithelial cells by chemicals identified in GATA inhibitor screenings. *Genes to Cells*, *22*(11), 939–952. <https://doi.org/10.1111/gtc.12537>
- Khoo, B. Y., Chua, S. L., & Balaram, P. (2010). Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(5), 2188–2199. <https://doi.org/10.3390/ijms11052188>
- Kitamura, H., Isaka, Y., Takabatake, Y., Imamura, R., Suzuki, C., Takahara, S., & Imai, E. (2008). Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in a unilateral ureteral obstruction model. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *23*(5), 1521–1528. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm842>
- Larsen, B. D., & Sørensen, C. S. (2017). The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS Journal*, *284*(8), 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/febs.13970>
- Lee, Y. M., Lee, S. H., Lee, K. B., Nguyen, M. P., Lee, M. Y., Park, G. H., & Kwon, M. J. (2013). Silencing of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs stimulates hyperplastic phenotypes through activation of epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-2 α .

BIBLIOGRAFIA

- PLoS ONE*, 8(12), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084520>
- Lemus-Varela, M. L., Flores-Soto, M. E., Cervantes-Munguía, R., Torres-Mendoza, B. M. G., Gudiño-Cabrera, G., Chaparro-Huerta, V., ... Beas-Zárate, C. (2010). Expression of HIF-1 α , VEGF and EPO in peripheral blood from patients with two cardiac abnormalities associated with hypoxia. *Clinical Biochemistry*, 43(3), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.09.022>
- Leney, A. C., El Atmioui, D., Wu, W., Ovaa, H., & Heck, A. J. R. (2017). Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), E7255–E7261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620529114>
- Lidid, L. A., Mora, M. V., & Ramírez, T. P. (2010). Necrosis papilar renal: El diagnóstico de un clásico en la era de la tomografía multidetector. *Revista Chilena de Radiología*, 16(3), 128–133. <https://doi.org/10.4067/s0717-93082010000300006>
- Liu, J., Wei, Q., Guo, C., Dong, G., Liu, Y., Tang, C., & Dong, Z. (2017). Hypoxia, HIF, and associated signaling networks in chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050950>
- Liu, W., Shen, S. M., Zhao, X. Y., & Chen Dr., G. Q. (2012). Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2), 165–178.
- Loberg, R. D., Vesely, E., & Brosius, F. C. (2002). Enhanced glycogen synthase kinase-3 β activity mediates hypoxia-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41667–41673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206405200>
- López, J., Gaafar, A., & Andrés, L. (2009). La médula renal normal y patológica The normal and abnormal renal medulla. *REV ESP PATOL*, 42, 263–275.
- Louis, K., & Hertig, A. (2015). How tubular epithelial cells dictate the rate of renal fibrogenesis? *World Journal of Nephrology*, 4(3), 367. <https://doi.org/10.5527/wjn.v4.i3.367>
- Lu, M., Wang, P., Qiao, Y., Jiang, C., Ge, Y., Flickinger, B., ... Gong, R. (2019). GSK3 β -mediated Keap1-independent regulation of Nrf2 antioxidant response: A molecular rheostat of acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Redox Biology*, 26(January), 101275. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101275>
- Luque Contreras, D., Vargas Robles, H., Romo, E., A, R., & Escalante, B. (2006). The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process. *Pharmacol. Ther.*, 112, 553–563.
- Maruhashi, R., Eguchi, H., Akizuki, R., Hamada, S., Furuta, T., Matsunaga, T., ... Ikari, A. (2019). Chrysin enhances anticancer drug-induced toxicity mediated by the reduction of claudin-1 and 11 expression in a spheroid culture model of lung squamous cell carcinoma cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50276-z>
- Mata-Greenwood, E., Goyal, D., & Goyal, R. (2017). Comparative and Experimental Studies on the Genes Altered by Chronic Hypoxia in Human Brain Microendothelial Cells. *Frontiers in Physiology*, 8, 365. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00365>
- Matassov, D., Kagan, T., Leblanc, J., & Sikorska, M. (2004). Measurement of Apoptosis by DNA Fragmentation. In Brady H.J.M (Ed.), *Apoptosis Methods and Protocols*.
- Maurer, U., Preiss, F., Brauns-Schubert, P., Schlicher, L., & Charvet, C. (2014). GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. *Journal of Cell Science*, 127(7), 1369–1378. <https://doi.org/10.1242/jcs.138057>
- Maxwell, P. H., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Nicholls, L. G., Tan, C. C., ... Ratcliffe, P. J. (1993). Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney International*, 44(5), 1149–1162. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.362>
- Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J. F., Tapia-Yáñez, T., Muñoz Montes, A., & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Diálisis y Trasplante. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.dialis.2011.06.004>
- Min Lee, S., Nga, N. T. H., Mi, H. P., Kyung, S. K., Kyoung, J. C., Dong, C. M., ... Jin, T. H. (2004). EPO receptor-mediated ERK kinase and NF- κ B activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(4), 1087–1095. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.060>

BIBLIOGRAFIA

- Montero, M., Poulsen, F. R., Noraberg, J., Kirkeby, A., van Beek, J., Leist, M., & Zimmer, J. (2007). Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures. *Experimental Neurology*, *204*(1), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.09.026>
- Moore, E., & Bellomo, R. (2011). *Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury*. 1–10.
- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H. T., Blasberg, R., & Serganova, I. (2009). Real-time imaging of HIF-1 α stabilization and degradation. *PLoS ONE*, *4*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005077>
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(11), 1–5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Murphy, J. M., & Young, I. G. (2006). IL-3, IL-5, and GM-CSF Signaling: Crystal Structure of the Human Beta-Common Receptor. *Vitamins and Hormones*, *74*(06), 1–30. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74001-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74001-8)
- Nayak, G., & Cooper, G. M. (2012). P53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program regulated by PI 3-kinase/Akt/GSK3 signaling. *Cell Death and Disease*, *3*(10), e400-11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.138>
- Nolin, A. C., Mulhern, R. M., Panchenko, M. V, Pisarek-horowitz, A., Wang, Z., Shirihai, O., ... Havasi, X. A. (2016). Proteinuria causes dysfunctional autophagy in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, *311*(47), 1271–1279. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00125.2016>
- Ortiz-Prado, E., Dunn, J. F., Vasconez, J., Castillo, D., & Viscor, G. (2019). Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *American Journal of Blood Research*, *9*(1), 1–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30899601> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6420699>
- Palani, S., & Sarkar, C. A. (2008). Positive receptor feedback during lineage commitment can generate ultrasensitivity to ligand and confer robustness to a bistable switch. *Biophysical Journal*, *95*(4), 1575–1589. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120600>
- Patel, N. S. A., Kerr-Peterson, H. L., Brines, M., Collino, M., Rogazzo, M., Fantozzi, R., ... Thiernemann, C. (2012). Delayed administration of pyroglutamate helix B surface peptide (pHBSP), a novel nonerythropoietic analog of erythropoietin, attenuates acute kidney injury. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *18*(4), 719–727. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00093>
- Riss, T., R., M., & Niles A. (2013). *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*.
- Samanta, A., Patra, A., Mandal, S., Roy, S., Das, K., Kar, S., & Nandi, D. K. (2018). Hypoxia: A cause of acute renal failure and alteration of gastrointestinal microbial ecology. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation : An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, *29*(4), 879–888. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.239653>
- Sato, Y., & Yanagita, M. (2017). Resident fibroblasts in the kidney: a major driver of fibrosis and inflammation. *Inflammation and Regeneration*, *37*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0048-3>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sessa, W. (2004). NOS at a glance. *J Cell Sci*, *117*, 2427–2429.
- Shi, J., Wu, S., Dai, C., Yi Li, I., Nge-Grundke-Iqbal, Iqbal, K., ... Gong, C.-X. (2012). Diverse Regulation of AKT and GSK-3 β by O-GlcNAcylation in Various Types of Cells. *FEBS Letters*, *586*(16), 2443–2450. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4002.BONE>
- Shi, M., Flores, B., Li, P., Gillings, N., McMillan, K. L., Ye, J., ... Hu, M. C. (2018). Effects of erythropoietin receptor activity on angiogenesis, tubular injury, and fibrosis in acute kidney injury: A “U-shaped” relationship. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *314*(4), F501–F516. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00306.2017>
- Shih, H. M., Wu, C. J., & Lin, S. L. (2018). Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *Journal of the Formosan Medical Association*, *117*(11), 955–963. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.03.017>

BIBLIOGRAFIA

- Shirato, K., Nakajima, K., Korekane, H., Takamatsu, S., Gao, C., Angata, T., ... Taniguchi, N. (2011). Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48(1), 20–25.
- Singh, M., Sharma, H., & Singh, N. (2007). Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, 7(6), 367–373.
- Socolovsky, M., Fallon, A. E. J., Wang, S., Brugnara, C., & Lodish, H. F. (1999). Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: A direct role for Stat5 in Bcl-XL induction. *Cell*, 98(2), 181–191. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81013-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81013-2)
- Strunk, T., Härtel, C., Temming, P., Matzke, N., Zimmer, J., & Schultz, C. (2008). Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 97(1), 16–20. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00560.x>
- Sturiale, A., Campo, S., Crascì, E., Aloisi, C., Sturiale, A., Campo, S., ... Buemi, M. (2007). *Experimental Models of Acute Renal Failure and Erythropoietin : What Evidence of a Direct Effect ? Experimental Models of Acute Renal Failure and Erythropoietin : What Evidence of a Direct Effect ?* 6049(October). <https://doi.org/10.1080/08860220701193290>
- Su, K. H., Yu, Y. Bin, Hou, H. H., Zhao, J. F., Kou, Y. R., Cheng, L. C., ... Lee, T. S. (2012). AMP-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced activation of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Cellular Physiology*, 227(8), 3053–3062. <https://doi.org/10.1002/jcp.23052>
- Suárez, V. M., Delvallepérez, L. O., Domínguez, G. D., & Abraham, C. M. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(3), 242–253.
- Tamayo y Orozco Juan, L. Q. S. (2016). *La enfermedad renal crónica en México HACIA UNA POLÍTICA NACIONAL PARA ENFRENTARLA*. Academia Nacional de Medicina de México (ANMM) Editado,.
- Tiwari, N. K., Sathyanesan, M., Schweinle, W., & Newton, S. S. (2019). Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry Carbamoylated erythropoietin induces a neurotrophic gene profile in neuronal cells. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 88(June 2018), 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.07.011>
- Tögel, F. E., Ahlstrom, J. D., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P., & Westenfelder, C. (2016). Carbamylated erythropoietin outperforms erythropoietin in the treatment of AKI-on-CKD and Other AKI models. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(11), 3394–3404. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015091059>
- Torban, E., Goodyer, P. R. (1998). Effects of PAX2 expression in a human fetal kidney (HEK293) cell line. *Biochim. Biophys.*, 1401, 53–62.
- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T., & Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1297–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.017>
- Vázquez-Méndez, E., Gutiérrez-Mercado, Y., Mendieta-Condado, E., Gálvez-Gastélum, F. J., Esquivel-Solís, H., Sánchez-Toscano, Y., ... Márquez-Aguirre, A. L. (2020). Recombinant Erythropoietin Provides Protection against Renal Fibrosis in Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8937657>
- Very, N., Steenackers, A., Dubuquoy, C., Vermuse, J., Dubuquoy, L., Lefebvre, T., & El Yazidi-Belkoura, I. (2018). Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(3), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9747-y>
- Wang, Z., Havasi, A., Gall, J., Bonegio, R., Li, Z., Mao, H., ... Borkan, S. C. (2010). GSK3 β promotes apoptosis after renal ischemic injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(2), 284–294. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009080828>
- Watowich, S. S. (2011). The erythropoietin receptor: Molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *Journal of Investigative Medicine*, 59(7), 1067–1072. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31820fb28c>
- Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, 389(10075), 1238–1252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
- Welch, J. J., Watts, J. A., Vakoc, C. R., Yao, H., Wang, R. C., Hardison, G. A., ... Weiss, M. J. (2004).

BIBLIOGRAFIA

- Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*, 104, 3136–3147.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., & Kluck, R. M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(4), 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>
- Wojchowski, D. M., Sathyanarayana, P., & Dev, A. (2010). Erythropoietin receptor response circuits. *Current Opinion in Hematology*, 17(3), 169–176. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328338008b>
- Wylie, B. J., Singh, M. P., Coull, B. A., Quinn, A., Yeboah-, K., Sabin, L., ... Pradesh, M. (2015). Epithelial to Mesenchymal Transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nature Medicine*, 34(3), 355–368. <https://doi.org/10.3109/10641955.2015.1046604>.Association
- Xiang, J., Wan, C., Guo, R., & Guo, D. (2016). Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *BioMed Research International*, 2016.
- Xie, Y., Li, W., Feng, J., Wu, T., & Li, J. (2016). MicroRNA-363 and GATA-1 are regulated by HIF-1 α in K562 cells under hypoxia. *Molecular Medicine Reports*, 14(3), 2503–2510. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5578>
- Xu, X., Cao, Z., Bin, L., Jing, G., Lin, Q., & Linli, H. (2009). Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Surgery*, 146(3), 506–514.
- Yang, W.-W., Shu, B., Zhu, Y., & Yang, H.-T. (2008). E2F6 Inhibits Cobalt Chloride-Mimetic Hypoxia-induced Apoptosis through E2F1. *Molecular Biology of the Cell*, 19(September), 3691–3700. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Yazihan, N., Karakurt, O., & Ataoglu, H. (2008). Erythropoietin reduces lipopolysaccharide-induced cell Damage and midkine secretion in U937 human histiocytic lymphoma cells. *Advances in Therapy*, 25(5), 502–514. <https://doi.org/10.1007/s12325-008-0055-5>
- Young, O. K., Li, C., Bo, K. S., Jung, S. K., Sun, W. L., Bun, S. C., ... Chul, W. Y. (2005). Preconditioning with 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Nephron - Experimental Nephrology*, 100(2). <https://doi.org/10.1159/000084574>
- Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A., & Lodish, H. F. (1993). Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*, 81(9), 2223–2236. <https://doi.org/10.1182/blood.v81.9.2223.bloodjournal8192223>
- Yung, L. Y., Lam, W. S., Ho, M. K. C., Hu, Y., Ip, F. C. F., Pang, H., ... Wong, Y. H. (2012). Astragaloside IV and cycloastragenol stimulate the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in multiple cell types. *Planta Med*, 78, 115–121.
- Zhang, F., Wang, S., Cao, G., Gao, Y., & Chen, J. (2007). Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease*, 25(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.007>
- Zhang, J., Zhao, D., Na, N., Li, H., Miao, B., Hong, L., & Huang, Z. (2018). Renoprotective effect of erythropoietin via modulation of the STAT6/MAPK/NF- κ B pathway in ischemia/reperfusion injury after renal transplantation. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(1), 25–32. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3204>
- Zhang, L., Liu, H., Xu, K., Ling, Z., Huang, Y., Hu, Q., ... Chen, M. (2019). Hypoxia preconditioned renal tubular epithelial cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischaemia-reperfusion injury mediated by the HIF-1 α /rab22 pathway and potentially affected by micrnas. *International Journal of Biological Sciences*, 15(6), 1161–1176. <https://doi.org/10.7150/ijbs.32004>
- Zhang, X. L., Yan, Z. W., Sheng, W. W., Xiao, J., Zhang, Z. X., & Ye, Z. Bin. (2011). Activation of hypoxia-inducible factor-1 ameliorates posts ischemic renal injury via inducible nitric oxide synthase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 358(1–2), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0979-y>
- Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M. D., Lodish, H. F., & Ghaffari, S. (2006). Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*,

BIBLIOGRAFIA

- 107(3), 907–915. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2516>
- Zhuang, S., Yan, Y., Daubert, R. A., Han, J., & Schnellmann, R. G. (2007). ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells Shougang. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F440–F447.

ANEXOS

Anexos

Especificación de reactivos utilizados

Reactivo	Catálogo	Marca
Acrilamida	1610101	Bio-Rad
A/G-agarosa	2003	Santa Cruz
Agarosa	1613102	Bio-Rad
APO BrdU ALX-850-0	ALX-850-042-KI01	Enzo
BCA Protein Assay	23225	Thermo Scientific
Bisacrilamida	1610200	Bio-Rad
Chrysin	C80105	Sigma-Aldrich
Cisplatino (1 mg/mL)	N/A	PISA
CoCl ₂	102539	Merck
DMEM	12100046	Thermo Scientific
Fast SYBR® Green Master Mix	4385612	Thermo Scientific
Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico	77617	Thermo Scientific
Glicina	1610718	Bio-Rad
H ₂ O ₂	1009	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	14533	Sigma-Aldrich
Isopropanol	I9516	Sigma-Aldrich
Leche grado proteómico	1706404	Bio-Rad
L-glutamina	25030081	Gibco
Luminol	WBLUF0100	Merck-Millipore
LY294002	201426	Santa Cruz
Metanol	332415	Sigma-Aldrich
MTT	M5655	Sigma-Aldrich
NaCl	106404	Merck
Proteinasa K	70663	Merck-Millipore
rhEPO (Exetin)	N/A	PISA
RIPA	R0278	Sigma-Aldrich
RNasa OUT (Invitrogen)	10777019	Sigma-Aldrich
SDS	1610302	Bio-Rad
SuperScript® III Reverse Transcriptase	18080093	Sigma-Aldrich
SFB	S1720	Biowest
SYBR-Safe	S33102	Thermo Scientific
Tris	1610719	Bio-Rad
TRIzol	15596018	Invitrogen
Tween 20	1706531	Bio-Rad
β-Mercaptoetanol	M6250	Simga-Aldrich

Entregables

Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato
23 al 28 de junio
2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Daniela Elizabeth Gómez Ramírez, Benjamín León Mancilla, Ana Laura Márquez Aguirre, Hugo Esquivel Solís

Por su participación con la contribución oral:

ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ANTIAPOPTOSIS EPOR/CD131 EN CÉLULAS DE RIÑÓN DE HUMANO EN HIPOXIA.

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMBB

Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador

Dra. Sylvie LeBorgne
Presidenta del Comité Científico

Congreso Internacional de Investigación Academia Journals
Hidalgo 2019

CERTIFICADO

otorgado a

Daniela Gómez-Ramírez
Benjamín León-Mancilla
Ana L. Márquez-Aguirre
Hugo Esquivel-Solís

por su artículo intitulado

*Activación del receptor antiapoptosis
epor/cd131 en células de riñón humano en
hipoxia*

Artículo No. HH688

La ponencia de este artículo fue presentada en el congreso llevado a cabo los días 2 al 4 de octubre del año 2019 en Hidalgo, México. El artículo se incluyó en las siguientes publicaciones: (1) los volúmenes de internet publicados por AcademiaJournals.com con ISSN 1946-5351, Vol. 11, No. 8, 2019 online e indexación en la base de datos Fuente Académica Plus de EBSCOHOST y (2) en el e-libro intitulado *Educación en la Educación Superior – Hidalgo 2019*, mismo que cuenta con ISBN 978-1-939982-52-0 online. Ambas publicaciones tienen enlaces para su libre acceso en el portal AcademiaJournals.com.



Dr. Rafael Moras
Editor, Academia Journals